



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *Escherichia coli*  
PRODUCTORA DE SHIGA-LIKE TOXIN EN OVINOS  
CON DIARREA EN UN SISTEMA DE  
PRODUCCIÓN INTENSIVA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**NÉSTOR MARTÍN CUENCA VERDE**

TUTOR:

**Dr. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ**

COMITÉ TUTORAL:

**Dr. CARLOS ESLAVA CAMPOS**

**Dr. EFREN DIAZ APARICIO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, MÉXICO.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó con el equipo e instalación de la  
Unidad Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FES-Cuautitlán UNAM

con financiamiento del proyecto  
Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica  
(PAPIIT) UNAM No. IN216005  
“Efectos sobre el sistema inmune de cepas de *Escherichia coli*”

y de la Cátedra de Investigación FES-C No. IN. 2.14  
“Mecanismos de patogenicidad microbianos”

con asesoría del Dr. Guillermo Valdivia Anda

Néstor Martín Cuenca Verde fue alumno becario

CONACYT 200750 (2005-2007)

COMECYT 07BTM516 (2007)

## AGRADECIMIENTOS

MVZ. Manuel Delgado Estrella.

MVZ María Reyes Pichardo M. del laboratorio de Ciencias Morfológicas y Biología Celular de la FES Cuautitlán UNAM.

M en C. Ariadna Cruz del laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

M en C. Armando Navarro Ocaña del laboratorio de Salud Publica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Dr. Guillermo Valdivia Anda por todo e interés y apoyo brindado para realizar este proyecto y creer en mí.

Dr. Jorge Tórtora Pérez por la oportunidad brindada.

Dr. Carlos Eslava Campos por toda la enseñanza y apoyo brindado, con gran admiración y respeto “muchas gracias”.

Dr. Efrén Díaz Aparicio, por la gran disposición y ayuda ofrecida.

Dr. Carlos Gerardo García Tovar por aceptar ser parte de este trabajo.

Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez, por todas sus enseñanzas durante estos años.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación: Dra. Clara Inés Álvarez, Dra. Gabriela Barcenás, Dr. Antonio Morilla, Dra. Virginia Tovar, Dr. Andrés Romero, Dr. Guillermo Valdivia, Dr. Jorge Tórtora, Dr. Víctor Tenorio.

M en C. Hilda Laura Sandoval Rivera, por su amistad, apoyo y comprensión.

M en C. Jorge Alfredo Cuellar Ordaz por ser más que un maestro un amigo que siempre apoya nuestra superación de manera incondicional.

MVZ Claudia Vásquez por su amistad y apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis amigos de la UIMSA: Ángeles, Paty, Elena, Laks, Alejandro, Marco, Gerardo, Miguel, Quique, Karina, Ana.

A todos los compañeros y amigos de la Facultad de Medicina, Ulises, Domingo, Alejandro, Lulú, Eva, Delia, Luis.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Sr. Elías Cuenca y Ma del Pilar Verde, son responsables de mi existencia y artífices de todos mis logros.

A mi Tomy por ser mi compañera, por tu apoyo y paciencia, te amo.  
A mis hijos Ovin y Machi, por que todo lo que hago esta inspirado en ustedes, los amo más que a nada en este mundo.

A mi pequeño, el mejor hermano que pude tener, porque has sido mas que un amigo, por estar conmigo realizando este sueño.

A mi hermanita Pili y porque nunca dejas de creer en nosotros, te amo.

A Elma por acompañar y comprender a mi hermano.

A mis sobrinas, Kiki, Sami y Leli, las quiero muchísimo.

A mis Abuelitos, tíos, tías, primos y primas. Que también inspiraron este esfuerzo.

A todos mis amigos, no deseo omitir a nadie, gracias por seguir siéndolo.

A la FES- Cuautitlán, por ser mi casa.

Muy en especial a mi Tío RIGO (†), porque fuiste un ejemplo de fortaleza para toda la familia, se que donde estas disfrutas este logro, te extraño.

Gracias a Dios por permitir estar en este momento.

“Por mi Raza Hablara el Espíritu”

Nestor

No sé si la instrucción puede salvarnos, pero no sé de nada mejor.

Jorge Luis Borges

## INDICE

<b>1. Introducción.</b>	1
<b>2. Antecedentes.</b>	6
<b>3. Justificación.</b>	10
<b>4. Hipótesis.</b>	11
<b>5. Objetivos.</b>	12
<b>6. Material y Métodos.</b>	13
6.1. Explotación.	13
6.2. Muestreo.	13
6.3. Aislamiento y conservación.	14
6.4. Identificación bioquímica.	14
6.5. Identificación de genes de virulencia por PCR.	15
6.6. Prueba de citotoxicidad.	18
6.7. Tipificación serológica de las cepas STEC.	19
6.8. Análisis de resultados.	21
<b>7. Resultados.</b>	22
7.1. Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> en corderos con y sin diarrea.	22
7.2. Genes de virulencia.	22
7.3. Genotipo (combinación de genes de virulencia).	25
7.4. Citotoxicidad.	26
7.5. Serogrupos y serotipos.	26
7.6. Seropantotipos.	27
7.7. Corderos colonizados.	30

7.8. Identificación de cepas STEC en las dos naves de producción.	31
<b>8. Discusión.</b>	<b>33</b>
<b>9. Conclusión.</b>	<b>41</b>
<b>10. Bibliografía.</b>	<b>42</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los diferentes grupos patógenos de <i>E. coli</i> diarreagénicas.	2
Tabla 2. Iniciadores utilizados en PCR.	16
Tabla 3. Frecuencia de aislamiento de cepas STEC identificadas por PCR en corderos con y sin diarrea.	23
Tabla 4. Proporción de corderos positivos a cepas STEC identificadas por PCR.	23
Tabla 5. Frecuencia de genes de virulencia encontrados por PCR en corderos con diarrea y corderos sin diarrea.	24
Tabla 6. Genotipos de cepas STEC aisladas en corderos con diarrea y corderos sin diarrea.	25
Tabla 7. Cepas sorbitol negativo aisladas de ovinos.	26
Tabla 8. Serogrupos y serotipos de <i>Escherichia coli</i> identificados en aislados obtenidos de corderos con y sin diarrea.	28
Tabla 9. Serotipos y genes de virulencia en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de corderos con y sin diarrea.	29
Tabla 10. Corderos colonizados en los dos grupos.	30
Tabla 11. Serotipos encontrados en las 2 naves muestreadas.	31
Tabla 12 Serotipos con mayor frecuencia en las dos naves muestreadas.	32
Tabla 13. Serogrupos identificados asociados a otros grupos patógenos.	38

## RESUMEN

*Escherichia coli* (STEC) ha sido aislada de bovinos y ovinos, especies consideradas reservorios para la infección en humanos, sin embargo, pocos reportes indican que estas pueden causar daño a los animales. Los reportes de aislamiento de cepas STEC de ovinos son escasos y señalan su papel como reservorio. El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización de STEC en corderos y determinar su posible asociación con la presentación de cuadros de diarrea, así como conocer el posible papel zoonótico de estas cepas. El estudio se realizó en una explotación dedicada a la cría intensiva de corderos. Se muestrearon 60 corderos con diarrea y 30 corderos sanos. Se aislaron 5 colonias lactosa positivo y se les realizó la identificación bioquímica, se identificaron los genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hlyA* por la técnica de PCR, se evaluó la capacidad citotóxica sobre cultivo de células Vero y se tipificaron serológicamente. De 424 cepas de *E. coli* trabajadas 69 (16.3%) presentan genes *stx*, 34 fueron aisladas de corderos con diarrea y 35 de corderos sin diarrea; El 40 % de los corderos con diarrea y el 53 % de los sin diarrea fueron positivos a cepas STEC, el análisis estadístico mediante la prueba  $X^2$ , demostró una mayor la proporción en los animales sin cuadro clínico ( $p < 0.05$ ). El 94% de las cepas fueron fermentadoras de sorbitol, 21% de las cepas STEC presentaron el gen *eaeA* y 43 % el *hlyA*. Los serotipos identificados con mayor frecuencia en los corderos con diarrea, fueron O104:H7 (14%), O26:H-, O117:H7, O165:H- y ONT:11 (5% c/u); en los sin diarrea los serotipos fueron O123:H- (20%), O165:H45 (14%) y O104:H7 y O146:H21 (8% c/u). Por otro lado no se encontró correlación entre las cepas STEC aisladas con la presencia de diarrea en corderos. El resultado indica que no se pueden asociar las cepas STEC con la presencia de diarrea en corderos. La presencia de STEC en corderos con y sin diarrea, demuestran que estos pueden actuar como reservorios de la bacteria en México y actuar como fuente de contaminación para el humano.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* (STEC) has been isolated from bovines and ovine, both species considered as reservoirs of the humans infection. Although, only few reports suggest the participation of these pathogens in the animals illness, the STEC strains isolation from ovines support their function as a reservoir. In this study was performed the isolation and characterization of *E. coli* strains from lambs with and without diarrhea to know their possible association in the lambs diarrhea. The study was conducted in an intensive production lambs folk, fecal samples from 90 animals 60 with diarrhea and 30 healthy lambs were analyzed. Five lactose positive colonies from each sample were isolated, these were identified by biochemical test and the identified as *E. coli* were analyzed by PCR assay to determine the presence of *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hlyA* genes. The production of toxins was evaluated on Vero cells cultures and the strains serotypes were determined using specific rabbit serum. A total of 424 *E. coli* were identified from both animal groups, in 69 (16.3%) of the strains (34 and 35 with and without diarrhea respectively) was determined the presence of *stx* genes. The statistic analysis of the gene positive strains show a significant  $X^2$  test ( $p < 0.05$ ) in the proportion of animals without diarrhea when both groups where compared. In STEC strains also were identified the *eaeA* (21%) and *hlyA* (43%) genes. The serotypes O104:H7 (14%), O26:H-, O117:H7, O165:H- and ONT:11 (5% each) in without diarrhea lambs and O123:H- (20%), O165:H45 (14%), O104:H7 and O146:H21 (8% each) from sick animals were the more common. Although the results are showing that STEC strains are not associated with diarrheal disease in lambs, their existence in the lambs feces confirm their participation as reservoirs and a possible source of the STEC strains transmission to humans in Mexico.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los estados de México, Jalisco y Michoacán se ha incrementado el número de explotaciones ovinas de tipo empresarial, con sistemas de producción intensiva (Cuellar y col., 2005).

Los sistemas de producción intensivos son aquellos en que independientemente de los objetivos del mismo, la producción animal se desarrolla al límite de la capacidad fisiológica de la especie y la cría como la engorda se realizan al ritmo más intenso posible, en estos se combina la capacidad de conversión de los ovinos y su eficiencia reproductiva. Una ventaja de estos sistemas es que la producción de corderos se mantiene constante a través del año (Ortiz, 2004).

Sin embargo, bajo estas condiciones se incrementa el porcentaje de mortalidad en corderos, ya que se aumenta la densidad de animales en confinamiento, se facilita la transmisión de microorganismos entre animales y estos están sometidos a fuertes condiciones de estrés, lo que lleva a una mayor incidencia de enfermedades contagiosas, principalmente antes y después del destete, los cuadros de enfermedad más importantes son los problemas respiratorios (neumonías) y los gastrointestinales (diarreas) (Moreno y col., 1996).

Las diarreas son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad durante las primeras semanas de vida en la mayoría de las especies animales, las causas de esta, son generalmente multifactoriales y pueden estar asociadas a factores ambientales, nutricionales y agentes infecciosos, estos últimos pueden ser virales, bacterianos y/o parasitarios (Blood y col., 2007).

Entre los agentes bacterianos uno de los más comúnmente asociados a cuadros de diarrea en los animales domésticos es *Escherichia coli*.

La tipificación serológica de esta bacteria se realiza en base a sus antígenos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular), según Kauffman (1944), en la actualidad se conoce un total de 181 antígenos O, con los que se define el serogrupo, la combinación específica de antígenos O y H, define el serotipo de una cepa aislada, para lo cual existen 56 antígenos H. El serogrupo y serotipo no confieren virulencia, pero tienen importancia epidemiológica ya que correlacionan con clones específicas de virulencia, (Nataro y Kaper, 1998). Así mismo, *E. coli* es

una especie bacteriana versátil, y algunos serotipos pueden contener y expresar diferentes factores de virulencia y exhibir patogenicidad, (Naylor y col., 2005).

En base a los factores de virulencia que poseen, las cepas de *E. coli* que causan diarrea se han clasificado como: *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* productora de toxina de Shiga o enterohemorrágica (STEC/EHEC), (Nataro y Kaper, 2005), las principales características de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de los diferentes grupos patógenos de *E. coli* diarreagénicas.

	Abreviatura	Definición	Enfermedad
<i>E. coli</i> Enterotoxigenica	ETEC	<i>E. coli</i> que produce toxinas denominadas termo estable (St) y termo lábil (Lt).	Diarrea acuosa aguda.
<i>E. coli</i> Enteropatógena	EPEC	<i>E. coli</i> que produce lesión "attaching and effacing" (A/E) y por lo general contienen un factor de adherencia codificada en un plásmido y producen bundle-forming pilis (BFP).	Diarrea aguda o persistente.
<i>E. coli</i> Enteroagregativa	EAEC	<i>E. coli</i> que produce un patrón de adherencia agregativa en cultivo celular.	Diarrea acuosa aguda o persistente.
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva	EIEC	<i>E. coli</i> que comparte determinantes de virulencia con <i>Shigella spp.</i>	Diarrea acuosa a menudo disentería.
<i>E. coli</i> de adherencia difusa	DAEC	<i>E. coli</i> que exhibe un patrón de adherencia difusa en cultivo celular.	Diarrea aguda o persistente.
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica	EHEC STEC VTEC	<i>E. coli</i> que produce Verotoxina o toxina de Shiga.	Diarrea, colitis hemorrágica(CH), síndrome urémico hemolítico (SUH)

Tomado y modificado de Molbak y Scheutz, 2004.

Las cepas *E. coli* enterohemorrágicas producen una enteritis hemorrágica, también han sido llamadas *E. coli* productoras de verotoxina (ECVT), o productoras de toxina de Shiga (STEC), por la producción de una potente citotoxina, dentro de este grupo el serotipo O157:H7 es el más reconocido en todo el mundo y ha sido el prototipo de investigación (Molbak y Scheutz, 2004).

Konowalchuk y col., 1977, describieron el efecto citopático irreversible característico sobre cultivo de células Vero (células de riñón de mono verde africano) producido por extractos filtrados de cultivos de *E. coli*, aisladas de niños con diarrea. Por su parte O'Brien y col., 1982, aislaron y caracterizaron una citotoxina producida por la cepa H30, (O26:H11) aisladas por Konowalchuk y encontraron similitud entre esta y la toxina Shiga (Stx) producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, y que era neutralizada por anticuerpos anti-Stx, posteriormente se reconoció la existencia de dos tipos de toxina Stx1 y Stx2 ó Vtx1 y Vtx2, las cuales son antigénicamente diferentes. De esta forma el término *E. coli* Verotoxigenica (VTEC) ó productora de verotoxina (Vtx) es derivado de las observaciones de Konowalchuk y col., 1977, mientras el término *E. coli* productora de toxina de Shiga (STEC), es derivado de lo demostrado por O'Brien y col., 1982.

El principal factor de virulencia de las bacterias STEC es la producción de una o ambas toxinas de Shiga (Stx1 y/o Stx2), las cuales se encuentran codificadas por genes presentes en bacteriofagos y cuyo receptor es el Globotriosilseramido (Gb3), La toxina Stx1 producida por STEC es idéntica a Stx producida por *S. dysenteriae* tipo 1, ésta es altamente conservada, en cambio Stx2 presenta variantes las cuales se han denominado Stx2c, Stx2v, Stx2d y Stx2e (Nataro y Kaper, 1998; Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>).

Estas toxinas actúan sobre las células blanco por inhibición de la síntesis proteica, al unirse a la fracción 60S del ribosoma, con lo que provocan la muerte celular, (Sandving, 2001). Estudios realizados por Samuel y col., 1993, trabajando con roedores, demostraron que la Stx2 tiene una toxicidad hasta 400 veces mayor que la Stx1.

Estas bacterias pueden presentar otros factores de virulencia, como la capacidad de producir la lesión "ataching and effacing" (A/E) mediada por las proteínas Intimina/Tir, ésta incluye la íntima adherencia al enterocito con modificación del citoesqueleto, produciendo la formación del denominado pedestal de actina y la producción de una hemolisina la cual es codificada por genes presentes en el plásmido pO157 (Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>).

Este grupo de bacterias está involucrado en la manifestación de dos síndromes clínicos en humanos, que afectan diferentes sistemas del organismo, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH), la mayor parte de

las observaciones de estos síndromes se han hecho con cepas STEC del serotipo O157:H7. El SUH se define por una triada de anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal (Nataro y Kaper, 1998).

Sin embargo, en animales, sólo se han descrito enfermedades como disentería en terneros y la enfermedad de los edemas en cerdos, pero la información en otras especies es limitada (OMS, 1998; Molbak y Scheutz, 2004).

Actualmente para la clasificación de las bacterias de este grupo patógeno existen diferentes criterios dependiendo el autor consultado, la siguiente clasificación es propuesta por Wittam, 1998:

*E. coli* enterohemorrágica EHEC<sub>1</sub>: Se usa para referirse a cepas O157:H7 que poseen los factores de virulencia Toxinas Stx1 y Stx2, adherencia A/E, y un plásmido de 60 MDa. el cual esta implicado en la producción de una hemolisina y que fueron aislados de casos de CH o SUH.

EHEC<sub>2</sub> no O157: Este se refiere a cepas que poseen los factores de virulencia antes mencionados y han sido implicadas en casos de CH o SUH, pero que pertenecen a serotipos diferentes a O157:H7, tal es el caso de los serotipos O26:H11, O26:H-, O111:H-, O103:H2, O103:H-, entre otros.

El término STEC se utiliza en forma general para referir a las cepas productoras de toxina de Shiga, sin embargo es muy común que se utilice para referirse a cepas que tienen uno o los dos genes para toxina y que pueden o no presentar los genes para A/E y/o el plásmido, éstas ocasionalmente pueden estar implicadas en casos de enfermedad.

La distribución de *E. coli* O157:H7 y otras STEC es mundial, en países con sistemas de vigilancia las infecciones por STEC varían y reflejan diferencias en incidencia, actividad diagnóstica y reportes. Se han reportado altas incidencias en regiones de Canadá, Escocia y Argentina, en países europeos y EUA, el rango anual de incidencia es de 1 a 4 casos por cada 100,000 habitantes. El verano es la época en que se presentan la mayor parte de casos de enfermedad en humanos, siendo los niños los principales afectados. El diagnóstico de STEC no O157 se realiza en pocos laboratorios por lo que puede estar subdiagnosticada (Molbak y Scheutz, 2004).

La principal fuente de STEC se consideran los animales en particular los rumiantes, principalmente el ganado bovino (OMS, 1998), sin embargo, se han aislado de una gran variedad de animales domésticos incluidos ovejas, cerdos,

cabras, perros, gatos y conejos, mayoritariamente de animales sanos (Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>; Nataro y Kaper, 1998).

La transmisión de cepas STEC ocurre principalmente por alimentos, agua y por contacto persona-persona, aunque la mayoría de los casos se han asociado a la ingesta de alimentos contaminados, principalmente alimentos de origen animal, carne de res, leche y queso, otros alimentos que se han identificado como fuentes de infección son los que se consumen crudos como el salami o los jugos de fruta mal pasteurizados (OMS, 1998), además de un gran número de vegetales como lechugas, espinacas, alfalfa y algunas frutas, sin embargo, la verdadera causa en estas se considera la contaminación con materia fecal de bovino (Nataro y Kaper, 1998).

Debido a que el serotipo O157:H7 es el más importante y se han desarrollado técnicas de mayor sensibilidad para aumentar la posibilidad de identificar bacterias de este serotipo, como el uso de medios selectivos, técnicas inmunológicas como la separación inmunomagnética y técnicas moleculares como PCR (Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>). Así mismo se han desarrollado diferentes modelos en animales para tratar de entender la patogénesis de la bacteria (Naylor y col., 2005).

Sin embargo, no solo el serotipo O157:H7 es considerado patógeno, existen otros serotipos que se han asociado a casos de enfermedad tanto en el hombre como en animales. Existen evidencias que sugieren que el ovino puede presentar susceptibilidad a los efectos de las toxinas de Shiga, Hoey y col., 2003, identificaron el receptor Gb3 para Stx en intestino delgado de bovino, estos autores sugieren la posible susceptibilidad de los rumiantes a los efectos de estas toxinas. Por otro lado Magne y col., 2006, demostraron que la Stx induce apoptosis en granulocitos de ovino y bovino, lo que indica que el papel de las STEC en los rumiantes no está bien determinado.

## 2. ANTECEDENTES

*E. coli* ha sido reconocida como parte de la microbiota normal de animales domésticos y de vida libre desde principios de los 1900s, siendo los rumiantes considerados como los reservorios más importantes (Naylor y col., 2005).

La identificación de *E. coli* STEC se puede hacer mediante métodos tradicionales, como con las técnicas moleculares más actuales. El aislamiento mediante uso de medios selectivos y la identificación basada en las características bioquímicas es importante para determinar género y especie.

La estrategia para el aislamiento de cepas O157:H7 es el uso de medios selectivos, basados en las características bioquímicas de este tipo de bacterias, como la incapacidad de fermentar el sorbitol, no fermentar la ramnosa y no producir  $\beta$ -D-glucoronidasa, para lo que se realiza el sembrado en placas de agar Sorbitol Mac Conkey (S-MAC) (Nataro y Kaper, 1998).

El problema con el aislamiento de cepas STEC no O157, es que estas no presentan característica bioquímicas que las diferencien de otras *E. coli* de la biota normal, por lo que algunos autores como Blanco y col., 1996, recomiendan seleccionar hasta 10 colonias para identificación bioquímica de rutina de *E. coli*.

La tipificación serológica es reconocida por muchos autores como un mecanismo muy importante para identificar una cepa patógena de *E. coli*, pero la realización de esta es imitada ya que son pocos los laboratorios que cuentan con la capacidad para realizarla (OMS, 1998).

Para detectar la producción de Stx, se pueden utilizar ensayos en cultivo de células Vero, que se considera la prueba de oro para confirmar cepas productoras de toxina. Sin embargo, las pruebas serológicas como ELISA, agiliza la detección de Stx, así como la aglutinación en látex, en la que se utilizan perlas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti-Stx1 y anti-Stx2 (Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>).

Para realizar la identificación de genes de virulencia, se utilizan métodos moleculares basados en el DNA, como la hibridación en fase sólida (colony blot) o la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que en la actualidad es la más utilizada para identificar genes de virulencia en bacterias patógenas.

Se han diseñado diversos ensayos con varios genes (Multiplex) donde se determina la presencia de algunos de los involucrados en la virulencia del grupo STEC, tal es el caso de los diseñados por Paton y Paton, 1998<sup>b</sup> y 2002, con los

cuales se determina la presencia de los genes para *stx 1*, *stx 2*, *eaeA*, enterohemolisina *hlyA*, *rfb O111* y *rfb O157* (porción de antígeno O), o como el desarrollado por López y col., 2003, que determina la presencia de siete factores de virulencia de diferentes grupos patógenos de *E. coli*.

Actualmente se conocen alrededor de 400 serotipos O:H STEC, sin embargo, el asociado a enfermedad en humanos es el O157:H7 y el diagnóstico de éste, basado en sus características bioquímicas particulares, sugiere la subestimación de la prevalencia de otros serogrupos STEC asociados a enfermedad en humanos como: O26, O91, O103 y O111 entre otros (Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>; Molbak y Scheutz, 2004).

En muchas partes del mundo se ha identificado la presencia de cepas STEC asociadas a animales, aislándose de muestras de diferente origen tanto de materia fecal como de productos y subproductos de origen animal, se han aislado de muestras fecales de bovinos de engorda en Argentina (Podola y col., 2004), vacas lecheras en EUA (Seongbeom y col., 2006) de carne de res en diferentes etapas de la cadena en todo el mundo, (Hussein y Bollinger, 2005), también en Argentina se han realizado aislamientos a partir de animales silvestres y mamíferos no domésticos en cautiverio (Leotta y col., 2006). Los reportes de México se han realizado determinando la prevalencia del serotipo O157:H7 con una prevalencia del 1.25 % en bovinos y del 2% en cerdos (Calaway y col., 2004). Varela y col, 2007, realizaron el aislamiento de cepas STEC a partir de canales de bovinos en un rastro municipal del estado de Jalisco, con una prevalencia del 2.7% de cepas O157:H7 y de 5% para cepas O157:H-, así mismo reportan un 20.5% de aislamiento de cepas STEC no O157. Por su parte Valdivia y col., 2000, reportan la asociación de cepas *E. coli* O157:H- y rotavirus, en un brote de diarrea en becerros en el Estado de México.

En México no se tienen reportes de aislamiento de cepas STEC a partir de muestras de ovinos, sin embargo en diferentes partes del mundo esta especie animal es calificada como reservorio de cepas STEC no O157 (Beutin y col., 1993).

Por otro lado se puede aislar cepas *E. coli* O157:H7 a partir de muestras de ovino y la frecuencia de aislamiento es mayor en la época de verano durante los meses de junio y agosto (Kudva y col., 1996). En un trabajo previo, estos mismos

investigadores demostraron en un modelo ovino, que es posible la transmisión de O157:H7 de corderos infectados a otros no infectados (Kudva y col., 1995).

Betuin y col., 1993, determinaron la prevalencia de STEC en 7 especies de animales domésticos (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, caninos felinos y aves), la mayor frecuencia de aislamiento se observó en ovinos (66.6%), cabras (56.1%) y bovinos (21.8%), los serotipos encontrados son muy variables, pero en ovinos y caprinos fue posible aislar cepas de diferente serotipo en muestras de un solo individuo.

La presencia de cepas STEC en ovinos ha sido señalada en Estados Unidos, Australia, Noruega, Brasil, España, y Suiza donde se reportan prevalencias del 29 al 51%, aislándose principalmente de animales sanos por lo que los ovinos se han considerado reservorios de las bacterias y se relacionan a la enfermedad en humanos (Kudva y col., 1997; Bettelheim y col., 2000; Urdahl y col., 2001; Vettorato y col., 2003; Rey y col., 2003; Zweifel y col., 2004<sup>a</sup>, 2004<sup>b</sup>).

La proporción de genes que codifican para Stx encontrados en cepas de origen ovino han sido: *stx1+stx2* en un rango de 48 a 53 %, *stx1* de 11 a 43% y el gen *stx2* tiene presencia solo de 4 a 21%. Los genes *eaeA* y *hlyA* en cepas de origen ovino ocurren con proporciones de 0 a 13% y de 30 a 80% respectivamente, todos estos trabajos fueron realizados en corderos sanos, (Kudva y col., 1997; Bettelheim y col., 2000; Urdahl y col., 2001; Vettorato y col., 2003; Rey y col., 2003; Zweifel y col., 2004<sup>b</sup>).

Beutin y col., 1995, encontraron diferentes tipos de Stx2 en las diferentes especies, sin embargo, en las cepas aisladas de ovinos, encontraron diferentes tipos de Stx2 y el 1.4% de las cepas que estudiaron presentaban el gen *eaeA*, por lo que concluyeron que las cepas aisladas pueden presentar baja virulencia para el humano. Por otro lado Wales y col., 2005, encontraron que la capacidad de producir lesión A/E de las cepas STEC es un mecanismo para la persistencia de estas en borregos.

En general cuando se analizan cepas de origen ovino se identifican una gran variedad de serogrupos y serotipos, los serotipos más frecuentemente reportados en ovinos y que se han relacionado con enfermedades como SUH y HC son: O5:H-, O26:H11, O75:H-, O76:H19, O91:H-, O103:H-, O103:H2, O121:H10, O128:H2, O146:H21, O157:H7, O163:H19, O174:H8 y ONT:H-, (Bettelheim y col., 2000; Kim y col., 2003; Vettorato y col., 2003; Rey y col., 2003; Zweifel y col.,

2004b). Así mismo es común que en los trabajos realizados en ovinos se identifiquen serotipos que se han reportado previamente como STEC.

Diferentes investigadores como Zweifel y col., 2004b y Rey y col., 2003, han aislado una gran variedad de seropatotipos. La gran importancia de conocer tanto el serotipo como los genes de virulencia con que cuenta una cepa bacteriana nos da una idea más clara del potencial patógeno que esta puede desarrollar.

Los niveles de colonización en diferentes animales que aparecen en la literatura, varían ampliamente estos pueden tener diferentes explicaciones, por un lado tanto cepas que se encuentran colonizando y cepas de tránsito, pueden aparecer con una frecuencia similar pero la eliminación en heces es mayor en las cepas que se encuentran colonizando (Betuin y col., 1997). Un aspecto técnico, ya que la tasa de aislamiento de STEC puede estar afectada por el número de colonias estudiadas de cada animal (Notario y col., 2000), por lo que algunos autores recomiendan seleccionar al menos 10 colonias.

En corderos con diarrea se tienen pocos reportes, el primero en 1996 por Blanco y col., quienes aislaron cepas STEC solo en el 4% de los corderos diarreicos que analizaron, por lo que sugieren que este tipo de bacterias no están relacionadas con la presentación de diarrea.

En este mismo sentido, Orden y col., 2003, aislaron cepas STEC tanto de corderos con diarrea como de corderos sin diarrea y encontraron una mayor frecuencia de aislamiento en los corderos sin diarrea que en los con diarrea, 24 y 16% respectivamente. Mientras en contraparte, en 2008, Bat y col., reportan el aislamiento de cepas STEC en mayor proporción (17.5%) en corderos con diarrea que en corderos sin diarrea (8.5%).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México, una de las principales causas de mortalidad en corderos criados bajo sistemas de producción de tipo intensivo, son las diarreas, sin embargo, al no realizarse diagnósticos de laboratorio confirmatorios, estos cuadros pueden ocultar la participación de *E. coli* productoras de toxina de Shiga, en estas patologías.

Los trabajos que se han realizado en México se han encaminado a determinar la presencia de cepas O157:H7, en bovinos, porcinos y humanos, pero no se tiene información respecto a la situación en ovinos y es importante conocer la situación de cepas STEC en esta especie; que se considera uno de los reservorios más importantes de la bacteria de riesgo para el humano.

Por otro lado la frecuencia de aislamiento de cepas STEC es mayor en ovinos comparado con la observada en bovinos, aunque existen menos estudios. El papel de las cepas STEC en casos de diarrea en ovinos ha sido poco estudiado.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los corderos criados en sistemas de producción intensiva de México, están colonizados por cepas productoras de toxina de Shiga (STEC) patógenas las cuales se encuentran involucradas en desarrollo de cuadros de diarrea.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Conocer si la frecuencia de aislamientos de *E. coli* productora de toxina de Shiga (STEC), esta relacionada a la presencia de cuadros de diarrea en corderos criados en un sistema de producción intensiva.

### 5.2. Objetivos Particulares

5.2.1. Realizar el aislamiento e identificación de *E. coli* productora de toxina de Shiga (STEC) a partir de muestras de heces de corderos con diarrea y sin diarrea, de un rebaño en producción intensiva.

5.2.2. Conocer si existe relación entre la frecuencia de aislamiento de *E. coli* productora de toxina Shiga con la presencia de diarrea en corderos.

5.2.3. Determinar si la presencia de los genes de virulencia *stx 1*, *stx 2*, *eaeA* y *hlyA* en las cepas de *E. coli* aisladas, se encuentra asociada con la presentación de diarrea en corderos criados de manera intensiva.

5.2.4. Determinar si los serogrupos y serotipos de las cepas STEC se encuentran relacionados con la presencia de cuadros de diarrea.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Explotación.**

El presente trabajo se realizó en una explotación ubicada en el municipio de Arandas en el estado de Jalisco.

El municipio de Arandas se localiza en el centro oriente del estado, en las coordenadas 20° 36' 30" a 20° 54' 30" de latitud norte y 102° 00' 45" a 102° 37' 00" de longitud oeste a una altura de 2,000 metros sobre el nivel del mar.

Tiene una superficie de 1,238.02 km<sup>2</sup>, se encuentra limitado al norte por los municipios de San Miguel el Alto, San Julián y San Diego de Alejandría; al sur con Jesús María, Ayotlán y Atotonilco; al este con el municipio de Jesús María y el estado de Guanajuato; y al oeste con Tepatitlán de Morelos y Atotonilco.

Arandas cuenta con un clima que se clasifica como semi-seco con invierno seco y semicálido, sin cambio térmico invernal definido. La temperatura media anual es de 19° C. y una precipitación media de 888.1 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de junio a septiembre. Los vientos dominantes son en dirección sureste. El promedio de días con heladas es de 31.8 al año.

El Mezquite es una explotación intensiva de tipo empresarial la cual se dedica a la cría y engorda de corderos para el abasto y pie de cría.

### **6.2 Muestreo.**

El número de corderos a muestrear se determinó mediante el cálculo del tamaño de una muestra (p) de acuerdo con Lemeshow, 1990, considerando la proporción observada por Blanco y col., 1986.

En la explotación se manejan dos naves destinadas a la etapa de lactancia en las que se realiza el mismo manejo productivo, al momento del muestreo se contaba con un aproximado de 1700 corderos. Se muestrearon 60 corderos con diarrea, 35 en la nave 1 y 25 en la nave 2 y 30 corderos sin diarrea (clínicamente sanos), 20 en la nave 1 y 10 en la nave 2. La edad promedio de los corderos al momento del muestreo fue de 7 semanas.

Las muestras se tomaron directamente del recto del animal con hisopos estériles y se sembraron en medio Cary Blair, se mantuvieron en cajas térmicas con refrigerantes para transportarlas al laboratorio, donde se trabajaron. Las muestras fueron tomadas en un solo día, 24 horas después llegaron al laboratorio, donde fueron trabajadas.

### **6.3. Aislamiento y Conservación.**

Las muestras se sembraron en placas de agar Mac Conkey (BIOXON®), incubadas a 37° C por 24 horas.

Se seleccionaron 5 colonias lactosa positivas y se sembraron en placas de agar soya tripticaseína (TSA) (BIOXON®) y fueron incubadas a 37° C durante 24 horas.

Se realizó el sembrado de las cepas por duplicado (una para trabajar y otra de reserva) conservándolas en viales de vidrio con medio especial para almacenamiento, con: 5 g de Bactopeptona (BIOXON®), 1.5 g de agar bacteriológico (BIOXON®) y 100 ml de agua destilada.

La solución se clarificó a ebullición por 2 minutos, se dispensó en los viales (5 ml.) se colocó la tapa y se esterilizaron 15 lb por 15 min. Se dejaron enfriar en inclinación.

Las cepas se sembraron en esterilidad por estría y se cerraron con tapa de plástico y retapa de aluminio. De esta forma se mantuvieron a temperatura ambiente, reduciendo el riesgo de contaminación.

### **6.4. Identificación bioquímica.**

Se formaron 5 grupos con 1 cepa de cada muestra (grupos A, B, C, D y E).

Se realizó la identificación bioquímica de las cepas con las pruebas: ureasa (caldo Urea BIOXON®), citrato (Medio Citrato de Simmons BIOXON®), rojo de metilo y Voges-Proskauer (Medio MR/VP BIOXON®), motilidad, indol, ornitina descaboxilasa (Medio MIO BIOXON®), lisina descarboxilasa, producción de SH<sub>2</sub> (Medio LIA MERCK®), fermentación de azúcares y producción de SH<sub>2</sub> y gas (medio TSI MERCK®), y fermentación de sorbitol.

Los medios se prepararon según la recomendación de los fabricantes, se realizó el sembrado de las cepas por duplicado. La interpretación de las pruebas se efectuó según Mac Faddin, 1984 y la identificación bacteriana basada en los criterios de Cowan y Steel, 1979.

En esta etapa se utilizaron como cepas control positivo *Escherichia coli* EDL933 EHEC (O157:H7) donada por el laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina UNAM y una cepa de *Proteus spp* aislada como contaminante en un trabajo previo.

### **6.5. Identificación de genes de virulencia por PCR.**

Para las siguientes técnicas se realizó el resembrado de las cepas del vial de trabajo en placas de agar TSA para corroborar su pureza antes de comenzar los procedimientos.

Lisado celular para obtención de la muestra de DNA según Paton y Paton, 1993.

De los cultivos en TSA se tomó una asada fue resuspendida en 1ml de agua desionizada en microtubos de 1.5ml, se homogenizó por agitación en vortex, se calentó en baño maría a ebullición durante 15 minutos, se mantuvo en hielo durante 10 minutos y fue centrifugada a 14000 rpm en microcentrifuga 16K de BIO-RAD®; el sobrenadante se utilizó como muestra de DNA, se mantuvo en congelación a -20° C hasta su uso.

Las cepas *E. coli* se organizaron en grupos de 10 cepas cada uno, con la finalidad de realizar el lisado celular y la técnica de PCR por grupo, al detectar grupos positivos a cualquiera de los genes, se realizaría el PCR a las cepas de en forma individual, por lo que se realizó simultáneamente el lisado celular a cada una de las cepas.

PCR para determinar genes de virulencia por grupos.

Se realizó la técnica de PCR multiplex para identificar los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA* en los grupos de 10 cepas siguiendo el protocolo descrito por López y col., 2003.

Cada reacción de 25µl contenía: 2.5µl Buffer (10mM Tris HCl, 50mM KCl) 10x, 1µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2µl de dNTP's (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) 200µM, 3.5µl de una mezcla de los 3 pares de iniciadores 1nM (tabla 2), 13.8µl de H<sub>2</sub>O para PCR, 0.2µl de Taq Polimerasa y 2µl de DNA (lisado). Todos los reactivos utilizados fueron de la marca INVITROGEN®. Basado en el trabajo de López y col., 2003, la proporción de los iniciadores fue: *stx1* 37.5%, *stx2* 25%, *eaeA* 37.5%.

Tabla 2. Iniciadores utilizados en PCR

Factor de virulencia	Nombre	Secuencia del iniciador	Tamaño de amplificación pb	Referencia
Shiga Like Toxin 1	<i>stx1F</i> <i>stx1R</i>	F: 5'CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3' R: 5'AGA ACG CGC ACT GAG ATC ATC3'	150	López y col. 2003.
Shiga Like Toxin 2	<i>stx2F</i> <i>stx2R</i>	F: 5'GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3' R: 5'TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3'	275	López y col. 2003.
"attaching and effacing"	<i>eaeAF</i> <i>eaeAR</i>	F: 5'GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3' R: 5'CCA CCT GCA GCA ACA AGAGG3'	387	López y col. 2003.
Enterohemolisina	<i>hlyAF</i> <i>hlyAR</i>	F: 5'GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC3' R: 5' AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T3'	534	Paton y Paton 1998b.

Se realizó PCR utilizando un termociclador PTC-100™ MJ RESEARCH, Inc.

Las condiciones de ciclado fueron:

- 1.- 5 minutos 94° C.
  - 2.- 2 minutos 50° C.
  - 3.- 0.45 minutos 72° C.
  - 4.- 0.45 minutos 94° C.
  - 5.- 0.45 minutos 50° C.
  - 7.- 10 minutos 72° C.
  - 8.- 4° C ∞.
- } 35 ciclos

## Separación electroforética de los amplificadores del PCR.

La separación de los amplificadores se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### Preparación del gel de agarosa 2%

- 0.6g de agarosa
- 30 ml de Tris-acetato EDTA TAE 1x.
- La solución se clarificó a ebullición por 1-2 min.
- Se dejó enfriar aproximadamente a 39° C.
- Se depositó en la cámara para electroforesis (Se utilizó una cámara Horizon 58 GIBCO BRL® con peine de 14 pozos).
- Una vez formado el gel se retiró el peine y se agregó TAE 1x hasta cubrir el gel.

Las muestras de los amplificadores se depositaron en los pozos en el siguiente orden: pozo 1 se colocó 10 µl del marcador de tamaño molecular 123 bp DNA Ladder INVITROGEN®, pozos 2-12 muestras problema, pozo 13 el amplificado del control (-) y pozo 14 amplificado del control (+). En cada pozo se depositaron 8 µl del amplificado más 2 µl de amortiguador de corrimiento Blue Juice 2x INVITROGEN®.

El corrimiento electroforético se realizó a 87 volts por 20 min. utilizando una fuente de energía Model 250 GIBCO BRL®.

Los geles fueron teñidos por inmersión en una solución de bromuro de etidio 1mg/100 ml. por 15 minutos, se visualizaron y capturaron las imágenes en un equipo transluminador UV con procesador de imagen SYNGEN®.

### PCR para determinar genes de virulencia en cepas por separado.

En el ensayo grupal, “en pool” todos los grupos resultaron positivos, al menos para un gen, por lo que se realizó el PCR dúplex a todas las cepas por separado, bajo el mismo protocolo, utilizando una mezcla de los iniciadores *stx1* 60% y *stx240*%.

A las cepas positivas al menos a un gen de toxina se les realizó PCR para determinar la presencia del gen *eaeA* además del gen *hlyA* por separado, siguiendo el mismo protocolo.

## **6.6. Prueba de citotoxicidad**

Para evaluar la citotoxicidad de las cepas STEC sobre células Vero se realizó la técnica “agar overlay method” descrito por Parreira y col., 2003.

Muestra bacteriana.

Se sembraron las muestras STEC aisladas y las cepas control en placas de TSA incubadas a 37° C por 24 h, para confirmar su pureza.

Los cultivos limpios se utilizaron a partir de las placas de TSA.

Cultivo celular.

Se utilizaron células Vero (células de riñón de mono verde africano), las cuales fueron donadas por el laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Celular de la FES-C UNAM.

Las células se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) EAGLES (SIGMA®) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (SIGMA®) incubadas a 37° C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Se realizaron cultivos en placas de 24 pozos de 16mm de diámetro NUNC® con 0.5 ml de cultivo celular por pozo, se incubaron a 37° C durante 24 a 48 horas hasta obtener una monocapa.

Cobertura de agar.

La cubierta de agar se preparó de la siguiente forma:

Para 100 ml. de solución:

90 ml de MEM, 1g de agarosa ultrapura y 10 ml de SFB.

Se disolvió la agarosa en 10 ml de MEM y se esterilizó a 15 lbs por 15 min, los 80 ml de MEM restantes y el SFB se mantuvieron en baño María a 44° C, se temperó la agarosa y se mezclaron las tres soluciones manteniéndolas a 44° C.

Se retiró el medio de las placas con las células y cada pozo se lavó una vez con 1ml de MEM sin SFB. Se dispensó en 1ml de la solución de agarosa y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Se revisó la integridad de la monocapa en un microscopio invertido.

### Inoculación

Se realizó la inoculación de la placa, tomando 2 pozos para cada cepa, inoculando con una colonia de cultivo en la superficie de la capa de agar, utilizando un asa bacteriológica de platino. Se realizó la inoculación de las cepas problema y las control. Una vez inoculadas, las placas se incubaron a 37° C en atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 a 48 h.

### Interpretación de la técnica.

Las placas inoculadas se revisaron cada 24 h. en un microscopio invertido evaluando el estado de la monocapa. Se interpretó como positivo cuando se presentó pérdida de la monocapa con aparente destrucción celular y negativo cuando esta se mantuvo íntegra.

## **6.7. Tipificación serológica de las cepas STEC.**

### Preparación del Antígeno (Ag) somático (O).

Como en todos los ensayos para verificar la pureza de las cepas se sembraron en gelosa sangre y agar Mac Conkey.

Confirmada la pureza se sembraron por extensión en tubos 16x150 con TSA inclinado, incubándose a 37° C durante 24 h.

El Ag se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Orskov y Orskov, 1984. Para cosechar el cultivo bacteriano se adicionaron 10 ml de solución salina fisiológica (0.085%) a los tubos, para desprender el cultivo.

La solución resultante se colocó en tubos de 16x150, se taparon individualmente y se calentaron a vapor fluyente durante 1h estos fueron fijados con 2 partes de formalina al 0.6%.

#### Obtención del Ag flagelar (H).

Las cepas se sembraron en un medio semisólido en tubos de rosca con tubo Craige incluido. Se incubaron a 30° C durante 15 días o hasta que la muestra saliera a la superficie fuera del tubo Craige.

Se tomó una asada de la superficie, fuera del tubo Craige, sembrándose en caldo de Peptona biotriptasa (BIOXON®) al 2% pH 7.2 y se incubaron a 30° C por 24 h. Se agregaron 2 partes de formalina 0.06% como fijador.

#### Identificación del serotipo de los aislados.

La serotipificación de las cepas STEC se realizó siguiendo el procedimiento empleado en el laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, de acuerdo con Orskov y Orskov, 1984 y utilizando los sueros específicos (SERUNAM-México®) obtenidos en conejos Nueva Zelanda blancos, se evaluaron 181 Ags O y 56 Ags H. Las reacciones de aglutinación se realizaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondo (NUNC®).

#### Reacción de aglutinación para Ag O.

Se colocaron 50 µl de cada uno de los antisueros anti O, utilizando un dispensador automático posteriormente se agregaron 50 µl del Ag O, se colocaron en columnas de 9 microplacas, se recubrieron con plástico adherente y se incubaron a 50° C durante 24 h.

Se consideró un resultado positivo cuando se formó una película de malla (aglutinación), y negativo a la formación de un botón en el fondo del pozo (precipitación).

Algunos Ag's presentaron reacción cruzada, se registraron los sueros y la intensidad con la que reaccionaron.

Se realizó una reacción de aglutinación con diluciones de los sueros. Se prepararon diluciones dobles de los sueros de 1:100 hasta 1:12800 para descartar o disminuir las reacciones cruzadas.

En los casos en que seguían ocurriendo respuestas cruzadas se realizó una evaluación de aglutinación con diluciones de los sueros puros.

Se prepararon diluciones dobles de los sueros, de 1:50 a 1:6400, definiendo el Ag somático con el suero que mayor título presentó o bien con el de mayor homología con el título del suero homólogo.

#### Reacción de aglutinación para Ag H.

Para determinar el Ag H se realizó una reacción de aglutinación con los sueros anti H, utilizando el mismo procedimiento que para el Ag O, con la diferencia de que la incubación se realizó a 50° C por 2 h.

### **6.8 Análisis de resultados.**

Se realizó el análisis mediante prueba de  $\chi^2$  con un nivel de significancia de 95%, para determinar si existía correlación entre la presencia de los genes de virulencia y la condición de colonización por cepas STEC, con la presencia del cuadro de diarrea.

Se realizó el análisis de prueba de hipótesis (significancia 95%) para 2 proporciones, comparando las frecuencias de aislamiento, presencia de genes y sus combinaciones, presencia de serotipos y proporción de corderos colonizados con cepas STEC de *E. coli* en corderos con diarrea y corderos sin diarrea, utilizando el paquete estadístico Microsoft Excel.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento e identificación de *E. coli* en corderos con y sin diarrea.

De los 90 corderos muestreados (60 con diarrea y 30 sin diarrea), se aislaron 5 colonias lactosa positivas por cordero, para obtener un total de 450 colonias.

De los corderos con diarrea (300 colonias lactosa positiva), se confirmaron bioquímicamente como *E. coli* 286 cepas, por otro lado en los corderos sin diarrea (150 colonias lactosa positivas) se confirmaron 136 cepas de *E. coli*.

Por identificación bioquímica resultaron 7 aislamientos del genero *Yersinia* spp., 4 *Klebsiella* spp., 3 *Enterobacter* spp., 2 *Proteus* spp., 2 de *Hafnia* spp. y 10 cepas no pudieron ser identificadas.

### 7.2 Genes de virulencia.

Los 422 aislamientos de *E. coli* se analizaron por la técnica de PCR y se identificaron 69 cepas (16%) que presentaban uno o ambos genes que codifican para la toxina Shiga (STEC). De los corderos con diarrea fueron aisladas 34 (12%) y de los corderos sin diarrea 35 (26%).

El análisis estadístico por prueba de  $\chi^2$  demostró que no existe relación ( $p>0.05$ ), entre el número de cepas STEC aisladas en los dos grupos de corderos, con la presencia de diarrea. La diferencia entre las frecuencias de aislamiento de cepas STEC, demostró que estadísticamente la proporción de cepas aisladas fue mayor en los corderos sin diarrea que en los corderos con diarrea ( $p<0.01$ ), (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de aislamiento de cepas STEC identificadas por PCR en corderos con y sin diarrea.

	Cepas <i>E. coli</i> (n)	Cepas STEC (%)	(p<0.01)
Corderos con diarrea	286	34 (12)	a
Corderos sin diarrea	136	35 (26)	b
Total	422	69	

Nota: Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística.

En 24 (40%) de los 60 corderos con diarrea se aisló por lo menos una cepa STEC y en los 30 sin diarrea 16 (53%), al realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia ( $p>0.05$ ) entre las proporciones observadas en los dos grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Proporción de corderos positivos a cepas STEC identificadas por PCR.

	Corderos muestreados	Corderos positivos a cepas STEC	Frecuencia (%)	p<0.05
Corderos con diarrea	60	24	40	a
Corderos sin diarrea	30	16	53	a
Total	90	40		

Nota: Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística.

De 34 cepas STEC aisladas de los corderos con diarrea, 10 (30%), presentaron solo el gen *stx1*, 9 (26%) el gen *stx2* y 15 (44%) presentan los genes *stx1* y *stx2*.

En los corderos sin diarrea 7 (2%) demostraron el gen *stx1*, 17 (48%) el gen *stx2* y 11 (32%) ambos genes.

Tabla 5. Frecuencia de genes de virulencia encontrados por PCR en corderos con diarrea y corderos sin diarrea.

Genes	Corderos con diarrea		Corderos sin diarrea		p<0.05
	Cepas (n 34)	Frecuencia (%)	Cepas (n 35)	Frecuencia (%)	
<i>stx1</i>	10	30	7	20	aa
<i>stx2</i>	9	26	17	48	aa
<i>stx1+ stx2</i>	15	44	11	32	aa
<i>eaeA</i>	10	30	5	14	aa
<i>hlyA</i>	15	44	21	60	aa

Nota: Letras diferentes en la fila indican diferencia estadística.

Se determinaron los genes *eaeA* y *hlyA* en las cepas positivas a genes para Stx. De las cepas aisladas de corderos con diarrea 10 (30%) presentan el gen *eaeA* y 15 (44%) el gen *hlyA* y de las de corderos sin diarrea 5 (14%) contenían el gen *eaeA* y 21 (60%) el gen *hlyA* (Tabla 5).

El análisis estadístico indicó que la presencia de los genes que codifican para las toxinas Stx1 y Stx2 y su combinación fue independiente de la presencia de diarrea en los corderos. Comparando la proporción de cepas con genes para Stx, no existió diferencia entre los dos grupos ( $p>0.05$ ).

### 7.3 Genotipo (combinación de genes de virulencia).

Algunos autores como Vettorato y col., 2003, utilizan el término genotipo para referir a las diferentes combinaciones de genes que se presentan en una cepa aislada.

En el grupo de corderos con diarrea se encontraron nueve de los 12 genotipos posibles mientras en el grupo de corderos sin diarrea se encontraron ocho.

En los corderos con diarrea los genotipos que se aislaron con mayor frecuencia fueron el *stx1 + stx2* en 10 de 34 cepas (29%), *stx2* en 5 (15%) y el genotipo con menor frecuencia fue *stx2+ hlyA* con solo 1 de 34 cepas (3%).

En los corderos sin diarrea el genotipo con mayor frecuencia fue *stx2+hlyA* en 10 de 35 cepas (29%), *stx1* y *stx1+ stx2 + hlyA* en 6 cepas (17%) por cada uno, mientras que los genotipos *stx1+ eaeA + hlyA* y *stx1+ stx2 + eaeA + hlyA* solo fueron aislados en 1 cepa (3%).

En el análisis estadístico solo se encontró diferencia en el genotipo *stx2 + hlyA*, el cual se aisló con una mayor frecuencia en el grupo de corderos sin diarrea ( $p < 0.05$ ), tabla 6.

Tabla 6. Genotipos de cepas STEC aisladas en corderos con diarrea y corderos sin diarrea.

Genotipo	Corderos con diarrea		Corderos sin diarrea		p<0.05	Total
	No. de cepas	%	No. de cepas	%		
<i>stx1</i>	3	9	6	17	aa	10
<i>stx1+hlyA</i>	3	9	0	0	aa	2
<i>stx1+eaeA+hlyA</i>	4	12	1	3	aa	5
<i>stx2</i>	5	15	4	11	aa	9
<i>stx2+hlyA</i>	1	3	10	29	ba	11
<i>stx2+eaeA+hlyA</i>	3	9	3	9	aa	6
<i>stx1+stx2</i>	10	29	4	11	aa	14
<i>stx1+stx2+hlyA</i>	2	6	6	17	aa	8
<i>stx1+stx2+eaeA+hlyA</i>	3	9	1	3	aa	4
Total	34	100	35	100		69

Nota: Letras diferentes en la fila indican diferencia estadística.

Analizando la combinación de los genes *stx2* y *hlyA*, independientemente de la presencia de los otros dos genes, se observa en el grupo de corderos sin diarrea una mayor proporción 20 de 35 (57%) de aislamientos, que en el grupo de corderos con diarrea 9 de 34 (26%) ( $p < 0.01$ ).

De las 69 cepas STEC, 65 (94%) fueron sorbitol positivas y solo 4 (6%) resultaron negativas. La tabla 7 muestra la proporción de cepas que presentaron la incapacidad de fermentar el sorbitol.

Tabla 7. Cepas sorbitol negativo aisladas de ovinos.

	Corderos con diarrea (n = 300)	%	Corderos sin diarrea (n=150)	%
<i>E. coli</i> sorbitol negativo	17	0.06	15	0.1
STEC sorbitol negativo	3	0.01	1	0.006

#### 7.4 Citotoxicidad

De las 34 cepas STEC aisladas de corderos con diarrea 32 (94%), produjeron citotoxicidad en cultivo de células Vero, contra 33 de 35 (94%) del grupo sin diarrea.

De las cepas del grupo de corderos con diarrea que no produjeron citotoxicidad en cultivo celular, una contenía los genes *stx1* + *eaeA* + *hlyA* y la otra presentó solo el gen *stx2*, las cepas aisladas de corderos sin diarrea presentaron el gen *stx1* (tabla 8).

#### 7.5. Serogrupos y serotipos.

En la tipificación serológica de las 69 cepas STEC, se encontraron 27 (O) serogrupos y 38 (O:H) serotipos diferentes.

Los serogrupos O8, O104, O123, O139, O146, O176 y OR, se encontraron en los dos grupos.

En las 34 cepas de corderos con diarrea se identificaron 20 serogrupos y 26 serotipos diferentes. Cinco cepas presentaron el serotipo O104:H7, los serotipos

O26:H-, O117:H11, O165:H- y ONT:H11 fueron identificados en 2 cepas cada uno y 21 serotipos se presentaron en una sola cepa.

En las 35 cepas STEC de corderos sin diarrea, se identificaron 14 serogrupos y 17 serotipos. Los serotipos de mayor frecuencia fueron el O123:H- en 7 cepas y O166:H45 en 5, O104:H7, O146:H21 en tres, O115:H45, O123:H10, O148:H- y OR:H- en dos cepas cada uno y 9 serotipos más fueron encontrados solo en una cepa (tabla 8).

Los serotipos O104:H7, O123:H-, O146:H21, OR:H- se encontraron en ambos grupos.

En la tabla 8 se presentan los serogrupos y serotipos identificados en las cepas STEC aisladas de corderos con diarrea y corderos sin diarrea.

#### 7.6. Seropatotipos.

Autores como Rey y col., 2003, y Zweifel y col., 2004b, utilizan el término seropatotipo para referirse a la asociación entre el serotipo y la presencia de genes de virulencia.

En las 34 cepas STEC aisladas de corderos con diarrea se encontraron 29 seropatotipos. Los serotipos O104:H7, O165:H- y ONT:H11 presentan 2 diferentes combinaciones de genes. En este grupo el seropatotipo aislado con mayor frecuencia fue O104:H7 *stx1+stx2* en 4 cepas, el O26:H- *stx1+ hlyA* y O117:H7 *stx2* en dos cada uno, además de 26 seropatotipos que solo se identificaron en una cepa.

En el grupo de corderos sin diarrea, se encontraron 23 seropatotipos, los serotipos O104:H7, O123:H-, O123:H10, O146:H21, O148:H- y O166:H45 presentaron 2 diferentes combinaciones de genes. En este caso, los seropatotipos aislados con mayor frecuencia fueron el O123:H- *stx2 + hlyA* con 4 cepas, el O123:H- *stx1+stx2+hlyA* y el O166:H45 *stx1*, con tres cepas cada uno y se identificaron 5 seropatotipos con 2 cepas y 15 con solo una cepa todos los seropatotipos de cepas STEC aisladas se presentan en la tabla 9.

Tabla 8. Serogrupos y serotipos de *Escherichia coli* identificados en aislados obtenidos de corderos con y sin diarrea.

Corderos con diarrea			Corderos sin diarrea		
Serogrupos	Serotipos	No. cepas	Serogrupos	Serotipos	No. cepas
O7	<b>O7:H9<sup>c</sup></b>	1	O8	<b>O8:H7<sup>c</sup></b>	1
O8	<b>O8:H21<sup>b</sup></b>	1	O15	O15:H45	2
O23	<b>O23:H7<sup>a</sup>, O23:H12<sup>c</sup></b>	2	O20	<b>O20:H4<sup>c</sup></b>	1
O26	O26:H- <sup>b</sup>	2	O103	<b>O103:H<sup>b</sup>, O103:H2<sup>b</sup></b>	2
O41	<b>O41:H21<sup>c</sup></b>	1	O104	O104:H7 <sup>a</sup>	3
O45	<b>O45:H12</b>	1	O123	O123:H- <sup>a</sup> , O123:H10 <sup>a</sup>	9
O55	<b>O55:H19<sup>c</sup></b>	1	O124	<b>O124:H10<sup>c</sup></b>	1
O104	O104:H7 <sup>a</sup> , <b>O104:H16<sup>a</sup></b>	6	O128	<b>O128:H2<sup>a</sup></b>	1
O115	<b>O115:H34<sup>c</sup></b>	1	O139	<b>O139:H-</b>	1
O117	O117:H7 <sup>a</sup>	2	O146	O146:H21 <sup>a</sup>	3
O118	<b>O118:H12<sup>b</sup></b>	1	O148	O148:H- <sup>c</sup> , <b>O148:H32<sup>c</sup></b>	3
O123	<b>O123:H-<sup>a</sup></b>	1	O166	O166:H45 <sup>c</sup>	5
O139	<b>O139:H21<sup>c</sup></b>	1	O176	<b>O176:H23<sup>c</sup></b>	1
O146	<b>O146:H21<sup>a</sup></b>	1	OR	OR:H- <sup>b</sup>	2
O165	O165:H- <sup>b</sup>	2			
O173	<b>O173:H23<sup>c</sup></b>	1			
O176	<b>O176:H25<sup>c</sup></b>	1			
O177	<b>O177:H11</b>	1			
ONT	<b>ONT:H-<sup>b</sup>, ONT:H11<sup>a</sup></b>	3			
OR	<b>OR:H-<sup>b</sup>, OR:H11<sup>b</sup>, OR:H12<sup>a</sup>, OR:H19<sup>a</sup></b>	4			
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>34*</b>	<b>14</b>	<b>17</b>
					<b>35**</b>

\* Aisladas de 24 corderos.

\*\* Aisladas de 16 corderos

H- No móvil

NT No tipificable

R Rugosa

Los serotipos en negritas se identificaron solo en una cepa.

<sup>a</sup>. Serotipo reportado previamente en cepas aisladas de humano.

<sup>b</sup>. Serotipo asociado a cepas STEC causantes de HUS.

<sup>c</sup>. Serotipo no reportado previamente en cepas STEC.

Tabla 9. Serotipos y genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de corderos con y sin diarrea.

Corderos con diarrea						Corderos sin diarrea					
Serotipo	stx1	stx2	eaeA	hlyA	Total	Serotipo	stx1	stx2	eaeA	hlyA	Total
O7:H9	+	+	+	+	1	O8:H7	+	+			1
O8:H21	+				1	O15:H45		+			2
O23:H7	+	+			1	O20:H4	+				1
O23:H12	+	+			1	O103:H-		+	+	+	1
O26:H-	+		+		2	O103:H2	+	+	+	+	1
O41:H21	+				1	O104:H7	+	+		+	2
O45:H12	+			+	1	O104:H7		+			1
O55:H19		+			1	O123:H-		+		+	4
O104:H7	+		+		1	O123:H-	+	+		+	3
O104:H7	+	+			4	O123:H10		+	+	+	1
O104:H16	+			+	1	O123:H10		+			1
O115:H34	+	+		+	1	O124:H10		+		+	1
O117:H7		+			2	O128:H2		+		+	1
O118:H12	+	+			1	O139:H-	+		+	+	1
O123:H-		+		+	1	O146:H21		+		+	2
O139:H21	+	+			1	O146:H21*	+				1
O146:H21	+				1	O148:H-	+	+		+	1
O165:H-		+	+	+	1	O148:H-		+	+	+	1
O165:H-	+	+	+	+	1	O148:H32	+	+			1
O173:H23	+				1	O166:H45	+				3
O176:H25		+	+	+	1	O166:H45	+	+			2
O177:H11*	+		+	+	1	O176:H23*	+				1
ONT:H-	+	+	+	+	1	OR:H-		+		+	2
ONT:H11		+	+		1						
ONT:H11	+	+			1						
OR:H-	+	+			1						
OR:H11	+	+			1						
OR:H12		+			1						
OR:H19*		+			1						

H- No móvil.

NT No tipificable.

R Rugosa.

\* Negativas a citotoxicidad en células Vero.

### 7.7. Corderos colonizados.

En este estudio se calificó a un individuo, del cual por lo menos 2 de las 5 cepas aisladas son del mismo serotipo como colonizado, siguiendo los criterios de Betuin y col., 1997.

En el grupo de corderos con diarrea, 8 individuos presentaron más de una cepa positiva a los genes de toxina (STEC), pero solo 4 presentaron más de una del mismo serotipo. En el grupo sin diarrea, 10 animales presentaron más de una cepa positiva y 6 se consideraron colonizados con más de 1 cepa del mismo serotipo tabla 10. El número de corderos colonizados, por cepas del mismo serotipo, fue mayor ( $p < 0.05$ ), en el grupo de corderos sin diarrea.

Tabla 10. Corderos colonizados en los dos grupos.

	Corderos con diarrea	Corderos sin diarrea
Corderos (n)	60	30
Corderos colonizados por cepas de un mismo serotipo (%)	4 (7) b	6 (20) a
Serotipos	O26:H-, O104:H7, O117:H7, O165:H-	O15:H45, O123:H-, O146:H21, O166:H45.

Nota: Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística  $p < 0.05$

Los serotipos presentes colonizando al menos un individuo en el grupo de corderos con diarrea fueron: O26:H-, O104:H7, O165:H-, O117:H7 y en el grupo sin diarrea son los serotipos: O15:H45, O123:H-, O146:H21, O166:H45.

## 7.8. Identificación de cepas STEC en las dos naves de producción.

El muestreo se realizó en 2 naves (alojamientos) de producción, en la tabla 11 se muestran los serotipos de los aislamientos.

En la nave 1 se identificaron 21 serotipos diferentes, mientras que en la 2 se aislaron 20. En la nave 1 el serotipo O166H:45 se identificó con mayor frecuencia con 5 cepas, mientras que los serotipos O104:H7, y O123:H- fueron los de mayor frecuencia en la nave 2 y los únicos que se encontraron en las dos naves.

Tabla 11. Serotipos encontrados en las 2 naves muestreadas.

Nave 1		Nave 2	
Serotipo	Cepas	Serotipo	Cepas
O8:H7	1	O7:H9	1
O8:H21	1	O26:H-	2
O15:H45	2	O55:H19	1
O20:H4	1	O104:H7	6
O23:H7	1	O117:H7	2
O23:H12	1	O118:H12	1
O41:H21	1	O123:H-	7
O45:H12	1	O123:H10	1
O103:H-	1	O124:H10	1
O103:H2	1	O139:H21	1
O104:H7	2	O146:H21	4
O104:H16	1	O148:H-	2
O115:H34	1	O148:H32	1
O123:H-	1	O165:H-	2
O128:H2	1	O176:H25	1
O139:H-	1	OR:H-	3
O166:H45	5	OR:H11	1
O173:H23	1	OR:H19	1
O176:H23	1	ONT:H-	1
O177:H11	1	ONT:H11	2
OR:H12	1		
<b>Total</b>	<b>27</b>		<b>41</b>

En la tabla 12 se muestran los serotipos aislados con mayor cantidad en las dos naves, En la nave 1 los serotipos O103:H2, O104:H7 y O166:H45 se aislaron al menos en 2 corderos, por otro lado el serotipo O104:H7 fue aislado en las dos naves tanto en corderos con diarrea como en corderos sin diarrea. Los sertipos O123:H-, O146:H21, O148:H-, ONT:H11 y OR:H- fueron los que se encontraron en al menos dos corderos en la nave 2. A excepción del serotipo ONT:H11, los demás presentan una mayor presencia en corderos sin diarrea.

Tabla 12. Serotipos con mayor frecuencia en las dos naves muestreadas.

Serotipo	Nave1		Serotipo	Nave 2	
	CsD/35	CD/20		CsD/25	CD/10
O103:H2	2(5)	0	O104:H7	3(12)	2(20)
O104:H7	1(2.8)	1(5)	O123:H-	3(12)	0
O166:H45	4(11)	0	O146:H21	2(8)	1(10)
			O148:H-	2(8)	0
			ONT:H11	0	2(20)
			OR:H-	2(8)	1(10)

CsD: Corderos sin diarrea.  
 CD: Corderos con diarrea.  
 (%)

## 8. DISCUSIÓN

Los rumiantes en general y principalmente bovinos y ovinos se consideran el principal reservorio para cepas de *E. coli* productoras de toxina de tipo Shiga (STEC) (Paton y Paton, 1998<sup>a</sup>). En este sentido se han realizado numerosos trabajos, en los que se intenta demostrar el papel de los ovinos como reservorio de cepas STEC incluido el serotipo O157:H7.

En el presente trabajo se procuró el aislamiento de coliformes, a partir de muestras de corderos con y sin diarrea, para determinar la posible relación entre la frecuencia de aislamiento de cepas STEC con el cuadro de diarrea. El 93% de las cepas aisladas, se confirmaron como *E. coli*, el 7% restante correspondieron a otros géneros bacterianos, *Proteus*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Hafnia*.

La frecuencia de aislamiento de cepas STEC (positivas al menos a un gen para Stx por PCR) fue de 16%, semejante a lo reportado por Kudva y col., 1997, en USA, quienes encontraron una frecuencia del 15 % de estas cepas en corderos sanos. En este caso los aislamientos se realizaron en corderos con y sin diarrea con una frecuencia de 12% y 26% respectivamente, la frecuencia en los corderos sin diarrea fue mayor ( $p < 0.05$ ), lo que sugiere que no existe una asociación entre la frecuencia de aislamiento y la presencia de diarrea en los corderos, sugiriendo que esas cepas no serían diarreagénicas para ovinos en la edad estudiada, resultados que contrastan con lo encontrado por Bhat y col., 2008, en la India que reportaron 17.5% en corderos con diarrea y 8.53% en corderos sin diarrea ( $p < 0.05$ ), que por el contrario sugieren que existe una asociación entre las cepas STEC y la presencia de diarrea. Por otro lado se tiene conocimiento de que otros patógenos intestinales pueden involucrarse en casos de diarrea en corderos (Muñoz y col., 1996; Wani y col., 2004). Así mismo no se puede descartar la presencia de otros grupos diarreagénicos de *E. coli*, los cuales no fueron evaluados en el presente trabajo.

Considerando la edad de los corderos muestreados (7 semanas) y la condición de cría, estabulación permanente, que facilita la transmisión de microorganismos, las frecuencias observadas pueden considerarse bajas, pero confirmaron lo señalado en cuanto al carácter de portador de los corderos y los riesgos consecuentes de Salud Pública. Los aislamientos de STEC en mayor cantidad de animales “sanos”, sin diarrea, en forma semejante a lo señalado por

otros autores, indica que estos patógenos no serían tales para la especie, al menos en animales de la edad y condición productiva de los muestreados.

Es importante notar que la mayoría de los investigadores reportan la prevalencia de STEC en ovinos, como la proporción de corderos positivos a cepas STEC. En este estudio el 40 % de los corderos con diarrea resultaron positivos cepas STEC, a diferencia de las frecuencias reportadas por autores españoles de solo el 4.8% (Blanco y col., 1996), 4.1% (Muñoz y col., 1996) y 3.1% (Orden y col., 2003), quienes trabajaron con corderos con diarrea. Las diferencias en las frecuencias pueden estar relacionadas a la edad de los corderos estudiados, Orden y col., 2003, reportaron que la eliminación de cepas STEC en heces, es mayor en los animales adultos (33%) que en los corderos (3.1%) y trabajaron con corderos menores de 4 semanas, 2 a 3 semanas más jóvenes que los del presente trabajo (Orden y col., 2003; Rey y col., 2003). El manejo productivo que predomina en España son sistemas en los que la madre es separada de los corderos durante el día para alimentarse (Ganzábal y Mottonsi, 1991), mientras que los corderos de este trabajo, permanecen hasta el destete más de 6 a 7 semanas, junto a la madre en condición de encierro permanente, siendo la madre la principal fuente de infección, lo cual explicaría que los corderos de este estudio, presenten una eliminación parecida a la señalada para los ovinos adultos.

El 53% de los corderos sin diarrea en este estudio fueron positivos a cepas STEC, semejante a lo observado en otros países, que reportan proporciones de ovinos sanos positivos a cepas STEC, del 35% (Rey y col., 2003) y del 13.8% (Orden y col., 2003) en corderos de España, el 67% en Alemania (Beutin y col., 1993), el 44.6% en Australia (Belttelheim y col., 2000) y del 52% en Brasil (Vettorato y col., 2003), estos tres últimos en ovinos adultos.

Kudva y col., 1996 y 1997, han determinado que en los meses de verano entre junio y agosto, en los que la humedad ambiental se incrementa, la frecuencia de aislamiento de cepas O157:H7 es mayor que en los meses de invierno, el muestreo en este trabajo se realizó en el mes de junio, cuando las condiciones de humedad son mayores en la región donde esta ubicada la explotación, quizás esta condición favoreció los aislamientos.

Kudva y col., 1995 y 1996, también mencionan que el tipo de alimentación que reciben en las diferentes estaciones del año influye en la frecuencia de

aislamientos, en el invierno, época en que se necesita suplementar con concentrados, es la temporada en que encuentran una menor frecuencia de aislamientos. En este estudio, la calidad y el tipo de alimento fue constante durante todo el año, por lo que la condición nutricional no influyó en la proporción de corderos positivos a cepas STEC, en todo caso se podría esperar un mayor porcentaje de aislamientos en rebaños con problemas de alimentación.

La mayoría de los reportes de cepas STEC aisladas de ovinos, indican mayor frecuencia de la combinación de los genes, *stx1* y *stx2*, Bhat y col., 2008, reportan en corderos con y sin diarrea un 45.7% de cepas con *stx1* y *stx2*, 42.8% solo con *stx1* y 11.4% con *stx2*; Vettorato y col., 2003, en corderos sanos encontraron 50% *stx1+stx2*, 38.1% *stx1* y 11.9 % *stx2*, Rey y col., 2003, encontraron algo parecido con 53% *stx1+stx2*, 43% *stx1* y 10% *stx2* y Zweifel y col., 2004b, con 53% *stx1+stx2*, 25% *stx1* y 21% *stx2*, resultados similares a lo encontrado en las cepas identificadas en corderos con diarrea en este estudio, el 44%, presentaron *stx1+stx2* el 30% *stx1* y el 26% *stx2*. En los corderos sin diarrea el 48% de las cepas presenta *stx2*, 32% *stx1+stx2* y 20% *stx1*. Estos resultados contrastan con lo reportado por otros investigadores quienes mencionan que la toxina más importante en aislamientos de ovinos es la Stx1 (Brett y col., 2003), Wieler y col., 1998, describen una asociación entre la presencia de la toxina Stx1 y la presencia de diarrea. No se encontró diferencia en la frecuencia de cepas con los genes *stx* entre los grupos de corderos con y sin diarrea ( $p>0.05$ ), por lo que no se puede atribuir su presencia a alguno de estos genes.

La identificación de los genes que codifican para intimina (*eaeA*) y enterohemolisina (*hlyA*), solo se realizó a las cepas que presentan genes para las toxinas Stx. El 30% y 14% de las cepas STEC aisladas de corderos con y sin diarrea fueron positivas al gen *eaeA*, y contrastan con las reportadas por otros autores como Orden y col., 2003, quienes encontraron el gen *eaeA* solo en 2.9% de las cepas STEC, Bhat y col., 2008, de la misma forma reportan 2.8% de cepas *eaeA*<sup>+</sup>. Se ha sugerido que la presencia de este gen en algunas cepas STEC es necesaria para producir CH y/o HUS, (Paton y col., 1996), por lo que se considera que las cepas *eaeA*<sup>-</sup> son de menor virulencia. Bajo este criterio, las cepas aisladas tendrían mayor capacidad patógena, dada la proporción de cepas con el gen *eaeA*. Sin embargo, se han reportado algunos casos de HUS, causados por cepas STEC *eaeA*<sup>-</sup> (De Acevedo y col., 1994, citado por Orden y col., 2003), por

lo que de no ser indispensable este gen para producir enfermedad, las cepas sin gen *eaeA* deben ser consideradas de riesgo.

Por otro lado, Wales y col., 2005, señalan que la capacidad de producir lesión A/E, de las cepas STEC, es un mecanismo para la persistencia de estas en borregos.

La frecuencia de cepas STEC con el gen *hlyA* en corderos con diarrea fue de 44% y del 60% en los sin diarrea. Otros investigadores han encontrado proporciones semejantes, 33% en Brasil (Vetoratto y col., 2003); del 47% (Rey y col., 2003) y 60% (Orden y col., 2003) en España; hasta del 80% en la India (Bhat y col., 2008), por lo que se considera más frecuente encontrar cepas positivas al gen *hlyA* que al gen *eaeA*. Tomando en cuenta lo reportado por Betuin y col., 1989, que observaron una fuerte asociación entre la presencia de enterohemolisina con la producción de Stx en cepas asociadas a enfermedades diarreicas, se podría pensar que la presencia del gen *hlyA* representaría una mayor oportunidad de aislar estas cepas en corderos con diarrea, sin embargo, no existió diferencia ( $p > 0.05$ ) en la frecuencia de este gen en los dos grupos muestreados, suponiendo que la presencia del gen *hlyA* no se relaciona con la presencia de diarrea en corderos.

Con la determinación de los genes *eaeA* y *hlyA* se encontraron diferentes combinaciones de genes de virulencia (genotipo).

Los genotipos más frecuentemente aislados en cepas de ovinos clínicamente sanos han sido *stx1+hlyA* (Djordjevic y col., 2001 y Zweifel y col., 2004a), *stx1+stx2+hlyA* (Vetoratto y col., 2003; Rey y col., 2003; Zweifel y col., 2004b).

El genotipo *stx2+hlyA* se observó con mayor frecuencia en el grupo de corderos sin diarrea ( $p < 0.05$ ), lo que indica que estos genes no tienen influencia en la presentación de diarrea en los ovinos. Por lo tanto la presencia de los genes de virulencia y los diferentes genotipos observados, no se relacionaron con la presentación de casos de diarrea en los corderos de este trabajo. Sin embargo cabe señalar que 3 cepas (9 %) STEC aisladas de corderos con diarrea, así como una cepa (3%), de las aisladas de los corderos sin diarrea, poseen todos los genes que se determinaron en este estudio, lo que hace suponer que estas tienen una capacidad patógena de riesgo para el humano.

Solo el 6% de las cepas STEC no fermentaron el sorbitol. Un estudio realizado en Chile mostró que el 100% de las 19 cepas aisladas de pacientes con SHU, independiente del serogrupo, no fermentaron el sorbitol (Ojeda y col., 1995). La frecuencia de cepas STEC, sorbitol negativo, fue muy baja en el presente estudio, por lo que la característica de no fermentar el sorbitol, no resulta un referente confiable para la identificación de cepas STEC, coincidiendo con Notario y col., 2000, en Argentina, quienes encontraron que alrededor del 60% de las cepas STEC (incluidas cepas O157) fermentaban el sorbitol en aislados de diferentes especies.

El 94% de las cepas STEC de este estudio, produjeron citotoxicidad en células Vero, lo que indica que estas bacterias expresan el o los genes para Stx que poseen. Otros autores que han realizado la evaluación de las cepas STEC aisladas de ovinos, mediante citotoxicidad en cultivo de células Vero, han observado una proporción alta de cepas que producen citotoxicidad, desde 82% (Kudva y col., 1997), 86% (Djordjevic y col., 2001), 93% (Betuin y col., 1989), hasta 100% (Vettorato y col., 2003; Orden y col., 2003; Mora y col., 2005). Sin embargo, no se pudo establecer si el efecto citotóxico, se deba exclusivamente a la acción del la Stx, ya que no se realizó la neutralización con anticuerpos específicos anti-Stx1 y anti-Stx2, para determinar cual de las toxinas fue la causante del efecto citotóxico y si otro factor de virulencia pudo determinar el efecto en los cultivos, como ocurre con el "*cytotoxic necrotizing factor*" CNF o el "*cytolethal distending toxin*" (CLDT), (Oseck, 2001; Bielaszewska y col., 2004), la presencia de los genes que codifican para estos factores de virulencia no se determinó y no se puede descartar su presencia en las cepas estudiadas.

Solo 4 cepas resultaron negativas a la prueba de toxicidad, dos aisladas del grupo con diarrea presentaron los genes *stx1+eaeA+hlyA* y *stx2* respectivamente y dos en los sin diarrea presentaron solo el gen *stx1*, se puede deducir que estas cepas, a pesar de tener los genes, no los expresaron bajo las condiciones del trabajo y es posible se trate de cepas con mutación en los genes, que estén regulados genéticamente, bien la bacteria no tenga la capacidad de exportar la toxina (Karch y col., 1992).

El serotipo se considera como la característica más consistente para la identificación de bacterias patógenas (Orskov y Orskov, 1984). En otros países se han reportado una gran variedad de serotipos en cepas aisladas de ovinos, los

más frecuentes son: O5:H-, O91: H-, O117:H-, O123:H-, O128:H2, O146:H8 y O146:H21 (Kudva y col., 1997; Bettelheim y col., 2000; Rey y col., 2003; Vettorato y col. 2003; Orden y col., 2003; Zweifel y col., 2004). De los anteriores serotipos en el presente estudio, se aislaron el O123:H-, O128:H2 y O146:H21 , en el grupo de corderos con diarrea los serotipos que se aislaron con mayor frecuencia fueron O104:H7, O26:H-, O117:H- O165:H-, ONT:H11, y en el grupo sin diarrea O123:H-, O166:H45, O104:H7, O146:H21, O115:H45 y O148:H-. Los serotipos O104:H7 y O123:H- se identificaron en corderos con y sin diarrea, estos dos serotipos han sido reportados en aislamientos de ovinos, bovinos y humanos (Bettelheim, 2003). Por otro lado se lograron identificar 15 serotipos que no han sido reportados como STEC.

Tomando en cuenta exclusivamente los serogrupos identificados, se puede observar que varios de éstos se han clasificado dentro de otros grupos patógenos (Tabla 13).

Tabla 13. serogrupos identificados asociados a otros grupos patógenos.

Corderos con diarrea		Corderos sin diarrea	
Serogrupo	Grupo Patógeno asociado	Serogrupo	Grupo Patógeno asociado
O7	Meningitis /sepsis, EIEC	O8	ETEC
O8	ETEC	O15	ETEC
O26	EPEC, EAEC	O20	ETEC
O55	EPEC	O124	EIEC
O115	ETEC	O128	EPEC, EIEC
O139	ETEC	O139	ETEC
O173	ETEC	O148	ETEC
		O166	ETEC

Tomado de Orskov y Orskov, (1992), Levine, (1987), Lior (1994) y Nataro y Kaper (1998).

El hecho que los genes que codifican para las toxinas Stx se encuentren en fagos, permite que se encuentren cada vez más serotipos con estos genes (Schmidt, 2001). En este trabajo se consideraron cepas del grupo STEC, a las que presentaron los genes que codifican para los factores de virulencia del grupo. Sin embargo, al no haberse realizado la identificación de los genes de virulencia de otros grupos diarreagénicos, se abre la posibilidad de que las cepas identificadas como STEC, también presentaran genes de virulencia de otros grupos.

En el presente trabajo se pudieron aislar cepas de 10 serotipos que se han relacionado con casos de HUS: O8:H21, O26:H-, O103:H-, O103:H2, O118:H12, O165:H, ONT:H-, OR:H- y OR:H11, (Bettelheim, 2003).

El no haber identificado cepas del serotipo O157:H7, puede ser un reflejo de la baja prevalencia del serotipo en México y de que no se dirigió el estudio en forma intencionada a este serotipo, incluyendo medios selectivos y de enriquecimiento, asociados a técnicas de separación inmunomagnética.

El término seropatotipo se utiliza para referirse a la asociación entre el serotipo y los genes de virulencia, en el presente trabajo se pudieron identificar algunos serotipos que presentan diferente combinación de genes, lo que hace más amplia las características de las bacterias identificadas.

Se identificaron cepas de serotipos relacionados a casos de HUS, como O26:H- aislada de un cordero con diarrea, que presentaron los genes *stx1* y *eaeA*, otro serotipo, el O103:H2, aislado de un cordero sin diarrea, también ha sido relacionado a casos de HUS y mostró todos los genes de virulencia determinados en este trabajo, lo que hace suponer que esta sería una bacteria potencialmente patógena, de la misma forma que las cepas aisladas del seropatotipo O165:H- *stx1* + *stx2* + *eaeA* + *hlyA* así como el seropatotipo ONT:H- *stx1* + *stx2* + *eaeA* + *hlyA*.

El hecho que de un animal se haya identificado más de una cepa STEC del mismo serotipo, sugiere que el mismo se encuentra colonizando al individuo. En este trabajo se identificaron en ambos grupos de corderos animales que presentaron una mayor eliminación de bacterias (2 o más) del mismo serotipo.

Los serotipos identificados colonizando el grupo de corderos con diarrea fueron: O26:H-, O104:H7, O165:H-, O117:H7, de los cuales O26:H- y O165:H- han sido reportados de casos de SUH, en el grupo sin diarrea los serotipos

O15:H45, O123:H-, O146:H21, O166:H45, se encuentran colonizando al menos a un animal, de estos el O123:H- y el O146:H21, han sido aislados del humano.

La diversidad genética y serológica, de las cepas de tránsito aisladas de ovinos, puede ser el resultado de la presencia de bacteriofagos que infectan cepas de *E. coli* no STEC en el intestino de los animales (Betuin y col., 1997).

Betuin y col., 1997, consideran que la principal fuente de bacteriofagos en un individuo son las cepas STEC que lo colonizan, ya que muchos de los animales que analizaron presentaron cepas con el mismo genotipo. En este estudio, algunos de los serotipos que se identificaron colonizando, muestran diferente genotipo. Probablemente se necesite analizar más individuos, así como cepas por individuo, para encontrar menos heterogeneidad en los resultados de trabajos como este.

Considerando las naves de producción muestreadas, se encontró que solo los serotipos O104:H7 y O123:H- estaban presentes en ambas, lo que puede indicar que el contar con personal independiente para cada nave tiene un impacto sanitario considerable y se podría descartar la posibilidad de que los encargados de las naves actúen como transmisores de este tipo de bacterias. Este resultado contradice lo mencionado por Kudva y col., 1995, quienes no descartan la posibilidad de que roedores que transitan de un alojamiento a otro pueden ser posibles vectores de la bacteria.

En las dos naves, la mayoría de los aislados corresponden a serotipos diferentes, en la nave uno O103:H2, O104:H7 y O166:H45 se aislaron al menos de dos corderos, mientras en la nave dos los serotipos O123:H-, O146:H21, O148:H-, ONT:H11 y OR:H- fueron aislados de 2 o más corderos. Esto puede, en cierta medida, apoyar lo señalado por Kudva y col., 1995, respecto a la posible transmisión horizontal de un animal infectado a otro no infectado, autores aislaron de ovinos no inoculados con *E. coli* O157:H7, cuando fueron alojados en el mismo corral con animales inoculados 21 días antes con este serotipo.

## 9. CONCLUSIÓN

Se realizó el aislamiento de *Escherichia coli* STEC tanto de corderos con y sin diarrea, resultando mayor el número de aislamientos de cepas STEC en los animales sin diarrea ( $p < 0.05$ ), por lo que al parecer estas bacterias no se encuentran asociadas a la presentación de diarrea en corderos. Tampoco existió asociación entre los serogrupos y serotipos aislados y el cuadro de diarrea en corderos criados de manera intensiva.

La presencia de los genes de virulencia *stx 1*, *stx 2*, *eaeA* y *hlyA* y las diferentes combinaciones de estos en las cepas STEC fue parecida en corderos con y sin diarrea, por lo que tampoco se encuentra relacionada con la presencia de diarrea.

Dado no encontrar relación entre la frecuencia de aislamiento, genes de virulencia así como serogrupos y serotipos con la presencia de diarrea, estas cepas no presentan un papel patógeno sobre los corderos. Sin embargo a pesar de no encontrar cepas O157:H7 se encontraron otros serotipos relacionados a enfermedad SUH, principalmente, lo que indica que los corderos son reservorios de estas cepas para su transmisión.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Barlow, R.S., Gobius, S.K., Desmarchelier, M.P. 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one-year study. *Int. J. Food Microbiol.* 111:1-5.
2. Bettelheim K.A., Bensink J.C. and Tambunan, H.S. 2000. Serotypes of verotoxin producing *Escherichia coli* isolated from healthy sheep. *CIMID*, 23:1-7.
3. Bettelheim, K.A. 2003. BioNet website <http://www.sciencenet.com.au>
4. Beutin, L., Montenegro, A.M., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S. And Stephan, R. 1989. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27:11:2559-2564.
5. Betuin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S. and Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31:9:2483-2488.
6. Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S. and Karch, H. 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J. Clin. Microbiol.* 33:631-635.
7. Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H.A. and Whittam, T. 1997. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol*; 63:2175–80.
8. Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tscha"pe, H., Schmidt, M. A. and Karch, H. 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* 72:3:1812-1816.
9. Bhat, M.A., Nishikawa, Y., Wani, S.A. 2008. Prevalence and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoeic and healthy lambs in India. *Small Rum. Res.* 75:65-70.
10. Blanco, J., Cid, D., Blanco, J.E., Blanco, M., Ruiz, J.A.S., De la Fuente, R. 1996. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolates from diarrhoeic lambs in Spain. *Vet. Microbiol.* 49: 209-217.
11. Blood, D.C., Studdert, V.P. and Gay, .C. 2007. Saunders comprehensive veterinary dictionary. Saunders Elsevier 3<sup>a</sup> Ed. Toronto Canada.

12. Brett, K.N., Ramachandran, V., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A., Walker M.J. and Djorjevic. S.P. 2003. Stx1c is the most common Shiga Toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41,3:926-936.
13. Callaway, T.R., Anderson, R.C., Tellez, G., Rosario, C., Eslava, C. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and swine in central México. *J. Food Prot.* 67,10:2274-2276.
14. Cowan, S.T. y Steel, K.J. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2ª ed. Ed. Continental, México.
15. Cuellar, O.J.A., Soto, D.L.C., Delgado, E.M. 2005. Producción ovina empresarial de los estados de México, Jalisco y Michoacán. *Rumiantes.* 11:56-60.
16. Cho, S., Diez-Gonzalez, F., Fossler, C.P., Wells, S.J., Hedberg, C.W., Kaneene, J.B., Ruegg, P.L., Warnik, L.D. and Bender, J.B. 2006. Prevalence of Shiga toxin-encoding and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from dairy farms and country fairs. *Vet. Microbiol.* 118:289-298.
17. Djordjevic, S.P., Hornitzky, M.A., Bailey, G., Gill, P., Vanselow, B., Walker, K. and Betteleim, K.A. 2001. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *J. Clin. Microbiol.* 39:5:2017-2021.
18. Ganzábal, A. y Montossi, F. 1991, Producción de leche ovina. Situación actual de la producción mundial y perspectivas en el Uruguay. Edit. por la UDIT del INIA. Uruguay. p. 1-41.
19. Hoey, E.D.E., Currie, C., Else, R.W., Nutikka, A., Lingwood, C.A., Gally, D.L. and Smith, D.G.E. 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J. med. Microbiol.* 52:143-149.
20. Hussen, H.S. and Bollinger, L.M. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat sci.* 71:676-689.
21. Karch, H., Meyer, T., Russman, H. and Heesemann. 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* 60:3464-3467.
22. Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Starvic, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:3:775-779.
23. Kudva, I.T., Hatfield, P.G. and Hovde, C.J., 1995. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1363-1370.

24. Kudva, I.T., Hatfield, P.G. and Hovde, C.J., 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. J. Clin. Microbiol. 34:2:431-433.
25. Kudva, I.T., Hatfield, P.G. and Hovde, C.J., 1997. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. J. Clin. Microbiol. 35:4:892-899.
26. Lemeshow, S. Hosmer Jr, D.W. Klar, J. and Lawanga, S.K. 1990. Adequacy of sample size in health studies. WHO. 1.1:1-4
27. Leotta, G.A., Deza, N., Origlia, J., Toma, C., Chinen, I., Miliwebsky, E., Iyoda, S., Sosa-Estain, S. and Rivas, M. 2006. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. Vet. Microbiol. 118:151-157.
28. Levine, M. 1987. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155:3:377.
29. Lior, H. 1994. Classification of *Escherichia coli* in domestic animals and human. Ed. Gyles, C.L. CABI. Oxford University Press. 46.
30. Lopéz, S.C., Cerna, J.F., Sepulveda, N.V., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Tarr, P.I. and Estrada, T.G. 2003. Single, multiplex polimerasa chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Emmer. Infect. Dis. 9:1127-131.
31. Mac Faddin, J. F. 1984. Biochemical test for identification of medical bacterial. 2<sup>a</sup>. ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore USA.
32. Menge, C., Eisenberg, T., Stamm, I. And Baljer, G. 2006. Comparison of binding and effects of *Escherichia coli* Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 113:392-403.
33. Molbak, K., Scheutz, F. 2004. Verotoxin-producing *Escherichia coli* and other diarrheagenic *E. coli*. Waterborne zoonoses: Identification, causes and control. OMS. 213-227.
34. Mora, A., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Dhahi, G., Echeita, A., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J. 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolates from humans, cattle, sheep and food in Spain. Res. Microbiol. 156:793-806.
35. Moreno, C.B., Tortora, P.J.L., Trejo G.A.A. 1996. Causas de morbilidad y mortalidad en corderos. Memorias curso Bases de la cría ovina III. Querétaro Querétaro. Mayo 16-18.

36. Muñoz, M., Alvarez, M., Lanza, I., Carmenes, P., 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect.* 117:203–211.
37. Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
38. Naylor, S.W., Gally, D.L. and Low, J.C. 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:419-441.
39. Notario, R.P., Fain, J.C.B., Prado, V.J., Ríos, M.V., Borda N.O. and Gambandé, T.G. 2000. Animal reservoir and genotypic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in Argentina. *Rev. Med. Chile.* 128:12:1335-41.
40. O'Brien, A.D., La Veck, G.D., Thompson, M.R. and Formal, S.B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146:763-769.
41. Ojeda, A., Prado, V., Martinez, J., Arellano, C., Borczyk, A., Johnson, W., Lior, H., and Levine, M. M. 1995. Sorbitol-Negative Phenotype among Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains of Different Serotypes and from Different Sources. *J. Clin. Microbiol.* 33: 8: 2199–2201.
42. Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Cid, D., Gonzalez, G.A., Blanco, J., De la Fuente, R. 2003. Prevalence and characterization of vero cytotoxin- producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 130:313–321.
43. Ortiz H.A. 2004. Sistemas de producción en el altiplano. *Rumiante.* 10:62-64.
44. Orskov, F. and Orskov, I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.* 12:43-112.
45. Osek, J. 2001. Characterization of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolates from healthy calves in Poland. *J. Vet. Med. B.* 48:641-646.
46. Parreira, V.R., Arns, C.W., Yano, T. 1994. An agar-overlay method for detection of toxin produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:303-306.
47. Paton, A.W., Paton, J.C., Goldwater, P.N. and Manning, P.A. 1993. Direct detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:3063-3067.
48. Paton, A.W., Ratcli, R.M., Doyle, R.M., et al. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of haemolytic syndrome-uremic caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1622–7.

49. Paton, J.C. and Paton, A.W. 1998<sup>a</sup>. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinic. Microbiol. Rev.* 11:3:450-479.
50. Paton, A.W. and Paton, J.C. 1998<sup>b</sup>. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *J. Clinic. Microbiol.* 36:2: 598:602.
51. Paton, A.W. and Paton, J.C. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *saa*. *J. Clinic. Microbiol.* 40,1: 271-274.
52. Podola, N.L., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Etcheverria, A.I., Arrolly, G.H., Usera, M.A. and Parma, A.E. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolates from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 100:3-9.
53. Sandvig, K. 2001. Shiga toxins. *Toxic.* 39:1629-1635.
54. Schmidt, H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* 152:687-695.
55. Rey, J. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Dhabi, G., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., Alonso, M.P., Usera, M.A., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J. 2003. Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet. Microbiol.* 94:47-56
56. Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J.E., Hermoso de mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J.M. 2006. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. food Microbiol.* 107:212-217.
57. Samuel, J.E., Vernon, L.T., Burris, J.A., Owens, J.W., Gordon, V.M., Wadolkowski, E.A. and O'Brien, A.D. 1993. Comparison of the relative toxicities of shiga-like toxin type I and type II for mice. *Infect. Immunity.* 61:8:3392-3402.
58. Urdahl, A.M., Alvseike, O., Skjerve, E. and Wasteson, Y. 2001. Shiga toxin genes (*stx*) in Norwegian sheep herds. *Epidemiol. Infect.* 127:129-134.
59. Valdivia, A.G., Cevantes, R.R., Soriano, B.D.M., Alba, H.F., Montaraz, C.J.A. y Tortora, P.J.L. 2000. Interacción de cepas verocitotóxicas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros. *Vet. Mex.* 31:4:293-300.

60. Varela, H.J.J., Cabrera, D.E., Cardona, L.M.A., Ibarra, V.L.M., Rangel, V.H., Castillo, A., Torres, V.M.R., Ramírez, A.A. 2007. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 113:237-241.
61. Vettorato, M.P., Leomil, L., Guth, B.E.C., Irino, K., Pestana de Castro, A.P. 2003 Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* STEC isolates of sheep in the state of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Microbiol.* 95:103-109.
62. Wani, S.A., Bhat, M.A., Samanta, I., Ishaq, S.M., Asharafi, M.A. and Buchh, A.S. 2004. Epidemiology of diarrhea caused by rotavirus and *Escherichia coli* in lambs in Kashmir valley, India. *Small. Rum. Res.* 52:145-153.
63. Wales, A.D., Pearson, G.R., Best, A., Cookson, A.L., La Ragione, R.M., Roe, J.M., Hayes, C.M. and Woolward, M.J. 2005. Naturally acquired attaching and effacing *Escherichia coli* in sheep. *Res. Vet. Sci.* 78:109-115.
64. Wieler, L. H., R. Bauerfeind, and G. Baljer. 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 276:243-253.
65. Wittam, T.S. 1998. Evolution of *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. In J.B. Kaper and A.D. O'Brien (eds.) *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM. Washington. USA. 195-212.
66. Organización Mundial de la Salud (OMS). 1998. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). WHO/CSR/APH/98.8.
67. Zweifel, C., Zychowska, M.A., Stephan, R. 2004a. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* Isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 92:45-53.
68. Zweifel, C., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., Stephan, R., 2004b. Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 19-27.

## ABREVIATURAS

STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> productora de toxina de Shiga).
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> enterohemorrágica).
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> enterotoxigenica).
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> enteropatógena).
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> enteroinvasiva).
EAEC	Enteroadgregative <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> enteroagregativa).
DAEC	Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> difusamente adherida).
Stx	Toxina de Shiga.
Stx1	Toxina de Shiga 1.
Stx2	Toxina de Shiga 2.
stx1	Gen que codifica para la toxina Stx1.
stx2	Gen que codifica para la toxina Stx2.
eaeA	Gen que codifica para la proteína Intimina.
hlyA	Gen que codifica para la enterohemolisina.
Gb3	Globotriosilseramido.
A/E	Lesión “attaching and effacing”.
CH	Colitis hemorrágica.
SUH	Síndrome urémico hemolítico.
Ag	Antígeno.