



Archivos de Medicina Veterinaria

ISSN: 0301-732X

archmv@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

Zamora, J.; Reinhardt, G; Polette, M.; Macías, P.; González, I.
Escherichia coli aislada de cerditos diarreicos: Presunción de cepas productoras del Factor Citotóxico
Necrosante (CNF)
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 32, núm. 1, 2000
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013741009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org





redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

-  Como citar este artículo
-  Agregar a favoritos
-  Enviar a e-mail
-  Imprimir HTML

Arch. med. vet. v.32 n.1 Valdivia 2000

Escherichia coli* aislada de cerditos diarreicos. Presunción de cepas productoras del Factor Citotóxico Necrosante (CNF)

***Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets. Presumption of Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) producing-strains**

J. Zamora, M.V.; G. Reinhardt, M.V. Dr. med. vet., M. Polette, T.M.; P. Macías, T. M.; I. González, T. M.

Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, casilla 167, Valdivia, Chile.

SUMMARY

Four hundred and ninety seven diarrheic fecal samples were obtained from suckling piglets (up to 40 days old) in order to isolate *E. coli* strains. The samples were tested for the capacity to produce toxins able to induce lesions into HeLa cell line, similar to those induced by CNF. Besides, the hemolytic capacity and the presence of fimbria were also determined.

A total of 275 strains of *E. coli* were isolated. Sixteen (5.8%) were shown to be producers of the toxin "CNF type", and 5 (31.2%) out these were hemolytic. Fimbria was not detected.

Palabras claves: *E. coli*, CNF, cerditos, diarrea.

Key words: *E. coli*, CNF, piglets, diarrhea.

INTRODUCCION

Son numerosos los tipos de toxinas que sintetizan diversas cepas de *Escherichia coli*, no obstante en el área médico veterinaria de Chile sólo se tiene información de las enterotoxinas termoestables (ST) y termolábiles (LT) de las cepas enterotóxicas (ETEC), como también de las verotoxinas (VT) ([Pinochet y col., 1989](#); [Borie y col., 1997](#); [Zamora y col., 1994, 1999](#)) y se carece, a la fecha, de mayores datos de cepas necrotóxicas (NTEC) productoras del factor citotóxico necrosante (CNF).

Esta última toxina fue descrita primero por [Caprioli y col. \(1983\)](#), a partir de cepas de *E. coli* aisladas de niños que sufrían de diarrea aguda, comprobándose posteriormente en adultos con cuadros extraintestinales ([Brauner y col., 1990](#); [Cherifi y col., 1990](#)), como también en distintas especies de animales con diarrea, septicemia, diversas infecciones extraintestinales y en casos de abortos bovinos y porcinos ([González y Blanco, 1985](#); [Blanco y col., 1990a](#); [Tabouret y De Rycke, 1990](#); [Penrith y col., 1995](#); [Pohl y col., 1992, 1993a, 1997](#); [Mainil y col., 1998](#)). Por su parte, [Wray y col. \(1993\)](#) inoculan experimentalmente cerditos neonatos y logran reproducir graves enterocolitis con o sin sangre e incluso con diseminación pulmonar.

Este factor posee dos tipos de toxinas, CNF1 y CNF2, que son producidas separadamente por diferentes cepas y causan cambios morfológicos en las líneas celulares Vero y IHeLa consistentes en aumento del tamaño celular y multinucleación, como también necrosis dérmica en el conejo ([Pohl y col., 1992, 1993b](#); [Wray y col., 1993](#)).

Dados estos antecedentes se consideró de interés investigar, en forma preliminar, si las cepas de *E. coli* aisladas de cuadros entéricos del porcino neonato tienen la capacidad de sintetizar toxinas que produzcan alteraciones morfológicas de la línea celular HeLa.

MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron 497 muestras de fecas diarreicas de cerditos lactantes de hasta 40 días de edad, las que se sembraron en Agar Eosina Azul de Metileno (Difco) e incubaron a 37°C por 18 24 h, considerando sólo aquellas placas que tenían, al menos, un 80% de colonias sospechosas de *E. coli* ([Schudel, 1985](#)), identificándolas posteriormente morfológica, fisiológica y bioquímica.

Para la obtención de CNF se procedió según [Blanco y col. \(1990b\)](#). Para tal efecto, las cepas *E. coli* se sembraron en Caldo Tripticasa de Soya (CTS) (Difco), pH 7,5, incubándola a 37° C durante 5 h en agitador orbital (200 ciclos por minuto). A continuación se adicionaron 20 ml de una solución que contiene 2,5 µg de mitomicina C (Sigma) y se reincubó en el agitador por 20 h más, centrifugando a continuación a 6000 x G a 4° C durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró por membranas Sartorius de 0,2 µm y se conservó a 20° C hasta su uso.

La actividad citotóxica de los filtrados se ensayó en monocapa de células HeLa en microplacas de 24 pocillos. Con este objeto, se inocularon los pocillos con una suspensión de 10⁵ células/ml adicionadas del medio MEM (Minimum Essential Medium, Sigma) con 10% de suero fetal, la que se incubó a 37° C en 5% de CO₂ por 24 h. A continuación se eliminó el medio y se reemplazó por otro carente de suero fetal incubando por 24 h más en las mismas condiciones descritas anteriormente. Transcurrido este lapso se cambió nuevamente el medio sin suero, adicionado con 50 ml de sulfato de polimixina B más 50 µ del extracto filtrado a cada pocillo. Se dejaron 3 pocillos como control negativo, uno con el medio MEM, otro

con el medio más sulfato de polimixina B y el tercero inoculado con CTS más mitomicina C. A las 48 h se hizo la lectura directamente mediante microscopio invertido y posteriormente se observaron las células teñidas con hematoxilina-eosina.

A todas las cepas que produjeron alteraciones morfológicas caracterizadas por aumento de tamaño y multinucleación de las células HeLa, se les determinó la capacidad hemolítica y los antígenos fímbricos.

Se estudió el tipo de hemólisis sembrando las cepas en placas de Triptosa Agar-Sangre-Base (Gibco BRL) suplementado con 10 mM de CaCl_2 y 5% de sangre desfibrinada de cordero; también se utilizó el mismo medio para preparar agar sangre con el equivalente del 5% de eritrocitos lavados por 3 veces en PBS. Además, se probó la resistencia frente al ácido nalidíxico y a las cepas que resultaron resistentes se les investigó la capacidad hemolítica en agar sangre con 25 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico mencionado ([Walton y Smith, 1969](#)). En todos los casos, la lectura se realizó después de 4 y 24 h de incubación a 37°C.

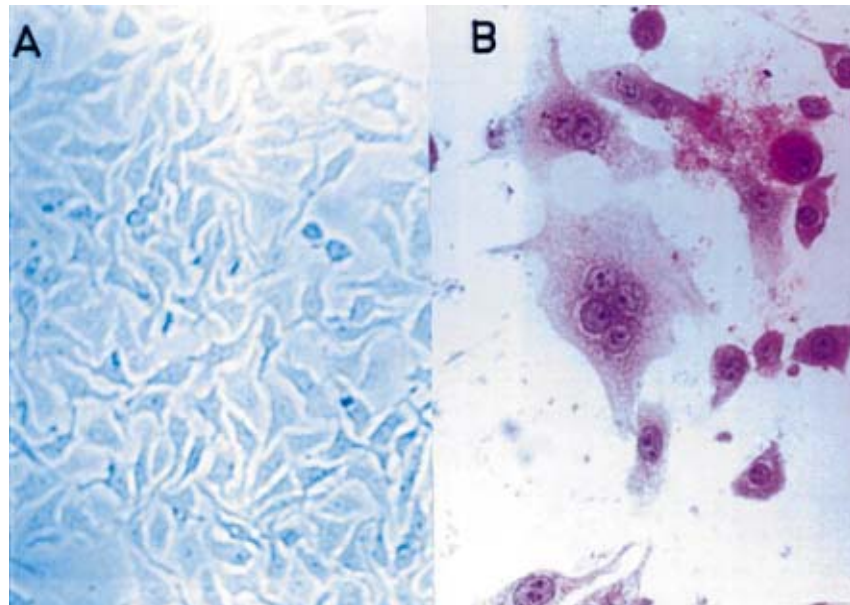
También se detectó la capacidad de producir hemólisis, sembrando 0,1 ml de la cepa cultivada durante una noche en caldo cerebro corazón (GIBCO BRL), en tubos con 10 ml del medio previamente calentado a 37°C. El cultivo se incubó durante 6 h y a continuación se les agregaron 0,5 ml de sangre de cordero desfibrinada, reincubándolos hasta el día siguiente ([Pohl y col., 1991](#)).

El tipo de hemólisis se interpretó de acuerdo con el criterio de [Pohl y col. \(1991\)](#) y de [Beutin y col. \(1988, 1991\)](#). Así, se consideró síntesis de a hemolisina si la hemólisis se presenta en placas con eritrocitos lavados, con sangre entera y en caldo. Es b, si la hemólisis se constata en agar sangre y no en caldo, en cuyo tubo se aprecia la sedimentación de eritrocitos; por lo demás, tanto la a y b hemolisinas comienzan a apreciarse después de 4 h de incubación. En cambio, se trata de enterohemolisina (EH) cuando la hemólisis se presenta únicamente en las placas con eritrocitos lavados y después de 24 h de cultivo. En el caso de g hemolisina, la hemólisis se hace evidente sólo cuando el agar sangre contiene ácido nalidíxico. El resultado es negativo si no se observa hemólisis en ninguno de los medios de cultivo empleados, considerando que una ligera coloración verdosa no corresponde a propiedades hemolíticas ([Walton y Smith, 1969](#)).

A las cepas se les determinó la presencia de fimbrias por serología, sembrándolas previamente en un medio que estimula su formación, consistente en 1% de casamino ácido, 0,15% de extracto de levadura, 0,005% de MgSO_4 , 0,0005% de MnCl_2 y 2% de agar ajustado a pH 7,4 ([Zamora y col., 1996](#)). Para tal efecto se emplearon los antisueros aglutinantes Fimbrex F41, K88, K99 y 987P elaborados por el "Central Veterinary Laboratory", Weybridge, Inglaterra.

RESULTADOS

Sólo en 275 muestras fecales de las 497 se aislaron cepas de *E. coli*, puesto que habían desarrollados 80% o más colonias típicas de esta enterobacteria en cada placa de cultivo. De éstas, 16 cepas (5,8%) produjeron toxinas que aumentaron el tamaño de las células HeLa y polinucleación de ellas como se describe para CNF, alteraciones que se pueden observar en la [microfotografía 1](#).



MICROFOTOGRAFIA 1. Cambios morfológicos en células HeLa a continuación de la incubación con extracto estéril de cultivo de *E. coli*. A: Células control. B: Efecto citopático producido por el extracto en la monocapa de células HeLa (aumento tamaño celular y multinucleación). 140 x, hematoxilina - eosina.

Morphological changes in HeLa cells following incubation with sterile extract of *E. coli* culture. A: Control cells. B: Cytopathic effect produced by the extract in HeLa cell monolayer (cellular enlargement and multinucleation). 140 x, hematoxylin-eosin.

A ninguna de las 16 cepas que producían las alteraciones celulares descritas tipo CNF se les pudo detectar fimbrias y 5 (31,20%) de ellas produjeron hemólisis, cuyos diversos tipos se detallan en el [cuadro 1](#).

CUADRO 1. Capacidad hemolítica de las 16 cepas de *E. coli* productoras de toxinas tipo CNF.

Hemolytic capacity of 16 *E. coli* strains toxins producing type CNF.

Tipo de hemólisis	Nº de cepas con toxina Tipo CNF	Porcentaje
a	1	6,25%
b	2	12,5%
g	2	12,5%
EH	0	0%
No hemolíticas	11	68,8%
TOTAL	16	100,0%

EH = Enterohemolisina.

DISCUSION

Las alteraciones que se produjeron en la monocapa de las células HeLa con el inóculo de los extractos de las cepas de *E. coli*, se caracterizaron por aumento del tamaño y multinucleación ([microfotografía 1](#)), coincidiendo con las que describieron por primera vez [Caprioli y col. \(1983\)](#), [McLaren y Wray \(1986\)](#) y [De Rycke y col. \(1990\)](#). Consecuentemente, esta característica lesión celular hace presumir que 16 cepas ([cuadro 1](#)) tendrían la capacidad de sintetizar CNF1, CNF2 o de ambas, las que son difícil de diferenciar si se carece de antisueros o de sondas, aunque [Blanco y col \(1990 b\)](#) informan que producen alteraciones diferentes en las células HeLa, pero que, naturalmente, se requiere de experiencia para detectarlas.

Se ha visto que las cepas CNF1 afectan al hombre y diversas especies animales y que las CNF2 son casi exclusivamente patógenas de los rumiantes, a los que les provoca cuadros intestinales y extraintestinales ([Blanco y col., 1990a](#); [Oswald y col., 1991](#); [DeRycke, 1996](#); [Pohl, 1997](#); [Mainil y col., 1998](#)).

Cepas NTEC están asociadas a diversas patologías en distintas especies de animales domésticos en diversas infecciones, aunque la patogenia no está del todo aclarada ([Oswald y col., 1991](#); [Wray y col., 1992](#); [Pohl y col., 1992, 1993a](#); [Blanco y col., 1993](#); [Mellata y col., 1998](#); [Orden y col., 1999](#)). En la especie porcina se ha informado de abortos ([Pohl y col., 1993a, 1997](#)), pero se describe más frecuentemente en cuadros diarreicos, algunas de los cuales cursan con lesiones de enteritis hemorrágica catarral difusa ([Blanco y col., 1990a](#); [Penrith y col., 1995](#)), infección que se puede extender a bacteriemia y al pulmón con lesiones tóxicas tanto en esa víscera como en cerebro, hígado, corazón y riñón, como lo demostraron [Wray y col. \(1993\)](#) por inoculación experimental en cerditos neonatos, por lo que opinan que las propiedades toxigénicas de *E. coli* productora de CNF juegan un importante papel en las infecciones entéricas de los cerditos.

Diferentes investigadores sostienen que las cepas NTEC de origen extraintestinal obtenidas de humanos y animales, están asociadas en un porcentaje elevado con la propiedad de producir hemolisina, preferentemente de tipo alfa, en cambio las cepas intestinales lo son en un bajo porcentaje ([Caprioli y col., 1987](#); [DeRycke y col., 1990](#); [Blanco y col., 1992](#); [Pohl y col., 1993](#)), por lo que llama la atención que el 31,2% de las CNF+ aisladas en el presente trabajo fueran hemolíticas. Posiblemente este alto porcentaje se deba a que en este estudio también se investigó la producción de g hemolisina, la que generalmente no investigan otros autores, lo que incrementó el número de cepas positivas ([cuadro 1](#)) y, naturalmente de no haberla investigado las no hemolíticas hubieran sido solamente 13 (81,3%), porcentaje más coincidente con lo que describe la literatura. Se constató la producción de a, b, y g hemolisinas y la ausencia de EH; no obstante, la cantidad de cepas NTEC aisladas fue escaso, lo que no permite concluir que esta última hemolisina no la produzcan las cepas CNF+.

A ninguna de las 16 cepas NTEC aisladas se les detectó serológicamente fimbrias con los antisueros K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6) ni F41 que corresponden a las más comúnmente descritas en diferentes especies animales con enteritis, lo que no significa necesariamente carencia de adhesinas. Estos resultados no extrañan, ya que investigaciones realizadas en el extranjero informan más frecuentemente de F17, F17a, F17b y F165 y en contadas ocasiones se publica la presencia de las adhesinas F6 y F41 en cepas NTEC aisladas de los animales domésticos ([Wray y col., 1992](#); [Mainil, 1993](#); [Pohl y col., 1995, 1998](#); [Mellata y col., 1998](#)). Por su parte, [Dozois y col. \(1997\)](#) analizan cepas CNF+ aisladas de cerdos con septicemia y diarrea e informan la presencia de adhesinas S y F1C, las que corrientemente están asociadas a cuadros extraintestinales del hombre por cepas NTEC, por lo que sugieren que los cerdos puedan ser reservorios de infecciones en humanos.

En atención a los resultados obtenidos en el presente estudio y al papel que se le asigna a las cepas NTEC en las patologías de los animales, consideramos importante confirmar en el futuro la presencia de *E. coli* productoras de CNF en infecciones intestinales y extraintestinales, como también diferenciar los tipos de las distintas necrotoxinas, puesto que ambas son importantes clínicamente. En consecuencia, sería del todo conveniente desarrollar un método adecuado en el diagnóstico de rutina para estas colibacteriosis.

RESUMEN

Se recolectaron 497 muestras de fecas diarreicas de cerditos lactantes de hasta 40 días de edad con la finalidad de aislar cepas de *E. coli*, a las cuales se les determinó la capacidad de producir toxinas que tuvieran la propiedad de producir lesiones en la línea celular HeLa como las que causa el CNF. Además, se investigó la capacidad hemolítica y la presencia de fimbrias.

Se aislaron 275 cepas de *E. coli*, de las cuales 16 (5,8%) eran productoras de la toxina "tipo CNF"; de éstas 5 (31,20%) eran hemolíticas y a ninguna se les detectó fimbrias con los antisueros utilizados.

Aceptado: 07.12.99.

* Proyecto FONDECYT 1951150.

BIBLIOGRAFIA

BEUTIN, L., J. PRADA, S. ZIMMERMANN, R. STEPHAN, I. ORSKOV, F. ORSKOV. 1988. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zbl. Bak. Hyg. A*. 267: 576 - 588.

BEUTIN, L. 1991. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 180: 167 - 182.

BLANCO, J., M. P. ALONSO, E. A. GONZALEZ, M. BLANCO, J. I. GARABAL. 1990 a. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P- fimbriated strains. *J. Med. Microbiol.* 31: 175 183.

BLANCO, J., M. BLANCO, E. A. GONZALEZ, M. P. ALONSO, J. I. GARABAL. 1990b. Comparative evaluation of three test for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 311 316.

BLANCO J., M. BLANCO, M. P. ALONSO, J. E. BLANCO, E. A. GONZALEZ, J. I. GARABAL. 1992. Characteristic of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Res. Microbiol.* 143: 869 878.

BLANCO, M., J. BLANCO, J. E. BLANCO, J. RAMOS. 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1446 1451.

BORIE, C., Z. MONREAL, P. GUERRERO, M. L. SANCHEZ, J. MARTINEZ, C. ARELLANO, V. PRADO. 1997. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch. Med. Vet.* 29: 205 212.

BRAUNER, A., M. KATOULI, K. TULLUS, S. H. JACOBSON. 1990. Production of cytotoxic necrotizing factor, verocytotoxin and haemolysin by pyelonephritogenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin.*

Microbiol. Infect. Dis. 9: 762 767.

CAPRIOLI, A., V. FALBO, L. G. RODA, F. M. RUGGERI, C. ZONA. 1983. Partial purification and characterization of and *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 39: 1300 1306.

CAPRIOLI, A., V. FALBO, F. M. RUGGERI, L. BALDASSARRI, R. BISICCHIA, G. IPPOLITO, E. ROMOLI, G. DONELLI. 1987. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* 25: 146 149.

CHERIFI, A., M. CONTREPOIS, B. PICARD, PH. GOULLET, J. DE RYCKE, J. FAIRBROTHER, J. BARNOUIN. 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 279 284.

DE RYCKE, J., E. A. GONZALEZ, J. BLANCO, E. OSWALD, M. BLANCO, R. BOIVIN. 1990. Evidence from two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolated of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 694 699.

DE RYCKE, J., P. MAZARS, J. P. NOUGAYREDE, Ch. TASCA, M. BOURY, F. HERAULT, A. VALETTE, E. OSWALD. 1996. Mitotic block and delayed lethality in HeLa epithelial cells exposed to *Escherichia coli* BM-2 producing cytotoxic necrotizing factor type 1. *Infect. Immun.* 64: 1694 1705.

DOZOIS, Ch. M., S. CLEMENT, C. DESAUTELS, E. OSWALD, J. M. FAIRBROTHER. 1997. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1 producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiol. Letters.* 152: 307 312.

GONZALEZ, E. A., J. BLANCO. 1985. Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and nonenteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 127 129.

MAINIL, J. 1993. Les colibacilloses dans l'espèce bovine. *Ann. Méd. Vét.* 137: 343 350.

MAINIL, J., S. BEZ, E. JACQUEMIN, A. KAECKENBEECK. 1998. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et chats: I) Détection des souches entérotoxigènes (ETEC), entérotoxigènes (EPEC), vérotoxigènes (VTEC), entérohémorragiques (EHEC) et nécrotoxigènes (NTEC). *Ann. Méd. Vét.* 142: 39 46.

McLAREN, I., C. WRAY. 1986. Another animal *Escherichia coli* cytopathic factor. *Vet. Rec.* 119: 576 577.

MELLATA, M., R. BAKOUR, A. M. O. SAID, E. JACQUEMIN, J. MAINIL. 1998. Genotypical and phenotypical characterization of potential virulence of bovine *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. *Ann. Méd. Vét.* 142: 207 214.

ORDEN, J. A., J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, D. CID, S. GARCÍA, R. de la FUENTE. 1999. Prevalence and characteristic of necrotoxigenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.* 66: 265 273.

OSWALD E., J. DE RYCKE, P. LINTERMANS, K. VAN MUYLEN, J. MAINIL, G. DAUBE, P. POHL. 1991. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2522 2527.

PENRITH, M. L., M. M. HENTON, C. G. CLAY. 1995. CNF1 toxin-producing strains of *Escherichia coli* isolated from weaner pigs with necrotic enteritis in South Africa. *Vet. Rec.* 136: 493 494.

PINOCHET, L., P. ABALOS, A. MORGADO, L. CUEVAS, P. SMITH, R. PIZARRO. 1989. Aislamiento y serotipificación de *Escherichia coli* enterotoxigénica desde casos de diarrea de cerdos lactantes. *Arch. Med. Vet.* 21: 117 122.

POHL, P., G. DAUBE, P. LINTERMANS, A. KAECKENBEECK, J. MAINIL. 1991. Description de 70 souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine possédant les gènes des vérotoxines. *Ann. Méd. Vét.* 135: 267 - 272.

POHL, L., J. MAINIL, L. A. DEVRIESE, F. HAESBROUCK, A. BROES, P. LINTERMANS, E. OSWALD. 1992. *Escherichia coli* productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF1) isolées à partir de processus pathologiques chez des chats et des chiens. *Ann. Méd. Vét.* 137: 21 25.

POHL, P., E. OSWALD, K. van MUYLEM, E. JACQUEMIN, P. LINTERMANS, J. MAINIL, K. van MUYLEM. 1993a. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.* 24: 311 315.

POHL, P., E. OSWALD, G. VAN ROBAEYS, F. STOCKMANS, P. LINTERMANS, J. MAINIL. 1993b. Test simples pour le diagnostic présomés des *Escherichia coli* isolées principalement chez le bovins et productrices des cytotoxines nécrosantes (CNF). *Ann. Méd. Vét.* 137: 503 505.

POHL, P., M. CONTREPOIS, H. IMBERECHTS, K. VAN MUYLEM, E. JACQUEMIN, E. OSWALD, J. MAINIL. 1995. Recherche de structures d'attachement et de facteurs de virulence chez des *Escherichia coli* adhérentes aux villosités intestinales du veau mais qui ne produisent pas les adhésines F5 (K99), F17 ni Att 111 in vitro. *Ann. Méd. Vét.* 139: 421 425.

POHL, P., H. IMBERECHTS, M. MARIN, C. SCHLICKER, F. STOCKMANS. 1997. Prévalence des gènes codant pour les cytotoxines nécrosantes (CNF1 & CNF2) chez des *Escherichia coli* isolées des bovins malades ou asymptomatiques. *Ann. Méd. Vét.* 141: 161 164.

POHL, P., H. IMBERECHTS, I. D'HOOGE. 1998. Signification de l'adhésine 20K chez les *Escherichia coli* d'origine bovine. *Ann. Méd. Vét.* 142: 143.

SCHUDEL, A. 1985. Manual de técnicas para la identificación de agentes infecciosos asociados a diarreas neonatales. FAO. Ofic. Reg. Am. Lat.

TABOURET M., J. DERYCKE. 1990. Detection of cytotoxic necrotising factor (CNF) in crude extracts of *E. coli* by enzyme-linked immunosorbent assay *J. Med. Microbiol.* 32: 73 81.

WALTON, J. R., D.H. SMITH. 1969. New hemolysin (g) produced by *Escherichia coli* *J. Bacteriol.* 98: 304 - 305.

WRAY, C., D. W. T. PIERCY, P. J. CARROLL, C. T. JOHNSON, R. J. HIGGINS. 1992. Bovine haemorrhagic colitis associated with CNF+ and F6+ (987P) *E. coli*. *Vet. Rec.* 131: 220.

WRAY, C., D. W. T. PIERCY, P.J. CARROLL, W. A. COOLEY. 1993. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sci.* 54: 290 298.

ZAMORA, J., G. REINHARDT, N. TADICH, X. CABEZAS, J. A. TIRACHINI, M. N. FRITZ. 1994. Cepas de *Escherichia coli* productoras de enterotoxina termoestable (ST) y de verotoxina (VT) aisladas de terneros y corderos con diarrea. *Arch. Med. Vet.* 26: 41 47.

ZAMORA, J., G. REINHARDT, M. POLETTE, R. AGUILAR, P. MACIAS. 1996. Cepas de *Escherichia*

coli enteroadhesivas aisladas de cerdos. Propiedades hemolíticas y determinación serológica de fimbrias. *Arch. Med. Vet.* 28: 35 - 40.

ZAMORA, J., G. REINHARDT, M. POLETTE, P. MACIAS, T. M. 1999. Diarrea neonatal porcina. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* toxigénicas productoras de STa, LT y VT. *Arch. Med. Vet.* En Prensa.