



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE
Escherichia coli EN LECHONES CON DIARREA EN LAS
ETAPAS DE LACTANCIA Y DESTETE MEDIANTE LA
TÉCNICA DE PCR.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA
MARÍA DANIELA GÓMEZ MERINO

Asesores:

Dra. Ana María Castro
MVZ. Jorge Raúl López Morales

México, D.F 2009



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.

A LA MEMORIA DE MI PADRE

Quien fue el mejor padre del mundo y mi ejemplo a seguir a lo largo de estos años. Gracias por haber dedicado tu vida a guiar mi camino y convertirme en una mujer de bien, por haberme enseñado los verdaderos valores de la vida, por tu inmenso amor, comprensión, sacrificios y apoyo a lo largo de mi vida y mi carrera. A ti te dedico este triunfo y espero que donde quiera que estés te sientas orgulloso de mí por haber logrado tu sueño, convertirme en una profesionalista. TE AMO Y TE EXTRAÑO MUCHO y se que aunque no pueda verte ni tocarte siempre estarás a mi lado.

DEDICATORIAS

A ti MAMA, por ser la mejor madre que Dios pudo haberme regalado y por ser la fuerza que me impulsa a seguir adelante todos los días. Gracias por haberme dado la vida, por tu gran amor, apoyo incondicional y por ser mi gran amiga a lo largo de estos años, pero sobre todo por tu paciencia y tus desvelos durante este proceso. Eres lo más importante de mi vida, TE AMO MUCHO.

A mi hermano Alfonso, gracias por la confianza que has puesto en mí, por tus cuidados y cariño, pero sobre todo por tu gran apoyo a lo largo de mi carrera. TE QUIERO MUCHO.

A mi tío Raúl, gracias por tus consejos, por el gran apoyo tanto moral como económico que me has ofrecido cuando más lo he necesitado y por ser un segundo padre para mí. Sabes que TE QUIERO MUCHO y siempre te llevo en mi corazón.

A mis grandes amigas: Celene, Hannia, Judith y Areli, por su amistad incondicional e incomparable, por su apoyo en los momentos más difíciles de mi vida y por haberme enseñado la verdadera amistad LAS QUIERO MUCHO, y espero que nuestra amistad perdure por siempre.

A toda mi familia por haberme apoyado en los momento más difícil de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dejado llegar a mi meta y darme la fortaleza para seguir adelante, pero sobre todo por darme la maravillosa familia que tengo a mi lado.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado los conocimientos para mi formación profesional.

Al Departamento de Producción Animal: Cerdos y a todos lo que ahí laboran, por haberme dejado formar parte de su grupo y por transmitirme sus conocimientos para una mejor formación profesional.

A mis asesores: Dra. Ana María Castro, por brindarme la oportunidad de realizar la parte experimental de este proyecto en su laboratorio de la Facultad de Medicina y al MVZ Jorge R. López Morales. Gracias a ambos por su tiempo, apoyo y colaboración para la realización de esta tesis y por haberme brindado parte de sus conocimientos.

A los miembros del jurado:

MVZ. Mario E. Haro Tirado, MVZ. MC Esperanza Galván Pérez, MVZ. Marcela Figueroa Ochoa, MVZ Jorge Raúl López Morales, Dr. Iván Sánchez Betancourt

Por el tiempo dedicado a la asesoría y revisión de esta tesis.

A la Dra. Andrea Toledo Rojas, por su ayuda en la fase experimental de este proyecto, por su apoyo incondicional, asesoría, paciencia y motivación para la realización de esta tesis. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos y por dejarme ver la gran persona que eres.

Al MVZ. Gerardo Ramírez Hernández, por su apoyo y colaboración en la obtención de muestras biológicas. Gracias por sus enseñanzas y sus consejos.

Al MVZ. Jaime Navarro Hernández, por su apoyo y colaboración en la realización del análisis estadístico.

A la PMVZ. Celene Cruz Benavides, por su colaboración en la obtención de muestras biológicas y por todo el apoyo que me brindó a lo largo de este proceso. ¡¡Gracias por tu paciencia amiga!!

Y a todas las personas que de alguna manera formaron parte de este proyecto.

¡¡MUCHAS GRACIAS!!

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Escherichia coli: agente causal de diarrea.....	3
1.2 Escherichia coli en cerdos.....	6
1.3 E. coli enterotoxigénica (ETEC).....	7
1.4 E. coli enterohemorrágica (EHEC).....	9
1.5 E. coli enteropatógena (EPEC).....	11
1.6 E. coli como agente etiológico de diarrea en lechones.....	11
1.6.1 Diarrea neonatal.....	11
1.6.2 Diarrea post- destete.....	13
1.7 Aspectos epidemiológicos de diarrea por Escherichia coli en lechones.....	14
1.8 Diagnóstico de la infección por E. coli.....	16
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivo particular.....	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1 Obtención de muestras biológicas.....	20
4.2 Obtención de ADN genómico.....	20

4.3 Identificación de genes de virulencia en cepas de E. coli.....	21
4.4 Base de datos y análisis de resultados.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Genes que codifican para toxinas.....	25
5.2 Genes que codifican para fimbrias.....	25
5.3 Etapa de lactancia.....	26
5.4 Etapa de destete.....	26
5.5 Lechones control.....	26
5.6 Asociación entre genes que codifican para fimbrias y toxinas.....	27
5.7 Análisis estadístico.....	28
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIONES.....	36
8. REFERENCIAS.....	38
9. TABLAS.....	46
10. FIGURAS.....	51
11. ANEXOS.....	54
11.1 Apendice.....	54

RESUMEN

GÓMEZ MERINO MARÍA DANIELA. Identificación de genes de virulencia de *Escherichia coli* en lechones con diarrea en las etapas de lactancia y destete mediante la técnica de PCR (bajo la dirección de: Dra. Ana María Castro y MVZ Jorge Raúl López Morales)

En cerdos, la diarrea neonatal (DN) y post-destete (DPD) o colibacilosis post-destete (CPD) origina pérdidas de gran magnitud a nivel mundial. Estas enfermedades son causadas por cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) así como por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), siendo éstas la principal causa tanto de diarrea como de muerte en lechones neonatos y destetados. En la actualidad se conocen los genes de virulencia relacionados con producción de DN y DPD, de los cuales en México no existe información al respecto, por lo que se considera de gran importancia su estudio en el país. El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante el ensayo de la PCR los principales genes de virulencia asociados a diarreas en lechones lactantes y destetados. Se analizaron 166 muestras de heces de lechones, de las cuales 113 se obtuvieron de lechones con diarrea y 53 de lechones sin diarrea, posteriormente se biotipificaron y 150 correspondieron a *E. coli*. A partir de estas cepas se extrajo el ADN y se amplificaron los genes que codifican para las toxinas LT, STa, STb, STx1, Stx2 y las fimbrias F18, F41, F4, mediante el ensayo de la PCR sencillo y duplex. Los productos de amplificación fueron identificados mediante geles de agarosa al 2%. Se utilizaron ocho cepas de referencia como controles positivos y una como control negativo para la amplificación de cada uno de los genes. De las 150 cepas de *E. coli* 110 (73.3 %) fueron positivas para uno o más de un factor de virulencia de ETEC y EHEC, de las cuales 30 (52.7%) provenían de lechones en etapa de lactancia y 41 (87.2%) de lechones destetados. De las cepas provenientes de lechones control (sin diarrea), 39 (84.8%) presentaron alguno de los genes estudiados.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas que afectan el aparato gastrointestinal del cerdo han sido una de las principales preocupaciones de los Médicos Veterinarios, debido a que originan grandes pérdidas económicas en las explotaciones porcinas⁽¹⁾

Entre los principales agentes causales de estas enfermedades encontramos al virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* tipos A y C, *Salmonella* sp y *Escherichia coli*⁽²⁾

La diarrea neonatal y post-destete en cerdos, es de tipo infeccioso y origina pérdidas de gran magnitud a nivel mundial. Estas enfermedades son causadas principalmente por cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigénica (ETEC) así como por *E. coli* productoras de Shiga-toxinas (STEC), siendo estos patotipos la mayor causa de enfermedad y muerte en cerdos neonatos o recién destetados^(3,4,5)

Investigaciones realizadas en Europa, Asia y Estados Unidos, muestran que la mayoría de las *E. coli* aisladas de lechones con diarrea pertenecen a cepas productoras de enterotoxinas y citotoxinas^(5, 6,7, 8, 9,)

La incidencia de la colibacilosis está influenciada mayormente por el manejo de la pira, siendo de gran importancia las condiciones de limpieza y humedad de las instalaciones, dado que la bacteria puede diseminarse en el ambiente. Además, los lechones estresados por frío o expuestos a condiciones adversas son más susceptibles de contraer la infección. Los lechones infectados por *E. coli* representan el principal reservorio de esta bacteria ⁽²⁾

1.1 *Escherichia coli*: agente causal de diarrea

Theodore Escherich, bacteriólogo alemán, fue quién primero aisló a esta bacteria a la cual denominó *Bacterium coli commune*, lo realizó a partir de heces de un infante sano y propuso una posible intervención de la bacteria en la producción de diarrea. La participación de la bacteria como agente causal de infecciones extraintestinales también fue señalada por Escherich. Sin embargo la primera descripción de *E. coli* ocurrió en el siglo XIX, en que se pudo establecer plenamente la participación de la bacteria como agente etiológico de diarrea ⁽¹⁰⁾

De acuerdo al manual de Bergey esta bacteria forma parte de la familia *Enterobacteraceae* dentro de la tribu *Escherichieae*; la cual incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*. El género *Escherichia* comprende las especies de *E.coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*. Es la especie del género *Escherichia* la que mejor se conoce en relación con su capacidad patógena ^(10,11).

Se caracteriza como un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, móvil o inmóvil. Crece a una temperatura entre 15-45°C y con un pH de 7.0. Las colonias en medios sólidos como agar sangre se observan redondas, convexas, grisáceas, opacas y su apariencia puede variar de lisa a rugosa, sin embargo en agar Mc Conckey produce colonias brillantes, circulares y rosadas que son lactosa positivas (12, 13)

El desarrollo de métodos serológicos, ha permitido identificar un gran número de serotipos de *E. coli* en base a la presencia de cuatro tipos de antígenos denominados: O, K, H y F. El antígeno somático (O), está localizado en la pared celular, constituyendo parte del complejo polisacárido, de estos se reconocen al menos 175. Del antígeno capsular (K) existen al menos 80 reconocidos. El antígeno flagelar (H), es de naturaleza proteica y se han identificado 56 grupos. (2, 13)

Las bacterias como *E.coli* presentan características genéticas que les permiten interaccionar con el hospedero y causar daño. El grado de daño depende de los factores de virulencia que expresa la bacteria, entre los que se encuentran las toxinas y adhesinas (14)

Las fimbrias (pilis) forman parte de las adhesinas bacterianas, son estructuras piliformes que se localizan en la parte externa de la bacteria y están formadas por subunidades proteicas (pilina) (14).

Las toxinas bacterianas pueden ser de dos tipos endotoxinas y exotoxinas. Estas últimas están constituidas por dos subunidades A y B. La subunidad B es un pentámero que se une a receptores celulares y la subunidad A es un dímero y es la subunidad activa ⁽¹⁴⁾.

Las exotoxinas se clasifican en enterotoxinas y citotoxinas. Las enterotoxinas producen una diarrea acuosa debido a la liberación de agua y electrolitos por parte del enterocito, y las citotoxinas producen una diarrea inflamatoria cuyas evacuaciones contienen moco y sangre ⁽¹⁴⁾.

La infección intestinal por *E. coli* se manifiesta por diarrea, y su gravedad depende de los factores de virulencia presentes en la bacteria, así como de la edad y el estado inmune del hospedero ⁽²⁾.

Con base en su mecanismo de daño, en la actualidad *E.coli* se ha clasificado en ocho patotipos: *E.coli* enteropatógena (EPEC), *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) o productora de Shiga-toxinas (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* uropatógena (UPEC) ⁽¹⁵⁾.

1.2 *Escherichia coli* en cerdos

E. coli es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea en lechones lactantes y destetados así como de la enfermedad del edema en cerdos después del destete. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal del cerdo y al igual que en el humano existen serotipos que producen daño tanto intestinal como extraintestinal. Su habitat primario es el tracto gastrointestinal y su proliferación se produce por lo general en su paso por el intestino delgado. La transmisión de *E.coli* se produce principalmente mediante la vía fecal-oral y por aerosoles ^(2, 5). Los largos períodos de supervivencia en el ambiente son favorecidos por las bajas temperaturas y humedad, entre otros factores ⁽¹⁶⁾.

La ocurrencia de la diarrea por este agente depende de la interacción entre la bacteria, las condiciones ambientales y ciertos factores del hospedero. La infección por esta bacteria en los cerdos recién nacidos se debe principalmente a que encuentran una alta contaminación ambiental, así como en la jaula de parición y en la piel de la madre, y por la ingestión de microorganismos a partir de la microbiota intestinal de la cerda. A pesar de lo anterior, los lechones se protegen de la infección por esta bacteria mediante los anticuerpos específicos presentes en calostro y leche materna, que inhiben la adherencia de la bacteria al intestino. Si la madre no fue expuesta a la *E.coli* patógena, los anticuerpos específicos contra esta bacteria no están presentes en el calostro y los lechones serán susceptibles de infectarse ⁽¹⁷⁾.

La infección por *E.coli* en el cerdo puede manifestarse de diferentes formas, como son: diarrea neonatal, diarrea en cerdos jóvenes y diarrea post- destete, sin embargo también puede presentarse la enfermedad del edema en cerdos destetados. ^(2, 18)

Los principales patotipos de *E.coli* causantes de diarrea en la especie porcina se clasifican en: *E.coli* enterotoxigénica, *E.coli* enterohemorrágica o productora de Shiga-toxinas, *E.coli* enteropatógena, *E. coli* enteroagregativa *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* de adherencia difusa y *E. coli* uropatógena, aunque las tres últimas no han sido estudiadas aún en cerdos ⁽²⁾

1.3 *E.coli* enterotoxigénica (ETEC)

Son aquellas cepas que tienen la capacidad de sintetizar dos clases de enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable. La toxina termolábil (LT) es inactivada a 60°C durante 15 min y es de alto peso molecular. Esta toxina es semejante en estructura y función a la toxina causante del cólera (CT) producida por *Vibrio cholerae* O1. Se conocen dos variedades de LT (LT-I, LT II), las cuales son antigénicamente diferentes. LT I se ha identificado en cepas aisladas tanto de humanos como de animales y LT II principalmente en cepas de origen animal ^(2,19)

La toxina LT I es dimérica, compuesta por una subunidad A y cinco subunidades B. Las subunidades B están arregladas en forma circular y es el componente de la toxina que se une al receptor gangliósido GM₁ así como a otras glucoproteínas de superficie en las células epiteliales del intestino delgado. La subunidad A compuesta por la fracción A1 y A2, es la porción de la toxina que tiene la actividad enzimática, la cual activa a la adenilato ciclasa estimulando la producción de AMP cíclico, provocando que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de cloro, sodio, bicarbonato y agua, produciendo una diarrea acuosa ^(19, 20)

Los genes que codifican para la expresión de LT se localizan en plásmidos que también pueden contener los genes que codifican ST y los antígenos del factor de colonización (CFAs) ⁽¹⁹⁾.

La toxina termoestable (ST) es de bajo peso molecular y resiste una temperatura de 100°C durante 15 minutos ⁽¹²⁾, tiene variedades que se clasifican en STa (también llamada STI) y STb (también llamada STII). Son dos clases de toxinas no relacionadas que difieren tanto en su estructura como en su mecanismo de acción. Están codificadas en plásmidos, aunque también se han encontrado en transposones. La enterotoxina STa es producida tanto por ETEC como por otras bacterias gramnegativas, a diferencia de STb que sólo es elaborada por cepas de ETEC ⁽¹⁹⁾

STa es un péptido de 2 KDa de peso molecular. De esta enterotoxina se conocen dos variantes una producida por cepas de ETEC de origen porcino (STp) y otra elaborada por cepas aisladas en humanos (STh). El banco celular de STa es la enzima guanilato ciclasa que se localiza en la membrana apical de las células del epitelio intestinal. La unión de STa a esta enzima ocasiona un incremento en los niveles intracelulares de GMP cíclico, lo que estimula la secreción de cloro y/o la inhibición de la absorción de cloruro de sodio dando como resultado la secreción de líquido intestinal ^(19, 20).

A diferencia de STa que sólo causa alteraciones en el transporte de líquidos, STb ocasiona alteraciones histológicas que se caracterizan por pérdida y atrofia parcial de las microvellosidades del epitelio intestinal. Esta enterotoxina estimula la secreción de bicarbonato de las células intestinales, incrementa los niveles de calcio intracelular a partir de fuentes extracelulares y también se ha observado que estimula la liberación de prostaglandinas (PGE₂) y serotonina ⁽¹⁹⁾.

1.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Las cepas de estos cuadros tienen la capacidad de elaborar una o más citotoxinas. Las citotoxinas que elaboran este grupo patógeno originalmente se denominaron verotoxinas (VTs) por el efecto citotóxico que causaban en cultivos de células Vero (línea celular de riñón de mono). Posteriormente y dado que anticuerpos anti-toxina de Shiga neutralizaban su actividad, se le denominó toxina

semejante a Shiga (SLT). Posteriormente surgió la necesidad de homogeneizar los criterios y actualmente se le denomina STx ^(19, 20).

Estas toxinas son proteínas poliméricas compuestas por dos polipéptidos, un pentámero de adhesión formado por cinco subunidades B y una subunidad A (fracción enzimáticamente activa). Una vez fijada a su receptor a través de la subunidad B la subunidad A es internalizada en la célula blanco (endoteliales, epiteliales y hematíes que presentan en su membrana el grupo glicolípido P1). La subunidad A interacciona con la subunidad 60s de los ribosomas de las células intestinales del hospedero, liberando un fragmento A1 cuya actividad resulta en un bloqueo irreversible de la síntesis proteica ⁽²¹⁾.

Otra propiedad de virulencia observada en este grupo de microorganismos es el daño conocido como adherencia y esfacelamiento (A/E) que se caracteriza por una íntima adherencia de la bacteria a la célula intestinal. Los factores de virulencia están codificados por un conjunto de genes típicos de EPEC y VTEC, contenidos en una región cromosomal denominada *locus* de esfacelamiento del enterocito (LEE). Dentro de esta región se encuentra el gen *eae*, cuyo producto es una proteína de membrana externa denominada intimina, la cual es la responsable de la unión de la bacteria a las células del epitelio intestinal ⁽²¹⁾.

1.5 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las bacterias pertenecientes a este patotipo se caracterizan por adherirse a células Hep-2 (línea celular de carcinoma faríngeo humano) formando microcolonias. Una vez formadas las microcolonias comienza una segunda fase de adherencia que se acompaña con la destrucción de las microvellosidades intestinales, proceso que se ha denominado esfacelamiento. La ausencia de microvellosidades permite a la bacteria adherirse en forma íntima a receptores de la membrana celular. Esta adherencia se lleva a cabo gracias a la expresión de genes codificados en un plásmido de 60 mDa llamado factor adherente EPEC. También cuenta con genes cromosomales nombrados *eae* A y B que operan en combinación con genes plasmídicos y son los encargados de codificar para una proteína de 94 kDa llamada intimina que está asociada a la adherencia y esfacelamiento. La adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial produce cambios en el citoesqueleto lo que se traduce en la polimerización de filamentos de actina por debajo de la unión de la bacteria a la célula hospedera ⁽¹⁹⁾.

1.6 *E. coli* como agente etiológico de diarrea en lechones

1.6.1 *Diarrea neonatal*

La diarrea neonatal es una de las enfermedades más importantes de los lechones. Su amplia distribución geográfica y elevada morbilidad la convierten en una de las enfermedades con mayor impacto económico para la porcicultura, debido a que se

presenta de forma constante en todas las granjas en mayor o menor grado, asociada a factores ambientales, tales como temperatura, humedad, sanidad y manejo ⁽¹⁸⁾

Este tipo de diarrea se observa por lo general en cerdos de 0 a 4 días de edad ⁽¹⁹⁾

La colibacilosis causada por ETEC es muy frecuente, afecta a animales de pocos días de edad y recién destetados. Este patotipo, puede producir por lo menos dos grupos de enterotoxinas denominadas termolábil (LT) y termoestable (ST). La mayoría de las cepas de ETEC aisladas de cerdos con diarrea pueden expresar una o más de las siguientes fimbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18 y F41 ⁽⁵⁾

Los signos clínicos varían desde muerte repentina y diarrea leve sin evidencia de deshidratación, hasta casos en que la diarrea se observa profusa y líquida. Las heces pueden observarse de color blanquecino o varios matices de marrón. La materia fecal puede escurrirse desde el ano hasta la región perineal, la cual se observa inflamada por el contacto con la materia fecal alcalina. En brotes severos, inicialmente los lechones pueden vomitar y a medida que la infección progresa los cerdos se observan deprimidos, inactivos, la musculatura abdominal se encuentra flácida, los ojos hundidos, con piel áspera y reseca; estos animales suelen morir. La cantidad de agua que se pierde por la diarrea puede ser tal que la pérdida de peso es hasta de un 40% ⁽²⁾.

1.6.2 *Diarrea post-destete*

La diarrea por *E.coli* post-destete es una enfermedad transmisible mediada principalmente por citotoxinas. También se le denomina colibacilosis entérica post-destete ⁽²⁾.

La morbilidad puede ser de hasta un 80% o más, pero el promedio es de 30 a 40%. El curso de la enfermedad en las pjaras varía desde 4 hasta 14 días, siendo el promedio de apenas una semana ⁽¹⁷⁾.

Los cerdos no destetados pueden contraer la infección en la paridera y pueden llevarla a la unidad de destete. Tanto la limpieza y desinfección de rutina insuficientes así como las bajas temperaturas en la sala de destete, podrían ser responsables del curso más grave de la diarrea post-destete ⁽²⁾.

El patotipo de *E. coli* que se ha relacionado con la diarrea post-destete es STEC, también denominado productor de verotoxinas, a este grupo patogénico se le ha asociado principalmente con enfermedad del edema ⁽⁵⁾

La primera manifestación de esta presentación es la muerte súbita de uno o varios cerdos a los dos días después del destete, así como bajo consumo de alimento en los lotes de cerdos afectados además de diarrea acuosa. Algunos cerdos presentan temblor de cola, temperatura rectal normal, deshidratación, depresión, cianosis en la punta de la nariz, orejas y abdomen, además de movimientos de incoordinación ⁽¹⁷⁾

1.7 Aspectos epidemiológicos de diarrea por *Escherichia coli* en lechones

La colibacilosis porcina representa una de las principales causas de diarrea en lechones durante las primeras semanas de vida (diarrea neonatal) o en lechones entre 3 a 6 semanas de edad (diarrea post-destete). Ambas están asociadas con ciertos serotipos de *E. coli*, así como con la presencia de factores de virulencia como son fimbrias y toxinas.

La colibacilosis porcina ha sido estudiada en diferentes países, dentro de los cuales se encuentran: Estados Unidos, Polonia, Cuba, Argentina, Eslovaquia, Dinamarca y China, entre otros, como se muestra en los cuadros 1 y 2 ^(5, 6, 7, 8, 9, 22, 23)

Cuadro 1. Prevalencia de genes que codifican para enterotoxinas en lechones de diferentes países.

PAIS	GENES QUE CODIFICAN PARA TOXINAS				Lechones/ Diarrea neonatal	Lechones/ Diarrea Post-destete
	LT %	STa %	STb %	STx1 %		
ESLOVAQUIA ⁽⁵⁾	42	13	49	ND	✓	-
POLONIA ⁽⁶⁾	22.50	72.50	77.50	0	-	✓
DINAMARCA ⁽⁷⁾	61.60	26.50	77.60	ND	-	✓
CHINA ⁽⁸⁾	10	14	9	ND	-	✓
ESTADOS UNIDOS ⁽⁹⁾	57.70	27	72.60	ND	-	✓
ARGENTINA ⁽²²⁾	2.90	24.50	ND	ND	✓	-
CUBA ⁽²³⁾	6	61	69	ND	-	✓

ND: No determinada

Cuadro 2. Prevalencia de genes que codifican para fimbrias en lechones de diferentes países.

PAIS	GENES QUE CODIFICAN PARA FIMBRIAS			Lechones/ Diarrea neonatal	Lechones/ Diarrea Post-destete
	F4 %	F18 %	F41 %		
ESLOVAQUIA ⁽⁵⁾	38	9	3	✓	-
POLONIA ⁽⁶⁾	ND	61.90	ND	-	✓
DINAMARCA ⁽⁷⁾	44.70	39.30	ND	-	✓
CHINA ⁽⁸⁾	3	26.50	ND	-	✓
ESTADOS UNIDOS ⁽⁹⁾	64.60	34.30	0.57	-	✓
CUBA ⁽²³⁾	0	61	0	-	✓

ND: No determinada

En México existen pocos estudios epidemiológicos sobre *E. coli*, dentro de ellos se encuentran el de Romero L.R., quién realizó estudios en la granja experimental Zapotitlán de la UNAM (Distrito Federal) con 101 cepas de *E. coli* aisladas de lechones con diarrea de 8 a 10 días de edad, identificando los siguientes serotipos: O96, O5, O8, O6, O45, O139, O149, O138, O108 y O35. De igual manera, en el año de 1988 en el estado de Yucatán, Heredia N.M., realizó estudios en 100 lechones de uno a ocho días de nacidos, encontrando únicamente la presencia del serotipo O8 ^(24, 25, 26). Sin embargo hasta el momento no se tienen registros acerca de los factores de virulencia de *E. coli* que afectan a lechones en la República Mexicana.

1.8 Diagnóstico de la infección por *E. coli*

El diagnóstico de la infección por *E.coli* se basa en primer lugar en los signos clínicos y las lesiones histopatológicas. Este diagnóstico es reforzado con el aislamiento y la identificación de la bacteria mediante pruebas bioquímicas, pero debido a que estas pruebas son insuficientes para poder determinar los factores de virulencia involucrados en la patogenia de la bacteria se han desarrollado diferentes métodos para identificarlos, como son pruebas serológicas (aglutinación, inmunofluorescencia y ELISA), ensayos en cultivos celulares (en células Vero o HeLa), pruebas *in vivo* como la ligadura de asa o la prueba de Sereny. Estos ensayos resultan ser muy laboriosos, por tal motivo se han desarrollado nuevos métodos que facilitan el proceso de identificación de genes de virulencia como son el uso de sondas y el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ^(2,13)

La PCR es una técnica de biología molecular creada en 1984 por Karry Mullis, la cual facilita la identificación de microorganismos causantes de enfermedad de forma rápida y sencilla mediante la amplificación de un fragmento específico de ácido desoxirribonucleico (ADN), por medio de ciclos de duplicación repetidos usando ADN polimerasas ^(27, 28).

Este ensayo se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas, que separan las hebras de ADN recién formadas entre sí después de cada fase de replicación y a continuación, dejar que se unan nuevamente para que vuelvan a duplicarse. Los componentes requeridos para un PCR son: iniciadores (oligonucleótidos) específicos, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), solución amortiguadora de la reacción $MgCl_2$, agua y ADN polimerasa. Lo anterior se resume en tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación de los fragmentos de ADN, cuyas condiciones serán diferentes en función del gen que se desea amplificar ^(27, 29, 30). Estas etapas se definen en:

Desnaturalización: Proceso en el cual se separan las dos cadenas complementarias de ADN blanco.

Alineamiento: Es la unión específica de los iniciadores y las cadenas simples de ADN blanco.

Elongación: La ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria al ADN a partir de los iniciadores.

Esta técnica ha permitido el desarrollo de nuevos procedimientos de diagnóstico, que faciliten la identificación de diversos microorganismos patógenos causantes de enfermedad, ya que es una técnica con alta sensibilidad y especificidad.

2. HIPOTESIS

La técnica de PCR es una alternativa de diagnóstico que permitirá identificar los principales genes de virulencia de *Escherichia coli* que codifican para fimbrias y toxinas causantes de diarrea en lechones.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Detectar los principales genes de virulencia de *E.coli* asociados a diarrea en lechones durante la lactancia y post-destete.

Objetivos particulares:

Identificar mediante el ensayo de PCR sí los principales genes de virulencia de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas y productoras de Shiga toxinas están presentes en heces de lechones con y sin diarrea (control) lactados y destetados.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Obtención de muestras biológicas:

Las muestras se obtuvieron de granjas tecnificadas de cuatro estados de la República Mexicana: Estado de México, Puebla, Hidalgo, Michoacán y el Distrito Federal.

Se colectaron 166 muestras de heces por medio de hisopos rectales de lechones lactados y destetados con y sin diarrea. De las 166 muestras de heces, 113 provienen de lechones con diarrea y 53 de lechones sin diarrea (control). Estas muestras se procesaron en la forma rutinaria para la identificación de especie de enterobacterias a través del coprocultivo y mediante pruebas bioquímicas. Una vez identificada *E. coli* en cada una de las muestras, a partir de estas cepas se obtuvo el ADN.

4.2 Obtención de ADN genómico:

Las cepas identificadas como *E.coli* se recultivaron en 3 ml de caldo de soya tripticaseína (DIBICO) ®, se incubaron durante toda la noche a 37°C hasta obtener una densidad óptica de $_{600nm} \geq 0.5$, la cual corresponde a obtener un crecimiento bacteriano $\geq a 1 \times 10^9$ células por mililitro. Las bacterias se colectaron en tubos "ependorf" y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos para la obtención de un botón (pellet), el sobrenadante fue eliminado mediante la utilización de pipetas Pasteur estériles. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de H₂O libre de nucleasas estéril para resuspender el pellet bacteriano, se sometieron a ebullición en baño María durante 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 5

minutos, se colectaron 150 μ l del sobrenadante en tubos “eppendorf” estériles. Este sobrenadante que es el que contiene el ADN genómico se utilizó como templado para la identificación de los genes de virulencia. El procedimiento anterior fue realizado de acuerdo a Zhang y cols, con algunas modificaciones.

4.3 Identificación de genes de virulencia en cepas de *E.coli*.

La identificación de estos genes se llevó a cabo mediante la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sencillo o duplex según el caso. La PCR se realizó utilizando como iniciadores, 8 oligonucleótidos específicos los cuales permitieron identificar 8 genes de virulencia de *E. coli*. Las condiciones de las PCRs a utilizar se tomaron de acuerdo a lo ya establecido con algunas modificaciones. Las secuencias de oligonucleótidos de los genes que se amplificaron se encuentran descritas en el siguiente cuadro:

CUADRO 3

Gen ó Factor de Virulencia	Secuencias de Primers (5' -3')	Nº de ascensión al Gen Bank	Referencia
LT	ATT TAC GGC GTT ACT ATC CTC TTT TGG TCT CGG TCA GAT ATG	S60731	6
STa	TCC GTG AAA CAA CAT GAC GG ATA ACA TCC AGC ACA GGC AG	M58746	31
STb	GCC TAT GCA TCT ACA CAA TC TGA GAA ATG GAC AAT GTC CG	AY028790	31
STx1	CGC TGA ATG TCA TTC GTC CTG C CTG GGT ATA GTC ACT GTC ACC	M17358	32
STx2	CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC	M59432	32
F18	GTG AAA AGA CTA GTG TTT ATTT TC CTT GTA AGT AAC CGC GTA AGC	M61713	33
F41	GAG GGA CTT TCA TCT TTT AG AGT CCA TTC CAT TTA TAG GC	X14354	31
F4	GCT GCA TCT GCT GCA TCT GGT ATG G CCA CTG AGT GCT GGT AGT TAC AGC C	AF022236	34

La mezcla para la realización de la PCR consistió de 50µl totales: 45µl del reactivo Taq Polimerasa GENE CHOICE ® (82.5 mM de Tris-HCl (ph de 8.5), 22 mM (NH₄)₂ SO₄, 2.2 mM de MgCl₂, 0.2% Tween 20®, 0.22 mM de dNTP's, 0.17 U de Taq polimeras) 1µl del cebador con sentido, 1µl del cebador antisentido y 3µl de templado. Se utilizó un termociclador (Thermo ELECTRON CORPORATION) con las siguientes condiciones de amplificación.

Cuadro 4

Gen ó Factor de Virulencia	Producto amplificado (pb)	Desnaturalización °C/ min	Alineamiento °C/ min	Elongación °C/ min	Elongación final °C/ min	Nº de ciclos
LT	280	94/5	59/ 1.5	72/ 5	-	30
STa	166	94/ 30 seg	60.5/ 30 seg	72/ 1	72/ 10	30
STb	278	94/ 30 seg	60.5/ 30 seg	72/ 1	72/ 10	30
STx1	302	94/ 3	60/ 1	72/ 1	-	55
STx2	516	94/ 3	60/ 1	72/ 1	-	55
F18	510	94/ 5	55/ 1	72/ 1	72/ 10	30
F41	431	94/ 1	53/ 2	72/ 1	72/ 10	30
F4	792	94/ 5 min	56.5/ 1	72/ 1	72/ 10	28

Los productos de amplificación se identificaron mediante geles de agarosa (BIOSELEC ®) TAE (Tris-Acido acético- EDTA) al 2%, utilizando un ADN 100 bp ladder (AMRESCO ®) como marcador de peso molecular. Se utilizaron cepas de referencia como controles positivos y negativos para cada uno de estos genes, las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Referencia de *E. coli*, de la Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España. Los productos de amplificación de PCR se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta (UV UVP. Upland, C.A), y se registraron utilizando el sistema

“Digidoc imaging system” (UVP, CA). Se consideró como un resultado positivo la aparición de una banda de un tamaño igual al descrito para cada uno de los iniciadores (cuadro 3).

4.4 Base de datos y análisis de resultados.

Toda la información obtenida se evaluó utilizando una base de datos, en la cual se registraron las cepas de *E. coli*, así como los resultados obtenidos para cada uno de los genes identificados. Las diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de genes de virulencia en los grupos de lechones (lactancia, destete y control) se realizó mediante la prueba de Ji- cuadrada (Chi- square), utilizando una P- value ≤ 0.05 . El programa utilizado: JMP ® versión 8.0.

5. RESULTADOS

La biotipificación de Las 166 muestras de heces de lechones permitió la identificación y aislamiento de 150 cepas de *E. coli*, de éstas, 104 provienen de lechones con diarrea y 46 de lechones sin diarrea (control). De los lechones con diarrea 57 cepas provienen de lechones en etapa de lactancia y 47 en etapa de destete. Tabla 1.

Por medio de la técnica de PCR, se identificaron genes de virulencia que codifican para toxinas y fimbrias presentes en cepas de *E.coli* enterotoxigénica y *E coli* enterohemorrágica. Para este fin se utilizaron 8 pares de oligonucleótidos correspondientes a 5 genes de toxinas y 3 genes fimbriales, los cuales fueron identificados como productos de PCR del tamaño correspondiente a los controles positivos. Figura 1.

La presencia de genes de virulencia de *E. coli* que codifican para toxinas y fimbrias se amplificaron mediante el ensayo de PCR en geles de agarosa al 2%. La figura 2 muestra una banda de 280 pares de bases (pb), que corresponde al gen que codifica para la toxina LT. En la figura 3 se muestran dos bandas de 166 y 278 pb, que corresponden a los genes que codifican para las toxinas STa y STb respectivamente.

De las 150 cepas de *E. coli* obtenidas, 110 cepas (73.3 %) fueron positivas para uno o más de un factor de virulencia de ETEC y EHEC (Tabla 1), de las cuales 30 (52.7%) provenían de lechones en etapa de lactancia y 41 (87.2%) de lechones destetados. De las cepas control, 39 (84.8%) fueron positivas para alguno de los genes estudiados. Tabla 1.

5.1 Genes que codifican para toxinas

La amplificación de los genes mediante PCR presentó que el 65.4% (68/104) de las cepas aisladas de lechones con diarrea fueron positivas para una o más de una de las toxinas estudiadas. En cambio el 52.2% (24/46) de las cepas aisladas de lechones sin diarrea (control) fueron positivas para por lo menos un gen que codifica para toxinas (Tabla 2). De los genes estudiados, el gen predominante que codifica para toxinas, en las cepas estudiadas fue el gen STa con un 31%, seguido de STb con un 18%, LT en 8% y STx2 con 4%. El gen que codifica para la toxina STx1 no fue detectado en ninguna de las cepas de *E. coli* analizadas. Tabla 3

5.2 Genes que codifican para fimbrias

Los genes que codifican para fimbrias fueron detectados mediante PCR en 66 (63.5%) de las 104 muestras aisladas de lechones con diarrea. En cambio 43/46 (93.5%) cepas aisladas de lechones sin diarrea (control) fueron positivas para por lo menos un gen que codifica para fimbrias (Tabla 2). El gen predominante en las cepas estudiadas fue el que codifica para F41 en un 59% de los aislados, seguido de F18 y F4 en un 8% y 5% respectivamente. Tabla 3

5.3 Etapa de lactancia

Del total de cepas de *E. coli* positivas para uno o más de un gen que codifican para toxinas de los lechones en la etapa de lactancia, 7 (12.3%) fueron positivas para la toxina STa, 3 (5.3%) para la toxina STb y 1 (1.8%) para la toxina LT. Con respecto a las fimbrias, el gen que codifica para F41 estuvo presente en 23 (40%) de las cepas de *E. coli*, F18 en 2 (3.5%) cepas y F4 en 1 (1.7%) cepa. Tabla 4

5.4 Etapa de destete

En la etapa de destete el gen que codifica para STa fue identificado en 25 (53.2%) cepas de *E. coli*, STb en 19 (40%), LT en 8 (17%) y STx2 en 5 (11%) cepas bacterianas respectivamente. Con relación a las fimbrias, el gen que codifica para F41 se encontró en 28 (59%) cepas de *E. coli*, seguido de F18 en 9 (19%) cepas, y por último F4 con 3 (6.4%) cepas. Como puede observarse en la tabla 4, el gen que codifica para la toxina STa y la fimbria F41 fueron los que predominaron en ambas etapas. Tabla 4

5.5 Lechones control

Respecto a los controles, el gen que codifica para STa estuvo presente en 15 (32.7%) cepas de *E. coli*, STb en 5 (10.9%) cepas, LT en 3 (6.5%) cepas y STx2 en 1 (2.2%) cepa, siendo el gen STa el que se presenta con mayor frecuencia en estas cepas. De los genes que codifican para fimbrias, el gen predominante en las cepas estudiadas fue el que codifica para F41 con 37 (80.4%) cepas de *E. coli*,

seguido de F4 y F18 con 4 (8.4%) y 1(2.2%) cepas bacterianas respectivamente.

Tabla 4

5.6 Asociación entre genes que codifican para fimbrias y toxinas

De las cepas de *E. coli* estudiadas, se identificaron 19 asociaciones de genes que codifican para toxinas y fimbrias (Tabla 5). La combinación de genes más frecuente fue STa/F41 con 17 (11.3%) cepas positivas, seguida de STa/STb/F41 con 7 (4.6%) cepas positivas.

En la etapa de lactancia se encontraron dos tipos de asociaciones entre genes que codifican para toxinas y fimbrias, F41/F18 y STa/ F41, presentando 2 (3.5%) y 5 (8.7%) cepas positivas respectivamente. En cepas aisladas de lechones destetados encontramos 16 tipos de asociación entre genes que codifican para toxinas y fimbrias: 5 (11%) cepas de *E. coli* que portan los genes STa/STb/F41, 3 (6.4%) LT/STa/F18, seguida de STa/F41, STa/STb con 2 cepas positivas cada una. Las siguientes combinaciones sólo estuvieron presentes en 1 (2.1%) cepa de *E. coli*: STa/STx2, F41/F18, F41/F4, STb/F41, STa/F41/F4, LT/STb/F41, LT/STa/STb/F41, LT/STa/F18/F41, LT/STa/STx2/F18/F41, STa/STb/STx2/F18/F41, Sta/STb/F18/STx2, LT/STa/STb/F18/F41. En el grupo control, también encontramos asociaciones de genes, siendo las más frecuentes STa/F41 con 10 (22%) cepas, seguida de LT/F41, STb/F41/F4, STa/STb/F41 con 2 (4.3%) cepas positivas cada una y F41/F4, STa/STb/F41/F4, LT/STa/STx2/F18/F4 con 1 (2.2%) cepa positiva cada una.

5.7 Análisis estadístico

La comparación de genes de virulencia entre cepas de *E. coli* aisladas de los grupos de lechones lactantes y destetados, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.3$). En el caso de genes que codifican para fimbrias (gen F) el análisis estadístico mostró diferencia significativa ($p=0.04$) entre las cepas provenientes del grupo de lechones control con respecto a las cepas provenientes de lechones lactantes. No se observaron diferencias significativas entre las cepas de *E. coli* provenientes de los grupos control y destetados ($p=0.7$). Así como entre los grupos de lechones lactantes y destetados ($p=0.8$). En relación a los genes que codifican para toxinas (Tx), el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las cepas provenientes del grupo control vs las muestras provenientes de lechones lactantes ($p= 0.02$). De igual manera mostró diferencia significativa entre las cepas provenientes del grupo de lechones lactantes vs las muestras provenientes de lechones destetados ($p= 0.00$).

6. DISCUSION

Es mundialmente aceptado que, tanto los serotipos como los patotipos de ETEC y STEC (EHEC) son responsables de la diarrea neonatal y post-destete en cerdos. Sin embargo, la distribución y frecuencia de los serotipos y patotipos puede variar considerablemente de región a región y con el transcurso del tiempo en una cierta región ⁽³⁵⁾

Las cepas porcinas de ETEC sintetizan la toxina termolábil LT y/o las termoestables STa y STb y expresan los antígenos de colonización intestinal F4, F5, F6, F18 y F41 ⁽³⁶⁾. De acuerdo con los trabajos de J. M Fairbrother, estos genes están presentes principalmente en cerdos neonatos de 0 a 6 días de edad, y pueden presentarse en cerdos de mayor edad ⁽¹⁷⁾. En cambio, las cepas de STEC (EHEC) que sintetizan las toxinas STx1, STx2 y el factor fimbrial F18, se han aislado principalmente de cerdos destetados o con enfermedad del edema, aunque también se ha encontrado el gen fimbrial F4 en cerdos con diarrea post-destete ^(5, 31, 33, 36).

En el presente trabajo fueron investigados los genes de virulencia más comunes de *Escherichia coli*, tanto en la etapa de lactancia como en la de destete. El 87.23% de las cepas aisladas de lechones destetados fueron positivas para por lo menos un gen de virulencia, a diferencia de los lechones en la etapa de lactancia con un 52.63% de cepas positivas indicando que la etapa de destete presentó

mayor proporción de genes positivos. Lo anterior puede deberse a que los lechones destetados carecen de anticuerpos presentes en el calostro que les proporcionen inmunidad frente a las *E. coli* patógenas, de la misma manera, la variación de la temperatura del medio ambiente, el estrés asociado con el cambio de área y de dieta, pueden ser factores importantes que desencadenen la proliferación de *E. coli* patógena en el intestino. ⁽¹⁷⁾

En el presente trabajo se identificaron los genes de virulencia de *E. coli* que se consideran dentro de los más importantes en la producción de diarrea en lechones, tanto en la etapa de lactancia como en la de destete.

En las cepas de *E. coli* aisladas, se encontró que un alto porcentaje de éstas expresaron el gen que codifica para la toxina STa (31%), tanto en lechones lactantes como destetados. Este hallazgo concuerda con estudios realizados en diferentes países, como son el de Thuy N. Do y cols, en el año de 2006, en Vietnam, quienes detectaron la presencia de STa en 92.1% de los aislamientos en lechones con diarrea pre-destete; Cicuta M. E y cols, en el año 2000 reportaron la presencia de este mismo gen en un 24.5% de los aislamientos, siendo el gen predominante en aislados de lechones de una semana hasta tres meses de edad. De la misma manera en el año 2004 los trabajos realizados por Chen X y cols, en China, mostraron que el gen que codifica para la toxina STa fue el de mayor prevalencia, detectándolo en un 60.5% de los aislamientos de cerdos con diarrea post-destete ^(23, 37, 38). En los trabajos realizados por Osek. J y cols, y por Cheng. D. y cols, el gen que codifica para la toxina STa estuvo presente en 14.58% y 72.5% de los aislamientos respectivamente, siendo el segundo gen más detectado en

cerdos con diarrea post-destete ^(6, 8). A diferencia de los trabajos realizados por Vuc-Khac. H y cols, Frydendhal. K, Zhang. W y cols, Osek. J y cols y Blanco. M y cols, quienes encontraron que el gen STb predomina en aislados bacterianos de lechones lactantes y destetados en países como Eslovaquia, Dinamarca, USA, Polonia y Cuba ^(5, 6, 7, 9, 22).

Los estudios antes mencionados revelan la gran heterogeneidad que existe con respecto a la presencia de genes de virulencia que codifican para toxinas y fimbrias de *E. coli*, y esto está relacionado con la región o zona geográfica de origen de los aislados.

E. coli productora de Shiga toxina, se ha asociado con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en humanos, en cambio, en cerdos tiene una alta implicación en la enfermedad del edema, sin embargo también produce diarrea post-destete, aunque no es tan común la presencia de la toxina en esta enfermedad ^(5, 20). En el presente trabajo el gen que codifica para la Shiga toxina 2, sólo se detectó en un 11% en cepas aisladas de lechones destetados, a diferencia de las cepas aisladas de lechones lactantes, donde no se detectó la toxina, lo cual concuerda con lo anteriormente citado. Sin embargo, el gen que codifica para la Shiga toxina 1 (STx1), no fue detectado en ninguna de las cepas estudiadas, lo que concuerda con estudios previos realizados por Osek. J y cols, Cheng. D. y cols., Blanco. M. y cols y Vuc- khac. H, y cols. ^(5, 6, 8, 22).

Los genes que codifican para las fimbria F4 y F18, han sido los mayormente identificados en aislados de *E. coli* proveniente de lechones con diarrea. El gen que codifica para la fimbria F4, es uno de los genes que con mayor frecuencia se encuentran en aislados de *E. coli* provenientes de lechones de lactancia y destete en diferentes países como lo muestran los estudios de: Vuc- Khac. H. y cols, Zhang. W. y cols, Frydendhal. K, Thuy. N. Do y cols.^(5, 7, 9, 37, 39) Así como en lo reportado por Darong. C y cols, Osek. J y cols, Chen X y cols, Henriques. M. R y cols y Goncalves. M. A. D y cols; el gen fimbrial F18, es uno de los más comunes en cerdos con diarrea post- destete^(6, 8, 38, 40, 41). Contrariamente a estos resultados, en el presente trabajo, el gen que codifica para la fimbria F4 sólo estuvo presente en 5% de las cepas de *E. coli*, siendo el menos detectado y el gen F18 se presentó sólo en 8% de las cepas. En contraste con lo antes mencionado, el gen fimbrial F41, tiene una baja prevalencia en países como Eslovaquia, Korea, USA y Vietnam (Vuc- Khac. H. y cols, Lee. S y cols, Zhang. W. y cols, Thuy. N. Do y cols)^(5, 9, 37, 42), sin embargo en el presente trabajo este gen fue el predominante en los aislados de *E. coli*, dado que se identificó en un 59% de las cepas bacterianas aisladas tanto de lechones de lactancia como destete. Este dato en particular tiene gran relevancia debido a que permite considerar que las cepas de *E. coli* aisladas de lechones en México presentan perfiles de genes de virulencia diferentes a los reportados en otros países, por lo que se considera un nuevo hallazgo con respecto a la presencia de fimbrias en cerdos, además de que apoya el hecho de que la presencia de genes de virulencia en *E. coli*, varía con la zona geográfica donde se realiza el estudio.

En lechones control (sin diarrea), se encontró que 39 (84.7%) de las 46 cepas de *E. coli*, presentaron por lo menos un gen de virulencia, siendo los genes que codifican para la toxina STa y el factor fimbrial F41 los predominantes (32.7% y 80.4%) respectivamente. El hecho de que las cepas bacterianas obtenidas de lechones control presenten genes de virulencia, puede tener diferentes explicaciones: es probable que las bacterias de microbiota normal posean genes de virulencia pero que éstos no se expresen, ya que estos son regulados en coordinación con señales ambientales, que controlan la expresión de genes de virulencias en las bacterias, estas señales incluyen: temperatura, disponibilidad de hierro, osmolaridad, fase de crecimiento, iones específicos como el Ca^{2+} y el pH. Por otro lado es sabido que las bacterias intercambian material genético a través de los mecanismos de transducción, transformación y conjugación, por lo que bacterias patógenas pueden transferir por estos mecanismos, factores de virulencia a bacterias no patógenas, y estas volverse patógenas. ^(14, 19, 43, 44)

Lo anterior concuerda con estudios realizados por Vuc-Khac. H y cols, quienes encontraron la presencia del gen EAST 1 en un 27% de los aislamientos de lechones sanos, lo que refieren a una infección asintomática ⁽⁵⁾. Contrariamente a lo anterior, el 27% de las cepas confirmadas como *Escherichia coli*, fueron negativas para los ocho genes de virulencia identificados, sin embargo esto no implica que las cepas se consideren como no patógenas, ya que pueden presentar otros genes de virulencia que no fueron determinados en el presente trabajo.

A la fecha, los estudios realizados con aislados de *E. coli*, han mostrado, en general, que las bacterias presentan más de un gen de virulencia, y que hay asociaciones de genes que se encuentran con mayor frecuencia en aislados bacterianos de algunos países como es la asociación STb/ LT/F4, la cual se presenta con mayor frecuencia en Vietnam, Australia, Dinamarca, USA, China y Canadá, y en ocasiones el gen STa puede estar presente en estas asociaciones (STa/STb/LT/F4). Así mismo F4, es el factor fimbrial más comúnmente encontrado en asociación con enterotoxinas ^(7, 8, 9, 37, 38, 45). A diferencia de estos reportes, en el presente trabajo la asociación predominante fue STa/ F41 con 11.33% en cepas de *E. coli* provenientes de lechones lactantes, destetados y controles; y la asociación STa/ STb/ F41 con 4.6% en *E. coli* de lechones destetados y controles. El gen que codifica para el factor fimbrial F41 estuvo presente en todas las cepas que poseen los genes Sta, STb, LT y STx2. La asociación STa/ F41, también fue encontrada en los estudios realizados por Osek. J., quien la detectó en un aislamiento ⁽⁴⁶⁾. Cheng D. et. al, la encontró en 4 aislamientos en cerdos con diarrea post-destete ⁽⁸⁾. Las asociaciones STa/ STb, LT/ STa/ F18, STb/ F41 estuvieron presentes en cepas de cerdos destetados con un 4.2%, 2.1% y 6.3% respectivamente; y la asociación LT/ F41 se presentó con un 4.3% en lechones control. Estas asociaciones también fueron descritas por Vuc- Khac, et. al, Frydendhal. K, Osek. J, Henriques. M. R. et. al y Goncalves. M. D. A, et. al, en cerdos de lactancia y destete ^(5, 7, 40, 41, 46)

La discusión de los resultados no se realizó con investigaciones hechas en México debido a la falta de publicaciones relacionadas con el tema, por tal motivo conviene resaltar la importancia de este estudio, dado que éste, es uno de los primeros trabajos realizados en México acerca de la detección de genes de virulencia de *Escherichia coli* en lechones de lactancia y destete.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados indican la presencia de ETEC y STEC en los aislamientos de cerdos con diarrea neonatal y post- destete. Siendo ETEC el patotipo predominante.
- En las cepas aisladas de lechones con diarrea se encontró mayor proporción de genes de virulencia, que en las aisladas de lechones control.
- En las 150 cepas de *E. coli* los genes que codifican para la toxina STa y para la fimbria F41, se presentaron en un 31% y 59% respectivamente, siendo los predominantes.
- En lechones destetados el 87.2% de las cepas fueron positivas para por lo menos un gen de virulencia, siendo las *E. coli* de este grupo, las que mostraron la mayor cantidad de genes de virulencia.
- En el presente trabajo se presenta una información acerca de los principales factores de virulencia de *E. coli* en lechones de México; sin embargo, el número de muestras es pequeño por lo que es necesario realizar estudios más amplios que involucren más granjas y zonas geográficas, que permitan conocer la prevalencia de estos genes en la República Mexicana. No obstante el conocer los principales factores de virulencia que afectan a la especie porcina en nuestro país, es de suma importancia para llevar a cabo un control más eficiente de la colibacilosis.

- El ensayo de PCR es un método de diagnóstico eficaz con alta sensibilidad y especificidad para la detección de genes de virulencia de *E.coli*, lo que la hace una prueba de gran importancia para el diagnóstico rápido, oportuno y certero de la enfermedad.

8. REFERENCIAS

1. Carvajal A, de Arriba M. L, Pozo J, Vidal A, 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.
2. Straw B. E, D'Allaire S, Mengeling W. L, Taylor,D.J: Enfermedades del cerdo. Intermédica. 8ª edición, Tomo II, Buenos Aires Argentina 2001. pag: 431-439.
3. Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E. Distribution of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004 51 (7):343-347.
4. Lee SI, Rayamahji N, Lee WJ, Kang SG, Kang ML, Cha SB: Genotypes, antibiogram, and PFGE profiles of *Escherichia coli* strains from piglets. 20th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Durban Sudáfrica. 2008, vol. 2, pag: 245.
5. Vu- Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco J. E, Dahbi G, Et. al. 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of

Escherichia coli isolated from piglets with diarrhea in Slovakia. The Veterinary Journal. 174: 176-187.

6. Osek J, Gallien P, Truszczynski M, Protz D. 1999. The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in Poland. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 22 (3): 163-74.
7. Frydendhal K. 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. Veterinary Microbiology. 85: 169-182.
8. Cheng D, Sun H, Xu J, Gao S. 2006. PCR detection of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. Veterinary Microbiology. 115: 320-328.
9. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. Veterinary Microbiology. 127: 145-152.

10. Hernández C. U: Caracterización biológica de una proteína secretada por *Escherichia coli* enteroagregativa. 2002. Tesis de maestría. Facultad de ciencias, UNAM.
11. Krieg, N.R and J. G. Holt: Bergey's manual of sistematyc bacteriology. Vol. 1, 1984, pags: 408-600.
12. Scalan C. M: Introducción a la bacteriología veterinaria. Acribia, 1991. Pag: 94.
13. Rodríguez MG: Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública México 2002; 44: 464-475.
14. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M: Microbiología Médica. Elseiver. 5ª edición. 2006. Pags: 193-201, 35-46.
15. Nataro James P, kaper James B: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1998, p. 142–201 Vol. 11, No. 1
16. Plonait, H: Manual de las enfermedades del cerdo. Acribia S.A. Zaragoza España 2001. pag:111
17. Leman A. D, Straw B. E, D'Allaire S, Mengeling W. L, Taylor,D.J: Diseases of swine. Iowa State University Press, Ames. 1999. pag: 489-497.

18. García R. O, Lobo M. G: Enfermedades de los cerdos. Trillas, México 1991. pags: 43-44
19. Tay Z. J, Gutierrez Q. M, López M. R, Manjarrez Z. ME, Molina L. J: Microbiología y parasitología médicas. Méndez editores. 3ª edición, México 2003.
20. Gyles C. L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. 1992. *Can J Microbiol.* 38(7):734-746.
21. Rivero M. A, Padora N. L, Etcheverría A.I, Parma A. E: *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 352-356
22. Blanco M, Lazo L, Blanco J. E, Dhahi G, Mora A, Et. al. 2006. Serotypes, virulence genes and PFGE patterns of enteropatogenic *Escherichia coli* isolated from Cuba pigs with diarrhea. *International Microbiology.* 9: 53-60.
23. Cicuta M. E, Parma A. E, Viñas M. R, Sanz M. E, Boehringer S. I, Roibón W. R, Et. al. 1999-2000. Factores de virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina. *Rev. Vet.* 10/11, 1 y 2.
24. Moreno C. R: *Ciencia Veterinaria.* FMVZ, UNAM. 1976. vol 1. pag:5

25. Romero L. R: Mortalidad de lechones: III. Seroagrupación de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de la granja experimental Zapotitlán de la UNAM. 1975. Tesis de Licenciatura. FMVZ UNAM
26. Heredia N M: Frecuencia de algunos serotipos patógenos de *E. coli* en lechones con diarrea en cuatro granjas del estado de Yucatán. 1988. Tesis de Licenciatura. FMVZ UNAM
27. Alcamo E: DNA technology. 2ª edición. Harcourt Academic Press, 2001, pag: 157.
28. <http://es.wikipedia.org>
29. Turner P. C, McLennan A. G, Bates A. D, White M. R. H: Molecular biology. 2a edición. BIOS Scientific Publisher Limited, 2000. pag: 167.
30. Garden E. J, Simmons M. J, Snustand D. P: Principios de genética. 4a edición. Limusa Wiley, 2005. pag: 381.
31. Ojeniyi B, Ahrens P, Meyling A. 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *Zentralbl Veterinarmed B*. 41(1):49-59.

32. Blanco M, Padola NL, Kruger A, Sanz ME, Blanco JE, Gonzalez EA, Et. al. 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol.* 7(4):269-76
33. Imberechts H, Bertschinger HU, Nagy B, Deprez P, Pohl P. 1997. Fimbrial colonisation factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease. *Adv Exp Med Biol.* 412:175-83
34. Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Et. al. 2006. Serotypes, virulencia genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *BMC Vet Res.* 20: 2 -10.
35. Blanco A. J: Serotipos y genes de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógenos porcinos. Desarrollo de una nueva vacuna: COLIDEX-C. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de santiago de Compostela Lugo, España.
36. Bertschinger HU, Nief V, Tschäpe H. 2000. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Vet Microbiol.* 71(3-4):255-67

37. Do T, Phu H, Huyen X, Tuan X, Quy N, Steve J, Et. al. 2006. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. *Journal of Medical Microbiology* 55: 93-99.
38. Cheng X, Gao S, Jiao X, Liu X. 2004. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Veterinary Microbiology*. 103: 13-20.
39. Do T, Stephens C, Townsend K, Wu X, Chapman T, Chin J, Et. al. 2005. Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates associated with diarrhoea in Queensland piggeries. *Australian Veterinary Journal*. 83 (5): 293-299.
40. Henriques M. R, Reis K. C. P, Guimaraes W. V, Santos L. F, Santos D. L, Santos J. L: Virulence factor genes in *Escherichia coli* isolated from feces of swine with diarrhea. 20th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Durban Sudáfrica. 2008, vol. 2.
41. Goncalves M. A. D, Mesquita R. C. T, Asanome W, Pellegrini D. C. P, Lippke R. T, Heres T, Et. al: Virulence factors among *E. coli* strains isolated from cases of diarrhea in pigs in Brazil. 20th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Durban Sudáfrica. 2008, vol. 2.

42. Lee S. I, Kang S. G, Kang M. L, Yoo H. S. 2008. Development of multiplex polimerase chain reaction assays for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* and their application to field isolates from piglets with diarrhea. J. Vet. Diagn. Invest. 20: 492-496.
43. Brooks G. F, Butel J. S, Morse S. A, Carroll K. C: Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª edición, Manual Moderno, 2008. Pags: 157-169.
44. Quinn P. J, Markey B. K, Carter M. E, Donnelly W. J. C, Lonard F. C, Maghire D: Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia, 2002. Pags: 23-29.
45. Amezcua R, Friendship R. M, Dewey C. E, Gyles C, Fairbrother J. M. 2002. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. The Canadian Journal of Veterinary Research. 66: 73-78.
46. Osek J. 1999. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated of virulence from diarrheic and healthy piglets after weaning. Veterinary Microbiology. 68: 209-217.

9. TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de cepas de *E. coli* aisladas de lechones con y sin diarrea, en las etapas de lactancia y destete.

<i>Lechones con y sin diarrea</i>	<i>Cepas de E. coli</i>	<i>Cepas de E. coli positivas para genes de virulencia (%)</i>
LACTANCIA	57	52.63
DESTETE	47	87.23
CONTROLES	46	84.78
TOTAL	150	73.33

Tabla 2. Número de cepas de *E. coli* que presentan genes que codifican para toxinas y fimbrias aisladas de heces de lechones con y sin diarrea.

GRUPO	TOXINAS		FIMBRIAS	
	(+)	(-)	(+)	(-)
CON DIARREA	68	36	66	38
SIN DIARREA	24	22	43	3
TOTAL	92	58	109	41

Tabla 3. Porcentaje de cepas de *E. coli* aisladas de heces de lechones con y sin diarrea positivas para uno o más de un gene analizado.

Genes identificados	Presencia de genes en cepas de <i>E. coli</i> (%)
LT	8
Sta	31
STb	18
STx1	0
STx2	4
F18	8
F 41	59
F 4	5

Tabla 4. Porcentaje de cepas de *E. coli* que presentan genes que codifican para toxinas y fimbrias aisladas de heces de lechones con y sin diarrea, en las etapas de lactancia y destete.

	LT	STa	STb	STx1	STx2	F18	F41	F4
	%	%	%	%	%	%	%	%
LACTANCIA	1.8	12.3	5.3	0	0	3.5	40	1.7
DESTETE	17	53.2	40	0	11	19	59	6.4
CONTROLES	6.5	32.7	10.9	0	2.2	2.2	80.4	8.7
TOTAL	8	31	18	0	4	8	59	5

Tabla 5. Relación de asociación de genes que codifican para toxinas y fimbrias en 150 cepas de *E.coli* provenientes de lechones con y sin diarrea, en las etapas de lactancia y destete.

GEN	LACTANCIA	DESTETE	CONTROLES	TOTAL	%
STa/STx2	0	1	0	1	
STa/ STb	0	2	0	2	
F41/F18	2	1	0	3	
F41/F4	0	1	1	2	
STa /F41	5	2	10	17	
STb/F41	0	1	0	1	
LT/F41	0	0	2	2	
STa/F41/F4	0	1	0	1	
STb /F41/F4	0	0	2	2	
LT/STb/F41	0	1	0	1	
STa/STb/F41	0	5	2	7	
STa/STb/F41/F4	0	0	1	1	
LT/STa/F18	0	3	0	3	
LT/STa/STb/F41	0	1	0	1	
LT/STa/F18/F41	0	1	0	1	
LT/STa/STx2/F18/F41	0	1	1	2	
STa/STb/STx2/F18/F41	0	1	0	1	
Sta/STb/F18/STx2	0	1	0	1	
LT/STa/STb/F18/F41	0	1	0	1	
(+)	7	24	19	50	
(-)	50	23	27	100	

10. FIGURAS

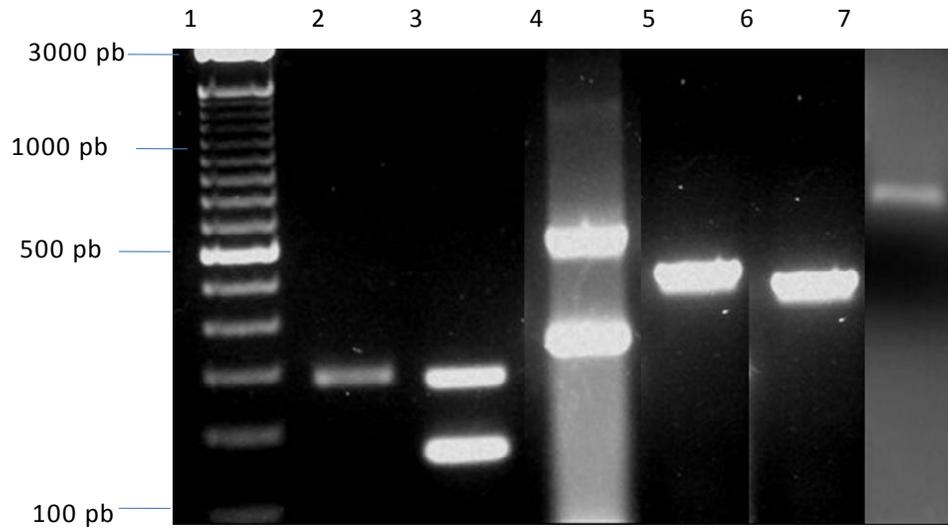


Figura 1. En gel de agarosa al 2% se observa en el carril 1: marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: Gen LT (280pb). Carril 3: Gen STa (166pb) y STb (278pb). Carril 4: Gen STx1 (302pb) y STx2 (516pb). Carril 5: Gen F18 (510pb). Carril 6: Gen F41 (431 pb). Carril 7: Gen F4 (792pb)

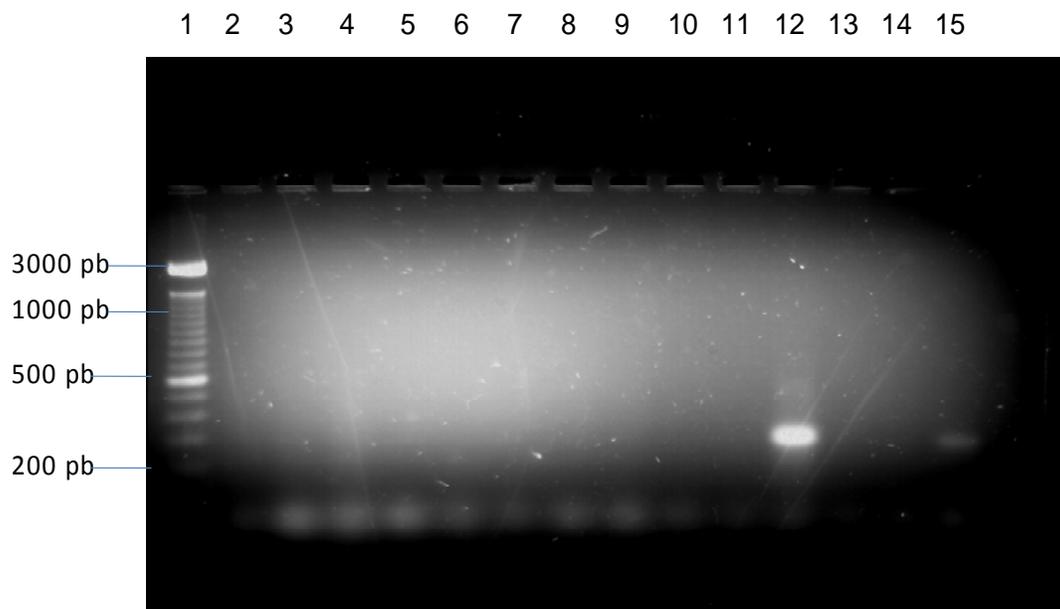


Figura 2. En el carril 1 se observa: marcador de peso molecular 100 pb. Carril 12 banda de 280 pb.(muestra positiva). Carril 14: control negativo (sin presencia de ADN). Carril 15: Control positivo.

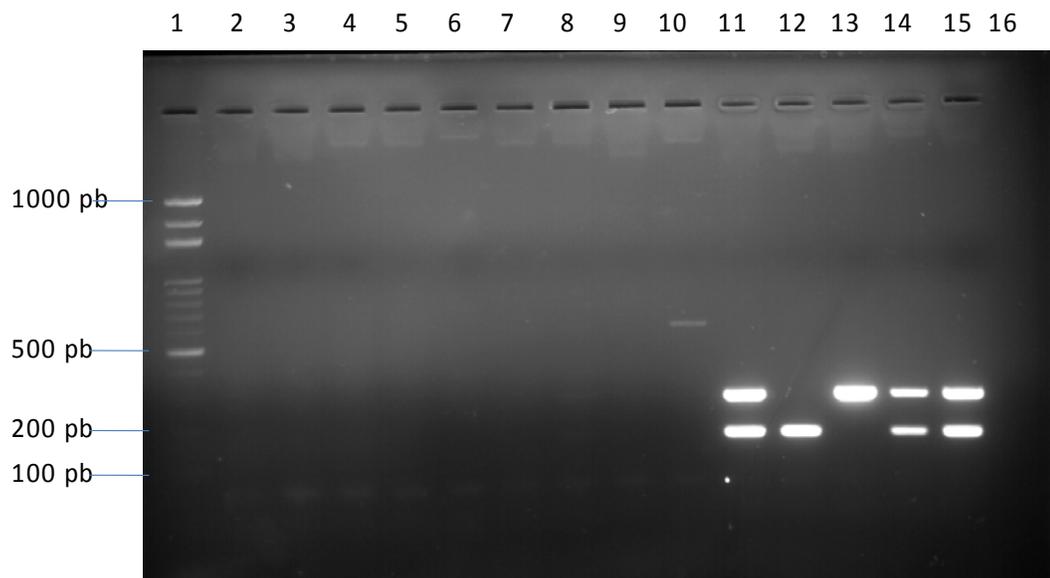


Figura 3. En el carril 1: marcador de peso molecular 100pb.Carril 11 a 14 bandas de 166 y 278 pb (muestras positivas). Carril 15: control positivo. Carril 16: Control negativo (sin presencia de ADN).

11. ANEXOS

11.1 APENDICE

CALDO SOYA TRIPTICASEÍNA

Poner 30g del medio (DIBICO ®) en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

GEL DE AGAROSA

Se utilizaron geles de agarosa al 2% (250ml).

Se disuelven 5g de agarosa (BIOSELEC ®) en 250 ml de buffer TAE 1x (Tris- Acido acético- EDTA). Calentar hasta disolver por completo y que la disolución se observe totalmente transparente (libre de grumos). Dejar enfriar unos minutos y verter 1 gota de Bromuro de etidio (0.05µg/ml). Vaciar el contenido en una base para geles con 2 peines de 1.0 mm para 25 carriles cada uno. Dejar reposar hasta que se solidifique la agarosa. Como colorante de carga para las muestras se utilizó el colorante agarose gel loading dye, 6x (amresco ®), utilizando 4 µl de colorante por cada 20 µl de muestra, se mezcla perfectamente y se procede a la carga en el gel.

EDTA

186.1 g de EDTA y 20 g de NaOH. Esterilizar para la total disolución del EDTA.

Ajustar el pH adicionando una solución de NaOH 1M.

BUFFER TAE (Tris-Acido acético- EDTA) 50x

121 g de Tris base (amresco ®)

28.5 ml de ácido acético (J.T Baker ®)

50ml de EDTA (J.T Baker ®) pH=8

Pesar la sal en un vaso, agregar los líquidos (ac. Acético y EDTA) y 250 ml de H₂O destilada. Calentar hasta que la sal se disuelva. Posteriormente verter el contenido en un matraz aforado y agregarle H₂O cbp 500ml.

BUFFER TAE 1x

980 ml de H₂O destilada

20 ml de TAE 50x

BROMURO DE ETIDIO (amresco ®)

5.7 mg en 9.12 ml de H₂O libre de RNAsas

Se diluye:

100 µl de Bromuro de etidio

900 µl de H₂O libre de nucleasas

Se utiliza una gota por cada 50 ml de agarosa ya disuelta.