

# Interacción de cepas verocitotóxicas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros

Guillermo Valdivia Anda \*  
Rocío Cervantes Rosales \*\*  
Diana M. Soriano Becerril \*\*  
Fernando Alba Hurtado \*  
Juan A. Montaraz Crespo \*  
Jorge L. Tórtora Pérez \*

---

## Abstract

An outbreak of dysenteric diarrhoea in calves of 1 to 20 days of age, with an acute course characterized by gastroenteric oedema, nervous signs and antibiotic treatment failure was studied. Tests for parasite, bacteria and rotavirus were carried out. *Escherichia coli* verotoxin producing strains (verotoxin or Shiga-like toxin, STX) were positive in 63.7% of the *E. coli* isolates, corresponding to 86.5% of the diseased animals. Rotavirus was detected in 24% of the sick calves by PAGE electrophoresis, and differences in the RNA migrating patterns were present. In all animals positive to rotavirus, *E. coli* STX strains were identified. The percentage of calculated risk was 100% where *E. coli* STX infection could induce rotavirus; meanwhile STX strains infection remained independent from the viral disease. These results point out that *E. coli* STX strains could be the primary aetiological agent of neonatal toxæmia on calves, and strongly reinforce the importance of the bovines as reservoirs of these cytotoxic bacteria involved in the human haemolytic uremic syndrome.

**Key words:** CALF DIARRHOEA, VEROCYTOTOXIC *ESCHERICHIA COLI*, HUMAN HAEMOLYTIC UREMIC SYNDROME, ROTAVIRUS-E. *COLI* INTERACTION, PUBLIC HEALTH.

## Resumen

Se estudió un brote de diarrea hemorrágica en becerros de 1 a 20 días de edad, de curso agudo, con edema gastrointestinal, signos nerviosos y sin respuesta al tratamiento con antibióticos. Se realizaron estudios parasitológicos, bacteriológicos e identificación de rotavirus. Se determinó en las cepas de *Escherichia coli* aisladas la capacidad de producir citotoxinas sobre células vero. El 63.7% de las cepas aisladas de *E. coli* resultaron verocitotóxicas (productoras de toxina vero o de toxina shiga, Stx), estas cepas se aislaron del 86.5% de los animales afectados. En 24% de estos animales se determinó la presencia de rotavirus mediante electroforesis en PAGE. Se encontraron variaciones en la movilidad electroforética de las bandas. Todos los casos con identificación de rotavirus correspondieron con la presencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga (STEC) en el intestino. El porcentaje de riesgo calculado, de presentar infección con rotavirus atribuible a la infección con *E. coli* STX, fue de 100, no existió, en cambio, riesgo de presentar cepas STX si se presentaba una infección primaria con rotavirus. Los datos sugieren que las cepas citotóxicas son agentes primarios de infección y toxemia neonatal en bovinos; a la vez, se refuerza el probable papel de los bovinos como reservorios de cepas citotóxicas que afectan al humano y determinan el síndrome urémico hemolítico.

**Palabras clave:** DIARREA EN BECERROS, *E. COLI* VEROCITOTÓXICA, SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO DEL HUMANO, INTERACCIÓN ROTAVIRUS - *E. COLI*, ZOONOSIS.

---

Recibido el 18 de octubre de 1999 y aceptado el 26 de abril de 2000.

\* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Ciencias de la Salud Animal, km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, 54700, Estado de México, México. Tel. 58-72-46-46.

\*\* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Carpio y Plan de Ayala, Col. Casco de Santo Tomás, 06400, México, D. F.

## Introducción

Tradicionalmente las cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea se han dividido en cinco grupos: Enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroadherente (EAEC) y enterohemorrágica (ECEH).<sup>1-6</sup>

En el grupo de las enterohemorrágicas, la producción de verocitotoxinas (STX) con capacidad de destruir células eucarióticas, representa el principal mecanismo de patogenicidad, estas cepas no producen toxina termoestable (ST) ni termolábil (LT) y no son invasivas.<sup>2</sup> Estas bacterias han cobrado gran interés en los últimos años por los cuadros que determinan en el humano en países desarrollados, particularmente el conocido como síndrome urémico hemolítico (SUH) y su vinculación con el consumo de alimentos contaminados, especialmente cárnicos de origen bovino.<sup>7-9</sup>

En animales infectados natural o experimentalmente, las lesiones producidas por cepas de *E. coli*, productoras de citotoxinas, ocurren principalmente en ciego y colon distal; con presencia de erosiones y úlceras, histológicamente los enterocitos se presentan cuboidales y no parece existir predisposición particular por algún tipo de célula en la mucosa. También se puede observar edema extenso, erosiones, úlceras y hemorragias en otros sitios del tracto gastrointestinal, sin que se demuestre colonización bacteriana, el aspecto de la diarrea ha sido definido como "disenteriforme".<sup>4,5,10</sup>

Los cuadros clínico-patológicos que se presentan en bovinos por estas cepas de *E. coli* son: septicémico, enterotóxico y enterotoxémico (enfermedad edematosa bovina). A pesar de que se aíslan frecuentemente cepas ECEH, productoras de STX, en bovinos, son pocas las comunicaciones en las que se les ha podido asociar con cuadros clínicos entéricos. En un caso se estudió un cuadro de diarrea disenteriforme con identificación de cepas EPEC que no produjeron STX; los cuatro animales involucrados no respondieron a la terapia de líquidos, electrolitos, transfusiones de plasma y antibióticos;<sup>11</sup> mientras que en otros trabajos en que se estudiaron situaciones de diarrea y enfermedad entérica en bovinos, en un caso se aisló una cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo O157:H7 y en otro se aislaron cepas productoras de STX y se identificaron distintos serotipos.<sup>4</sup>

La patogenicidad y patología de estas cepas citotóxicas de *E. coli* en el bovino no ha sido completamente esclarecida. El problema se ha estudiado fundamentalmente considerando al bovino como un reservorio y fuente de infección para el humano, a través de los alimentos contaminados, dado que se han identificado los mismos serotipos bacterianos y tipos de STX en ambas especies.<sup>4,7,8</sup>

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae, su genoma está formado por once segmentos de doble cadena de ARN. Esta particular estructura permite su

reconocimiento diagnóstico por electroforesis (electroferotipo) e incluso su caracterización taxonómica y epidemiológica.<sup>10,12</sup>

Las infecciones por rotavirus en animales domésticos están restringidas al intestino delgado (yeyuno-íleon) y determinan trastornos en la absorción de nutrimentos al producir disminución del tamaño y fusión de las vellosidades.<sup>13</sup> En los bovinos se han descrito infecciones en las cuales todos los diagnósticos correspondieron a un mismo electroferotipo<sup>14</sup> o a patrones diferentes.<sup>15</sup> Se ha comunicado mayor prevalencia del grupo A en los bovinos en donde pueden causar desde infecciones asintomáticas hasta cuadros de diarrea con pérdida abundante de líquido y desbalance electrolítico. La diferente presentación se atribuye a la variación en la virulencia de las cepas, edad de los animales, estado inmunológico, dosis infectante, estrés ambiental, así como infecciones asociadas. En un estudio de varias explotaciones, la incidencia de infecciones por rotavirus varió del 7% al 11%, con 26.9% de aislamientos positivos, y se determinó que en terneros de una semana de edad fue común encontrar infecciones asociadas que incluyen la presencia de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas.<sup>16</sup> Por otra parte, se ha puesto en duda la importancia de los rotavirus como agentes primarios en las afecciones diarreicas, particularmente por lo que se ha observado en cerdos.<sup>17-19</sup> No se han informado casos de asociación de infecciones por rotavirus y por *Escherichia coli* productoras de STX.

En este trabajo se demuestra la presencia de cepas de *E. coli* citotóxicas y de rotavirus asociadas con un brote de diarrea hemorrágica en terneros, se analiza la relación entre estos agentes como factor de riesgo y como determinantes de lesiones intestinales en los bovinos.

## Material y métodos

En un hato ubicado en el municipio de Tepetzotlán, Estado de México, México, se presentó un brote de diarrea en las áreas de lactancia. La explotación es de tipo intensivo, en áreas separadas para cada fase de desarrollo (lactancia, recría, engorda, gestación y parto), la alimentación consistía de concentrados elaborados en la misma unidad o de origen comercial, y henificados comprados fuera de la explotación; los animales pertenecían a razas puras (Holstein y Suizo) y a cruza (Suizo-Cebuino-Holstein). El área de lactancia donde se presentó el problema tenía instalaciones separadas del resto de la explotación, muros de concreto, con tapetes sanitarios y personal exclusivo para ella. En la inspección se constató que contaba con un buen manejo higiénico general.

Se examinaron 96 muestras de heces, 84 correspondieron a becerros de uno a 20 días de edad del área de lactancia, que presentaban, o habían presentado, dia-

rea hemorrágica; 12 se colectaron al azar de animales adultos, clínicamente sanos, pertenecientes al área de cría y desarrollo I, de entre 1 y 1.5 años de edad, durante un periodo de 11 meses.

Las muestras de heces fueron recolectadas con hisopos estériles en frascos de vidrio en condiciones de asepsia, directamente del ano de los animales, posteriormente fueron almacenadas en refrigeración hasta su estudio.

Los datos de los principales hallazgos a la necropsia se obtuvieron en algunos casos en forma directa y en otros fueron proporcionados por el médico veterinario encargado del área.

## **Histopatología**

Durante la necropsia se tomaron muestras para realizar estudios histológicos de los órganos que presentaron lesiones macroscópicas, y en todos los casos de intestino delgado (yeyuno-íleon) y abomaso. Las muestras se fijaron en formol amortiguado al 10%, para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5 mm de espesor, que se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina y se montaron con resina, según técnicas de rutina,<sup>20</sup> para su observación al microscopio.

## **Examen coproparasitoscópico**

Para su evaluación microscópica en examen directo las muestras fueron procesadas mediante la técnica de flotación, en busca de parásitos o sus formas de desarrollo y reproducción.<sup>21</sup>

## **Aislamientos bacteriológicos**

Las muestras de heces se sembraron, sin ningún tratamiento previo, sobre placas con agar eosina azul de metileno, agar Mac Conkey, agar Campy Bac, agar verde brillante y agar *Salmonella-Shigella*,\* las cuales fueron incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Asimismo, se inoculó un tubo con caldo selenito\* que se incubó 18 h y se resembró sobre agar Mac Conkey. Al finalizar el periodo de incubación, las cajas se revisaron y se evaluó el crecimiento bacteriano. Para la identificación bacteriológica se utilizaron pruebas bioquímicas interpretadas en forma rutinaria.<sup>22,23</sup>

## **Cepas de referencia**

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *E. coli* 933 (O157:H7) productora de "Shiga like toxin I" (SLTI)

\* Bioson.

\*\* Sorvall.

\*\*\* Millipore.

† Sigma.

y SLTII; *E. coli* 933J productora de SLTI; *E. coli* 933W productora de SLTII y *E. coli* K12 C600, cepa avirulenta empleada como testigo negativo. Para evaluar el efecto toxigénico se utilizaron células vero (células de riñón de mono verde africano) en su pase 146.

Para establecer los patrones electroforéticos del rotavirus se utilizó una cepa de rotavirus de simio (SA11) como referencia.

Las cepas de *E. coli*, células y el virus fueron donadas por los laboratorios de Virología y de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN).

## **Obtención de la toxina**

Para la obtención de la verotoxina, se colocó una colonia de cada una de las cepas problema en 5 ml de caldo soya tripticaseína\*\* estéril (CST), se incubó durante 24 h a 37°C. El cultivo obtenido se centrifugó a 17 000 g durante 30 min en una centrifuga refrigerada,\*\* se separó el sobrenadante y se filtró con 0.45 µm\*\*\*. El filtrado que se obtuvo se utilizó para los ensayos subsiguientes de citotoxicidad sobre células vero.<sup>24,25</sup>

## **Identificación de la toxina semejante a Shiga**

Los cultivos con 100% de confluencia de células de riñón de mono verde africano (Vero), pase 146, mantenidas en medio mínimo esencial (MEM) en botellas de 50 cm<sup>2</sup>, se trataron con tripsina† al 0.05% y se resuspendieron en MEM con suero fetal bovino al 10%, ajustando a una concentración celular de 10<sup>5</sup> células por ml. De esta suspensión se colocaron 100 µl en cada pozo de una microplaca de 96 pozos, las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> hasta tener 70% de confluencia del cultivo celular. Posteriormente se agregaron 100 µl del filtrado obtenido de las cepas problema. Las placas se incubaron durante 72 h y se realizaron observaciones diarias de la posible aparición del efecto citopático que caracteriza a las toxinas SLT.<sup>24,26-28</sup>

## **Identificación de rotavirus**

Para el corrimiento electroforético se utilizó un gel espaciador de poliacrilamida al 5% y un gel concentrador al 3%. Las condiciones de corrimiento fueron de 20mA/200V hasta la entrada de las muestras al gel espaciador, después se aumentó a 40 mA hasta la salida del colorante. El gel se reveló mediante tinción con solución de nitrato de plata y posteriormente se secó empleando un secador de geles marca LKB.<sup>12</sup> El gel se fotografió con película Kodak de alto contraste a trasiluminación.

## Pruebas serológicas

A los animales en estudio se les realizaron pruebas de seroneutralización para determinar la presencia y cantidad de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB) y el de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR). Estos estudios fueron realizados en el Centro de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA).

## Análisis estadístico

El cálculo de las medidas de riesgo atribuible y relativo fue realizado de acuerdo con Morton.<sup>29</sup>

## Resultados

### Signos y lesiones en los bovinos

El signo clínico que se observó en forma dominante en los becerros de 1 a 20 días de edad fue la diarrea hemorrágica. En 60% de los casos las heces presentaron sangre completa y los animales una deshidratación severa. En 70% de los casos se observaron signos nerviosos con pataleo, tortícolis y muerte rápida. El cuadro clínico con diferente presentación resultó inusualmente severo, con una morbilidad de 80% y una mortalidad que alcanzó 60%. Los animales no respondieron a la administración de antibióticos por vía oral y endovenosa, ni a la terapia de restitución de líquidos por vía endovenosa a la que fueron sometidos.

Las lesiones en los 15 casos en que fue posible realizar la necropsia consistieron en enteritis hemorrágica en íleon y ciego y úlceras en abomaso, intestino delgado (yeyuno-íleon) e intestino grueso.

Diez animales presentaron distensión de las asas intestinales con acumulación de líquido y sangre en cantidad escasa. En 14 animales se observó edema subcutáneo y gástrico.

### Histopatología

Las principales lesiones histológicas encontradas en los 15 bovinos fueron: enteritis no supurativa, destrucción marcada de enterocitos con acortamiento y necrosis de las vellosidades. En cinco casos se presentó fusión con infiltrado de mononucleares en la submucosa; algunas células de la submucosa presentaron pigmento ocre. En 13 animales se observaron úlceras en abomaso e íleon, con infiltrado polimorfonuclear y fibrina en la superficie.

En 12 casos la pulpa blanca del bazo presentaba una menor cantidad de células linfoides, comparada con el aspecto que presenta en animales sanos.

En el riñón, encéfalo, hígado y pulmón, no se encontraron cambios histopatológicos relevantes, sólo se

observaron lesiones leves, focales, de tipo supurativo, con infiltrado discreto de neutrófilos en pulmón.

## Exámenes parasitológicos

En los exámenes coproparasitológicos realizados no se observaron estructuras parasitarias; en los cortes histológicos tampoco existió evidencia de coccidiosis u otra parasitosis.

## Aislamientos bacteriológicos

Los intentos de aislamientos bacteriológicos fueron negativos para bacterias enteropatógenas como *Salmonella*, *Shigella* o *Campylobacter*. En las muestras de heces de los 84 becerros y los 12 adultos se desarrollaron colonias sugestivas de *E. coli* sobre EMB.

## Evaluación de verocitotoxinas

Por el procedimiento anterior, se seleccionaron 480 cepas de *E. coli* a partir de los cultivos, 420 de lactantes y 60 de animales adultos.

De los 420 primoaislamientos seleccionados de los becerros, 268 cepas resultaron verocitotóxicas (63.8%), mientras que de las 60 cepas seleccionadas de los primoaislamientos de animales adultos, ninguna resultó verocitotóxica.

El efecto citotóxico presentado por los sobrenadantes de las 268 cepas, sobre los cultivos de células vero fue cualitativamente de la misma intensidad, destrucción total del monoestrato celular y rapidez, que el de la cepa 933 (productora de SLTI y II) empleada como testigo positivo. Este efecto se presentó desde las 24 h de incubación y a las 48 h la destrucción del cultivo celular fue total. En algunos ensayos se pudo apreciar un efecto citotónico (redondeamiento sin lisis) sobre las células a las 24 h de observación, posteriormente se lisaban (efecto citotóxico).

Para evaluar el número de animales positivos, se consideró como positivo el que al menos en una de las cepas probadas del aislamiento se demostrara la presencia de citotoxina en el ensayo cualitativo. Los resultados de este análisis mostraron que de las 84 becerras analizadas, 71 fueron positivas (84.5%).

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de la cuantificación de la toxina para las cepas 933, 933W, 933J y la cepa 375RPS, una de las cepas aislada de los terneros. Los resultados son promedio de dos determinaciones separadas y se expresan como dosis citotóxicas al 50% en cultivo celular (DC50%/ml), definidas como el inverso de la dilución que aún presenta efecto citopático al menos en 50% del monoestrato celular bajo las condiciones de la prueba. Los resultados obtenidos en cuanto a la producción de toxina para la cepa aislada

**Cuadro 1**  
CITOTOXINAS PRODUCIDAS POR LAS CEPAS DE  
*Escherichia coli* EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

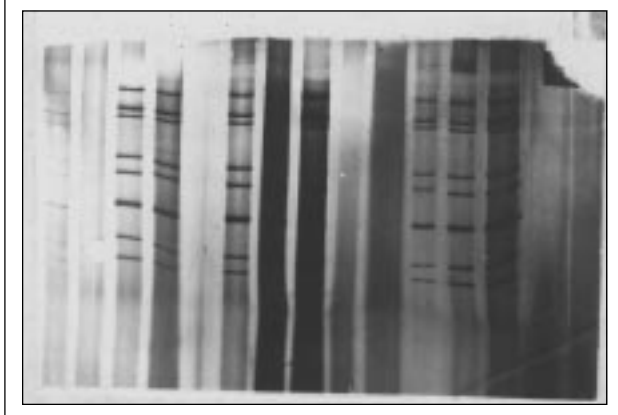
Cepa	Toxina Producida **	Título (DC50%/ml)
933	VT1 y VT2	$5.0 \cdot 10^5$
933W	VT2	$8.5 \cdot 10^4$
933J	VT1	$7.0 \cdot 10^4$
375RPS*	VT1 y VT2	$1.8 \cdot 10^4$

DC50% . Dosis citotóxicas en 50% del cultivo de células Vero. El título se expresa como el inverso de la máxima dilución que causó al menos el 50% de células lisadas.

\* Cepa aislada en el presente estudio.

\*\* Toxina Shiga o Verotoxina 1 o 2 (VT)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



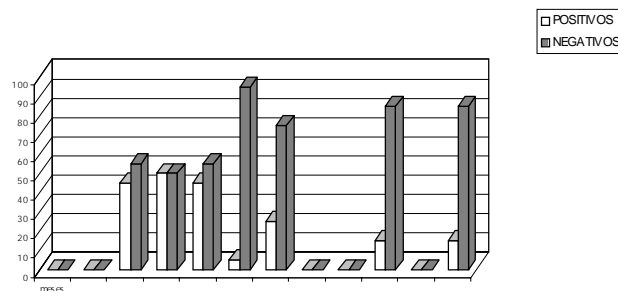
**Figura 1.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de algunas de las muestras de heces de bovino analizadas. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 3% como concentrador y al 5% como espaciador, el revelado se realizó con nitrato de plata y se fotografió con película Kodak de alto contraste a transiluminación. Carril 1; Rotavirus cepa SA-11 carriles 2-15: Extractos de heces de bovinos.

y probada fue casi la mitad de la producción que para las cepas testigo.

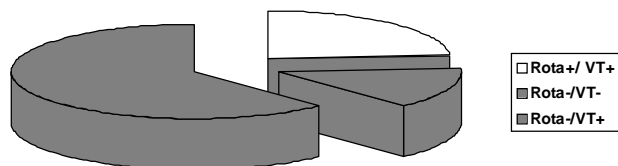
### Identificación de rotavirus

En 27 de las 84 muestras de heces de los animales en lactancia (32%), se identificó un patrón electroforético de ARN correspondiente a rotavirus (electroferotipo); en la Figura 1 se muestran algunos de los electroferotipos encontrados, que correspondieron con el del virus SA11

\* Rotavirus vacune Norden Lab.



**Figura 2.** Frecuencia mensual de Rotavirus en la sala de lactancia.



**Figura 3.** Relación de la presentación de los rotavirus con las cepas de *Escherichia coli* productoras de verotoxina (VT).

usado como patrón de referencia, con algunas variaciones menores en las bandas de ARN; estas variaciones de corrimiento no fueron constantes en los casos de los análisis realizados en diferentes tiempos dentro de la explotación. Las 12 muestras de adultos resultaron negativas a la prueba.

El análisis de la distribución de casos positivos con respecto al tiempo se observa en la Figura 2. Se puede apreciar que los casos positivos a rotavirus fueron disminuyendo con el tiempo, con el consiguiente aumento de los negativos. Se indica el mes cinco, en el que se empezó a utilizar una vacuna con virus inactivado,\* aplicada por vía intramuscular a las hembras gestantes, 15 a 20 días antes del parto.

La relación entre infección por rotavirus y aislamiento de cepas citotóxicas en los becerros se observa en la Figura 3, se aprecia que el mayor porcentaje de relación lo tienen los casos negativos a rotavirus y positivos a *E. coli* citotóxicas.

El cálculo de las medidas de riesgo para los eventos de que los animales tengan cepas de *E. coli* citotóxicas STEC (EC) o rotavirus fueron de: Riesgo relativo = rotavirus 0.0; EC = 0.387; riesgo atribuible = rotavirus 0.24; ECVT 0.380. Lo anterior indica que en este cuadro no existió relación (factor de riesgo) entre la infección por rotavirus y la infección con cepas citotóxicas. Por otra parte, no se encontraron casos en donde sólo se presentara rotavirus sin cepas citotóxicas al mismo tiempo.

## Discusión

El curso de la enfermedad con un corto periodo de incubación, que principalmente afectaba a los becerros en los primeros cinco días de edad, con disentería y signos nerviosos, sugería en principio un agente no bacteriano y hacía presumir la posibilidad de un agente viral o una condición enterotóxica como etiología del problema. A la necropsia, las lesiones se ubicaron casi exclusivamente en el aparato digestivo, las observaciones histológicas resultaron compatibles con un cuadro de etiología viral, con enteritis no supurativa y destrucción de vellosidades sin un proceso inflamatorio severo.

Por otra parte, las marcadas alteraciones vasculares en el tracto digestivo, que determinaban la disentería, con gastritis y enteritis necrótico-hemorrágica ulcerativa, sugerían un cuadro tóxico o enterotoxémico, que resultaba semejante al descrito en la bibliografía para las infecciones por *E. coli* citotóxicas.<sup>10,13</sup> Los resultados de los estudios bacteriológicos eliminaron la posibilidad de otros patógenos bacterianos que pudieran haber dado un cuadro semejante, aunque la edad de los becerros afectados y las características del mismo no correspondieran completamente con lo observado, como pudiera haber sido el caso de *Salmonella*.<sup>10,13</sup> Estos resultados se consideran confiables, dado que en ninguna de las 84 muestras trabajadas se obtuvo desarrollo de este tipo de bacterias. El hecho de que los animales habían sido tratados con antibióticos por vía parenteral pudo haber interferido con el aislamiento de los patógenos; sin embargo, en todos los casos ocurrió el crecimiento de bacterias consideradas de la microbiota normal y de *E. coli*, lo que reduce esta posibilidad.

Los resultados negativos obtenidos en las pruebas serológicas en busca de anticuerpos contra los virus de DVBeIBR, permitieron eliminar estas posibles etiologías.

La posibilidad de que el cuadro estuviera relacionado con cepas de ECEH verotoxigénicas se presumió en función del cuadro clínico patológico caracterizado por la disentería con signos nerviosos, la presencia de gastroenteritis necrótico-hemorrágica severa y el edema del tracto digestivo, elementos que en bovinos y humanos han sido atribuidos al efecto de las citotoxinas de las cepas de ECEH.<sup>4,7,9-11,25,28,30-32</sup> Además se tomó en cuenta que los bovinos son considerados el principal reservorio y fuente de infección, por estas cepas ECEH 0157, para el hombre, a través de alimentos contaminados —cárnicos y lácteos—, que provocan colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico.<sup>4,5,8,9,16</sup>

Al realizar la evaluación de la presencia de citotoxinas mediante cultivo celular y comparar el efecto en los testigos empleados, se pudo apreciar un efecto de la misma intensidad y severidad en la cepa aislada de los bovinos, respecto de los testigos positivos. Si se toma en cuenta que las cepas empleadas como testigo pertene-

cen al grupo considerado como altas productoras de citotoxinas, se puede asumir que las cepas aisladas en este caso pertenecen al mismo grupo. Se han notificado títulos de producción de citotoxina de entre 160 y 156 250 unidades citotóxicas por ml en cultivos celulares (uccc), para los aislamientos de *E. coli* de origen bovino, mientras que en el caso de los cerdos, éstos han sido del orden de 10 a 160 uccc.<sup>28</sup> Lo anterior coincide con los títulos demostrados en este trabajo, en que se obtuvieron cerca de 10<sup>5</sup> uccc para la cepa aislada, en la que se cuantificó la producción de citotoxina.

Durante el desarrollo de la prueba de efecto citotóxico sobre células Vero, se observó en algunos cultivos un efecto citotónico, como el descrito para la enterotoxina LT, con algunas células con malformaciones; dicho efecto pudiera deberse al factor citotóxico de necrosis (CNF) descrito en cepas de *E. coli*,<sup>16,33</sup> o efectivamente a la presencia de LT.

Si comparamos lo descrito por otros autores en otros países,<sup>7,8,10,16,34</sup> la frecuencia de cepas positivas a la producción de citotoxina encontrada en este trabajo fue alta (63.8%); sin embargo, si se considera el tipo de explotación evaluada en la que el confinamiento era de densidad alta, parece ser que esto último fue la condición que presumiblemente facilitó la transmisión del agente. De igual manera, el programa de pariciones en esta explotación determinaba el ingreso permanente de becerros al área de lactancia, por lo que siempre existían animales en ella y no era posible el vaciado y la higiene completa de las instalaciones contaminadas. La imposibilidad de practicar el “vacío sanitario” aunado a la presencia permanente de animales susceptibles, probablemente también ayudó a la persistencia y transmisión del agente.

Si se considera el número de casos positivos determinados, como aquellos en los que al menos una de las cepas aislada, identificada y seleccionada produjo toxina, el número de animales infectados fue muy alto (86.5%); además, no todos ellos desarrollaron cuadro clínico y ya ha sido comunicada la posibilidad de aislar cepas de ECEH de animales aparentemente sanos.<sup>7,16,32,35</sup> Sin embargo, si la identificación de cepas de *E. coli* STX en alta proporción y con un número elevado de animales infectados, se asocia con los signos clínicos predominantes en los animales afectados y se correlaciona con la morbilidad apreciada en la explotación, se puede deducir su efecto en el cuadro de disentería grave y explica la falta de respuesta al tratamiento con antibióticos una vez establecido el cuadro enterotoxémico.<sup>36</sup>

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

de riesgo entre ambos factores indican que el porcentaje de riesgo de presentación de una infección por rotavirus, atribuible a la presencia de cepas citotóxicas es de 100 y en contraste no existe riesgo de *E. coli* STX en una infección por rotavirus. Estos datos indican la posibilidad de que al menos la infección por cepas STX positivas no requiera de una infección previa por rotavirus, situación que contrasta con la propuesta de otros autores que consideran a la infección viral como evento previo a la infección bacteriana<sup>5,10,13,37</sup> y parece apoyar la posición de quienes consideran que el incremento en la eliminación de rotavirus podría ser secundario a otras alteraciones fisiopatológicas en el intestino, tal como se ha propuesto para los cerdos.<sup>17</sup> El factor de riesgo calculado para la infección por rotavirus fue pequeño, mientras que resultó mayor el de una infección por cepas productoras de STX, afirmando la posibilidad de que ésta sí puede predisponer a la infección viral, o al menos a una mayor multiplicación del agente.

En un modelo de infección experimental con cepas ECEH en conejos, se ha observado un posible efecto citotóxico sobre los linfocitos de la mucosa intestinal,<sup>38</sup> que podría determinar algún efecto inmunosupresor local o sistémico y una mayor susceptibilidad a la infección y multiplicación de agentes virales que circulan en la explotación.

Los resultados de este trabajo indican que las cepas de *E. coli* STX son agentes primarios de cuadros enterotoxémicos en becerros y refuerzan el papel de los bovinos como reservorios de cepas citotóxicas que pueden afectar al humano.<sup>39,40</sup>

## Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por los Proyectos: PAPIIT IN220596 (Universidad Nacional Autónoma de México) y Cátedra Multidisciplinaria, Clave 5:23 (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán).

Los autores agradecen la realización de las pruebas serológicas en los bovinos realizadas por el personal del Centro Nacional de Diagnóstico en Sanidad Animal, Tecamac, Estado de México y a los laboratorios de virología y microbiología veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por las cepas de referencia donadas.

## Referencias

- Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987;155:377-389.
- Law D. Virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1988;26:1-10.
- Lupski JR, Feigin RD. Molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1988;157:1120-1123.
- Dorn CR, Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. Properties of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7. *Epidemiol Inf* 1989;103:83-95.
- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 1989;53:210-230.
- Mühlendorfer J, Hacker J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathog* 1994;16:171-181.
- Borczyk A, Karmali MA, Lior H, Duncan LMC. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1987;1:98.
- Orskov F, Orskov I, Villar JA. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1987;2:276.
- Clarke RC, McEwen SA, Gannon VP, Lior H, Gyles CL. Isolation of verocytotoxin producing *Escherichia coli* from milk filters in South Western Ontario. *Epidemiol Inf* 1989;102:253-260.
- Holland RE. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:345-375.
- Mainil JG, Duchesnes CJ, Whipp SC, Marques TD, O'Brien AD, Casey TA, Moon HW. Shiga like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am J Vet Res* 1987;48:743-748.
- Barrón RBL, López MC, Bañuelos PG, Cuervo HG, González JZ, Maya NV. Rotavirus. En: Manual de prácticas del laboratorio de virología: Instituto Politécnico Nacional editor. México (DF): IPN, 1989:108-116.
- Barker IK, Van Dreumel AA. The alimentary system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, editors. Pathology of domestic animals. 3rd ed. Orlando (Ca): Academic Press Inc., 1985:1-237.
- Gouvea V, Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol* 1995;4:159-162.
- Taniguchi K, Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. *Sem Virol* 1995;6:123-131.
- Wohlgemuth K. Diarrhea in calves, diagnosis and incidence in the North Central States. Proceedings of the 81<sup>st</sup> Annual Meeting of the Animal Health Association; 1977 August; Washington (DC). Washington (DC): The Animal Health Association, 1977:131-140.
- Jestin D, Madec F. Les diarrhées blanches du porcelet sous la mere. 2. Mise en évidence et signification de la présence du rotavirus chez le porcelet au moment du sevrage. *Rec Méd Vét* 1986;162:1195-1201.
- Benfield DA, Francia DH, McAdaragh JP, Holland JB, Torrier AB. Combined rotavirus and K99 *Escherichia coli* infection in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 1988;49:330-337.
- Pospischiel A, Guscetti F. Viral diarrhoea in pigs- an update. *Pig News Inf* 1989;10:337-340.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Part 5 histology. In: Davies ET, Bell RA, Bonson MD, Gray DE, Hewitt SH, Hunter D, *et al.*, editors. Manual of veterinary investigation techniques laboratory. Middlesex (UK): Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1978:59.
- Georgi JR. Parasitología animal. México (DF): Interamericana, 1992.
- Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Minneapolis (MI): Burgess Publishing Co, 1972:146-288.
- Cowan ST, Steel KJ. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. México (DF): Continental S.A., 1979.
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977;18:775-779.

25. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983;1:619-620.
26. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK. Shiga like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 1984;226:694-696.
27. Noda MT, Yutsudo K, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microbiol Pathog* 1987;2:339-349.
28. Palacios MMA. Detección de citotoxina (SLTII) en cepas de *Escherichia coli* de origen porcino (tesis de licenciatura). México (DF) México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, 1992.
29. Morton RF, Hebel JR. Bioestadística y epidemiología. 2a ed. México (DF): Interamericana, 1985.
30. Neil MA, Agosti J, Rosen H. Haemorrhagic colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding adult haemolytic uremic syndrome. *Arch Int Med* 1985;145:2215-2217.
31. MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet Pathol* 1991;28:66-73.
32. Okerman L. Enteric infections caused by non-enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals: occurrence and pathogenicity mechanisms. A review. *Vet Microbiol* 1987;14:33-46.
33. Rycke J, Gonzalez EA, Blanco J, Oswald E, Blanco M, Boivin R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1990;28:694-699.
34. Woodward MJ, Carroll PJ, Wray C. Detection of enterotoxin and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1992;31:251-261.
35. Fratamico P, Buchanan RL, Cooke PH. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:4245-4252.
36. Gonzalez E, Blanco J. Serotypes and antibiotic resistance of verotoxigenic (VTEC) and necrotizing (NTEC) *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea. *FEMS Microbiol Lett* 1989;31-36.
37. Robbins SL, Cotran RS. Patología estructural y funcional. México (DF): Interamericana, 1984.
38. Valdivia-Anda G. Modelo animal en el conejo para el estudio de cepas citotóxicas de *Escherichia coli* (VT) (tesis de maestría). Cuautitlán Izcalli (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1995.
39. Brook MG, Smith HR, Bannister BA, MacConell N, Satan N, Chest H, *et al.* Prospective study of verocytotoxin-producing, enteroaggregative and diffuse adherent *Escherichia coli* in different diarrhoeal states. *Epidemiol Infect* 1994;112:63-67.
40. Doyle MP, Shoeni J. Isolation of *Escherichia coli* O157 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:2394-2396.