

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA PARA DETECTAR FACTORES DE
VIRULENCIA DE *Escherichia coli* TOXIGÉNICA DE LECHONES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

FLORENCIA DEL ROSARIO BÁEZ GUILLÉN

Asesoras:

MVZ MC Rosario Esperanza Galván Pérez

MVZ EPA Alejandra Marcadillo Sierra

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi padre Rafael por todo su apoyo y amor durante todo este tiempo.
A mi madre Irma, por todo el cariño y el apoyo durante todo este tiempo.

A mis hermanos Tania y Rafael, por todo el amor y los miles de momentos felices que hemos pasado juntos, durante toda la vida y la carrera. También a mis gatos por todos los alegres momentos que me dan.

A mis abuelos, tíos y primos, con mención especial a mis tías Violeta, Eva y Concepción, porque siempre están ahí, para ayudar, apoyar, escuchar y dar mucho pero mucho cariño, no solo durante la carrera si no en mi vida.

A Carlos Andrés Ramírez Granada por darme ese empujón que se necesita para llegar al final de este camino, TE AMO.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Departamento de Producción Animal: Cerdos

A mis asesoras por su apoyo y enseñanzas durante la elaboración de este trabajo.

En especial a la Dra. Esperanza, por que gracias a ella se, lo que se.

A Iván S. B. por el apoyo en la realización de la experimentación para este trabajo. Y por todo el apoyo durante la realización del mismo.

A Dr Roberto Martínez Gamba, por el apoyo en la redacción de este trabajo.

A los sinodales por la atención prestada para esta tesis.

A los miembros del DPAC, por todo el apoyo, cariño y aguante que tuvieron para conmigo.

A mis amigos porque sin ellos todo este tiempo no hubiera sido tan divertido y por todo el apoyo, porque en las buenas y en las malas siempre estuvieron ahí: Araceli, Judith, Erendira, Carolina, Cecilia, Ernesto, Francisco pero en especial agradecer a Rocío, Diana, Edward, porque me vieron llorar y reír, y me vieron enojada y muy frustrada y aun así estuvieron y están conmigo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	10
HIPOTESIS	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24
FIGURAS Y CUADROS	31

I. RESUMEN

FLORENCIA DEL ROSARIO BÁEZ GUILLÉN. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA DETECTAR FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* TOXIGÉNICA DE LECHONES. (Dirigido por: la MVZ MC Rosario Esperanza Galván Pérez y la MVZ EPA Alejandra Mercadillo Sierra.)

El objetivo de este estudio fue estandarizar la técnica de PCR para la detección de genes productores de los factores de virulencia de *Escherichia coli* (*E. coli*). Así como determinar los factores de virulencia (FV) de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de lechones con diarrea en las primeras semanas de edad. Se utilizaron 100 cepas de *E. coli* previamente identificadas por pruebas bioquímicas a partir de casos clínicos de diarrea en lechones lactantes (81) y lechones destetados (19). Fue estandarizado un protocolo de PCR con un tiempo y temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de Extensión de 94°C por 45", 60°C por 45" y 72°C por 45", y una extensión final a 72°C por 10 minutos. La visualización de los amplicones se realizó con electroforesis en Gel de Agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. De las muestras trabajadas, el 35% fueron positivas a uno o más factores de virulencia; el factor de virulencia que se presentó en mayor porcentaje fue STa (45%), seguido de F4 (43%), F5 (37%), F18 (26%), LT (23%), las toxinas F41 y F6 se presentaron en el 6% de los casos, mientras que VT en un 3 %.

En cuanto a las muestras de lechones lactantes, 25% de ellas fueron positivas a uno o más factores de virulencia. El factor de virulencia mas encontrado fue STa con 60%, F4 y F5 40%, F18 28%, LT 24%, F6 y F41 8% y VT con 4%.

En el grupo de lechones destetados, el 10% de las muestras fueron positivas, el factor de virulencia que tuvo mayor porcentaje fue F4 con 50%, seguido de F5 con 40%, F18, STa y LT 20%.

En conclusión, a través de la técnica de PCR es posible detectar los factores de virulencia de *E. coli*. causantes de diarreas neonatales y del destete.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA DETECTAR FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* TOXIGÉNICA DE LECHONES.

II. INTRODUCCIÓN

Actualmente la porcicultura representa una de las industrias ganaderas mas importantes del país, la producción mensual se estima alrededor de 90 mil toneladas, en el año 2008 la producción estimada fue de 1.18 millones de toneladas, el consumo per cápita de carne de cerdo es de 9.6 kilogramos por año, aproximadamente y el consumo de carne de cerdo en México es de 1.54 millones de toneladas⁽¹⁾⁽²⁾.

Debido a la selección genética, en la actualidad el cerdo es muy eficiente en su conversión alimenticia y ganancia de peso, pero ha desarrollado una deficiencia en la resistencia a las enfermedades, siendo éste un problema común en todas las etapas de la producción. Su impacto económico es importante debido a la tasa de mortalidad, retraso en el crecimiento y adicionalmente por los costos en medicación empleada basada en el uso de quimioterapéuticos para suplir las deficiencias en las instalaciones, manejo, higiene y otros factores que están relacionados con la salud del animal.⁽³⁾⁽⁴⁾

Las enfermedades gastroentéricas de los cerdos, han sido una de las principales preocupaciones tanto de los productores, como de los Médicos Veterinarios, ya que junto a otras enfermedades, son responsables de cuantiosas pérdidas económicas en las explotaciones porcinas.⁽³⁾

Estas se clasifican de acuerdo con la porción del tracto digestivo afectado, el grado de lesión producida por cada uno de los agentes y a la edad de los animales.⁽⁴⁾

Entre las enfermedades que causan diarrea en lechones, encontramos a las parasitarias, como la Coccidiosis, causada principalmente por *Isospora suis*, las virales, como la Gastroenteritis transmisible, provocada por un Coronavirus, y dentro de las bacterianas está la Enteritis necrótica del lechón, por *Clostridium perfringens* tipo C, así como las causadas por *Escherichia coli* (*E. coli*).⁽⁵⁾

Las cepas de *E. coli* que producen diarrea se caracterizan por ser endémicas, altamente transmisibles y por presentar un desenlace usualmente fatal, en lechones de 0 a 12 semanas de edad.⁽⁶⁾

Los lechones están expuestos a una gran cantidad de bacterias al momento de nacer, la mayoría de ellas no son patógenas, pero potencialmente alguna cepa patógena de *E. coli* pudiera estar presente y desarrollar la infección.

Hay diferentes factores que pueden influenciar el establecimiento de la infección por *E. coli* causando diarrea, por ejemplo el pH relativamente alcalino del estómago y duodeno al nacimiento, la poca producción de enzimas y el abrupto cambio de leche a alimento sólido, así como factores de manejo y estrés que tienden a disminuir la inmunidad de los animales, pudiendo ser factores importantes, que permiten la sobrevivencia y desarrollo de bacterias patógenas ingeridas.⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾

E. coli es un bacilo Gram-negativo, móvil y anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y a la tribu *Escherichia*, puede ser recuperado fácilmente de especímenes clínicos en medios generales o específicos a 37°C bajo condiciones aeróbicas.⁽¹⁰⁾

La diferenciación serológica de *E. coli* está basada en la determinación de antígenos superficiales, O, K, H y F; el antígeno O es un polisacárido termoestable, el K es un polisacárido capsular, el H está compuesto de antígenos flagelares y el F por antígenos fimbriales.

Existen al menos 6 patotipos de *E. coli* que provocan diarrea, basándose en las diferentes características clínicas y epidemiológicas, así como por sus determinantes de virulencia específicos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC).⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

Las cepas causantes de diarrea en los lechones durante la lactancia y postdestete son las pertenecientes al patotipo ETEC, las cuales colonizan el intestino delgado del lechón en las primeras horas de nacido, atacando a los enterocitos, con ayuda de unas proteínas de superficie llamadas fimbrias, las cuales le dan la capacidad de adherirse a las células del epitelio intestinal, estimulando la salida de líquido de los enterocitos, produciendo diarrea acuosa acompañada de deshidratación, desbalance electrolítico, que incluye hipokalemia y acidosis, o un desbalance electrolítico de calcio y sodio, ocasionado por la producción de hasta 3 enterotoxinas: Termolábil (LT), Termoestable (ST) y la Verotoxina (VT).⁽⁸⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ Estas pueden alterar la fisiología intestinal, provocando un incremento del contenido acuoso en el interior de éste, reduciendo su capacidad de absorción.⁽¹⁴⁾

Esta combinación de cambios patológicos da como resultado la muerte de los lechones.⁽⁸⁾⁽¹⁵⁾

Las fimbrias se adhieren a los enterocitos a través de receptores celulares que interactúan en forma específica con ellas, lo que le permite multiplicarse *in situ*

logrando la colonización de la mucosa del intestino delgado, una vez establecida, secreta las enterotoxinas.⁽¹⁶⁾

Las toxinas LT y ST tienen 2 subunidades, la subunidad B forma un anillo pentamérico con una subunidad A que es monomérica, la cuál está insertada en el centro. El anillo se une a los gangliósidos sobre la superficie celular y parece proveer de un canal a través del cual penetra la subunidad monomérica. Se forma una modificación proteolítica y después de la internalización se lleva a cabo la ADP-ribosilación de un complejo regulador en la membrana celular (usando NADH como sustrato), causando así la activación de la enzima adenilato ciclasa. La activación de esta enzima, da lugar a un incremento en la producción del AMP cíclico, lo que lleva a un decremento en la incorporación de cloruro de sodio desde el lumen intestinal y activa la secreción de iones y agua, dando lugar a la diarrea.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

La VT trabaja cuando un fragmento de la subunidad pasa por el ribosoma, donde tiene actividad de N-glicosidasa sobre un solo residuo de adenosina. La diarrea es el resultado, no de una forma activa de secreción de iones/agua, sino de una deficiente absorción de agua debida a la muerte de los enterocitos, al inhibir la síntesis de proteínas.⁽¹⁴⁾

Hasta el momento han sido reportados varios factores antigénicos de colonización llamadas adhesinas, en las enfermedades entéricas de los porcinos, como son: K88 (F4), 987P (F6), K99 (F5), F41 y en raras ocasiones puede presentarse F18.⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

La ETEC provoca diarrea en la etapa neonatal (menores de 6 días) e inmediatamente después del destete.⁽⁸⁾

El factor fimbrial F4 está asociado a la diarrea en ambos periodos⁽²¹⁾, sin embargo F6, F5 y F41, comúnmente están relacionados con el periodo neonatal, e infrecuentemente

con el destete, mientras que F18 está asociado casi exclusivamente a la diarrea postdestete.⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾

Algunas cepas de *E. coli* causantes de diarrea postdestete y enfermedad del edema, pueden producir VT.

Debido a que a través del aislamiento bacteriano, solo es posible aislar el agente involucrado sin poder diferenciar las cepas toxigénicas, se han desarrollado diferentes técnicas para identificarlas, entre las que se pueden citar, ensayos inmunológicos, pruebas *in vivo*, como son la ligadura de asa intestinal o la prueba de Sereny, las cuales resultan muy laboriosas y cruentas.⁽¹²⁾⁽²²⁾⁽²³⁾

Las pruebas de biología molecular como el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica creada en 1983 por el Dr. Kerry Mullis, representa un gran avance en cuanto a métodos de diagnóstico, ya que permite la identificación rápida de microorganismos, mediante la amplificación específica de fragmentos de ADN limitados por iniciadores, en la que se pone de manifiesto los fragmentos de genes que están involucrados en los mecanismos de patogenicidad,⁽²⁴⁾ en corto tiempo, ofreciendo una alternativa a los métodos de cultivo bacteriológico y serotipificación. Esta técnica se ha vuelto común a causa de la relativa facilidad de manipulación y a su alta reproducibilidad.⁽²³⁾

La identificación de factores de virulencia, en cuadros de diarrea de lechones, permite realizar un diagnóstico más rápido de cepas ETEC para instaurar tratamientos e inmunoprofilaxis⁽²⁵⁾

Para la diferenciación entre ETEC de otras *E. coli* no patógenas y otras bacterias entéricas aisladas se requiere la detección de los genes de las enterotoxinas. El diagnóstico convencional depende del crecimiento de la bacteria y una identificación subsiguiente con un perfil bioquímico, además para la diferenciación de las toxinas producidas se requiere

de comprobaciones adicionales. La PCR ha sido descrita para la diferenciación específica de *E. coli* de otras bacterias Gram negativas, con iniciadores derivados de secuencias de nucleótidos, de genes específicos de los factores de virulencia de dicha bacteria.⁽²⁴⁾

A pesar de los significativos avances para la identificación molecular de ETEC, es importante mejorar los procedimientos actuales de PCR para la detección de estos organismos y su diferenciación entre toxigénicos y no toxigénicos. Este procedimiento puede simplificar el proceso de identificación y eliminar los requerimientos de otros procesos de confirmación.⁽²⁴⁾

III. JUSTIFICACIÓN

Dada la incapacidad del aislamiento bacteriano para tipificar *E. coli*, se requiere estandarizar una técnica de PCR, en la que, a partir de una sola muestra, se identifiquen cepas enterotoxigénicas.

IV.OBJETIVO

1-Estandarizar la técnica de PCR con iniciadores específicos, que permitan la detección de los factores de virulencia: STa, STb, LT, VT, F4, F5, F6, F18 y F41 de *Escherichia coli*.

2- Determinar los factores de virulencia de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de lechones con diarrea en las primeras semanas de edad.

V. HIPOTESIS

La técnica de PCR detectará la presencia de los genes que codifican factores de virulencia en las *E. coli* toxigénicas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Muestras bacterianas:

Se utilizaron 100 cepas de *E. coli* previamente aisladas de muestras de lechones lactantes y destetados (Tabla 1), con diarrea remitidos al Laboratorio de Diagnóstico del DPAC.

Las cepas de *E. coli*, preservadas en leche descremada, se resembraron en medios selectivos Agar MacConkey y Agar MacConkey con Sorbitol (Figuras 1 y 2) y fueron verificadas como *E. coli*, por medio de pruebas bioquímicas, (Cuadro1). Se resuspendieron 5 colonias en 100µl de agua inyectable estéril, en crioviales, manteniéndose en congelación, hasta su uso. (Figuras 3, 4 y 5)



FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURA 3



FIGURA 4



FIGURA 5

Tabla 1. Etapa productiva de colección de muestras.

Edad de la muestra	# de muestras
Lactación	81
Destete	19
TOTAL	100

Para la extracción de ADN se utilizó la técnica descrita por Soumet *et al.* Una vez descongelada la muestra, se somete a ebullición a 100°C durante 10 minutos y se centrifuga a 3000 g x minuto.⁽²²⁾⁽²⁶⁾

Se utilizaron 9 iniciadores para los factores de virulencia que intervienen en la diarrea neonatal y posdestete de los lechones. (Tabla 2)

Tabla 2. Iniciadores Utilizados en la Técnica de PCR

Factor de virulencia	Secuencia 5' a 3'	Referencia Gene bank	Pares de bases (pb)
STa	F: CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT R: TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG	M25607	157
STb	F: TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT R: CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA	AY028790	112
LT	F: GGG GTT ACT ATC CTC TCT AT R: TGG TCT CGG TCA GAT ATG T	X83966	271
VT	F: AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT R: TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC	AM904726	732
F4	F: CAA TCC GTC CGA GAA TAT CA R: CTT GGT ACA GGT CTT AAT GG	AJ616256	190
F5	F: AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA R: AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT	XO5797	229
F6	F: AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC R: GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC	U50547	408
F18	F: TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA R: ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG	M61713	312
F41	F: AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG R: CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC	M21788	611

Se utilizaron los siguientes reactivos y cantidades para la reacción de PCR.

Reactivo* ¹	Cantidad (µl)
Buffer de muestra	2

Magnesio	1
DNTP's	2
Taq polimerasa	0.5
DNA muestra	0.5
Iniciador	0.5 c/u
Agua estéril	9.5

Fue estandarizado un protocolo de PCR múltiple usando un termociclador*², con un tiempo y temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de Extensión de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Una vez terminada la reacción de PCR, los productos se leyeron en un gel de Agarosa al 2%, utilizando para 7 µl de muestra, 1µl de solución de muestra y 3µl de marcador de peso molecular*¹.

Se corrió la electroforesis a 90 volts por 70 minutos. Terminada la electroforesis, el gel fue teñido con Bromuro de Etidio durante 15 minutos; la lectura se realizó comparando el peso molecular de cada uno de los genes amplificados, con respecto al marcador de peso molecular pBR322/Msp I, que va de 147 pb a 622 pb y se visualizó en un foto documentador.*³

*¹ Marca BIOGENICA.

*²Termociclador *MyCycler Thermal-cycler* (Biorad, USA).

*³Marca UVP UV/White Light Transilluminator.

VII. RESULTADOS

De las 100 muestras trabajadas, el 35% fue positivo a uno o varios factores de virulencia pertenecientes a ETEC (cuadro2).

Cuadro 2. Porcentaje de Muestras Positivas por Etapa.

Etapa	Nº de Animales	Porcentaje
Lactancia	81	25
Destetados	19	10
Total	100	35

Cuadro 3. Porcentaje de Factores de Virulencia

Factores de Virulencia (FV)	% de Presentación
STa	48.57
LT	22.85
VT	2.85
F4	42.85
F5	40
F18	25.71
F41	5.71
F6	2.85

Como podemos observar en el cuadro 3, la toxina más encontrada fue STa en un 48.57%, seguida por LT en un 22.85% y VT solamente en un 2.85%. La toxina STb no pudo ser detectada en estas muestras. En cuanto a la fimbria, F4 se encontró en un 42.88%, F5 en 40%, F18 en 25.71%, F41 en 5.71% y F6 en 2.85%.

Lactacia

Se trabajaron 81 muestras de cerdos lactantes, de las cuales el 30.86% fueron positivas. En cuanto a las toxinas, se observó que el 60% fueron positivas a STa, 24% a LT y sólo el 4% a VT. Para las fimbrias, se encontró que el 40% de las muestras fueron positivas a F4 y F5, F18 el 28%, F41 en un 8% y el 4% a F6 (Cuadro 4)

Cuadro 4. Porcentaje de FV de Cerdos Lactantes.

Toxinas	Fimbrias
STa (60)	F18 (28)
LT (24)	F4 (40)
VT (4)	F5 (40)
	F41 (8)
	F6 (4)

Cabe señalar que se presentaron combinaciones entre los FV, donde una sola muestra puede tener uno o más, las cuales se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentaje de Combinaciones de Cerdos en Lactancia.

S/C	F4	F5	F18	F41	F4- F5	F4- F41	F5- F18	F4- F18	F4- F5- F6
-----	----	----	-----	-----	-----------	------------	------------	------------	------------------

LT	0	4	20	0	4	4	0	0	0	0
VT	12	8	4	12	0	0	0	0	0	0
STa	0	4	0	4	0	0	4	0	8	4
LT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4

S/C: sin combinación.

Destete

En cuanto a las muestras de cerdos destetados, el 52.63% fueron positivas, el 20% lo fue tanto para STa, como para LT; la fimbria F4 fue en un 50%, F5 40% y F18 20% (cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de los FV de Cerdos Destetados.

Toxinas (%)	Fimbrias (%)
STa (20)	F4 (50)
LT (20)	F5 (40)
VT (0)	F18 (20)
	F41 (0)
	F6 (0)

De igual forma hay que mencionar que de las muestras positivas, se encontraron algunas que tienen uno o más factores de virulencia, lo cual se refiere en el cuadro 7.

Cuadro 7. Porcentaje de Combinaciones de Cerdos Destetados.

	S/C	F4	F5	F4-F5	F5-F18
STa	20	0	0	0	0
LT	0	40	10	10	20

S/C: sin combinación

VIII. DISCUSIÓN

La diarrea es uno de los signos más comunes en cerdos recién nacidos y destetados a causa de trastornos gastroentéricos. Es mundialmente sabido de factores de virulencia involucrados en la diarrea neonatal y post destete.

En este estudio el 35% de las muestras trabajadas fueron positivas, porcentaje similar al de Macedo et al.⁽²⁷⁾ en el 2007 quien obtuvo el 29.2 %, mientras que en el 2006, Costa et al.⁽²⁸⁾ y Blanco et. al.⁽¹³⁾ obtuvieron al menos un factor de virulencia en un porcentaje mayor de 82.5% y 100% respectivamente.

A. ENTEROTOXINAS

Lo que se detecto en este estudio en cuanto a las enterotoxina, **STa** fue la más encontrada, en un 47.22%. Lo cual coincide a lo reportado por Vu-Khac H. et. al.⁽²⁹⁾ en el 2007 en 50%, pero en un menor porcentaje lo reportan Costa et al. en el 35% y Macêdo et. al. en un 33.3%, y difiere de lo reportado en el 2006 por Thuy N. Do. et. al.⁽³⁰⁾ quien obtuvo el 92.1% de sus muestras positivas. Se ha demostrado que esta toxina se presenta principalmente en lechones de menos de 2 semanas y se reduce su efecto en lechones de mayor edad⁽³⁶⁾, comprobándose esto, ya que se presentó en el 60% de las muestras de lactancia y 20% en las de destete, en cambio, en 1999 Zamora et. las encontró en un 19% de cerdos lactantes y 13% en las de destetados. De acuerdo a lo que se ha reportado, esta toxina es altamente inmunogénica, lo cual se puede confirmar con nuestros resultados.⁽³⁶⁾ La toxina **LT** induce fácilmente la formación de anticuerpos, por lo cual es un componente importante para la elaboración de vacunas⁽³⁷⁾. En este trabajo se presentó en un 22.85%, resultados muy similares a los reportados por Blanco et. al en 1997, Macêdo et al. y da

Costa et al. en el 26% y 35% de sus muestras respectivamente; otros investigadores la reportaron en un 42% Vu- Khac H. et al. en el 2007 y en el 2006 Thuy N. Do et. al. 55.6%.

En cuanto a las cepas de cerdos lactantes, en este estudio, se presentó en el 24%, mientras que en destetados no se detecto.

La toxina **VT** puede ser causa también diarreas con o sin hemorragias, pudo ser detectada en un porcentaje muy bajo (2.77%), resultado similar al de Vu-Khac H. et al. quien la reporta en 4% y Costa et al. el 8%, a diferencia de Macedo de 21.4%.

La toxina que más se asocia con cepas de origen porcino es la **STb**⁽³¹⁾ en este trabajo no pudo ser detectada, mientras que en otros trabajos podemos observar que: Blanco et. al y Vu-Khac H. la reportan en 71% y 50% respectivamente, Zhang⁽³²⁾ la reporto en un 72.6% y Thuy N. Do., en un 83.3%.

B. FIMBRIAS.

En cuanto a la fimbria, **F4** se menciona que con frecuencia puede ser encontrada en muestras de lechones con diarrea, neonatos y destetados⁽¹³⁾, en esta investigación se detecto en el 38.88% de las muestras trabajadas, esto concuerda con los resultados de otros autores, como Thuy N. Do. y Vu-Khac H. que la reportaron en 53.1% y 38% respectivamente de sus muestras.

En las cepas de lechones lactantes fue detectada en el 40% y para las de lechones destetados en el 50%.

La fimbria **F5** es altamente inmunogénica siendo los lechones recién nacidos los más susceptibles a esta⁽³⁶⁾, en este trabajo se pudo detectar en el 40%, teniendo una diferencia con reportado por Thuy N. Do. en el 2006 y el de Chen X.⁽³³⁾ en el 2004, los cuales la detectaron en porcentajes menores en 16.7% y 2.32% respectivamente.

En este trabajo se presento de manera similar tanto en las muestras de lechones lactantes así como de los destetados. En el año 2008 Menin et al.⁽³⁵⁾ la reporta en un porcentaje menor, del 20% para las muestras de lechones lactantes y en 0.6% de destetados. Mientras Chen X.⁽³³⁾ en el 2004 en 2.32% de los destetados.

La fimbria **F18** esta muy relacionada en la producción de diarrea en lechones destetados y también tiene una importancia relevante en la enfermedad del edema⁽¹³⁾, en este estudio se detecto en el 25.71% de la muestras en general, resultado similar al presentado con Chen X. en el 2004 que refiere 20% , mientras que los estudios de Cheng D.⁽³⁴⁾ en 2005 y Blanco en 2006 presentan porcentajes mas elevados que los encontrados en este trabajo, 48.15 y 61% respectivamente; pero a diferencia de los estudios de Vu-Khac H. que fue del 9% .

En relación a los cerdos lactantes, la F18 se presentó en el 28% de las muestras, siendo resultados relevantes, ya que otros autores no la han reportado, con respecto a los lechones destetados no se obtuvo resultado positivo como el de Chen X.⁽³³⁾ en el 2004 (15.8%).

La fimbria **F41** es poco frecuente y se expresa generalmente en cepas que también expresan a la fimbria F5⁽³⁸⁾ en este estudio se presentó en 5.71%, resultado similar al de Vu-Khac H., que la reporta en tan solo en el 3% de sus muestras positivas, el estudio de Chen X. en el 2%. En este estudio dicha fimbria fue encontrada únicamente en 8% de las muestras de lechones destetados, mientras que no ha sido detectada por otros autores.

La fimbria **F6** es frecuentemente encontrada en lechones lactantes con diarrea⁽¹³⁾, en este estudio se encontró en un porcentaje relativamente bajo 2.85%, lo cual concuerda con otros estudios: Vu-Khac H., la refiere en un 3%, y Chen. X. en 2004 en el 7%.

En el caso de los lechones lactantes se obtuvo en el 6%, mientras que en los destetados no fue detectada, resultado muy semejante con Menin et al.⁽³⁵⁾ en el 2008 que la reporta en un 16.3% de las muestras de lechones lactantes y no la detecta en lechones destetados: en cambio Chen. X. en el 2004 la detecta en un 6%.

Existen reportes en cuanto a las combinaciones más comunes como: F5+F6, F5+F41, F4+F6. La mayoría de combinaciones encontradas en este estudio no fueron reportadas en bibliografía, las combinaciones F4-F18 y F5-F18 fueron encontradas también en el trabajo de Chen X.⁽³³⁾ refiriéndolas en 0.93% de muestras en cerdos destetados.

IX. CONCLUSIONES

A través de la PCR se pueden detectar a los Factores de Virulencia de ETEC.

El 35% de las muestras fueron positivas a uno o varios factores de virulencia pertenecientes a ETEC.

Tres toxinas fueron detectadas Sta, LT y VT.

Se detectaron las siguientes fimbrias F4, F5, F18, F41 y F6.

Los Factores de Virulencia de *E coli* son las causantes de diarreas neonatales y al destete.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1- Avance de la Producción Pecuaria, disponible en :www.siap.sagarpa.gob.mx.
- 2- Evolución de la producción de carne de cerdo (2004-2008), Comparativo del comportamiento del consumo per cápita de carne en México (1993-2004), Evolución del consumo de carne de cerdo en México (2004-2008) disponible en: <http://www.porcicultura.com/estadisticas/>
- 3- Carvajal A., de Arriba M. L., Pozo J., Vidal A. y Rubio P. Situación actual de la patología digestiva en cerdos en España, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Epidemiología, Medicina Preventiva y Policía Sanitaria. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Año?
- 4- Carranza A. I., Corrales J. P., Ambroggi A. Enfermedades que producen diarrea en cerdos en las etapas de desarrollo y terminación, Vº Congreso de Producción Porcina del Mercosur. 2006.
- 5- Varley M.A, El lechón Recién Nacido. Desarrollo y Supervivencia, Acribia S.A., España, 1996, 247-273.
- 6- Cicuta, M.E.; Parma, A.E.; Viñas, M.R., Sanz, M.E.; Boehringer, S.I.; Roibón, W.R.; Benitez, M.C.; Barceló, M.C.; Vena, M.M., Factores de Virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina, *Rev. Vet.* 10/11, 1 y 2, 1999ó2000.

7- Taylor D.J, Pig Diseases, 7th edition, Book Production Consultants PLC, USA, 1999, 132-145.

8- Pritchard J, Ngeleka M, Middleton D, In vivo and in vitro colonization patterns of AIDA-I-positive *Escherichia coli* isolates from piglets with diarrhea, J Vet Diagn Invest 16:108–115 (2004), 108-115.

9- Carstensen L. , Kjær E. A. , Hjelholt J. K., Peter N. J., *Escherichia coli* post-weaning diarrhoea occurrence in piglets with monitored exposure to creep feed, Veterinary Microbiology 110 (2005) 113–123.

10- Murray R. G., et al, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, USA, 1984, 420-423.

11- Ha S., Choi C., Chae C., Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease, J Vet Diagn Invest 15:378–381 (2003).

12- Rodríguez A. G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, Salud Publica Mex 2002; 44:464-475.

13- Blanco M., Lazo L., Blanco J. E., Dhabí G., Mora A., López C., González E. A., Blanco J., Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea, International Microbiology (2006) 9:53-60

14- Bacteriología – capítulo diez Aspectos Generales de la Patogénesis Bacteriana.

Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu>

15- Cortés-Ortiz I A, Rodríguez-Angeles G, Moreno-Escobar E, Tenorio-Lara J M, Torres-Mazadiego B P, Montiel-Vázquez E, Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México, salud pública de México / vol.44, no.4, julio-agosto de 2002, 297-302.

16-Tsuji T., Kato M., Kawase H., Imamura S., Kamiya H., Ichinose Y. and Miyama A., *Escherichia coli* LT enterotoxin subunit A demonstrates partial toxicity independent of the nicking around Arg192, *Microbiology* (1997), 143, 1797–1804

17- Arias B. I., Huguet T. J., Detección molecular de toxinas termoestable y termolabil de *Escherichia coli* mediante hibridación, Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002; 19 (4).

18- Basulto R., Calzada L, Junco J. A., Olivera T, Caracterización fenotípica de cepas autóctonas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas 987P, Rev. prod. anim. Vol 12 sept. 1999/jul. 2000, 83-86.

19- Zamora, J., Reinhardt, G., Polette, M. *et al.* Diagnóstico de la diarrea colibacilar porcina mediante tinciones inmunoquímicas. *Arch. med. vet.*, 1999, vol.31, no.1, p.135-139. ISSN 0301-732X.

20- Yang H, Chen. S, White D. G , Zhao S, McDermott. P, Walker R, and Meng. J, Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China, Journal of clinical microbiology, Aug. 2004, p. 3483–3489, Vol. 42, No. 8

21- Bosworth B., Dean-Nystrom E.A., Casey T. A., and Neibergs H. L., Differentiation of F18ab⁺ from F18ac⁺ *Escherichia coli* by Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis of the Major Fimbrial Subunit Gene (*fedA*), Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May; 5(3): 299–302.

22- Moller N. E. and Thorup A. M., Detection and Characterization of Verocitotoxin-producing *Escherichia coli* by Automated 5' Nuclease PCR Assay, Journal of clinical microbiology, July 2003, p. 2884–2893.

23- Alcazar MCD (2002) Detección de *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes* como agentes contaminantes en queso fresco tipo panela y semimadurado tipo chihuahua por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis de Maestría. FMVZ UNAM.

24- Osek J. Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, Vet Diagn Invest 13:308–311 (2001) 308-311.

25- Canal, A.M., Cubillos, V., Zamora, J. *et al.* Identificación de fimbrias de *Escherichia coli* enteropatógeno mediante inmunohistoquímica en cerdos lactantes con diarrea. *Arch. med. vet.*, 1999, vol.31, no.1, p.37-44. ISSN 0301-732X.

26- Frensch C R, Oliveira L F, Carvalho S, Bruno de Oliveira C J, Comparison of DNA-extraction and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). Braz. J Microbiol. v.36 n.4 Sao Paulo oct./dec. 2005.

27- Macêdo N.R., Menezes C.P.L., Lage A.P., Ristow L.E., Reis A., Guedes R.M.C., Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.5, 1117-1123, 2007

28- da Costa M. M., Sá S. M. Silva, Spricigo D. A., Mazzini W. N., Beutinger M. S., Kolling L. e Castagna A.P., Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil Brasil, Pesq. Vet. Bras. 26(1):5-8, jan./mar. 2006

29- Vu-Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Dhabí G., Mora A., Lòpez C., González E.A., Blanco J., Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia, The Veterinary Journal 174 (2007) 176–187

30- Thuy N. Do, Phu H. Cu, Huyen X. Nguyen, Tuan X. Au, Quy N. Vu, Steve J. Driesen, Kirsty M. Townsend, James J.-C. Chin and Darren J. Trott, Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam, Journal of Medical Microbiology (2006), 55, 93–99

- 31- Taillon C., Nadeau E., Mourez M. and J. Dubreuil D., Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs Journal of Medical Microbiology (2008), 57, 887–890
- 32- Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A. and Francis D., Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US, Veterinary Microbiology Volume 123, Issues 1-3, 20 July 2007, Pages145-152.
- 33- Chen X., Gao S., Jiao X., Liu X.F., Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China, Veterinary Microbiology 103 (2004) 13–20
- 34- Cheng D., Sun H., Xu J. and Gao S., Prevalence of fimbrial colonization factors F18ab and F18ac in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema and/or diarrhea in China, [Veterinary Microbiology Volume 110, Issues 1-2](#), 30 September 2005, Pages 35-39
- 35- Menin A., Reck C., de Souza D., Klein C., Vaz E., Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.6, p.1687-1693, set, 2008

36- Información Adicional Infecciones por *Escherichia coli* en cerdos, disponible en http://www.aacporcinos.com.ar/sanidad_porcina/infecciones_por_escherichia_coli_en_cerdos.html

37- Rubio P., Carvajal A., Colibacilosis, Universidad de León. España (19-06-2009), disponible en <http://www.3tres3.com/diarreas-en-lactacion/>

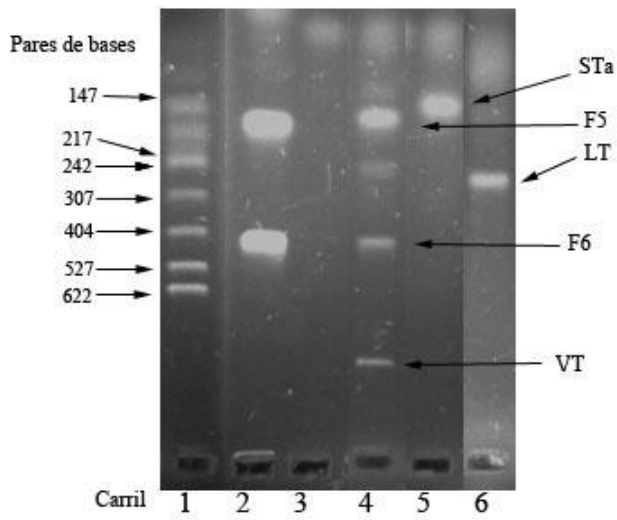
38- Campal A; Junco J; Casas S; Arteaga N; CastroM; Fuentes F; León L; Barreto G; Pardo G; Anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes conformacionales de la fimbria F41 de la *Escherichia coli* enterotoxigénicas, REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504, 2007 Volumen VIII Número 8

FIGURAS Y CUADROS

Cuadro 1. Identificación bioquímica de *Escherichia coli*.⁽⁶⁾

Prueba bioquímica	Tipo de reacción
Oxidasa	-
Voges-Proskaguer	-
Citrato de Simmons	-
Ácido sulfídrico de TSI	-
Malonato	-
Urea	-
Motilidad	[+]
Indol	+
Rojo de metilo	+
Producción de gas de glucosa	+
Lactosa	+
Ácido de glucosa	+
Manitol	+
Adonitol	-
Inositol	-
Sorbitol	+
Arabinosa	+
Ramnosa	[+]
Maltosa	+
Xilosa	+
Trealosa	+
Manosa	+
Nitrato a nitrito	+
- Negativo , + Positivo, [+] presentación tardía	

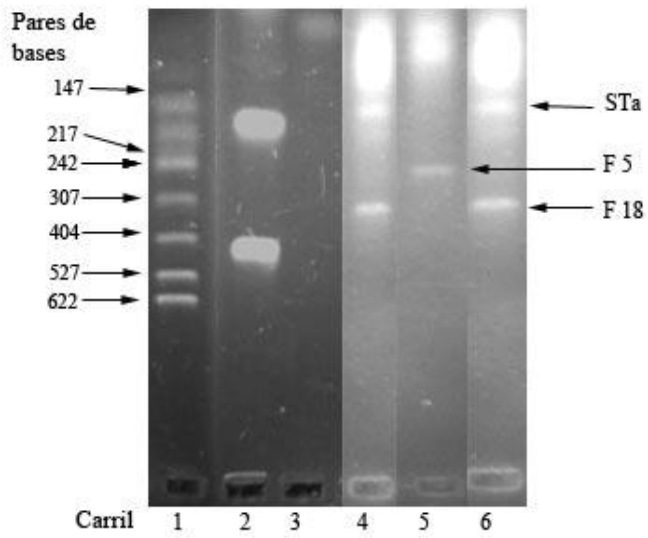
FIGURA 6. Amplificación por PCR de los FV: F5, F6, STa, LT, VT.



C1: Marcador de peso molecular
C2: Control (+)
C3: Control (-).
C4: Muestra (+) del FV: F5, F6,
VT,
LT y STa.
C5: Muestra (+) del FV: STa.
C6: Muestra (+) del FV:LT.

(+): *Positiva.*
(-): *Negativo.*
C: *carril*

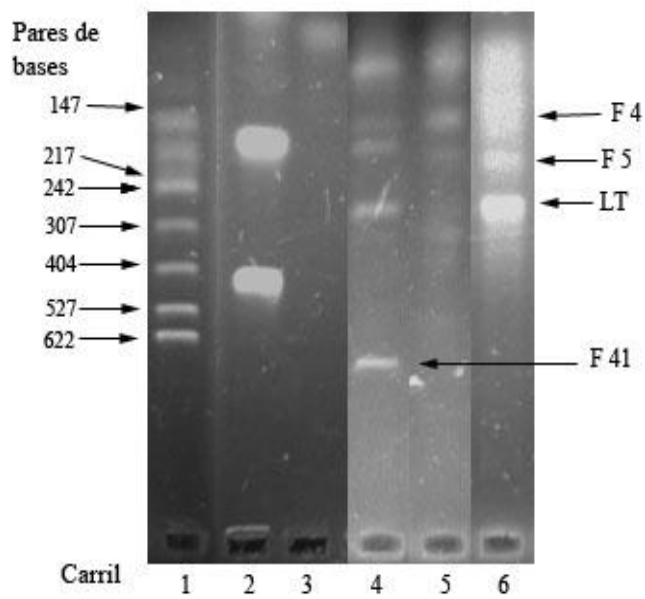
FIGURA 7. Amplificación por PCR de los FV STa, F5, F18.



C1: Marcador de peso molecular
C2: Control (+)
C3: Control (-).
C4: Muestra (+) del FV: F18.
C5: Muestra (+) del FV: F5.
C6: Muestra (+) del FV: STa y F18.

(+): Positiva.
(-): Negativo.
C: carril

FIGURA 8. Amplificación por PCR de FV: F4, F5, F41, LT.



C1: Marcador de peso molecular
C2: Control (+)
C3: Control (-).
C4: Muestra (+) del FV: F4, F5, LT y F41
C5: Muestra (+) del FV: F4 y F5.
C6: Muestra (+) del FV: F4, F5 y LT

(+): *Positiva.*
(-): *Negativa.*
C: *carril*