UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONÓMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"EFECTOS PATOLÓGICOS CAUSADOS POR LA INOCULACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICAS AISLADAS DE ENFERMEDAD EN CERDOS, EN EL APÉNDICE CECAL DE CONEJOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N:

LAURA CARRANZA ROBLES

LISZET ANAID ESQUIVEL VARGAS

ASESOR DE TESIS: DR en C. Guillermo Valdivia Anda

Cuautitlán Izcalli, Estado de México **2012**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN ……..……..... 1

II. ANTECEDENTES ……..…….. 7

III. JUSTIFICACIÓN ……..…….. 8

IV. HIPÓTESIS ……..……. 8

V. OBJETIVOS ……..……..……. 9

Objetivo General …..……..…… 9

Objetivos Particulares ……. 9

VI. MATERIAL Y MÉTODOS ……... 10

VII. RESULTADOS …… 18

PCR …….. 18

Signos Clínicos ……... 19

Laboratorio …… 19

Necropsia …… 25

Histopatología ……. 28

VIII. DISCUSIÓN …… 32

IX. CONCLUSIONES …… 37

X. BIBLIOGRAFÍA ……. 38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de las cepas de *Escherichia coli* empleadas en el presente trabajo. 10

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores de los genes stx1, stx2 y *eae*A utilizados para la Técnica de PCR 11

Cuadro 3. Reactivos empleados en la reacción de PCR múltiplex para *Escherichia coli* EHEC. 12

Cuadro 4. Parámetros del termociclador para PCR múltiplex 12

Cuadro 5. Anestésicos utilizados en la cirugía. 14

Cuadro 6. Evaluación del grado de lesión en el estudio histopatológico de acuerdo a Hernández y col. 17

Cuadro 7. Genes encontrados en las cepas empleadas mediante la técnica de PCR 18

Cuadro 8. Signos clínicos observados en los conejos inoculados en Apéndice cecal en *E. coli* enterohemorrágica 0157-H7 19

Cuadro 9. Lesiones a la Necropsia de los grupos inoculados con diferentes cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157-H7. 25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la inclusión en parafina 16
Figura 2 Comportamiento de las medias de glóbulos rojos por cepa y su línea de tendencia central 20
Figura 3 Comportamiento de las medias de hemoglobina por cepa y su línea de tendencia central 21
Figura 4 Comportamiento de las medias de hematocrito por cepa y su línea de tendencia central 21
Figura 5 Comportamiento de las medias de plaquetas por cepa y su línea de tendencia central 22
Figura 6 Comportamiento de las medias de leucocitos por cepa y su línea de tendencia central 22
Figura 7 Comportamiento de las medias de linfocitos por cepa y su línea de tendencia central 23
Figura 8 Comportamiento de las medias de neutrófilos por cepa y su línea de tendencia centra 23
Figura 9 Comportamiento de las medias de urea por cepa y su línea de tendencia central 24
Figura 10 Comportamiento de las medias de creatinina por cepa y su línea de tendencia centra 24
Figura 11 Perforación Gástrica presentada en el conejo inoculado con la cepa EDI-222 observada a la necropsia 26
Figura 12 Ulcera Gástrica presentada en el conejo inoculado con las cepas EDL-933, EDI- 200, 221 y 228 observadas a la necropsia 26
Figura 13 Encéfalo sin cambios patológicos aparentes, congestión en el encéfalo del conejo inoculado con la cepa EDI-222 27
Figura 14 Riñón sin cambios patológicos aparentes, Riñón congestionado en los conejos inoculados con la cepa EDI-228 y EDI- 221 a la necropsia 27
Figura 15 Bazo sin cambios patológicos aparentes del conejo Inoculado con la cepa Mc4100wt, y Atrofia en el Bazo en los conejos inoculados con las cepas EDI-228, EDI- 200 y EDI-22 27
Figura 16 Lesiones histopatológicas de bazo 28
Figura 17 Lesiones histopatológicas de riñón 28
Figura 18 Lesiones histopatológicas de apéndice cecal 29
Figura 19 Microfotografía de apéndice cecal de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* Mc4100wt 29
Figura 20 Microfotografía de apéndice cecal de conejo inculado con la cepa de *Escherichia coli* EDL-933 30
Figura 21 Microfotografía de bazo de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* Mc4100wt 30
Figura 22 Micrografía de bazo (pulpa blanca) de conejo inoculado con la cepa Escherichia coli Mc4100wt comparativo con bazo de conejo inoculado con *Escherichia coli* EDL-933 31
Figura 23 Microfotografía de riñón de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* Mc4100wt 31
Figura 24 Microfotografía de riñón de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* EDL-933 31

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el equipo e instalaciones Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, Campo 4.

Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS:

Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

IT224311-3

Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN216005.

Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE 200707

AGRADECIMIENTOS

Dr. Guillermo Valdivia Anda por darnos la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y tiempo dedicado. Gracias por todos sus consejos y aportaciones que nos ayudaron a mejorar nuestro proyecto.

MVZ Susana Elvira García Vázquez por su asesoría, consejos y siempre buena disposición.

Dra. Lucia Angélica García Camacho por aprobar nuestro trabajo.

Dr. José Francisco Morales Álvarez por todas sus enseñanzas como sinodal, profesor y persona.

MVZ Jesús Arturo Sandoval Romero por su gentileza y su amable colaboración para mejorar este proyecto

Dr. Juan Carlos del Río García por su colaboración, su ayuda y tiempo desinteresado que nos brindo a lo largo de este trabajo. Lo estimamos.

M. en C. Cesar Cuenca Verde por todo tú apoyo, paciencia, consejos y asesoría a lo largo de este proyecto que sin tu ayuda no habríamos logrado. Por la valiosa amistad que nos has brindado. Te vamos a extrañar.

A los amigos y compañeros de UIMSA:

Emmanuel, por la gran amistad que tenemos.

A Hadad y Tamara, por su colaboración en la realización de este trabajo, por su alegría y amistad.

Juan José, por contagiarnos de tu alegría y por esos momentos tan divertidos dentro y fuera del Lab 3. Eres un gran amigo.

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

“Por mi raza, hablará el espíritu”

DEDICATORIAS

- LISZET

A MI PADRES

Esto es para ustedes. Por cada uno de los esfuerzos que han hecho por mí, apoyándome siempre en todo lo que hago, por su amor incondicional. Porque soy la persona que soy, gracias a ustedes. A ti papá por dejarme hacer todo lo que he querido sin nunca decir, no. Te Quiero Mucho Papi y aunque no siempre te lo digo, siempre estás en mi corazón. A ti mami por ser siempre aquella persona que me escucha y estar siempre al pendiente de mí, por tener esa fortaleza para salir adelante a pesar de todo Te Amo Mami.

A MI HERMANITO MAY (+)

Mi angelito. Aún me duele tanto tu partida... Pero sé que estás conmigo en cada paso que doy, cuidándome y queriéndome. Tu y yo siempre estaremos juntos y veras que hare todo aquello que planeamos. Siempre estás en mi pensamiento y corazón. Te Quiero Tanto!!!

A MI HERMANO JUAN CARLOS

A ti hermanito, aquel cómplice de tantas locuras. Gracias por todo lo que me has enseñando, por siempre estar ahí apoyándome en todo momento. Te Quiero Mucho y Admiro. Gracias por esas dos lindas sobrinas que quiero mucho y son la luz de nuestra familia.

A MIS ABUELITOS

Aquellos dos personitas que son el pilar de esta gran familia. Gracias por su apoyo y cariño.

A MIS TIOS Y TIAS

Por estar con nosotros en las buenas y en las malas, por apoyarme y siempre preocuparse por mí.

A MI TIO JESUS (CHUY)

Por todo lo que me ha enseñado, por aquellas salidas y noches donde aprendimos tanto al hablar de música, anécdotas, libros... son momentos que nunca olvidare... Gracias por apoyarme siempre. Te Quiero. Tu lis...

A MIS PRIMOS

Sergio, Erick, Lalo, Karla, Connie, Cris, Esli, Nancy, Pablo, Misis y Miguel, Gemma por todo lo que me han dado cada uno y formar parte de mi vida, preocupándose siempre por mí, por todos los momentos que hemos vivido juntos, formando parte de mis locuras. Los kiero!! A Karla por todo lo que le diste a mi hermano, por querer tanto a mi mamá, y quedarte con nosotros haciendo que la pena fuera menor, porque en ti hay mucho de él. Te quiero cuñis y siempre serás parte de la familia.

A LAU

Por todos los momentos que vivimos en este largo camino, para poder llegar hasta aquí, por todos nuestros paseos y visitas aquellos lugares que nos gustan tanto... nuestras charlas por horas y horas, además de aquellas de interminables risas. Comenzamos con oposiciones pero con el paso del tiempo llegamos acoplarnos, dando como resultado una verdadera amistad. Sabes que cuantas conmigo para siempre en las buenas y en las malas. Y no, esta no es una despedida, es el inicio de otra etapa para cada una, pero siempre juntas. Te Kiero mucho!!

A MI JEFA Y AMIGA

Dra. Norma gracias por todas las enseñanzas que ha dejado en mí, por todas esas charlas en las que aprendimos tanto de la vida como de la profesión, en ese lugar que he de extrañar tanto el día que tenga que marcharme. Es una gran persona, a la cual admiro. La quiero mucho. Además a ese niño que he visto crecer y madurar Emi Te quiero.

A JUAN CARLOS

Aquella persona que conocí por casualidad y compartimos tantos momentos... Donde los dos aprendimos el uno del otro. Te Quiero Mucho!!

A MIS AMIGOS

Aquellos incondicionales en todo momento, estando conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por todos los momentos de risas y tristeza, por aguantar mi impuntualidad y quererme tanto, por todas aquellas anécdotas, de las cuales ahora nos reímos. A ti Rous por contestar mis llamadas no importando la hora, siempre escuchándome y dándome tus consejos. Oscarito mi mejor amigo siempre acompañándome y aguantando mis locuras durante los 4 años que pasamos juntos. A Mel la fuerte, aprendiendo a ser un poco como tú. Gabita y Lizy siempre haciéndome reír, con ese carisma que tienen. A Kike callado pero siempre con un buen consejo. A Isma por quererme como me quieres y estar conmigo en aquellos momentos que más lo necesite. A Martín por escucharme y convertirte en un gran amigo. A Diana por ser una buena amiga. Los Quiero!!

DEDICATORIAS

- LAURA

A MIS PADRES:

A mis padres: Por ustedes hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles y nunca perdieron la confianza en mí. A mi Papá del cual me siento muy orgullosa, eres la persona que más admiro y respeto en la vida, mi ejemplo a seguir. A mi Mami, tan luchadora y siempre al pendiente de la familia, por tu gran fortaleza para sacarnos siempre hacia adelante. Gracias por fomentar en mí el deseo de superación, por lo que han hecho de mi, esto va por ustedes, porque lo valen, porque son las personas más importantes en mi vida. Atribuyo todos mis éxitos a la enseñanza moral que me dieron. Los amo

A MIS HERMANOS

A Sergio, Mi hermanito mayor, gracias por estar siempre conmigo cuando más lo necesito, por cuidarme y por todo lo que hemos vivido, en las buenas y en las malas sé que puedo contar contigo. TQM

A Carlos, por ser mi compañero incondicional, mi confidente, sobre todo un gran amigo, porque sé que puedo confiar ciegamente en ti, gracias por tus consejos y por todo el apoyo que siempre estás dispuesto a dar, TQM Maní Manito!!!

A Karina Hernández: Gracias por tu apoyo, por que sé que puedo contar contigo en los momentos más difíciles!

A MIS HERMOSOS SOBRINOS

Ferni, Graciosa, lista y cariñosa, día a día le das tanta alegría a mi vida, te quiero mucho. Espero poder ser un buen ejemplo para tí.
Leo: Una personita que me da tantas satisfacciones. Te adoro!

A MI FAMILIA

Abuelita, tíos y primos que siempre están con nosotros y que constantemente me dan trabajo, confiando sinceramente en mi.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, comprensión y sus consejos en los momentos más difíciles.

A LIZ

Por ser la mejor amiga y persona, que nunca juzga y siempre comprende, que siempre estuvo conmigo incondicionalmente, a pesar de las peleas, por abrirme las puertas de su casa donde siempre me recibieron con gran amabilidad. Gracias por todo lo que hemos vivido, las tardes en los museos, en los helados, en el suburbano, en las plazas y por todos esos lugares que llenamos de nuestras risas indiscretas. Te agradezco infinitamente por todo lo que me has dado. Te quiero mucho amiga y espero que esto sea solo el inicio de nuevos proyectos.

A MVZ. NORMA FLORES

Por ser una excelente persona y profesional. Mi gran maestra, aprendí mucho contigo, personal y profesionalmente, gracias por brindarme siempre tu apoyo, tu optimismo y por compartir tu conocimiento, pero sobre todo por tu amistad.

A MIS AMIGOS

A todos los que han estado conmigo a lo largo de este recorrido. **Gabyta**, mi gran amiga y compañera desde que iniciamos la carrera, en nuestros conciertos y salidas, gracias por esos momentos, TQM. A **Kikito**, por ser un amigo que siempre me provoca una sonrisa, te voy a extrañar. A **Isma** que siempre me cuida y se preocupa por mí, y por su contagioso optimismo, te quiero. A **Sergio**, porque nunca me he sentido tan identificada con nadie como contigo, gracias Cotí por tus aportaciones y los momentos tan divertidos.

A todos espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo incondicional y sincero

¡¡Sigue adelante!! Haz tus sueños realidad. No te des por vencido en la pelea, estarás bien, porque no hay nadie como tú en el universo. No temas de lo que tu mente conciba, debes soportar y defender aquello en lo que crees... Y entonces podemos decir verdaderamente que juntos somos invencibles!!

RESUMEN

Escherichia coli enterohemorrágica está relacionada con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre , cuadro que se denominó como colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. También se asocio a casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre.

En este trabajo se determinaron los efectos patológicos por diferentes cepas que se aislaron de un brote diarreico en cerdos. Se utilizaron 4 cepas problema y un testigo positivo pertenecientes a serotipo O157-H7 y una cepa testigo negativo Mc4100wt. Se caracterizaron genotípicamente para los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A, y se evaluaron los signos clínicos, biometría hemática, química sanguínea e histopatología, donde se encontraron diferentes lesiones entre cepas.

Los resultados mostraron que las cepas aisladas de cerdo que presentan los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A, presentan las mismas lesiones que la cepa aislada de humano y que caracterizan al síndrome urémico hemolítico, además de ser más virulentas. Se encontraron lesiones severas a nivel gastrointestinal y úlceras que llegaron hasta la perforación del órgano. También se demostró que la sola presencia del gen *eae*A es suficiente para causar lesiones similares en el SUH.

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli Y SUS CARACTERÍSTICAS GENERALES

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia* que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre y animales, pocas horas después del nacimiento, sin embargo hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos la diarrea. Se excreta diariamente con las heces (entre 10^8-10^9 UFC/g de heces). (36)

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varia y actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo, la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. (21)

Las *E. coli* patógenas son caracterizadas por la expresión de factores de patogenicidad, como factores de adherencia, invasivas y cápsulas entre otras. En los últimos años se han identificado categorías de *E. coli* causantes de enfermedad diarreica aguda: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). (5, 21, 35)

Escherichia coli ENTEROTOXIGÉNICA

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias o pilis que tiene diversas formas denominadas factor de colonización antigénico (CFA), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de toxinas llamadas, termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). (7, 31)
Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua e iones. (42)

Escherichia coli ENTEROPATÓGENA

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. La adherencia esta mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF (EPEC factor de adherencia) y de algunos genes cromosomales. (14, 15). En la adherencia es necesaria la

síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gen cromosomal *eae*A y que sirve como señal en adherencia y esfacelación (A/E). (21, 35)
Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae*A para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para e Bfp; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae*A. (34, 39)

Escherichia coli ENTEROINVASIVA

Su mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon; el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo la mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posteriormente multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas subyacentes. (35) La información genética está en el loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado PIinv, que codifica para las proteínas.

Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA

En el mecanismo de patogenicidad de las EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce, también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se aglutinan en una fina película en el epitelio intestinal y puede estar relacionada con la capacidad de colonizar el intestino. Es caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre si y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2. (21, 35, 52)

La adherencia a células Hep-2 y a la hemaglutinación de eritrocitos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria 1 de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gen aggA que se encuentra en el plásmido de 60 MDa. (12, 34)

Escherichia coli DE ADHERENCIA DIFUSA

Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. (4) Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en un cromosoma o plásmido, también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo O126:H27. (3)

Escherichia coli ENTEROHEMORRÁGICA o *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA

La patogénesis involucra un proceso con múltiples pasos, con complejas interacciones entre la bacteria y el huésped. La etapa más temprana en el proceso de la enfermedad es la ingesta de alimento contaminado con EHEC, que es capaz de resistir la acidez gástrica. Este fenotipo es medido por *rpoS* que codifica un factor sigma de fase estacionaria que le permite sobrevivir largos periodos al pH por debajo de 2.5 y cuyas mutaciones originan variaciones en la resistencia a la acidez y diferencias en la infectividad de distintas cepas y es superior en cepas que han permanecido en condiciones ácidas previas y a bajas temperaturas, lo que permite que este tipo de células presente ventajas frente a las condiciones ácidas del estómago, pudiendo resistirla y producir la infección. (2)

Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro que se denominó como colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. (40) Karmali, en 1983, lo asoció a casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre. (27, 35, 37)
Se ha observado que la citotoxina se neutralizó con la antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que se le llamó “shiga-like-toxin” o toxina semejante a Shiga (SLT) o “Shiga toxin” (Stx), y a las *E. coli* capaces de producirla se les denomina STEC. (35, 37)

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es el patógeno emergente en alimentos de mayor impacto, siendo su principal reservorio el ganado bovino, altamente riesgoso en la población infantil, y se reconoce al serotipo O157:H7 como el más representativo. (10, 32, 38)

La citotoxina Stx es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago Stx, que esta insertado en el genoma. La Stx actúa a nivel de síntesis de proteínas, ya que se une a la unidad 60s ribosomal de las células intestinales o renales del hospedero. (37)

En las cepas EHEC se han encontrado aisladas las variantes de Stx1 y Stx2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sinteticen una o ambas toxinas. (35, 47, 53)

TOXINAS SHIGA

Stx1

Stx1 es esencialmente idéntica a la toxina de Shiga, (difieren solo en un aminoácido) producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, en cuanto a sus propiedades biológicas, características físicas y antigénicas. Ha sido aislada de cepas de EPEC y EHEC. (43)

Stx está constituida, en sus diferentes isoformas, por una subunidad A y 5 subunidades B que forman una estructura pentamérica. Esta última se une a receptores (Gb3), presentes en algunas células eucariotas, para luego ser endocitada siguiendo un camino de transporte retrógrado a la secreción de proteínas. En el interior de la célula, la subunidad A inhibe la síntesis de proteínas por inactivación de la unidad 60s ribosomal y la subunidad B puede desencadenar procesos apoptóticos. (8, 45, 47)

Stx1 parece actuar directamente sobre la absorción de las células epiteliales de las vellosidades y de las criptas, debido a su gran contenido de Gb3 que las convierte en células más susceptibles a ser atacadas por la toxina. Este receptor de membrana (Gb3) también está altamente expresado en la corteza de riñón humano. (43)

Stx2

Las subunidades A y B de Stx2 exhiben 58% de homología en nucleótidos y 56% de homología en aminoácidos con respecto a Stx1, tienen el mismo receptor el mismo mecanismo de acción intracelular que le confiere la misma actividad biológica, sin embargo por unidad de proteínas en células lisadas es menos citotóxica que stx1 y más letal en ratones. Difiere significativamente en cuanto al receptor que es Gb4, el cual da un rango de células blanco diferente, los genes que codifica son cromosomales y no asociados a fagos. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad, como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presenta el gen cromosomal *eae*A que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos; el gen *eae*A también se encuentra en las cepas EPEC. Otro factor de patógenicidad es el plásmido p0157 de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina. (32, 34)

SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO Y SU DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El síndrome urémico-hemolítico (SUH) es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la infancia a nivel mundial, un síndrome clínico que se caracteriza por la tríada diagnóstica de: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA); fue descrito por primera vez por Gagger en el año 1957 y fue en Argentina donde Carlos Gianantonio, publicó la primera casuística de 66 casos en el año 1962 en un trabajo que ya es clásico a nivel mundial (3); desde entonces ese país ocupa el primer lugar en el mundo en incidencia del síndrome que es alrededor de 200 a 400 casos por año, o sea 7 a 12.5 pacientes por cada 100,000 niños (4, 5) mientras en Chile y Uruguay la incidencia es de 4-5 casos por cada 100,000 niños, en tanto que difícilmente ningún otro país supere 2 casos por cada 100,000 niños.

Como todo síndrome obedece a varias causas, siendo sin dudas las gastroenteritis provocadas por bacterias enteroinvasoras (*Escherichia coli enterohemorrágica, Shigella dysenterie* tipo I*, Campylobacter yeyuni, Yersinia, Salmonella sp*), las responsables del 90% de las formas *típicas* asociado a diarrea SUH(D+) afectando en particular a niños menores de 2 años; en la forma esporádica el agente causal más frecuente es el *Escherichia coli* entero-hemorrágico O157:H7, siendo también el serotipo más implicado en las epidemias en Argentina y en Norteamérica (3-5). Un estudio realizado por Siegler en Norteamérica, 8-10% de los pacientes pueden desarrollar SUH hasta un periodo de 14 días después del inicio de la infección por la cepa *Escherichia coli* O157:H7(4), este riesgo aumenta en niños menores de 5 años cuando la diarrea es sanguinolenta, cuando la cifra de leucocitos en sangre esta marcadamente elevada, cuando se administran frenadores de la motilidad intestinal (7) o debido al uso de antibióticos(8,9), aunque un meta-análisis no encontró asociación entre el uso de estos, y el riesgo posterior de desarrollar SUH. (10)

La infección por EHEC muestra una variación estacional con un aumento de casos en primavera y verano, épocas que coinciden con el periodo en que se aíslan mayor cantidad de muestras en ganado bovino. (35)

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

La mayoría de los brotes causados por *Escherichia coli* O157:H7 y otras cepas STEC están asociadas al consumo de carne de vacuno poco cocinada, por lo que se le ha considerado como el principal reservorio de dicha bacteria. Sin embargo no solo se encuentra en reservorios animales, de la misma forma se han derivado brotes asociados al consumo de productos lácteos no pasteurizados o de vegetales (33), posiblemente contaminados con heces de

animales y aguas de riego. También se han descrito brotes asociados a la utilización de aguas recreacionales y al consumo de agua contaminada. (19, 44)

También se ha descrito la transmisión directa de persona a persona vía fecal-oral. Es el mecanismo del cual se obtienen casos secundarios y se presenta mayormente en niños pequeños que aún no han adquirido buenos hábitos de higiene. (19)

Existen casos de transmisión a través del contacto directo con animales, esto se ve facilitado por la baja dosis infecciosa que presentan estos patógenos, situada entre 10 y 100 células. (26)

II. ANTECEDENTES

Las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 ha despertado mucho interés por presentar dos características especiales: ocasiona un cuadro clínico de colitis hemorrágica afebril, asociada con frecuencia a dos graves complicaciones, el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la púrpura trombocitopenica (PTT) y es causante de brotes epidémicos importantes. (22)

La *E. coli* enterohemorrágica puede estar en el intestino del ganado vacuno sano y así ser transferido a la leche del mismo y contaminar la carne en los mataderos, como fue detectada en 1.3% de las 66 muestras de carne molida en una región de Argentina en el 2006 (9), en Wisconsin y Washington identificaron *E. coli* O157:H7 en 2.8%. (6)

Estudios experimentales demuestran que cepas de STEC patógenas en humanos colonizan el tracto intestinal de terneros y pueden causar diarrea (3). Los daños observados tanto en intestino como en los riñones de niños infectados, son ocasionados por productos bacterianos potenciados por mediadores inflamatorios, siendo la toxina Shiga tipo 1 o 2 necesaria para el desarrollo de SUH. (47)

A través de los años se ha experimentado la inoculación en Apéndice Cecal de conejos, para determinar el comportamiento de toxinas de Shiga.

En 1997, Valdivia y col, usaron la inoculación de *E. coli* en apéndice cecal de conejo, para determinar el efecto sobre linfocitos y se observaron destrucción de linfocitos locales y en el bazo, proponiéndose que dicho efecto pudo ser mediado por una lisis de linfocitos portadores de receptores Gb3 o bien por un fenómeno indirecto vía citocinas. (50)

III. JUSTIFICACIÓN

Es importante estudiar esta bacteria para saber si causa las mismas lesiones, que las cepas aisladas de enfermedad en humano, ya que la mayoría de las infecciones por EHEC en los seres humanos son transmitidas por los alimentos y la fuente de infección se encuentra en el reservorio animal.

IV. HIPÓTESIS

Las cepas aisladas de enfermedad en cerdos que presentan los genes stx1, stx2 y *eae*A, causarán lesiones similares a las cepas aisladas de enfermedad de Síndrome Urémico Hemolítico de humano.

V.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones patológicas provocadas por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) aisladas de enfermedad en cerdos, inoculadas en el apéndice cecal de conejo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar las alteraciones clínicas que se causan al inocular en el apéndice cecal de conejos cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas aisladas de cerdos.
2. Evaluar las lesiones macroscópica y microscópicas originadas al inocular las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica en el apéndice cecal de conejos.
3. Evaluar las alteraciones en la biometría hemática, urea y creatinina sérica provocadas al inocular en el apéndice cecal del conejo las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS

Se trabajaron en total 6 cepas de *Escherichia coli,* 5 fueron O157-H7; EDL-933 como testigo positivo, que fue aislada de un brote de Síndrome Urémico Hemolítico en humanos, y 4 cepas problema EDI-200, EDI-221, EDI-222, EDI-228, las cuales fueron obtenidas de un brote en enfermedad de cerdos, en una unidad de producción, donde se observó un cuadro clínico en lechones de 3 días de edad con diarreas, en animales entre los 20 y 45 días de edad y en cerdos adultos con un desenlace de muerte. Un factor importante fue el hecho de que las lesiones a la necropsia ubicaron casi exclusivamente al aparato digestivo, lechones con el intestino hemorrágico, estómago lleno, alimento seco, estómago e intestinos con edema, así como sistema nervioso con presencia de edema en cerebro (51), y 1 cepa silvestre Mc4100wt apatógena que sirvió de testigo negativo (Cuadro 1). Fueron donadas por el cepario de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, que las conserva en tubos con gelosa especial.

Cuadro 1. Características de las cepas de *Escherichia coli* empleadas en el presente trabajo

Identificación	Procedencia	Genes presentes*	Citotoxicidad a células Vero
EDL933	Patógena de humanos	*stx1, stx2, eae*A	+
EDI-200 (CIVB-009)*	Patógena de cerdos	*stx1, stx2, eae*A	+
EDI-221 (CIVB-031)*	Patógena de cerdos	*stx1, stx*2	+
EDI-222 (CIVB-032)*	Patógena de cerdos	Ninguno	+
EDI-228 (CIVB-038)*	Patógena de cerdos	*stx1, eae*A	+
MC4100wt**	Silvestre Apatógena de humanos	Ninguno	-

*stx*1: codifica para toxina de Shiga tipo1, *stx*2: codifica para toxina de Shiga tipo 2, *eae*A: gen que codifica para la intimida

*Citada por Vázquez 2008

**Cepa de Campo

BIOQUIMICA

Se realizaron pruebas bioquímicas para descartar contaminación con otros géneros bacterianos. Se realizaron las siguientes pruebas:

Pruebas primarias: tinción de Gram, Catalasa y Oxidasa.

Pruebas secundarias: Citrato de Simmons, Urea, Sorbitol, rojo de metilo y Voges Proskauer (MR-VP).
Pruebas múltiples: Triple Hierro Azúcar (TSI), Lisina Hierro Agar (LIA) y Movilidad Indol Ornitina (MIO).

Caracterización de factores auxiliares de virulencia por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las cepas se sembraron en agar soya Tripticaseína en caja de petri mediante estría continua, se incubaron a 37° C durante 24 hrs. Posteriormente se colocó 1 ml de agua estéril en un tubo Eppendorf al cual se le agregó con la ayuda de un asa de inoculación el cultivo obtenido de cada cepa.

Los tubos Eppendorf se colocaron en baño María a ebullición por 10 minutos, esto con la finalidad de provocar lisis celular, seguido de lo cual se colocaron en hielo durante 10 minutos, pasado este tiempo se centrifugaron (BIO-RAD Mod 16K microcentrifuge™) a 14000rpm durante 2 minutos. (OIE 2004).

Cuadro2. Secuencia de los iniciadores de los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A utilizados para la Técnica de PCR*

Genes	Iniciadores	Pares de Bases (pb)	Pares de Bases amplificados (pb)
***stx*1**	F:5 CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3 R:5 AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3	22 21	150
***stx*2**	F:5 GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3 R:5 TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3	21 22	255
***eae*A**	F:5 GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3 R:5 CCA CCT GCA ACA AGA GG3	20 20	384

*Aranguré, 2011

Cuadro 3. Reactivos empleados en la reacción de PCR múltiplex para *Escherichia coli* EHEC.*

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	10x	2.5µl
MgCl2	50 mM	1µl
DNTPS	200µM	0.5µl
Iniciadores	6 genes	5µl
Agua destilada		13.8µl
Taq Polimerasa		0.2µl
DNA		2µl
Total		23µl

*Aranguré 2011

En un tubo Eppendorf se mezclaron los reactivos de la tabla (cabe mencionar que la Taq polimerasa se agregó en último lugar debido a que se manejó en frio) se agregó el lisado y se homogeneizó. Se utilizó como testigo positivo una cepa O157:H7 y como negativo la cepa Mc4100wt, ambos controles se trabajaron en las mismas condiciones que el resto de las cepas problema.

Los tubos preparados se colocaron en el termociclador PTC-100™ (Programmable Termal Controller MJ Researche Inc) con los siguientes parámetros:

Cuadro 4. Parámetros del termociclador para PCR múltiplex

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

Técnica de electroforesis

En un matraz se colocaron 50ml de TAE 1X al cual se le agregaron 2g de agarosa al 2%, posteriormente se calentó directamente en la flama de un mechero hasta clarificar y obtener un medio reconstituido. Se dejó enfriar (sin solidificar) y se agregaron 10µl de bromuro de etidio, se homogenizó y se vertió en la cámara de electroforesis, se colocaron los peines dentro del gel con la

finalidad de formar los pozos que contienen a las muestras. Estos peines se retiraron una vez solidificado el gel.
Se montó el sistema en una cámara de electroforesis y se agregó TAE 1X hasta cubrir completamente el gel. Las muestras de ADN se colocaron de la siguiente manera:
Sobre un papel Parafilm® se colocaron 3µl de Buffer de corrido y 7µl de ADN, se homogeneizaron con ayuda de una micropipeta y se colocó cada muestra en cada uno de los pozos del gel. Se encendió la cámara de electroforesis con un voltaje de 85 miliamper. El tiempo de corrido fue de aproximadamente 40 minutos. Posterior a esto se procedió a realizar la lectura del gel en el transiluminador ultravioleta. Técnica empleada según López y col. 2003, con algunas modificaciones.

Material biológico

Se utilizaron 18 conejos de la raza nueva Zelanda de aproximadamente 1.8 kilogramos, de sexo indistinto, sanos, donados por la unidad de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

El número de animales utilizados se determinó en base a los trabajos realizados por Valdivia en 1995, en los cuales el 100% de los animales que fueron inoculados bajo las mismas condiciones de este experimento, reaccionaron en forma idéntica de acuerdo al inóculo empleado. Los animales que murieron por la cirugía o en menor tiempo fueron eliminados, respetando la numeración cronológica asignada. Los animales eran dietados un día previo a la cirugía solo de alimento sólido, con agua a libre acceso.

Cabe mencionar que todos los animales utilizados en este trabajo fueron manejados y tratados en condiciones humanitarias de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a las normas internacionales.

Técnica quirúrgica

La técnica quirúrgica fue realizada como lo mencionó Valdivia en 1995.

Se realizó tricotomía de toda la región abdominal del conejo
Se tomó muestra de sangre por punción yugular y/o auricular.

Se procedió a tranquilizar al animal con maleato de acepromacina (0.20 ml), sulfato de atropina (0.15 ml) y poco después se aplicó 26mg de ketamina (0.48ml de anesket). El protocolo de medicación completo llevado a cabo a lo largo de todas las cirugías es indicado en la Cuadro 5.

Cuadro 5. Anestésicos utilizados en la cirugía

Principio Activo	Dosis Administrado (mg/kg)		
	Inicio	Inducción	Mantenimiento
Maleato de Acepromacina	0.08	-	-
Sulfato de Atropina	0.04	-	-
Ketamina	0.26	0.65	33.33

Tras observar la entrada del paciente a primer plano de anestesia (aproximadamente 5 minutos), se procedió a colocarlo en decúbito dorsal y realizar la antisepsia del área de intervención con cloruro de benzalconio 1:100 tiempo durante el cual el paciente se fue profundizando hasta el plano III de anestesia.

Una vez alcanzado el plano quirúrgico se procedió a realizar la técnica:

PRIMER TIEMPO: Incisión de la piel por la línea mediana ventral aproximadamente 2cm, debajo del esternón abarcando piel y línea alba. Una vez en cavidad se procedió a localizar el apéndice cecal el cual (la mayoría de las veces) se encontró en la región hipocondríaca derecha dorsal al ciego. Una vez ubicada la estructura, ésta se expuso sobre gasas mojadas en solución salina fisiológica estéril (SSFE).
SEGUNDO TIEMPO: Se seleccionó un segmento de 5cm aproximadamente en el cual fuese fácil ligar la vasculatura local del órgano y que fuese lo suficientemente proximal al ciego para permitir una fácil manipulación del saco ciego. Se procedió a ligar con doble nudo de cirujano de vicryl 3-0, la vasculatura local a lo largo de una porción de 2 a 3 cm de largo, lo suficiente para crear holgadura cómoda entre el apéndice cecal y su vasculatura principal.
TERCER TIEMPO: Una vez ligada la vasculatura local del órgano se pinzó la región que había quedado sin irrigación con dos pinzas rectas de Kelly una junto a la otra y se realizó un corte entre ambas pinzas.
CUARTO TIEMPO: Se procedió a cerrar el extremo proximal al ciego por medio de una sutura de jareta proseguida de una sutura de connell-cushing con monocryl 3-0.
QUINTO TIEMPO: Se prosiguió a abrir la pinza del lado distal al ciego en donde cuidadosamente se instiló SSFE por medio de una jeringa de 20 ml unida a una sonda de alimentación infantil, recuperando el líquido en un pequeño frasco estéril, tomando todas las medidas necesarias para evitar el

derrame de líquido hacia las vísceras o cavidad. Este procedimiento se repitió hasta que el líquido dejo de ser turbio.
SEXTO TIEMPO: Una vez lavado el segmento del ciego, se prosiguió a realizar una sutura de jareta, pero antes de apretarla, se aplicó con una jeringa, 1 ml del inoculó correspondiente, seguida de una sutura de connell-cushing. Se cambiaron todos los campos inmediatamente, así como guantes y el instrumental.
SEPTIMO TIEMPO: Ambos muñones fueron cerrados, y se comprobó la hermeticidad de ellos, se tomaron los cabos libres de las suturas de ambos muñones y se anudaron entre ellos.
OCTAVO TIEMPO: Se procedió a regresar la víscera a su posición original para proseguir a cerrar la pared abdominal con súrgete continuo anclado de monocryl 2-0 y de la piel con puntos en "u" de naylon 3-0. Finalmente se aplicó negasunt.
Después de realizada la cirugía, los animales fueron llevados al laboratorio de Diagnostico Integral Veterinario DIVET®, donde estaban continuamente vigilados, proporcionándoles agua y alimento a libre acceso, y se tomaron muestras de sangre periódicamente hasta el día que fallecieron.

Las muestras sanguíneas fueron procesadas en el laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).

Elaboración de Rangos Normales Sanguíneos

Para comparar los datos que se obtuvieron después de la inoculación, se tomaron como rangos normales los resultados de las muestras de sangre obtenidas antes de realizar la cirugía y antes de la anestesia.

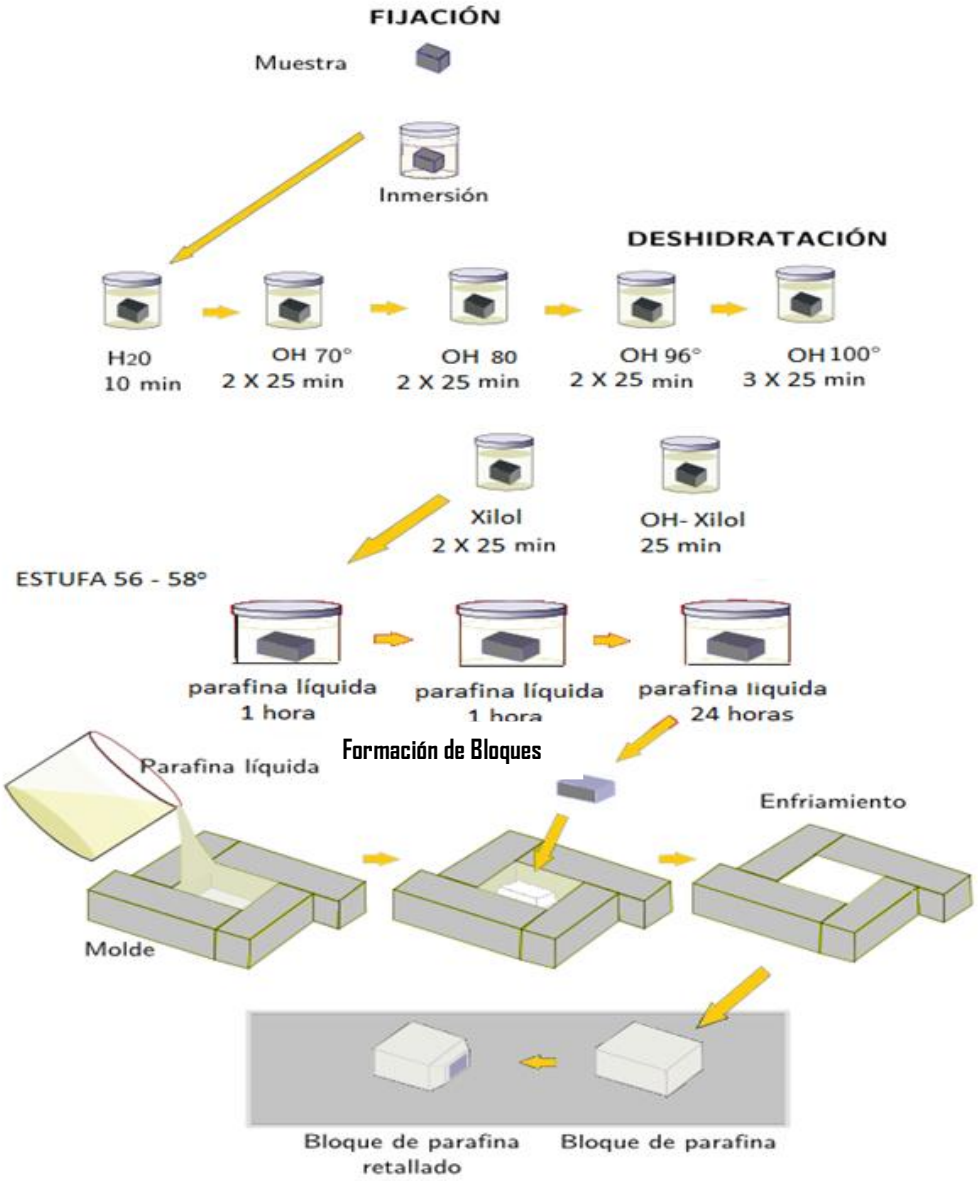
Necropsia

Después de que los conejos fueron eutanasiados o murieron antes del tiempo esperado, se le realizó necropsia. Se obtuvieron: riñón, bazo, apéndice cecal y encéfalo; los cuales fueron fijados con paraformaldehído al 4%.

Histopatología

Después de fijar el tejido, se realizaron cortes de cada muestra y se colocaron en cápsulas para proceder a enjuagarlas y someterlas a un tren de deshidratación en alcoholes en concentraciones crecientes durante una hora cada uno (OH 60°, OH70°, OH80°, OH96°, absoluto) hasta llegar a xilol (dos cambios) y por último se infiltraron en parafina. (16, 18)

Figura 1. Esquema de la técnica de inclusión en parafina



Cortes

Los cortes se realizaron en el micrótomo, con un grosor de 5 micras en series, los cuales se sometieron a un baño de flotación a 37ºC con grenetina, para que se extendieran y adhieran al portaobjetos, de dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.

Tinción hematoxilina-eosina

- Se sumergieron los preparados histológicos en xilol para eliminar los excesos de parafina.
- Luego pasaron por una serie de alcoholes (100°. 95° y 70°).
- Se lavaron en agua para eliminar exceso de alcohol

- Se sumergieron en hematoxilina por 10 minutos, luego se lava en agua para eliminar excesos y se pasa rápidamente por alcohol ácido.
- Se lavaron nuevamente
- Se sumergieron 30 segundos en eosina.
- Se pasaron por otra serie de alcoholes, en orden creciente (70°, 95° y 100°).
- Finalmente se dejaron remojar 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final.

Finalmente se procedió a revisar las distintas muestras en diferentes objetivos.

La revisión de las laminillas, se realizó, dándole una puntuación a los elementos evaluados de la siguiente manera:

Cuadro 6. Evaluación del grado de lesión en el estudio histopatológico de acuerdo a Hernández y col.

0	Sin Cambio Patológico Aparente (SPCA)
1	Leve
2	Moderado
3	Severo

*Hernández y col. (1993)

Lesiones Histopalógicas Evaluadas

- Apéndice Cecal: Necrosis Linfoide y Apoptosis
- Bazo: Deplesión Linfoide, Apoptosis, Hemosiderina y Congestión.
- Riñón: Hinchamiento Glomerular, Hemosiderina, Congestión y Necrosis Glomerular.

Se realizaron 3 laminillas por órgano y cada en cada una se revisaron 3 campos, por 3 personas diferentes para realizar el análisis estadístico.

Los datos se analizaron con una estadística no paramétrica de Kruskal, en el software estadístico statgraphics 5.0 plus, con un nivel de significancia de p{0.05

VII. RESULTADOS

PCR

Se realizó la identificación del gen *stx*1, *stx*2 y *eae*A mediante la técnica de PCR, se confirmaron que el testigo positivo tiene la presencia de los 3 genes, mientras que el testigo negativo no presentó ninguno, la cepa EDI-222 posee los genes *stx*1, *stx*2 y eaeA, la cepa EDI-221 presenta *stx*1 y *eae*A y las cepas EDI-220 Y EDI-228 solo tuvieron la presencia del gen *eae*A, como se observa en la cuadro 7.

Cuadro 7. Genes encontrados en las cepas empleadas en el estudio mediante la técnica de PCR

CEPA	PCR*		
	Gen amplificado		
	stx1	*stx2*	*eaeA*
EDL-933	+	+	+
EDI-222	+	+	+
EDI-221	+	-	+
EDI-220	-	-	+
EDI-228	-	-	+
Mc4100wt	-	-	-

*Se utilizo la técnica descrita por Aranguré, 2011

Modelo animal

Los días posteriores a la inoculación los animales se mantuvieron en el bioterio de DIVET®, donde se les suministraba agua, alimento y estaban vigilados constantemente. Se revisó la signología que presentaba cada individuo hasta el momento de fallecer, se realizó un cuadro comparativo para la signología mostrada por los diferentes grupos inoculados representando su grado de severidad.

Signos clínicos

Cuadro 8. Signos clínicos observados en los conejos inoculados en Apéndice cecal con *E. coli* enterohemorrágica O157:H7.

	CEPA					
SIGNOS CLINICOS	**EDL-933**	**Mc4100wt**	**EDI-228**	**EDI-200**	**EDI-221**	**EDI-222**
DESHIDRATACIÓN	++ *	+	+++	+++	+++	+++
ANOREXIA	++	+	+++	++	++	+++
CIANOSIS	-	-	++	+++	+++	+++
MUCOSAS PALIDAS	++	-	-	-	-	+
DIFICULTAD PARA RESPIRAR	+++	-	++	+++	-	+++
DIARREA	+++	-	+++	++	+++	++
DIARREA FETIDA	++	-	++	+++	-	+++

*SEVERIDAD:
- NULA
+ LEVE
++ MODERADA
+++ SEVERA

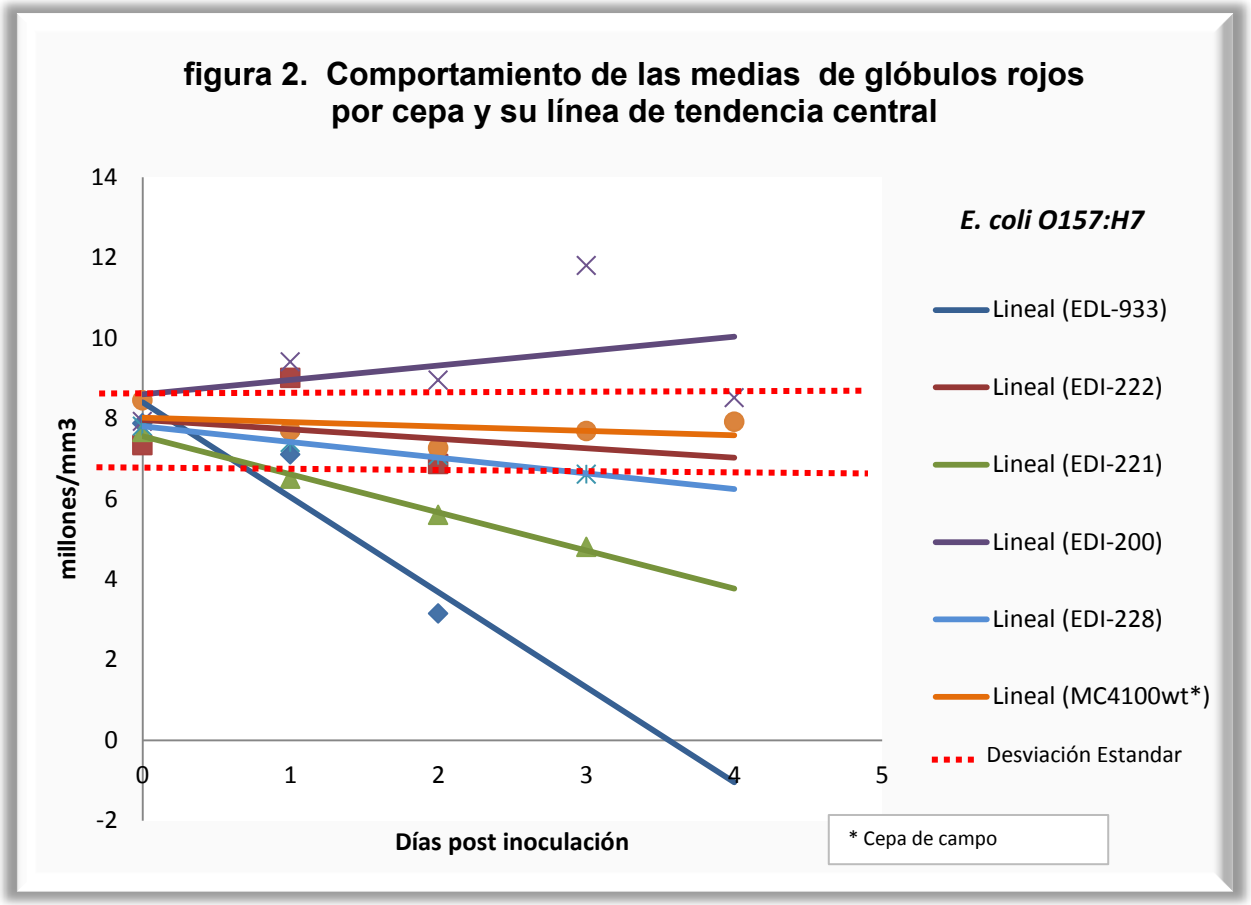
La mayoría de los grupos inoculados con cepas O157:H7 presentaron una signología similar en cuanto a la severidad, aunque los individuos que fueron inoculados con las cepas EDL-933, Y EDI-222, la signología se presentó a los 2 días post-inoculación, mientras que en los individuos inoculados con las cepas EDI-200 Y EDI-228 es hasta los 4 días después de la inoculación.

Laboratorio

Resultados obtenidos en el hemograma

Los grupos que fueron inoculados con la cepa de *Escherichia coli* EDL-933 y EDI-221 presentaron una disminución en los valores promedio de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito al segundo día post inoculación, mientras que los grupos inoculados con las cepas de *Escherichia coli* EDI-222 y EDI-228 solo presentaron disminución en el hematocrito fig. 2, 3,4.

La cepa de *Escherichia coli* EDI-200, se comportó de manera contraria a los demás grupos, mostrando una ligera policitemia, mientras que la cepa Mc4100wt mantuvo los niveles normales fig. 2.



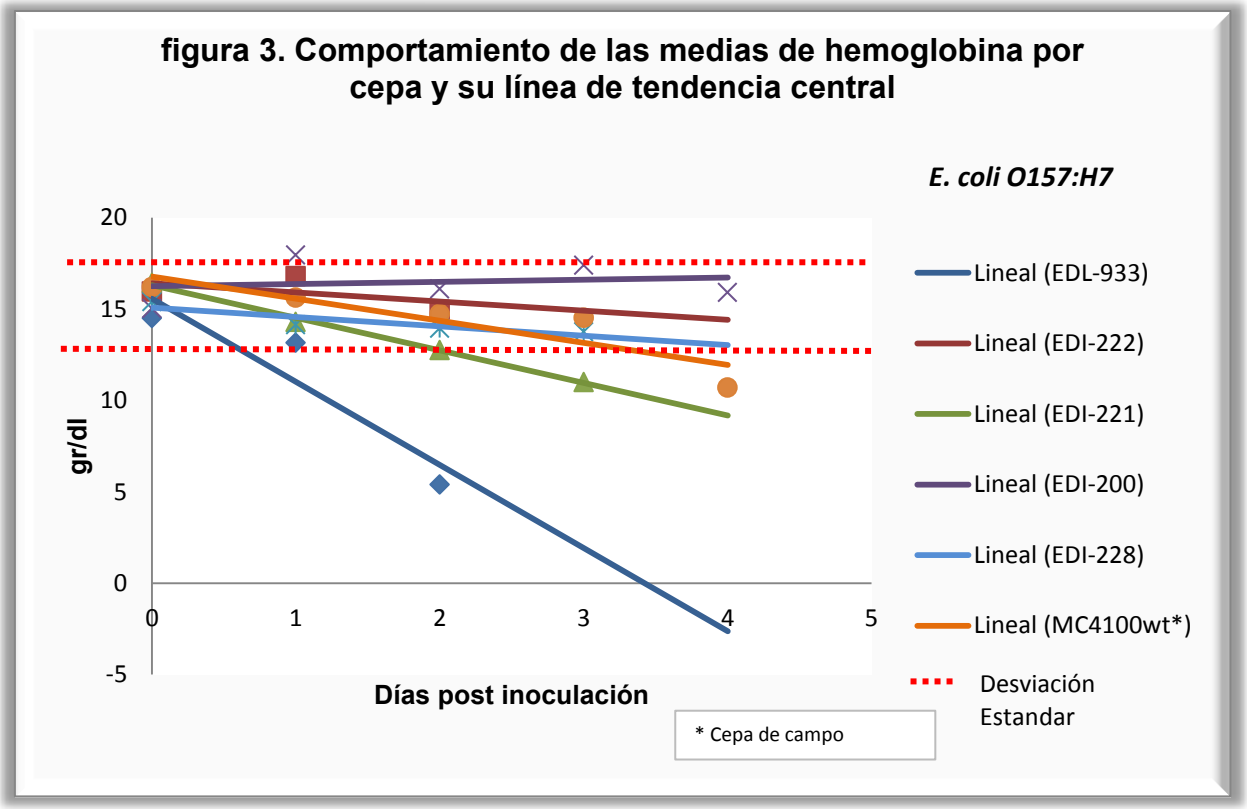


figura 3. Comportamiento de las medias de hemoglobina por cepa y su línea de tendencia central
E. coli O157:H7
20
15
10
5
0
-5
gr/dl
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (MC4100wt*)
Desviación Estandar
* Cepa de campo

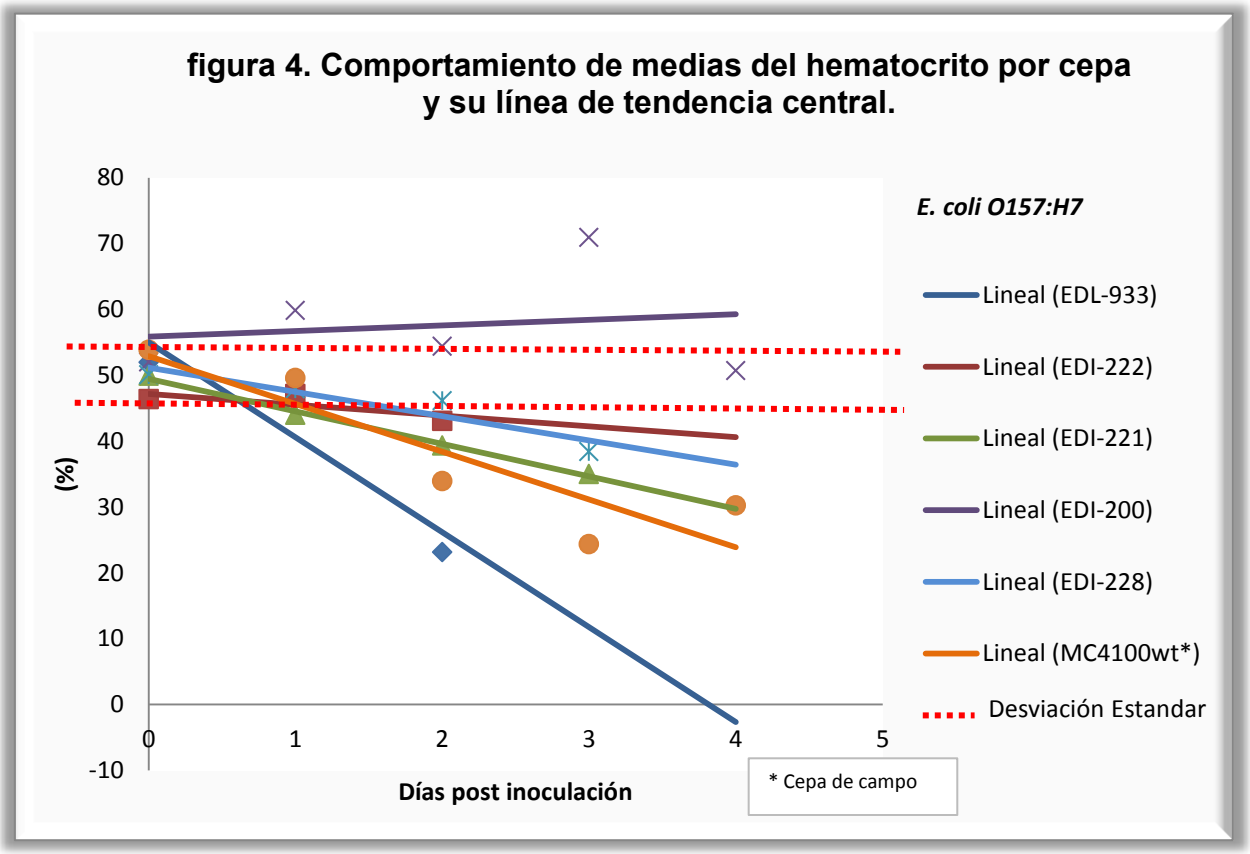


figura 4. Comportamiento de medias del hematocrito por cepa y su línea de tendencia central.
E. coli O157:H7
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
(%)
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (MC4100wt*)
Desviación Estandar
* Cepa de campo

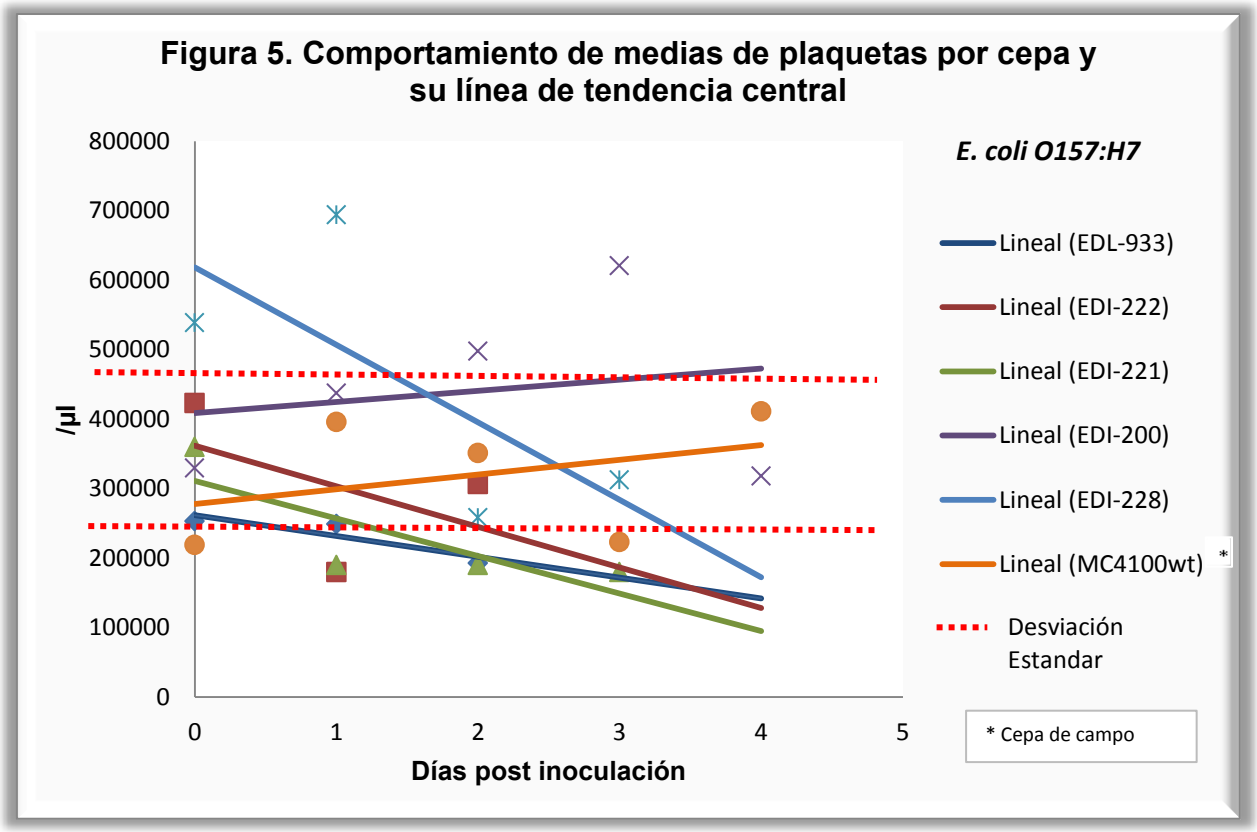


Figura 5. Comportamiento de medias de plaquetas por cepa y su línea de tendencia central
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
/µl
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
E. coli O157:H7
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (MC4100wt) *
Desviación Estandar
* Cepa de campo

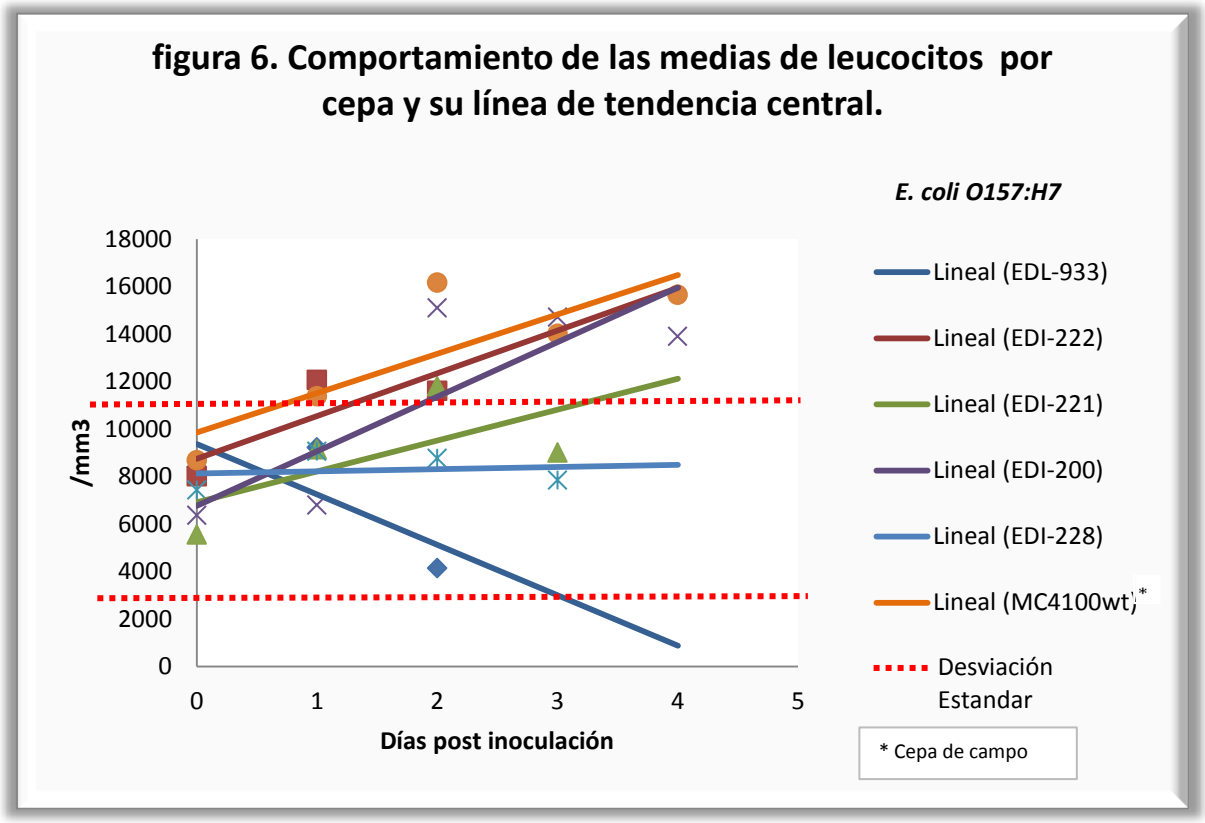


figura 6. Comportamiento de las medias de leucocitos por cepa y su línea de tendencia central.
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
/mm3
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
E. coli O157:H7
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (MC4100wt) *
Desviación Estandar
* Cepa de campo

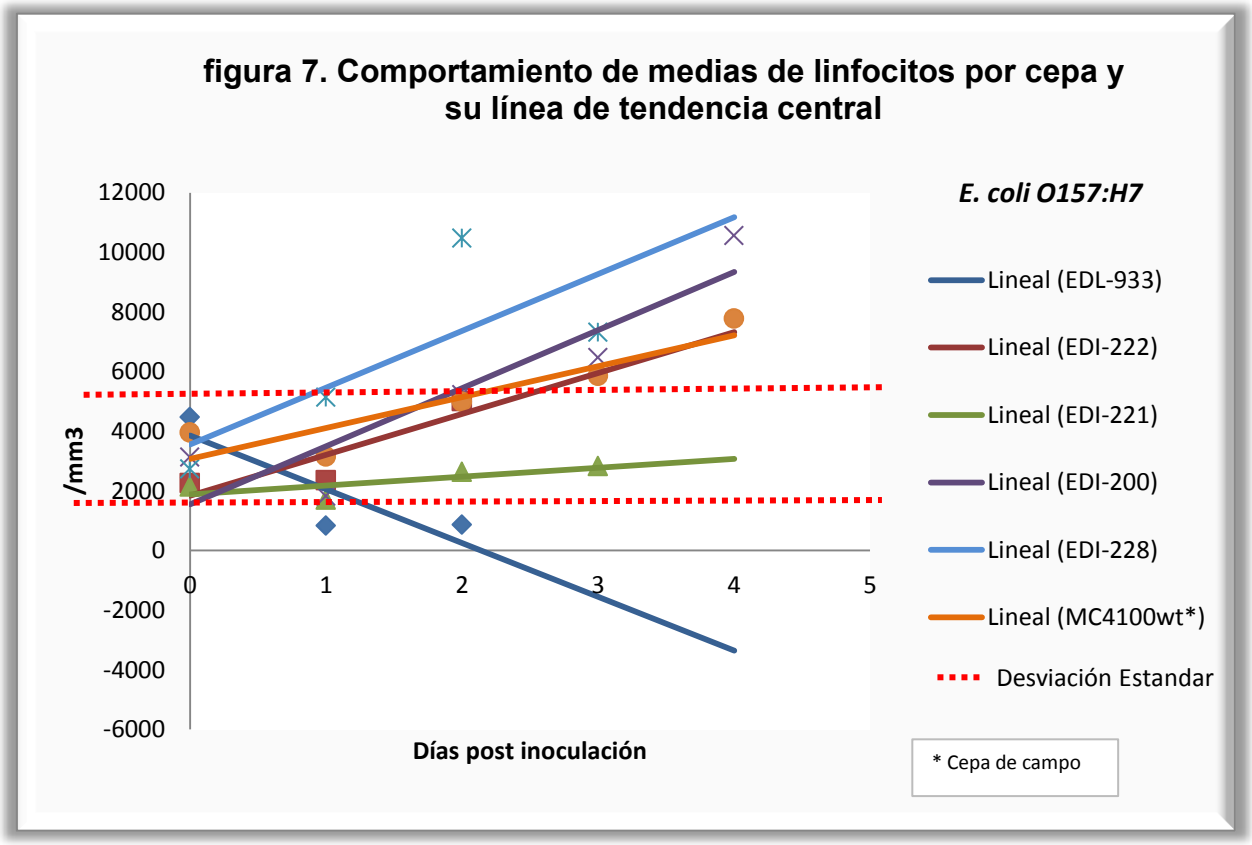


figura 7. Comportamiento de medias de linfocitos por cepa y su línea de tendencia central
E. coli O157:H7
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
-6000
/mm3
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (MC4100wt*)
Desviación Estandar
* Cepa de campo

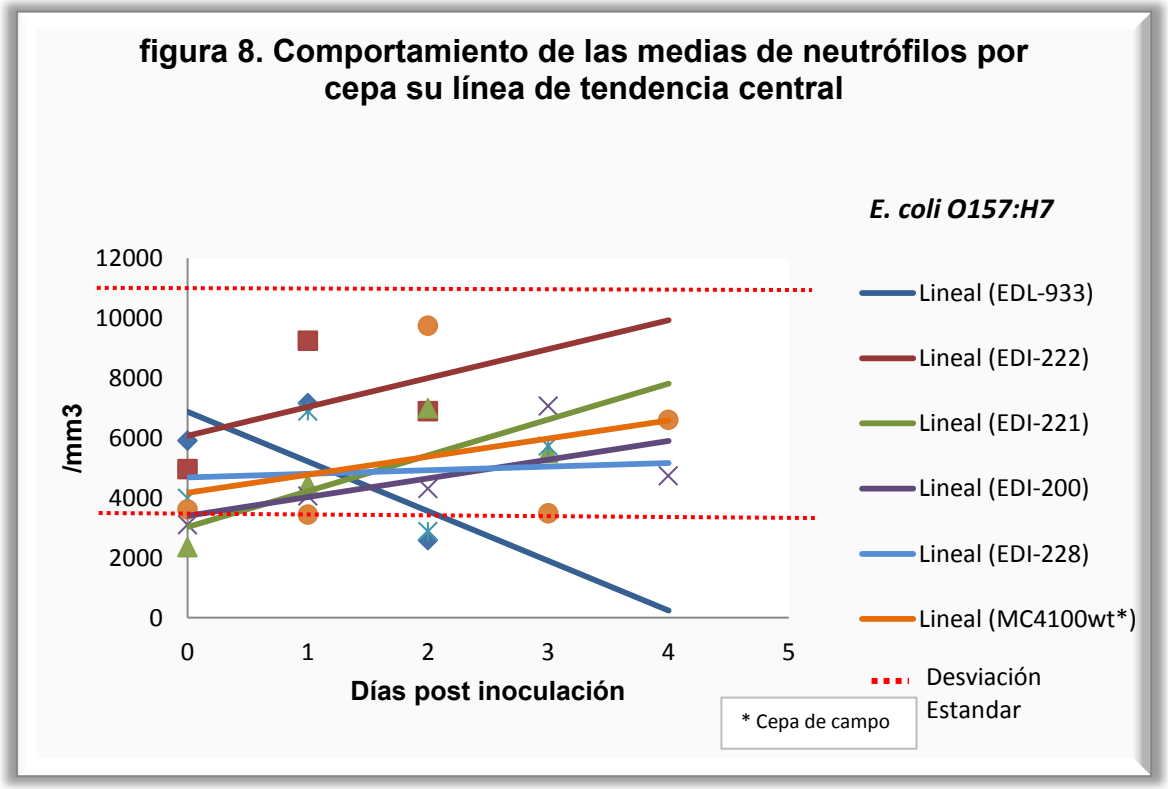


figura 8. Comportamiento de las medias de neutrófilos por cepa su línea de tendencia central
E. coli O157:H7
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
/mm3
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (MC4100wt*)
Desviación Estandar
* Cepa de campo

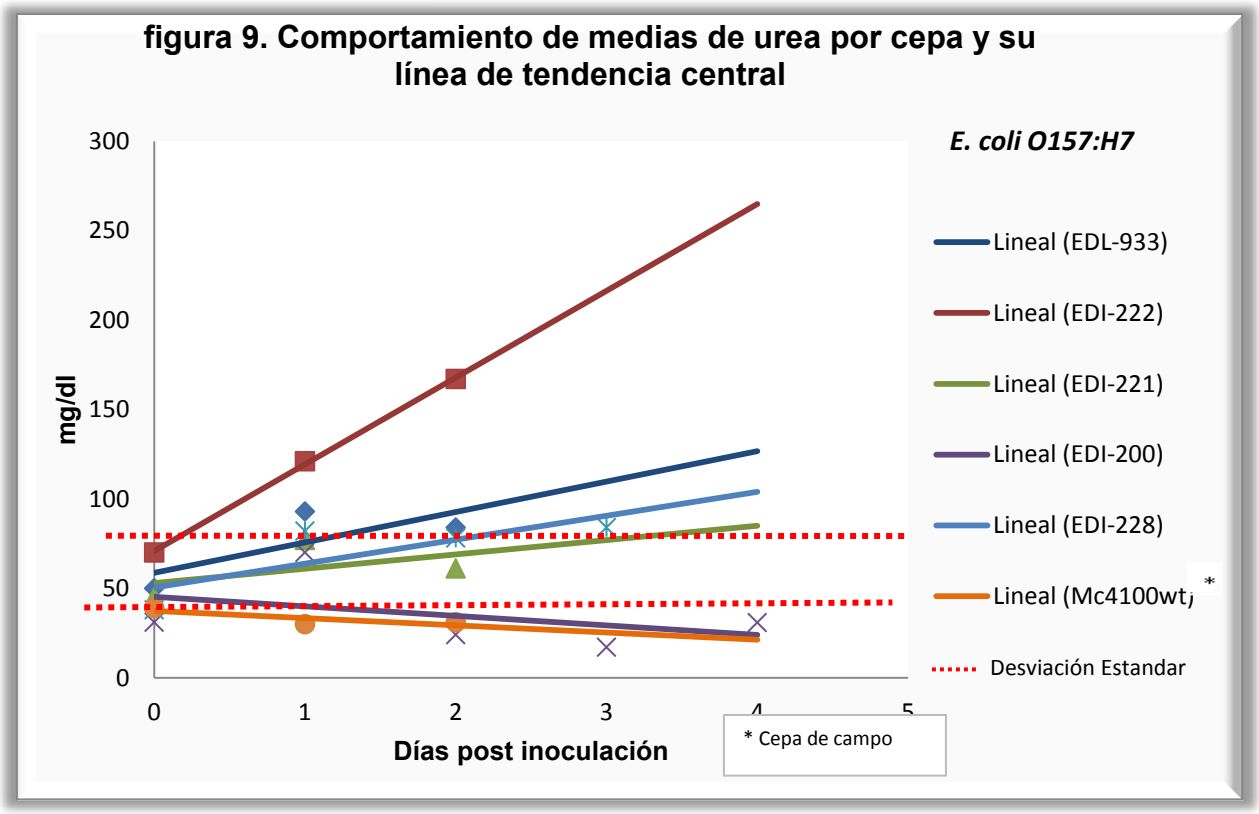


figura 9. Comportamiento de medias de urea por cepa y su línea de tendencia central
E. coli O157:H7
mg/dl
300
250
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
Lineal (EDL-933)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-228)
Lineal (Mc4100wt)
Desviación Estandar
* Cepa de campo

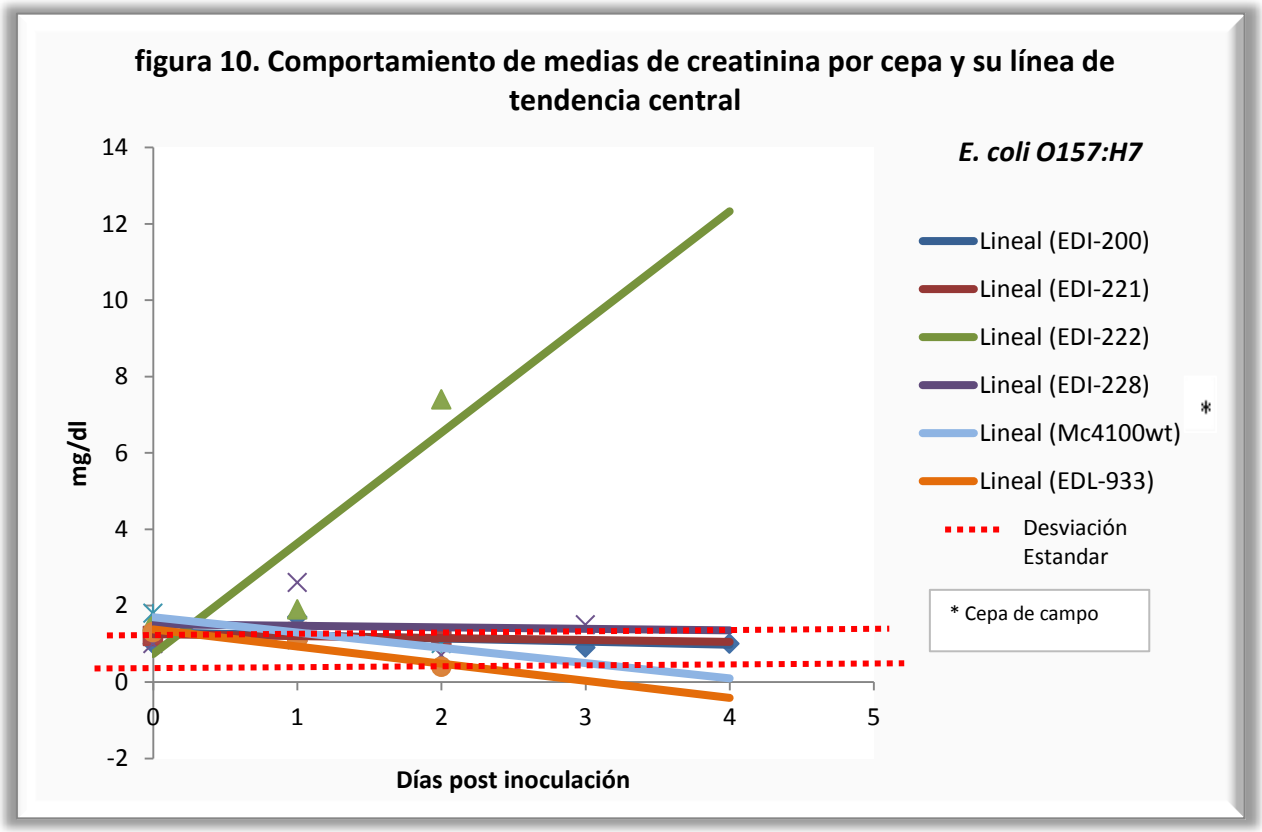


figura 10. Comportamiento de medias de creatinina por cepa y su línea de tendencia central
E. coli O157:H7
mg/dl
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
0
1
2
3
4
5
Días post inoculación
Lineal (EDI-200)
Lineal (EDI-221)
Lineal (EDI-222)
Lineal (EDI-228)
Lineal (Mc4100wt)
Lineal (EDL-933)
Desviación Estandar
* Cepa de campo

Necropsia

En los conejos inoculados con las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 se observaron diversas lesiones en distintos órganos, siendo el apéndice cecal, riñón y bazo los más característicos en todos los grupos.

En el cuadro 9 se muestra un comparativo de las lesiones que se presentaron en los diferentes grupos inoculados.

Cuadro 9. Lesiones a la Necropsia de los grupos inoculados con diferentes cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157-H7.

		CEPA					
	LESIÓN	**EDL-933**	**Mc4100wt**	**EDI-228**	**EDI-200**	**EDI-221**	**EDI-222**
	Ulcera Gástrica	+	-	+	+	+	++*
	Mucosa Intestinal Traslucida	+	-	+	+	-	+
Necrosis	**Apéndice Cecal Inoculado**	-	-	-	-	+	+
Congestión	**Intestino**	-	-	+	+	+	+
	Riñón	-	-	+	-	+	-
	Encéfalo	-	-	-	-	-	+
	Nefromegalia	+	-	-	-	-	+
	Hepatomegalia	+	-	+	+	-	-
	Atrofia de Bazo	-	-	+	+	+	-
	Hemorragia en Bazo	-	-	-	-	+	-

(+) Positivo *En 2 de 3 animales se apreció Ulcera Perforada en Estomago

(-) Negativo

Al igual que en los signos clínicos, las lesiones observadas son comunes entre grupos y la variante es la severidad de la lesión, siendo las cepas que contienen los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A, las más virulentas, ya que los animales

solo sobrevivieron tres días después de la inoculación, mientras que los demás grupos variaron entre 5 y 6 días posteriores a la cirugía.

En todos los individuos que fueron sometidos a la inoculación se presentaron algunas adherencias en peritoneo, en la región de segmento operado.

Las siguientes figuras representan algunas de las lesiones en los órganos, de algunos individuos.

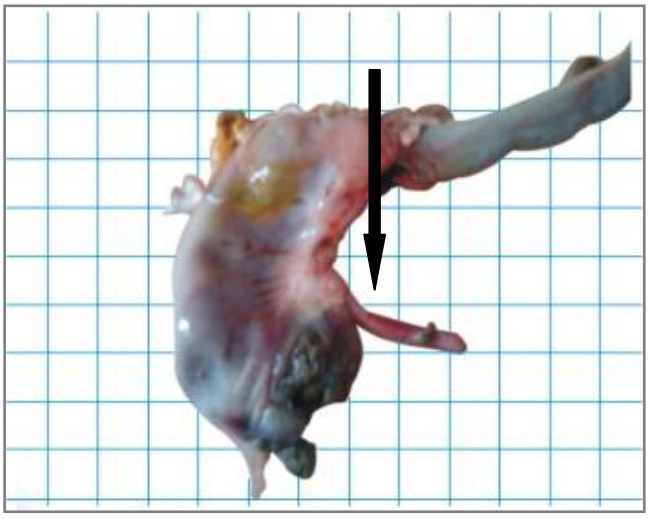


Figura 11. Perforación Gástrica presentada en el conejo inoculado con la cepa EDI-222 observada a la necropsia

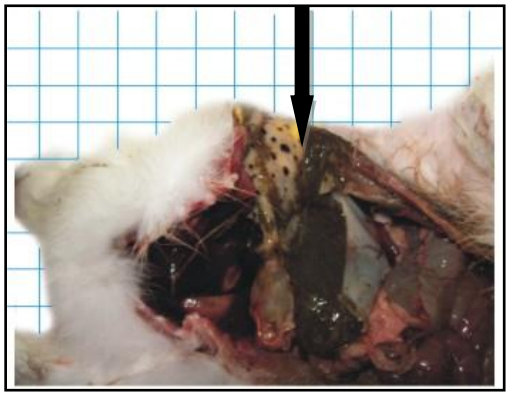
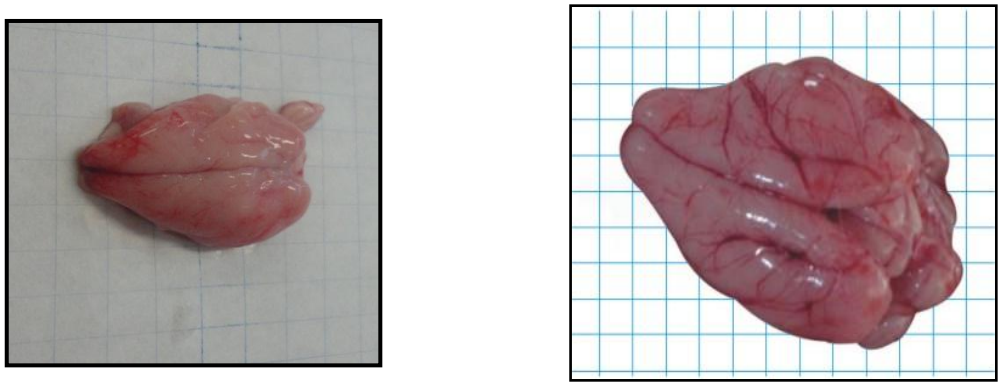


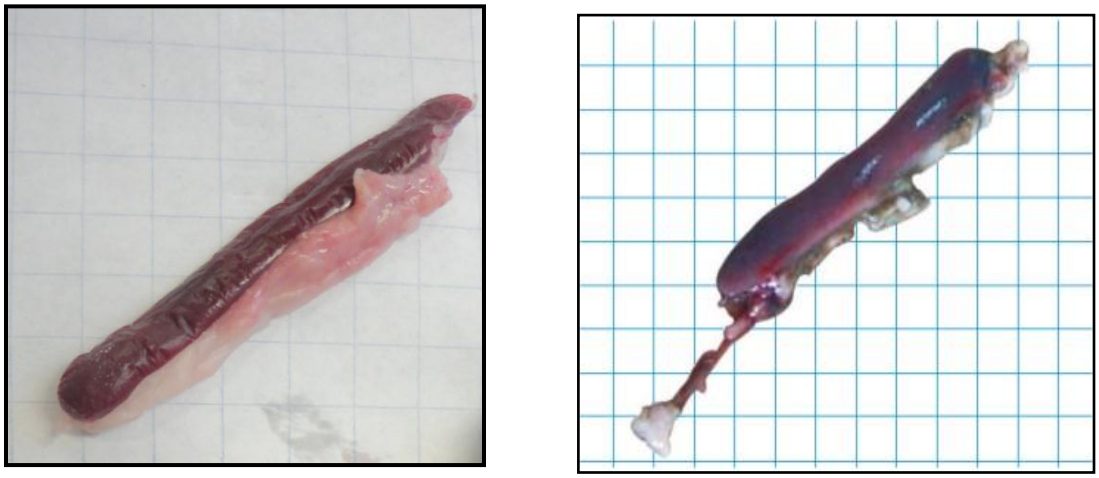
Figura 12. Ulcera Gástrica presentada en el conejo inoculado con las cepas EDL-933, EDI- 200, 221 y 228 observadas a la necropsia



A) B)

Figura 13. A) Encéfalo sin cambios patológicos aparentes B) Congestión en el encéfalo del conejo inoculado con la cepa EDI-222

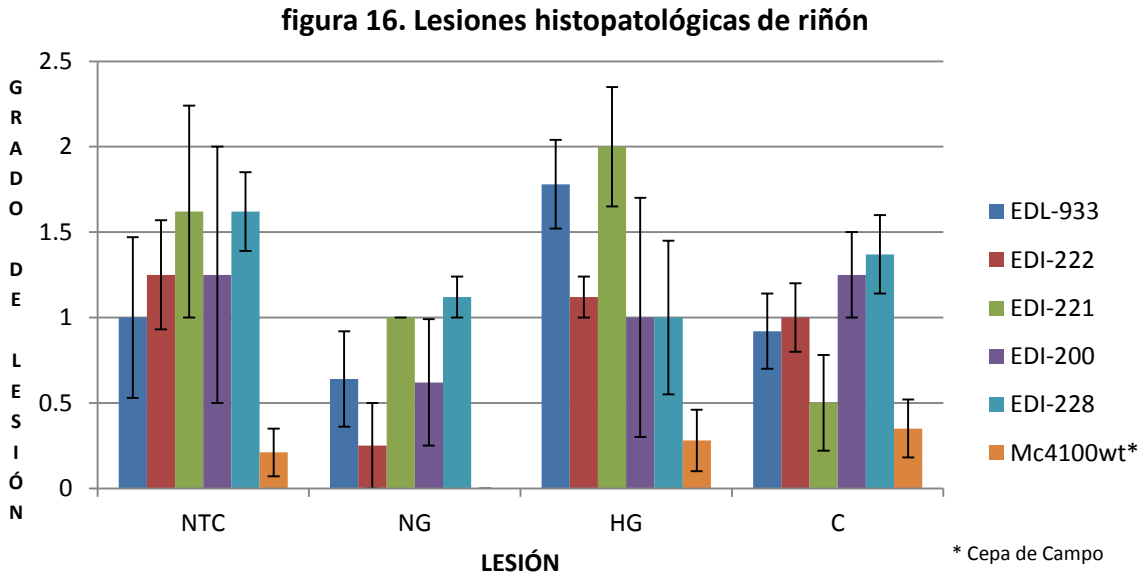
Figura 14. A) Riñón sin cambios patológicos aparentes B) Riñón congestionado en los conejos inoculados con la cepa EDI-228 y EDI- 221 a la necropsia



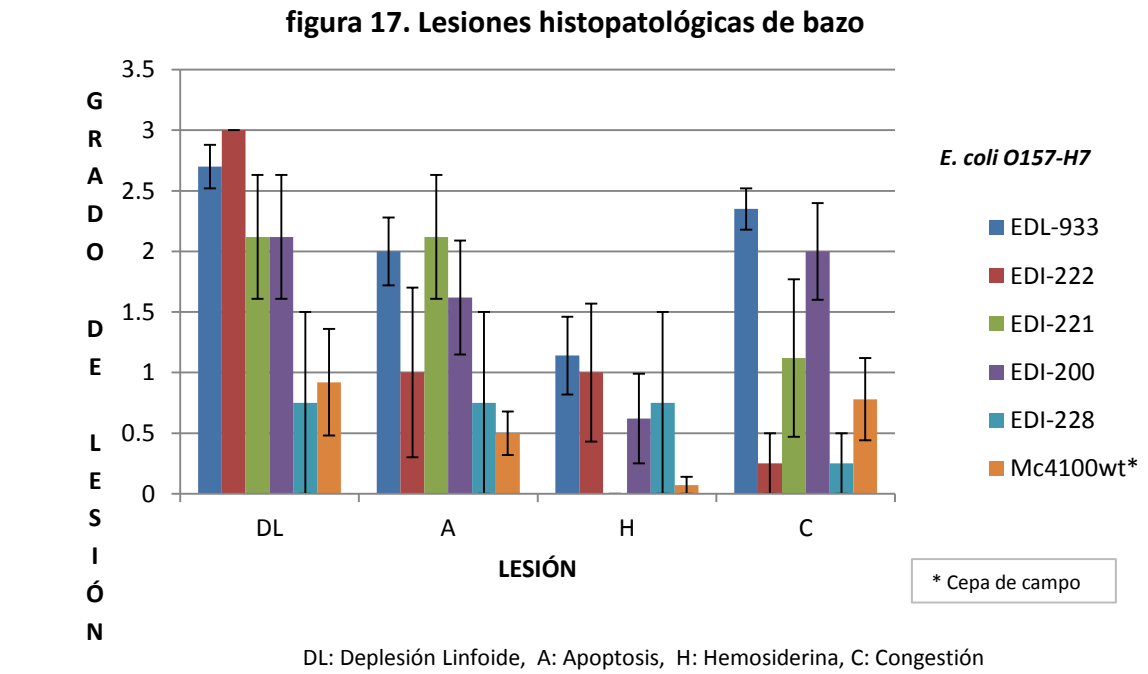
A) B)

Figura 15. A) Bazo sin cambios patológicos aparentes del conejo inoculado con la cepa Mc4100wt B) Atrofia en Bazo de los conejos inoculados con las cepas EDI-228, EDI- 200 y EDI-221 presentado a la necropsia

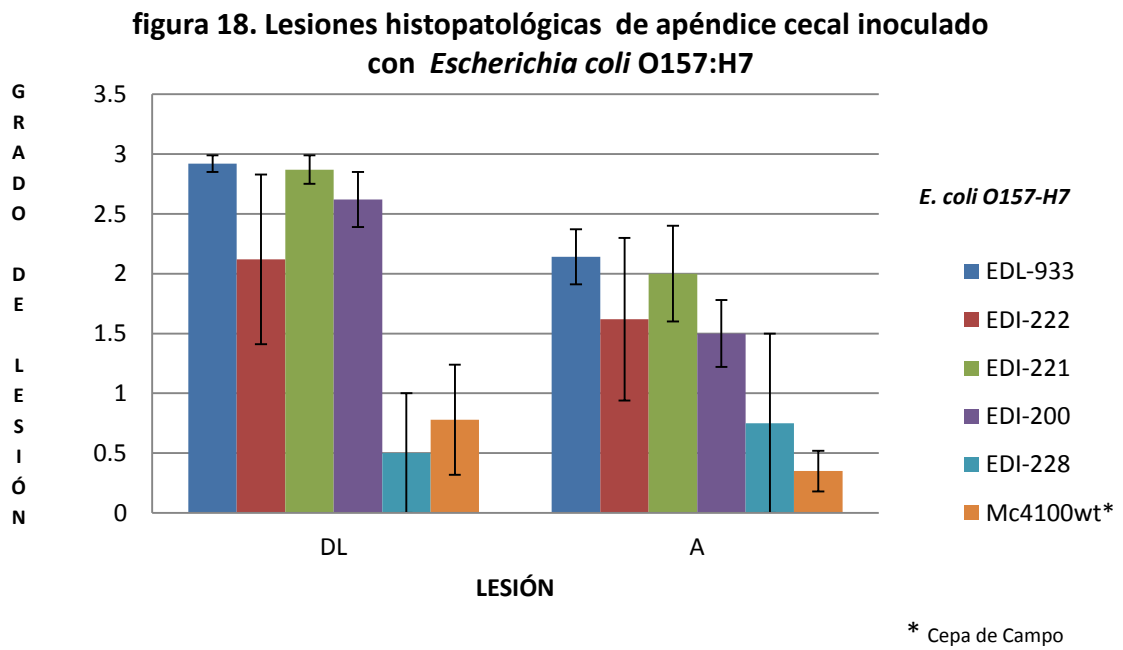
LESIONES HISTOPATOLÓGICAS



NTC: Necrosis de Tubulo Contorneado, NG: Necrosis Glomerular, HG: Hinchamiento Glomerular , C: Congestión Renal



DL: Deplesión Linfoide, A: Apoptosis, H: Hemosiderina, C: Congestión



DL: Deplesión Linfoide, A: Apoptosis

Las siguientes figuras muestran algunas lesiones que se encontraron al microscopio en diferentes objetivos.

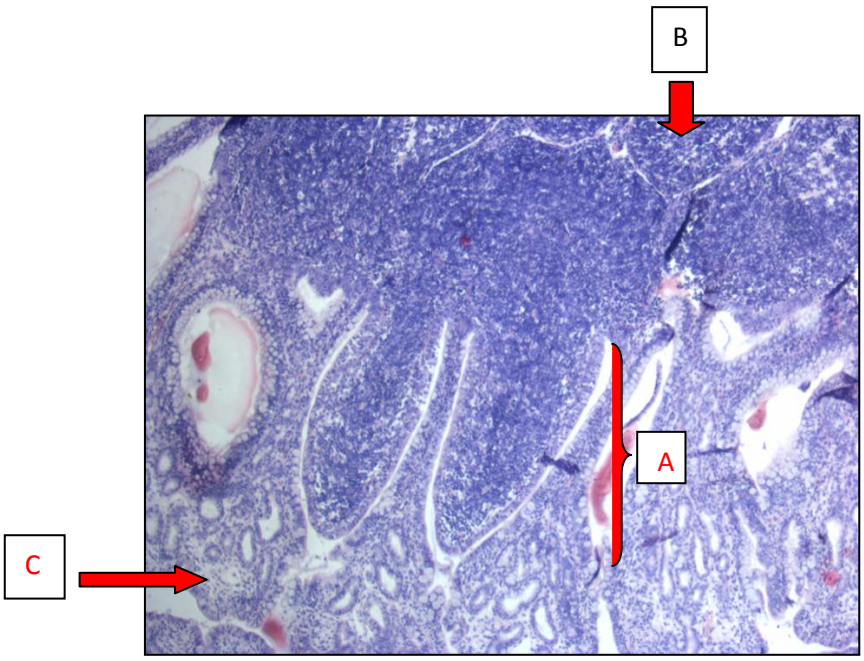
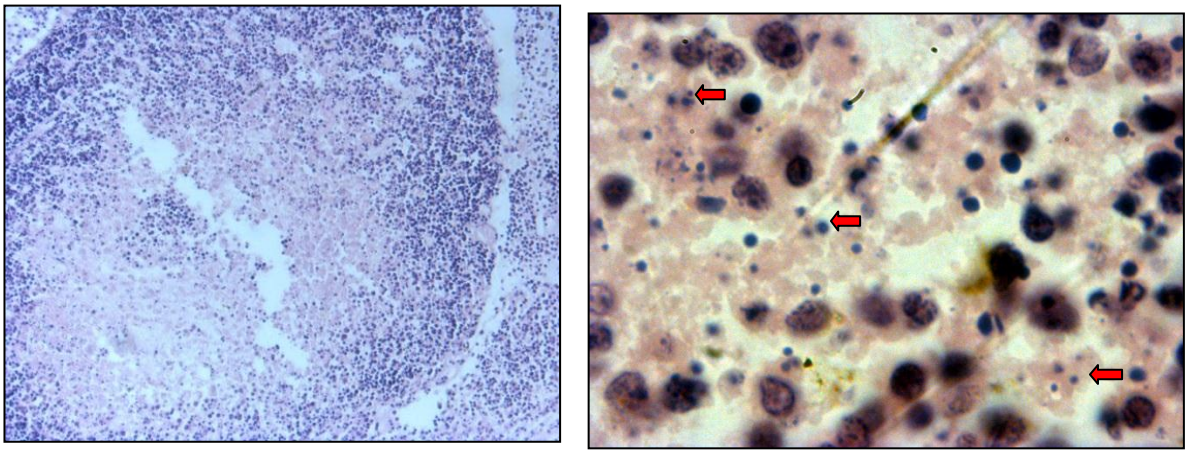


Figura 19. Microfotografía de apéndice cecal de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* Mc4100wt se encontró sin cambios histopatológicos aparentes. A) Domo, B) Centro Germinativo, C) Vellosidad, tinción H-E., 40x.



A) B)

Figura 20. Microfotografía de apéndice cecal de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* EDL-933, se encontró A) Necrosis linfoide de Centros Germinativos, tinción H-E., 400 B) Apoptosis, tinción H-E., 1000x.

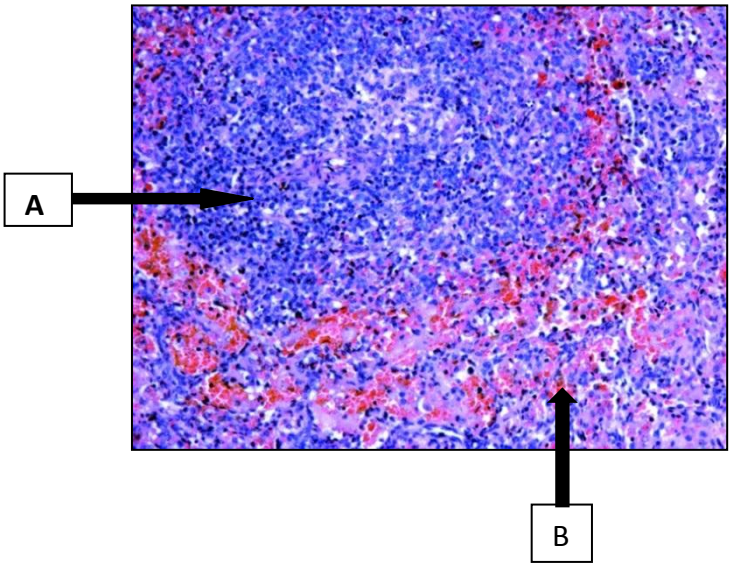
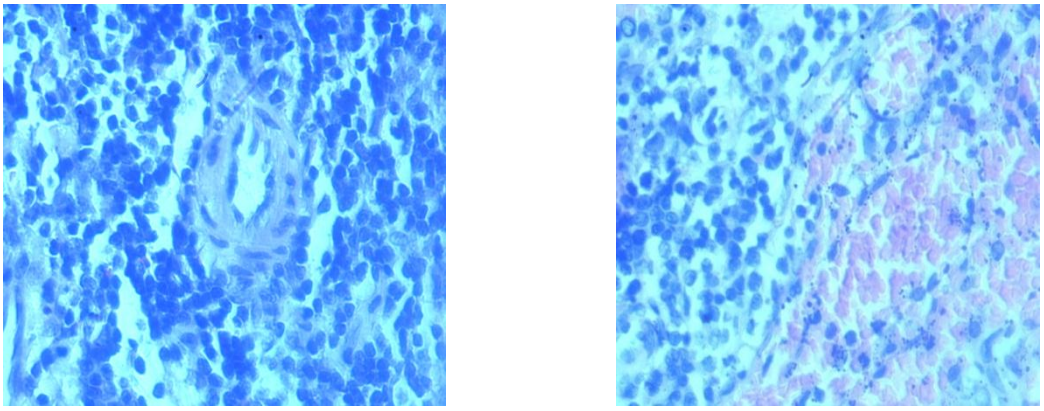


Figura 21. Microfotografía de bazo de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* Mc4100wt, se encontró sin cambios histopatológicos aparentes, A) Pulpa blanca, B) Pulpa roja, tinción H-E., 400 x.



A) B)

Figura 22. A) Microfotografía de bazo (pulpa blanca) de conejo inoculado con la cepa *Escherichia coli* Mc4100wt, se encontró sin cambios patológicos aparentes B) Microfotografía de bazo de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* EDL-933 se encontró Deplesión linfoide y Congestión, tinción H-E., 400 x.

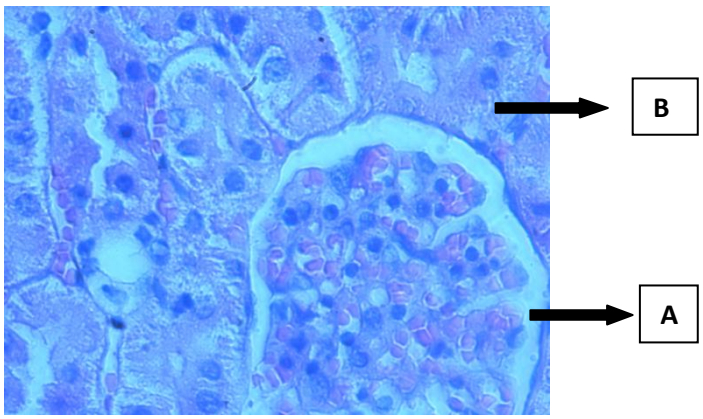


Figura 23. Microfotografía de riñón de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* Mc4100wt, se encontró sin cambios histopatológicos aparentes. A) Glomérulo renal B) Túbulo Contorneado, tinción H-E., 400x.

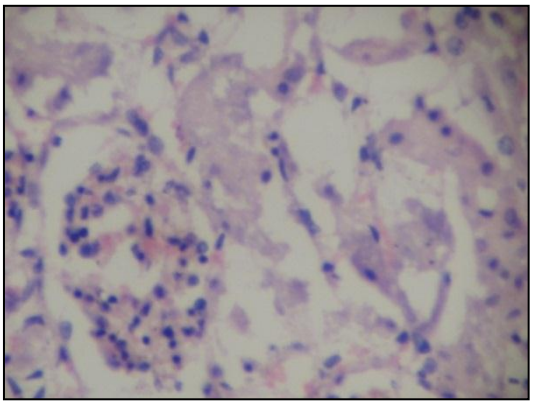


Figura 24. Microfotografía de riñón de conejo inoculado con la cepa de *Escherichia coli* EDL-933, se encontró necrosis glomerular, tinción H-E., 400x.

VIII. DISCUSIÓN

Las cepas empleadas en el presente trabajo fueron obtenidas previamente de un brote de enfermedad en cerdos y se seleccionaron todos los aislamientos pertenecientes al serotipo O157:H7. Sin embargo al comparar los resultados de la presencia de los genes reportados por Vázquez y los obtenidos en el presente trabajo (Cuadro 1 y Cuadro 7) se observaron discrepancias, como por ejemplo: en la cepa EDI- 200 ella menciona que presenta los genes a *stx*1, *stx*2 y *eae*A, en el presente trabajo solo presento el gen *eae*A, en la cepa EDI- 222 en el trabajo de Vázquez no presenta ningún gen y al realizar las pruebas de PCR presento *stx*1, *stx*2 y *eae*A. Esto pudo deberse a un inadecuado marcaje de los viales que contenían las cepas en almacenamiento.

A pesar de que las cepas problemas desarrollaron en los conejos signos clínicos iguales, las diferencias en tiempos y severidad nos marcan un contraste elemental. Las cepas problema EDI-200, EDI-221 y EDI-228 en un tiempo más prolongado, como la diarrea que se presentó hasta el 4to día post-inoculación, mientras que en las cepas EDL- 933 y EDI-222 se presentó al 2do día post-inoculación. Esto podría deberse a las diferencias genotípicas que presenta cada una de las cepas (Cuadro 7) por lo que el tener los tres genes al mismo tiempo les confiere mayor virulencia Brandt, 1995. Este efecto en los conejos sugiere que los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A en todas las cepas se están expresando.

Los animales desarrollaron diarrea, deshidratación, mucosas pálidas, anorexia, cianosis y disnea, con una severidad que dependió de la cepa empleada, correlacionando ésta con la portación de los tres genes al mismo tiempo como se observa en el Cuadro 8. Este hecho fue reportado previamente por Cuellar, 2002 al observar que los mayores efectos se han tenido con cepas portando todos los genes de virulencia, por lo que los signos clínicos más severos se presentaron con la cepa EDI-222.

En virtud de que los animales empleados desarrollaron los signos clínicos y lesiones en un tiempo muy corto y de que solo se emplearon tres conejos fue necesario calcular la tendencia de los valores a lo largo del tiempo, línea de tendencia central.

En la formula roja los grupos inoculados con la cepa EDI-221 y EDL-933 presentaron una anemia al segundo día post inoculación, siendo más severa en la cepa de referencia (Figura 2), esto podría deberse a que esta pertenece al grupo de las altas productoras de citotoxinas como lo menciona Palacios en 1992, mientras que las cepas de cerdo son bajas productoras de citotoxina mencionado en el trabajo de Vázquez. El grupo inoculado con la cepa EDI-222 y EDI-228 solo presentó una tendencia a la disminución en el hematocrito. Las demás grupos entran dentro de los rangos normales.

Los conejos inoculados con la cepa EDI- 200 presentaron una tendencia al aumento en la formula roja, probablemente a la deshidratación del animal,

causada por la diarrea severa que manifestó (Figura 2, 3, 4), quizá por la presencia del gen *eae*A, el cual participa en la adherencia bacteriana a las células del epitelio intestinal en los cerdos, el cual esta mediado por adhesinas, mencionado por Nataro en 1998.

En relación a los Glóbulos Blancos (GB) hay una tendencia a la disminución muy marcada en la cepa EDL-933 (Figura 6) esto podría deberse a que los conejos tienen receptores en leucocitos, linfocitos y neutrófilos para las toxinas, que los destruye. La tendencia aumentar en leucocitos y linfocitos se presentó en los conejos inoculados con las cepas EDI-200, EDI-228, EDI-222 y Mc4100wt podría deberse a que estas cepas poseen otros factores de virulencia como LPS (Figura 7 y 8).

En cuanto a los resultados obtenidos en el conteo de las plaquetas en los conejos inoculados hay una tendencia a la disminución con las cepas EDI-221, EDI-222 y EDL-933 (Figura 5) la cual nos indica una trombocitopenia, la causa de está, podría deberse a una lesión en el endotelio de los pequeños vasos sanguíneos y a depósitos de fibrina en estos microvasos, esto tiende a presentar puntos de impacto en donde el glóbulo rojo se destruye en su tránsito por la sangre provocando una anemia microangiopática la cual es una característica de el Síndrome Urémico Hemolítico como lo menciona Karmali, 1983. Esto se atribuye a que estas cepas tienen uno o los dos genes de *stx*1 y *stx*2.

La urea en el presente trabajo se encontró una tendencia aumentar en la cepas EDI-228, EDI-222 y EDL-933 al contrario con el grupo inoculado con las cepas EDI-200 y Mc4100wt la cuales tuvieron una tendencia a disminuir. No sucedió lo mismo en relación con la creatinina, ya que el grupo inoculado con la cepa EDI-222 tuvo una tendencia al aumento, mientras que el grupo de la cepa EDL-933 disminuyó. Las demás grupos entraron dentro de los rangos normales (Figura 9 y 10).

Los resultados encontrados en el hemograma de los conejos que se inocularon con la cepa EDI- 222 que presentan una tendencia a aumentar en urea y creatinina nos habla de un daño en riñón, una insuficiencia renal aguda provocada por los genes *stx*1 y *stx*2 que actúan directamente sobre las células endoteliales glomerulares alterando la tasa de filtración de las células del riñón, debido a su gran contenido de Gb3 que las convierte en las células más susceptibles a ser atacadas por la toxina, provocando así la IRA. Tomas, 1995.

Varios modelos animales han sido desarrollados para estudiar la patogénesis de la infección, sin embargo en ninguno de ellos se ha logrado producir la triada del SUH que menciona Karmali, 1983, en el presente trabajo se observaron dichas las características en la cepa EDI-222, que tiene los tres genes (*stx*1, *stx*2 y *eae*A).

En estudios anteriores se ha determinado que el animal más importante en infección humana es el ganado vacuno, pero estos resultados demuestran que los cerdos también podría ser otra fuente de infección.

Las lesiones encontradas a la necropsia en los diferentes grupos inoculados fueron muy similares, (Cuadro 9) solo que los tiempos fueron distintos, siendo que las cepas EDL-933 y EDI-222 murieron a los 3 días mientras que los demás grupos inoculados fueron hasta los 5 o 6 días. Lo cual nos indica que las cepas que presentan los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A, son más virulentas, aunque las cepas que provienen de enfermedad en cerdo son bajas productoras de toxina.

Lo que se encontró en todos los individuos fue una ligera adherencia en peritoneo, en el lugar donde se encontraba el segmento inoculado, esto posiblemente por la manipulación que hubo durante la cirugía, en el grupo inoculado con la cepa Mc4100wt, fue la única lesión que se encontró, los demás órganos se encontraban sin ningún cambio patológico aparente, incluso el segmento de apéndice cecal inoculado solo se encontraba ligeramente pálido, pero mantenía irrigación.

El grupo inoculado con la cepa EDI-222 fue el único grupo que presentó una lesión a nivel nervioso, que fue la congestión (figura 13), este puede ser un efecto directo de la toxina sobre el sistema nervioso central, y puede estar mediado por el receptor Gb3, esto ya se ha visto en otros trabajos como el de Francis y col, en cerdos afectados con cepas O157:H7 y Stx2, pero en este trabajo se describieron signos clínicos, que posiblemente podrían haberse presentado en este modelo, solo que la agresividad de las toxina en otros órganos, no permitió la sobrevivencia de estos individuos.

Valdivia en 1995, describe lesiones vasculares sobre sistema nervioso central en conejos inoculados con cepas O157:H7, pero presentan un cuadro de parálisis de tren posterior, por lo que podríamos describir a la cepa EDI-222 como neurotóxico, a pesar de que los individuos no presentaron una signología nerviosa.

Entre las lesiones más severas que se pudieron observar, fue úlceras gástricas hemorrágicas en todos los grupos inoculados con cepas O157:H7, pero los grupos inoculados con la cepa EDI-222 tuvieron una mayor severidad siendo que esta llego a perforar el estómago, esta lesión no ha sido reportada en ningún modelo animal inoculado con cepas enterohemorrágicas ni en casos de SUH, siendo quizá una nueva patología de las cepas, aunque en la cepa EDL-933 no llego a la misma perforación, las úlceras eran muy severas. También se mostraron daños en la mucosa intestinal que se tornó translúcida.

El efecto en el sitio de la inoculación en las cepas EDI-221 y EDI-222, fue muy severo presentando una necrosis del apéndice cecal, que puede ser debido al gen *eae*A que tienen un efecto directo en el enterocito de “attaching and

effacement". A pesar que las cepas provenientes de cerdo son consideradas como bajas productoras de toxina.

La atrofia de bazo es también una lesión característica de las cepas O157:H7, ya que todos los grupos inoculados con este tipo de cepas presentaron una disminución marcada en el tamaño, siendo por primera vez reportada por Valdivia en 1995 en conejos, y posteriormente reportada por Brambila y Martínez en 2006 igualmente inoculada en conejos. A pesar de que las características genéticas de las cepas son diferentes, la lesión se presenta, aunque en menor severidad.

Por otra parte las lesiones encontradas en riñón, en las cepas EDL-933 y EDI-222, fueron muy similares, la nefromegalia estuvo presente en todos los individuos de estos grupos, los riñones presentaba congestión y edema, esta lesión se puede asociar con la presencia de stx2 en ambas cepas, que se caracteriza por la inhibición de la síntesis proteica en los órganos blanco y siendo quizá el riñón el órgano que presenta los receptores Gb3 en la corteza renal, por lo que el órgano se ve más afectado.

Con base a los resultados obtenidos en la histopatología, pudimos observar que la cepa EDL-933 y EDI-222 que poseen los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A, presentan un mayor grado de lesión en cuanto a la deplesión linfoide de bazo, como lo mencionó Thomas en 1996, sin embargo también pudimos observar que no es tan necesaria la presencia de dichas toxinas ya que las cepas EDI-221 y EDI-200 que no presentan los tres genes, tienen la misma lesión, aunque en menor severidad. Pudiendo ser que la causante de la lesión sea el gen *eae*A que es el único gen que se encuentra presente en todas las cepas, y la presencia de los genes *stx*1 y *stx*2 agrave la lesión.

Las lesiones en riñón más severas que se obtuvieron fueron, necrosis de túbulos contorneados y necrosis glomerular que son las más importantes en el funcionamiento del órgano, y este se vio más dañado en el grupo inoculado con las cepas EDL-933, EDI-222 y EDI-221, como podemos observar en la Figura 24, en donde se demuestra el daño celular provocado por la cepa a comparación de la Figura 23 en donde no se muestran cambios patológicos estas cepas tienen en común el gen *stx*1 que ha sido mencionado como el gen que ataca dicho órgano provocando lesiones muy similares con lo que reporta Hughes y col, en 2001 en los casos de síndrome urémico hemolítico,

Los grupos inoculados con las cepas EDI-221, EDI 222 Y EDL-933, también demostraron daño en túbulos, que se caracterizó por una necrosis, y congestión en todo, con lo cual se ven alteradas las funciones del órgano, estas lesiones ya habían sido descritas por Taguchi en 1998.

La necrosis glomerular que se observó, fue similar a la que reportó Jaime y col, 2003, en un brote de SUH en humanos. A pesar de que la cepa proviene de una enfermedad en cerdos, en estos no se ha reportado daño glomerular. Pero ya que se ha demostrado la presencia de receptores para la toxina en riñón a nivel glomerular, la lesión que encontramos es explicada por este hecho.

Podría ser que el conejo al igual que el humano, la corteza del riñón expresa gran cantidad de glicoproteína Gb3, por lo cual es el órgano más afectado por contar con los receptores adecuados para la unión de la toxina, y por lo tanto presenta las mismas lesiones al inocular la cepa de humano y la cepa de cerdo, y las que se han reportado en SUH.

A pesar de la diferencia genética de las cepas todas se comportaron con una deplesión linfoide marcada en apéndice cecal como Brambila y Martínez en 2006 encontraron inoculando cepas O157-H7, posiblemente por ser el órgano de inoculación, a excepción de los grupos inoculados con las cepas EDI-228 y MC4100wt que no tuvo cambios significativos.

IX. CONCLUSIONES

Las cepas aisladas de enfermedad en cerdo que presentan los genes *stx*1, *stx*2 y *eae*A causan las mismas lesiones en el conejo que la cepa de humano, siendo estas más virulentas.

Los signos clínicos presentados fueron de mayor gravedad en aquellos animales inoculados con las cepas que poseen los tres genes (*stx1, stx2 y eae*A).

Las cepas aisladas de enfermedad en cerdo provocaron el SUH y la colitis hemorrágicas en los conejos, características de cepas productoras de toxina de Shiga.

2 animales inoculados con las cepas de origen porcino presentaron perforación de Estomago, esta lesión no ha sido descrita previamente en el SUH en humanos.

Las cepas que presentan los genes *eae*A, *stx*1 y *stx*2, causaron mayor deplesión linfoide en el bazo.

La sola presencia del gen *eae*A es suficiente para causar lesiones similares a las de SUH, aunque sea poco virulenta.

La histopatología de las cepas de humano inoculada en conejo fueron igual que las provocadas por las cepas que provienen de enfermedad en cerdos.

Los animales presentaron al mismo tiempo uremia, hemolisis y trombocitopenia, características observadas en el SUH del humano.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Aranguré P. Desarrollo de un modelos experimental en bovinos para estudios de factores auxiliares de virulencia de una cepa de *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga (Tesis Maestría). FES-C, UNAM. México. 2010
2. Benjamin M, Datta A. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli.* Appl. Environ. Microbiol. 1995; 1(4): 1669-1672.
3. Benz I, MA Schmidt. 1992. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). Infect Immun 1996;60:13-18.
4. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. J Bacteriol 1989;171:4281-4289.
5. Boob CA, Brenner FW, Wells JG, Strokbine N. *Escherichia*, *Shigella,* and *Salmonella*. En: Manual of clinical microbiology. Murray PR, E Jo Baron, MA Faller, FC Tenover, RH Yolken. 7thed Washington, D.C. E d. ASM. Press. 1999:459-474
6. Brambila D, Martínez M. Efecto de los factores auxiliares de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7 sobre los linfocitos tisulares en un modelo en Conejos. Tesis, FES-C UNAM. México 2006
7. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. J Ind Microbiol 1995;15: 214-226.
8. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL (2003) Shiga toxins and apoptosis. FEMS Microbiol. Lett. 228:159-166)
9. Cicuta ME. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina de Shiga en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. Rev Vet 2006;17 (1):20-25.
10. Cobbold R, Desmarchelier P (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herd. Vet. Microbiol. 71: 125-137.
11. Cuellar G. L., López R., Gastelbondo R., 2002, Síndrome Hemolítico Urémico en la población infantil de Bogotá. Pediatrías Universidad del Bosque.
12. Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Philips A, Hall R, Kothary MH et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 1997;65:4135-4145
13. Delgado N. Procesamiento para muestras en microscopia, primera edición, UNAM, México D.F, 2009

14. Donnenberg MS, Girón JA, Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. Mol Microbiol 1992;6:3427-3437.
15. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaría de Salud México, 1994: 251
16. Estrada F.E. Manual de técnicas histológicas. AGT Editor. México. 1982; 27-70
17. Francis, D. H., R. A. Moxley, C. Y. Andraos. 1989. Edema diseases- like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7, *Infect. Immun.* 57: 1339 - 1342.
18. Gaete B.A. Manual de técnicas histológicas para Médicos Veterinarios Zootecnistas. Tesis de licenciatura. FES-C, UNAM. México. 1996
19. García A. C. 2004. Detección del gen stx2 en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Barcelona.
20. Geldreich, E. E., K. R. Fox, J. A. Goodrich, R. M. Chark, y D. L. Swerdlow. 1992. Searching for a watte supply connetion in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. Water Res. 26:1127-1137
21. Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enropathogenic *Escherichia coli.* Science 1991;254:710-713.35.
22. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 1991; 13: 60-98.
23. Hernández R, Fernandez P., Baptista. 1993. Metodología de la Investigación. MC. Graw-Hill. México, D.F.
24. Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW: Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. Infect Immun 2001; 69:6148-55.
25. Jaime, F.J.C., Delgado, G.Y, Castillo, D.G. Síndrome Urémico Hemolítico Rev. Cuba Hematol Inmunol. Hemerot 2003.pp.19, 2-3.
26. Karch, H., M. Bielaszenwska, M. Bitzan, y H. Schimidt. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34:229-243.
27. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C, Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 1983;1:619-620.
28. Lindgwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. Trends Microbiol 1996; 4:147-153.
29. López S., Catalina., Cerna, Jorge F., Villegas S. Nicolás., Thompson, Rocío., Velázquez, F. Raúl., Torres, Javier., Tarr, Phillip I., Estrada G., Teresa. 2003. Single Multiplex Polimerase Chain Reaction To Detect

Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases Vol. 9, No. 1, January.

30. Mattar S, Vázquez E. Importancia de la vigilancia de un brote de *Escherichia coli*. Bol Oficina Sanitaria Panamericana 1996;120:523.spm21
31. Mc Veigh A, Fasano A, Scott DA, Jelacic S, Moseley SL, Robertson DC et al. IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. Infect Immun 2000;68:5710-5715.
32. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, *et al* (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. I. J. Food Microbiol. 96: 189-198.
33. Meng, J. y M. P. Doyle. 1998. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods, p. 92-108. In J. B. Kaper and A. D. O´Brien (eds.), AMS Press, Washington D. C.
34. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Leviene MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human eritrocytes. Infeact Immun 1992;60:2297-2304.
35. Nataro JP, Karper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli.* Clin Microbiol Rev 1998;11:142-201
36. Naylor S.W. Gally.D.L., Low. J.C 2005.Enterohaemorragic *E. coli* in veterinary medicine. International Journal of Medical Microbiology. 295:419-441
37. O´Brien A, GD LaVeck, MR Thompson, Formal SB. 1982. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli.* J Infect Dis 1977;146:763-769.
38. Palacios M.M.A. 1992 Detección de citotoxina (SLTilv) en cepas de Escherichia coli de origen porcino. Tesis ECNB. IPN. México.
39. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, *et al* (2000) Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. Eur. J. Epidemiol. 16: 757-762.
40. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983;308:681-685.
41. Rosa AC, Mariano AT, Pereira AM, Tibana A, Gómez TA, Andrade JR. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. J Med Microbiol 1998;47:781-79038.
42. Sears CL, Kapper JB. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Revs 1996;60:167-215.

43. Su Ch, Brandt L. *Escherichia coli* 0157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. Clin Infect Dis. 1995; 20:1-10.
44. Swerdlow, D. L., B. A. Woodruff, T. C. Brandy, P. M. Griffin, S. Tippen, H. D. Jr. Donnell, E. Geldreich, B. J. Payne, A. Jr. Meyher, J. G. Wells, K. D. Greene, M. Bright, N. H. Bean, y P.a. Blake. 1992. A waterborne outbreak in Missouri of Escherichia coli O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. Ann. Intern. Med. 117:812-819.
45. Taguchi CM, Uchida H, Kiyokawa N, Mori T, Horie H, et al (1998) verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. Kidney Int. 53: 1681-1688
46. Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. Clin Infect Dis 1995;20:1-10.
47. Tomas A, Cheosty T, Fost J, Chart H, Smith H, Rowe B, Verocytotoxin, producing *Escherichia coli*, particulary serogroup 0157 associated with human infections in England and Wales: 1992-1994 Epidemiol- Infect 1996;117:1-10
48. Valdivia G. Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de verotoxinas (VT) de *Escherichia coli.* Tesis, FES-C. UNAM. México. 1995
49. Valdivia G. Evaluación de las alteraciones inducidas en el conejo por *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en el apéndice cecal. Tesis, FESC-UNAM. México, 2002.
50. Valdivia G., Montaras, J.A., Tortora, Perez, J.L. Limphotoxin effects of verocytotoxin producing *E. coli* in rabbit caecum 3° international symposium and work shop of Shiga toxin producing *E. coli* infection. Baltimore Maryland U.S.A 1997.
51. Vázquez Cl. Aislamiento y caracterización patogénica de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas semejante a Shiga de cerdo con enfermedades del edema (tesis de licenciatura), FES-C, UNAM. México. 2008
52. Vial PA, Robins R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP et al. Characterization of enteroadherente-aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 1988;158:70-79. Spm38
53. World Heatl Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC). Repor of a WHO scientific workin group meetin. 1998.
54. Zamora J., Reinhartdt G., Polette M., Macias P. 2000 Detección rápida en el diagnostico de *Escherichia coli* toxigenica productora de LT y VT, Instituto de microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de chile, casilla 167, V32n.1 pag.3-9.