



PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* POR MEDIO DE
LA TÉCNICA DE PCR Y DETERMINACIÓN DE VARIANTES POR RFLP'S

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA:
FLORENCIA DEL ROSARIO BÁEZ GUILLÉN

DR. IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.
MC. ROSARIO ESPERANZA GALVÁN PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.
DRA. PATICIA TATO ZALDIVAR
FACULTAD DE MEDICINA

MEXICO, D.F. JUNIO 2013



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.

DEDICATORIA

A mi padre Rafael por todo su apoyo y consejos durante la realización de este trabajo.

A mi madre Irma, por todo el amor, el apoyo y los consejos 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 todas las etapas de mi vida.

A Cora, Robin y mi niño Argos por ser tan lindos perros y magníficas mascotas

A Doña Florencia porque siempre tiene un buen abrazo para mí, a Don Castulo que está en ese lugar que se van todas las personas que amamos cuando mueren, a mis tíos y primos, con mención especial a mis tías Violeta, Eva y Concepción, porque siempre están ahí y hacerme sentir mejor.

A Carlos Andrés Ramírez Granada por siempre estar ahí, porque en mi estrés, frustración y felicidad nunca me dejó sola y me ayuda a salir adelante, TE AMO.

A Andrea Isol que será lo más importante en mi vida de ahora en adelante, que por ella daré la vida y en recompensa ella cambiara la mía. TE ADORO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos

A mi Comité Tutor por su apoyo y enseñanzas durante la elaboración de este trabajo, Dr Iván Sánchez Betancourt, MC Esperanza Galván y Dra. Patricia Tato Zaldivar.

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 Cecilia, Ernesto y Diana, por todo el apoyo, por estar ahí en las buenas y las malas y por esos momentos que sin ellos este tiempo hubiera sido un desastre.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFIA	34

DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PCR Y DETERMINACIÓN DE VARIANTES POR RFLP'S

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue la determinación de factores de virulencia en aislamientos de *Escherichia coli* (*E. coli*) procedentes de lechones con diarrea con el uso de la técnica de PCR, así como identificar cambios genéticos de dichos factores de virulencia mediante el uso de RFLP's. Se utilizaron 569 aislamientos de *E. coli* de casos clínicos de diarrea en lechones lactantes y lechones destetados. Se realizó aislamiento bacteriano e identificación con pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli*. Se llevó a cabo la técnica de extracción de plásmido a 50 muestras y PCR-RFLP a todos de los aislamientos. 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 100% fueron positivas a aislamiento de *Escherichia coli*, el 100% de las muestras procesadas para extracción de plásmido fueron positivas a dicha técnica, el 0.3% de las muestras sometidas a PCR fueron positivas a STb el cual presentó una variación genómica con el uso de la enzima de restricción *MboII*. En conclusión, en este trabajo se identificó una variante de la toxina STb de ETEC con la enzima *MboII*, lo que sugiere que la prueba molecular PCR-RFLP es una herramienta que confirma la presencia de variantes en cepas ETEC.

DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PCR Y DETERMINACIÓN DE VARIANTES POR RFLP'S

INTRODUCCIÓN:

La porcicultura representa una industria ganadera muy importante en el país, la producción del año 2011 fue de 1 182 916 toneladas y para 2012 se pronostica una producción de 1 119 989 toneladas.^(1,2)

Debido a la selección genética, 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 la medicación 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)

El cerdo actual es un animal muy magro y con un aparato digestivo llevado al límite de su capacidad y es, en consecuencia, mucho más proclive a sufrir alteraciones digestivas.⁽³⁾

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⁾

La diarrea es la manifestación clínica de uno de los complejos más comunes de enfermedades del cerdo, su impacto económico es muy importante debido al incremento de

la tasa de mortalidad, retardo en el crecimiento, mala conversión alimenticia y adicionalmente por los costos en medicación.⁽⁴⁾

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 pudiera estar presente y desarrollar la infección.

Hay diferentes factores que pueden influenciar el establecimiento de la infección causante de 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.^(5,6,7)

La diarrea de los cerdos jóvenes es uno de los principales problemas que afecta a las explotaciones porcinas, ya que es una manifestación clínica que puede ser causada por muchos factores a los que se asocian otros predisponentes que contribuyen a aumentar la severidad de los brotes.⁽⁸⁾

Entre las enfermedades que causan diarrea en lechones, se encuentran las parasitarias, como la coccidiosis, causada principalmente por *Isospora sui*; las virales, como la gastroenteritis transmisible, provocada por un Coronavirus; y dentro de las bacterianas, la enteritis necrótica del lechón por *Clostridium perfringens* tipo C; así como la colibacilosis causada por *Escherichia coli*.⁽⁹⁾

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, móvil y anaeróbico facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, fermenta azúcares, normalmente produce gas, es citrato negativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia*, puede ser recuperado fácilmente de especímenes clínicos en medios generales o específicos a 37°C

bajo condiciones aeróbicas.⁽¹⁰⁾ Existen poblaciones en la porción distal del intestino y en el estómago y se estima que 1 a 4% de todas las bacterias cultivables del colon son *E. coli* no patógenas (*E. coli* comensales) que mantienen el medio fisiológico de la digestión intestinal y actúan como defensa contra los patógenos entéricos. Otras cepas de *E. coli* portan y expresan genes de virulencia, que puede provocar graves brotes de diarrea (*E. coli* patógena) y son responsables de los principales pérdidas económicas en la cría de cerdos.⁽¹¹⁾

E. coli es el agente etiológico presente en la diarrea de lechones y la enfermedad del edema, se caracteriza por ser endémica, altamente transmisible y por presentar un desenlace generalmente fatal, originando considerables pérdidas.⁽¹²⁾ Estos microorganismos se pueden clasificar de acuerdo a los mecanismos por los cuales causan la enfermedad y por los factores de virulencia (FV) que expresan.

De acuerdo a las diferentes características clínicas, epidemiológicas así como por sus determinantes de virulencia específicos, existen cuatro patotipos de *E. coli* que provocan diarrea a los cerdos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatogénica (EPEC) y verotoxigénica (VTEC).

Los patotipos ETEC y VTEC son las principales categorías de *E. coli* diarreogénica que causan infecciones entéricas en cerdos.^(13,14)

ETEC es la causante de diarrea durante el periodo neonatal (menor de 6 días) e inmediatamente después del destete (3 a 9 semanas de nacidos) mientras que las cepas verotoxigénicas inducen a la formación de lesiones en las células intestinales que pueden causar, también, diarreas con o sin hemorragias y enfermedad endémica de los cerdos o enfermedad del edema.^(15,16,17) Estos patotipos tienen en común la combinación de varios genes de virulencia para la adhesión y la elaboración de enterotoxinas.⁽¹⁸⁾

La adherencia a la superficie de la mucosa intestinal de los lechones por las fimbrias es un paso inicial y esencial en la patogénesis de la diarrea, estas son estructuras fimbriales protéicas de superficie que permiten la adherencia bacteriana a las células epiteliales del intestino, por lo que constituye un importante factor de virulencia. Las adhesinas fimbriales actúan al adherir las bacterias a glicoconjugados presentes en los bordes de cepillo de los enterocitos siendo F4, F5, F6, F18 y F41 las asociadas con la colonización. (17,19,20)

Las fimbrias F4 y F18 están implicadas en diarrea post destete (DPD), F4, F5, F6 y F41 son usualmente encontradas en aislamientos de lechones con diarrea neonatal (DN)^(13,15)

Después de la unión de la fimbria con el enterocito las ETEC proliferan rápidamente hasta alcanzar números masivos y producen una o más tipos de enterotoxinas, las cuales estimulan la salida de líquidos y electrolitos de las células intestinales produciendo diarrea. Los patotipos ETEC Y VTEC producen 3 toxinas: Termolábil (LT), Termoestable (ST) y la Verotoxina (VT). ETEC coloniza el intestino delgado en las primeras horas de vida atacando el borde de las microvellosidades de los enterocitos con los factores fimbriales, la bacteria entonces produce una o más toxinas, las cuales son proteínas que actúan directamente en los enterocitos a través de diferentes vías que estimulan la secreción de líquido, lo que reduce su absorción y provoca una diarrea acuosa, acompañada de deshidratación y desbalance electrolítico.^(6,16,20)

Los FV están regularmente localizados en plásmidos y pueden ser transmitidos a cepas de *E. coli* receptoras.^(11,21)

El antígeno F4 (K88) se encuentra codificado dentro de un plásmido no conjugativo de 75 kb, el cual se clasifica en tres variantes genéticas basadas en sus regiones antigénicas, K88ab, K88ac y K88ad, las infecciones en lechones con cepas ETEC que expresan K88ab

o K88ac son las que causan la diarrea y mortalidad neonatos y recién destetados. Las tres variantes se unen a los carbohidratos presentes en las células epiteliales del intestino, sin embargo, tienen diferentes especificidades de unión para este tejido. El operón K88 incluye 10 genes diferentes (*faeABCDEFGHIJ*). Estos incluyen los genes reguladores (*faeAB*), una subunidad mayor (*faeG*), subunidades menores (*faeCFHIJ*), acomodadores y acompañantes (*faeDE*). El mapa de este operón demuestra que está rodeado de secuencias de inserción.^(22,23)

El antígeno F5 (K99) es codificado por un plásmido conjugativo de 78kb, se expresa como una fimbria manosa-resistente y se ha encontrado que es altamente conservada. El operón K99 (*fanABCDEFGH*) incluye reguladores positivos, una subunidad de pilina, un acompañante, así como los genes de montaje y alargamiento de la fimbria. Su expresión es dependiente de temperatura, inhibida por temperaturas bajas y activada a temperatura corporal.⁽²²⁾

La fimbria F6 (987P) está sujeta a variación de fase dependiendo de sus condiciones de crecimiento. El operón de F6 puede estar situado en plásmido o en el cromosoma bacteriano, los plásmidos que contienen F6 varían en tamaño desde 35 a 40 MDa, y comprenden de 8 genes (*fasABCDEFG*).

La fimbria F18 está localizada en plásmidos (*fedABCEF*) de diferentes tamaños (42 a 98 MDa) y están generalmente ligada con hemolisinas y la producción de enterotoxinas. El operón que codifican F18 está compuesto de 5 genes, un gen que codifica la proteína más grande, *fedA*, 2 genes que codifican proteínas menores, *fedE* y *fedF*, *fedB* codifica para una proteína acomodadora y *fedC* para una proteína acarreadora. La propiedad de adhesión específica de F18 se asocia con *fedF*, que es conocida como la adhesina F18. Existen 2

variantes de la fimbria F18: F18ab y F18ac, esta última se asocia a diarrea y F18ab a enfermedad del edema.^(24,25)

La fimbria F41 esta codificada en plásmidos. Los determinantes genéticos de F41 presentan una homología en 102 nucleótidos con los genes que codifican F4.⁽²⁶⁾

En cuanto a las toxinas, la variabilidad natural conocida de la toxina LT se ha limitado principalmente a las diferencias detectadas entre las LT producidas en humanos LTh y en cerdos LTp dadas por los sitios antigénicos así como en la movilidad electroforética lo que indica que las toxinas difieren en su secuencia primaria de aminoácidos, pues a pesar de que tienen una identidad de 95%, en total se detectaron 6 sustituciones de aminoácidos entre sus subunidades.⁽²⁷⁾

LT es una toxina heterohexamérica de 2 subunidades A-B, es estructural y funcionalmente similar a la toxina del cólera, en la cual la subunidad homopentamérica B es responsable de la unión a los receptores gangliósidos GM1 del hospedador. La subunidad A posee actividad de ADP-ribosilación que covalentemente modifica la subunidad α de las proteínas G de la unión GTP, resultando en la activación constituida de adenilciclase y la producción de 3', 5'-AMP cíclico (cAMP). El aumento de cAMP intracelular lleva a la activación de la proteína dependiente de cAMP proteincinasa (PKA), que fosforila el dominio R del regulador transmembranal de la fibrosis quística, el cloruro y el fluido de líquido al lumen intestinal provoca volúmenes significantes de diarrea.⁽²⁸⁾

La toxina ST está codificada por el gen *estA* y puede ser clasificada en 2 tipos mayores, STa y STb, típicamente las cepas aisladas de humanos producen STa, mientras que STb es predominantemente elaborada por cepas de animales. Ambos tipos tienen receptores específicos en el borde de las células del intestino delgado, activa la guanil ciclase (cGMP), resultando en diarrea.⁽²⁹⁾

La verotoxina (VT) se encuentra en un bacteriófago que codifica al gen *stx*, se conocen 2 tipos de toxina, Stx1 y Stx2, la mayoría de los signos clínicos más severos están relacionados a las cepas que producen Stx2 ésta inhibe la síntesis proteica en las células eucarióticas por inactivación de la subunidad ribosomal 60S, por lo que se inhibe el factor de elongación 1 (FE-1), también pueden causar diarreas con o sin hemorragias. Las cepas de *E. coli* que produce VT en ausencia de otras enterotoxinas causan enfermedad del edema pero no diarrea.^(14, 16, 30)

Estudios moleculares y de serotipificación demuestran que la toxina Stx2 que produce enfermedad en humanos es diferente a la que provoca enfermedad en cerdos, pues varían en la interacción con las células del epitelio intestinal, además la cepas que afectan a los cerdos no cuentan con el gen *hlyA* que codifica para una hemolisina y no tienen el operón *ure* el cual codifica proteínas estructurales y accesorios polipéptidos necesarios para el montaje de la ureasa y es usado para detectar cepas productoras de Stx2 en humanos.⁽³¹⁾

Estos FV son integrales en la patogénesis de la diarrea y son los focos principales para el desarrollo de vacunas protectoras usadas para inducir títulos de anticuerpos en hembras para transferir la protección a los lechones recién nacidos por la vía calostrual.⁽⁶⁾

La vacunación de las hembras madre y la inmunidad de la lactancia serían el procedimiento profiláctico de elección en este tipo de infección altamente endémica; por lo que es conveniente implementar una medida específica de protección, al vacunar a las madres gestantes con los tipos de *E. coli* presentes en la explotación o, por lo menos, que cubran todos los tipos toxigénicos incluidas las fimbrias purificadas, por su alto poder inmunogénico, con una consiguiente producción de anticuerpos que bloqueen la colonización bacteriana en el intestino de los lechones.⁽³²⁾

En el mercado existe una gran variedad de vacunas y bacterinas, como son Porcilis coli de Intervet que contiene el toxoide LT de *E. coli* y las adhesinas F4ab, F4ac, F5 y F6; Porcine pili shield[®] de Novartis que es una bacterina elaborada con cepas de campo seleccionadas por su alta antigenicidad contra las adhesinas fimbriales F4, F5, F6 y F41. Scormune[®] de Intervet es una bacterina que ayuda en la prevención de la colibacilosis porcina causada por *E. coli* con pili tipo F4, F5 y F6; LITTERGUARD LT-C de Pfizer es una bacterina que contiene cepas de *E. coli* portadoras de antígeno F4, F5, F6, F41 y un antígeno subunitario de la toxina LT, así como el beta toxoide de *Clostridium perfringens*.

Los experimentos que se han hecho inmunizando cerdas gestantes con bacterinas de *E. coli* que contienen los FV demuestran que hay una buena protección de los lechones cuando se desafía con la misma cepa, lo que indica que para la protección contra la colibacilosis el mejor método es la inmunización de la cerda.⁽³³⁾

Los tipos toxigénicos son susceptibles de variar sin modificar el serotipo especialmente si las cepas provienen de diferentes regiones geográficas. El conocimiento de los patotipos ETEC/VTEC y sus factores de virulencia podría orientar para el desarrollo de futuros ensayos de inmunoprotección.⁽³²⁾

La diferenciación entre *E. coli* patógenas y otras no patógenas requiere de la detección de los genes de los FV ya que el diagnóstico convencional depende del crecimiento de las bacterias y su subsecuente identificación bioquímica.⁽³⁴⁾

Inicialmente, la detección de las cepas toxigénicas se realizaba con ensayos en animales y técnicas de cultivo celular que requieren anticuerpos específicos para demostrar la presencia de los FV. Después las técnicas de ELISA e hibridación del DNA basado en membranas, mejoraron la velocidad y facilidad de detección, lo que las hizo populares dando paso a nuevas técnicas de biología molecular como los ensayos de PCR, estos son

alternativas atractivas a los métodos anteriores por su sensibilidad y especificidad, así como por su velocidad y fácil disponibilidad de reactivos.^(13, 35)

El análisis de PCR ha revelado que incluso las *E. coli* comensales poseen algunos genes de virulencia. Además la sola posesión de uno solo o algunos genes de virulencia no da a las cepa un estatus de patogenicidad, al menos que la cepa adquiera una apropiada combinación de genes de virulencia para causar enfermedad, por ello es discutible si los aislados que tienen uno o pocos factores de virulencia representan clones patógenos que han perdido genes de virulencia o son comensales en el proceso de adquirirlos.⁽¹⁸⁾

Ya que los FV son clave para el desarrollo de la enfermedad, muchos investigadores han desarrollado también ensayos de PCR-RFLP, que permiten además de la rápida identificación de los FV y la identificación de las variantes de estos.⁽³⁰⁾

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el aislamiento bacteriano de muestras de *E. coli* de lechones con diarrea es de poco valor diagnóstico, ya que dicha técnica no es capaz de diferenciar bacterias patógenas de las comensales, los aislamientos deben ser sometidos a un método como la técnica de PCR-FRLP que permita identificar los factores de virulencia y sus variaciones genéticas presentes en los patotipos ETEC y VTEC que causan diarrea en los lechones, colonizando el intestino delgado provocando graves problemas de mortalidad, lo cual permitiría implementar medidas de control adecuadas.

HIPOTESIS

Los aislamientos de *E. coli* de diarrea de lechones y destetados poseen factores de virulencia clásicos y variantes genéticas de los patotipos ETEC y VTEC los que serán detectados por la técnica PCR-FRLP.

OBJETIVOS

Determinación de factores de virulencia en aislamientos de *E. coli*.

Identificar variabilidad genética en dichos factores de virulencia, mediante el uso de PCR-RFLP's.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Muestras bacterianas

Se utilizaron 395 aislamientos de *E. coli* y 174 muestras que se remitieron durante la elaboración de este trabajo de lechones lactantes y destetados con diarrea lo que dio como resultado un total de 569 muestras (Cuadro 1) las cuales fueron obtenidas de diferentes órganos (Cuadro 2) de animales que presentaban diarrea remitidos al Laboratorio de Diagnóstico del DMZC.

Edad	# de muestras
Lactación	510
Destete	59
TOTAL	569

Cuadro 1. Distribución por etapa de los aislamientos utilizados.

Tipo de Muestra	
Estómago	264
Duodeno	249
Encéfalo	43
Cepas	13

Cuadro 2. Distribución por tipo de muestra de los aislamientos utilizados

Para la técnica de PCR se utilizaron como controles positivos cepas productoras de las toxinas LT , STa y STb y de las fimbrias F4, F6, F18 y F41.

Aislamiento de *Escherichia coli*

Se utilizaron 174 muestras provenientes de lechones del Estado de México y Michoacán remitidas al Laboratorio de Diagnóstico del DMZC, las cuales fueron trabajadas para el aislamiento de *E. coli* de acuerdo al método de prueba aislamiento de *Escherichia coli*, LTB-DPAC-MV-01-03 del área de bacteriología.

Las muestras que se recomiendan para realizar el aislamiento de *E. coli* en lechones es el estómago con 10 centímetros de duodeno ligado o, si se sospecha de enfermedad del edema las muestras requeridas son encéfalo y líquido cefalorraquídeo, para ello se localizan zonas de tejido sano y con lesión para tomar 2-3 cm de éste y realizar una impronta en agar McConkey (MC), se incuban a 37°C durante 24-48 h, se realiza un frotis y tinción de Gram, de colonias lactosa positivas en agar MacConkey, al microscopio se observan bacilos Gram negativos. Posteriormente se realizan pruebas bioquímicas correspondientes según el manual Cowan para *E. coli*.

Los aislados de *E. coli*, preservadas en leche descremada se sembraron en medios selectivos Agar McConkey y fueron nuevamente identificadas como *E. coli* por medio de pruebas bioquímicas.

Identificación de *E. coli*

Las pruebas bioquímicas que se utilizaron para la identificación de *E. coli* fueron: (Cuadro 3)⁽¹⁰⁾

Pruebas	Reacción
Motilidad	d
Catalasa	+
Citrato	-
Malonato	-
Gas en glucosa	+
Ácido de:	
Adonitol	-
Arabinosa	+
Dulcitol	d
Lactosa	+
Maltosa	+
Mannitol	+
Rhamnosa	d
Salicin	d
Sorbitol	d
Sacarosa	d
Trehalosa	+
Xylosa	d
ONPG	+
Hidrolisis de esculina	d
Indol	+
Urea	-
H₂S en TSI	-
Descarboxilación de Lisina	+
Descarboxilación de Ornitina	d

Cuadro 3. Características bioquímicas de *E.coli*.

+ = positivo, - = negativo, d = dudoso

Extracción de ADN

Se suspendieron en crioviales 5 colonias de cada cepa en 100 µl de agua inyectable estéril, la muestra se sometió a ebullición a 100°C durante 10 min, después a congelación durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 g x 10 min en una centrífuga marca Eppendorf mini spin.

^(36,37) El sobrenadante se usó como templado para el PCR.

Iniciadores

Se utilizaron 9 iniciadores para los factores de virulencia que intervienen en la diarrea neonatal y posdestete de los lechones. (Cuadro 4)

Factor de virulencia	Secuencia 5' a 3'	Referencia	Peso molecular pares de bases (pb)
F4 (K88)	F: AGT TGG TAC AGG TCT TAA TG R: AAC AGT TTC ATC AGT GTA CT	Diseñados para este estudio	569
F5 (K99)	F: AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA R: AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT	(38)	229
F6 (987P)	F: AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC R: GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC	(38)	408
F18	F: TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA R: ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG	(38)	312
F41	F: TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA R: ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG	(38)	611
LT	F: GGG GTT ACT ATC CTC TCT AT R: TGG TCT CGG TCA GAT ATG T	(38)	271
STa	F: CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT R: TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG	(38)	157
STb	F: CAC AGA TAC AAC GGA TAG TT R: GTT GGT AGT ACC ATT ATT GG	Diseñados para este estudio	711
VT	F: AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT R: TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC	(38)	732

Cuadro 4. Iniciadores Utilizados en la Técnica de PCR

Protocolo de PCR

Se realizaron 2 técnicas de PCR, una para fimbrias y otra para toxinas, el protocolo de PCR múltiple fue usado con un tiempo y temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 min, 35 ciclos de alineación de 94°C por 45 seg, extensión a 60°C por 45 seg y 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 10 min.

Se utilizó el Kit AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase System. (Invitrogen Cat. No. 12339-019) en las siguientes cantidades para la reacción de PCR.(Cuadro 5)

Reactivo	Concentración	Cantidad
10x PCR Buffer II		2.5 µl
MgCl ₂	50 mM	0.7 µl
Primers	10 Pm	0.5 µl cada uno
Taq DNA Polymerase	5 u/µl	0.5 µl
Agua		16.8 µl
DNA de muestra		5 µl

Cuadro 5. Protocolo de uso del el Kit AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase System.

La técnica de PCR se realizó en un Termociclador *MyCycler Thermal-cycler* (Biorad, USA)

Una vez terminada la reacción de PCR, los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2%, utilizando 7 µl de DNA amplificado del PCR, 1µl de solución de muestra y 3µl de marcador de peso molecular de Fermentas Life sciences, pUC Mix Marker, 8 #SM0301.

(Figura 1)

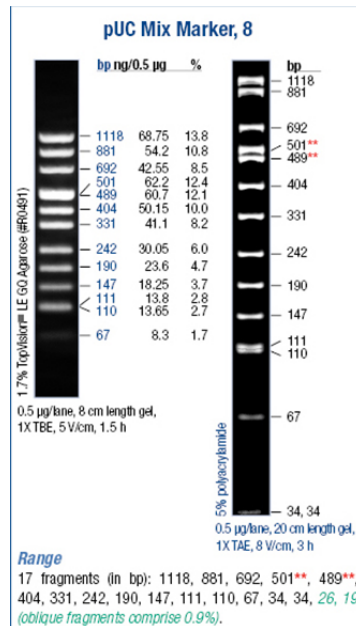


Figura 1. pUC Mix Marker.

Se corrió la electroforesis a 90 volts por 70 minutos, terminada ésta, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 15 min. La visualización se realizó comparando el peso molecular de cada uno de los genes amplificados, con los controles positivos utilizados, se visualizó con ayuda de un transiluminador DNR bio-imaging system y un sistema de tratamiento de imágenes Gel logic 112 de Kodak.

Extracción de DNA II

Para verificar que se estaban procesando adecuadamente las muestras de DNA se realizaron extracciones de DNA a 50 muestras ya procesadas por el método descrito anteriormente, incluyendo los controles positivos, utilizando el kit de invitrogen™ PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit, Cat no.12280-050, Lot No.911095, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Extracción de Plásmido

Se realizó la extracción de plásmido de 50 cepas y control positivo, con la técnica de Mini preparación de ADN de plásmido descrito por Silhavy *et al.*, la cual consiste en crecer una colonia de cultivo puro de *E. coli* en 3ml de medio de cultivo líquido TSB durante 24 h, centrifugar el crecimiento bacteriano a 3 500 rpm/6 min, decantar y adicionar a la pastilla 200 µl de solución de lisis*, resuspender dicha pastilla con vortex o micropipeta, incubar por 10 min a temperatura ambiente (TA), adicionar lisozima a una concentración final de 1.25 µg/µl, incubar por 10 min a TA, hervir en baño María por 1 min, centrifugar 10 min a 12 000 rpm, recuperar el sobrenadante, adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto frío, incubar 30 min a -20°C, centrifugar 10 min a 14 000 rpm y decantar, lavar la pastilla

adicionando 300 µl de etanol al 70%, centrifugar 5 minutos a 10 000 rpm, decantar y repetir el lavado, decantar, secar la pastilla por calor y resuspenderla en 100 µl de agua destilada estéril y correr de 3 a 5µl en un gel de agarosa al 1%.

*La solución de lisis contiene, 8% de sacarosa, 5% tritón X-100, 50mM EDTA, 50 mM Tris pH 8. ⁽³⁹⁾

PCR de plásmidos

Se realizó la técnica de PCR para los productos de la extracción de plásmidos, así como de los restos celulares derivados de dicha técnica, siguiendo el mismo protocolo de PCR usado para las demás muestras.

Modificación de temperatura

El protocolo de la técnica de PCR fue modificado para asegurar que los resultados obtenidos son reales y no están influenciados por la temperatura de alineación la cual se disminuyó a 59°C por 45 seg y 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 10 min.

Modificación de la concentración de DNA de muestra.

Se modificó la cantidad de DNA obtenido de la muestra a 1µl, 3µl, 7µl y 9µl para asegurar que los resultados obtenidos no están influenciados por la cantidad de ADN utilizado para la PCR, y se realizó la técnica de PCR descrita anteriormente.(Cuadro 6)

Reactivo	Concentración	Cantidad
10x PCR Buffer II		2.5 µl
MgCl₂	50 mM	0.7 µl
Primers	10 pM	0.5 µl cada uno
Taq DNA Polymerase	5 u/µl	0.5 µl
Agua		16.8 µl
DNA de muestra		1, 3,7 y 9 µl

Cuadro 6. Modificación de la cantidad de DNA utilizado para la PCR.

RFLP a partir del producto de PCR de *E. coli*.

Se utilizaron los productos de la PCR de las cepas de *E. coli*, las enzimas utilizadas fueron *Hpy8I* y *MboII*, FastDigest® de Fermentas (Cuadro 7) para identificar variaciones genéticas de los amplicones obtenidos. De acuerdo con el protocolo que el fabricante proporciona se tiene que mezclar gentilmente y homogenizar e incubar a 37° a baño María durante 5 min.

Reactivo	<i>Hpy8I</i>	<i>MboII</i>
Agua	17 µl	17µl
Buffer	2µl	2µl
DNA	10µl	10µl
Enzima	1µl	1µl
Total	30µl	30µl

Cuadro 7. Protocolo de FastDigest® de Fermentas

Una vez terminada la reacción, los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 3.5%, utilizando 7 µl de muestra, 1µl de solución de muestra FastDigest® Green Buffer y 3µl de marcador de peso molecular de pBR322/Msp I, (Figura 2) que va de 622 pb a 147 pb.

Se corrió la electroforesis a 90 volts por 120 minutos. Terminada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 15 min.

Se visualizó con ayuda de un transiluminador DNR bio-imaging system y un sistema de tratamiento de imágenes Gel logic 112 de Kodak.

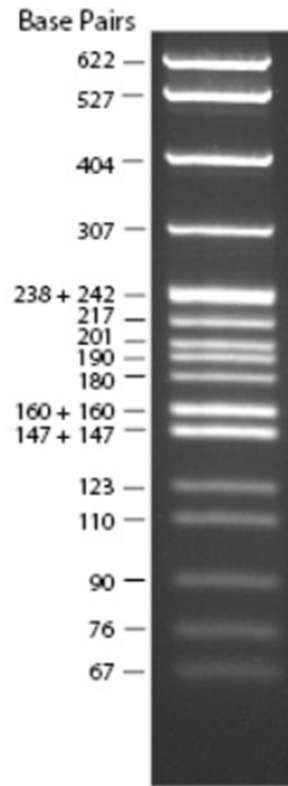


Figura 2. Marcador de peso molecular pBR322 DNA-MspI

RESULTADOS

Aislamiento bacteriano

El 100% de las muestras fueron positivas a *Escherichia coli* por medio de pruebas bioquímicas.

Extracción de plásmidos

El 100% de la muestras procesadas fueron positivos a la presencia de plasmido. (Figura 3)

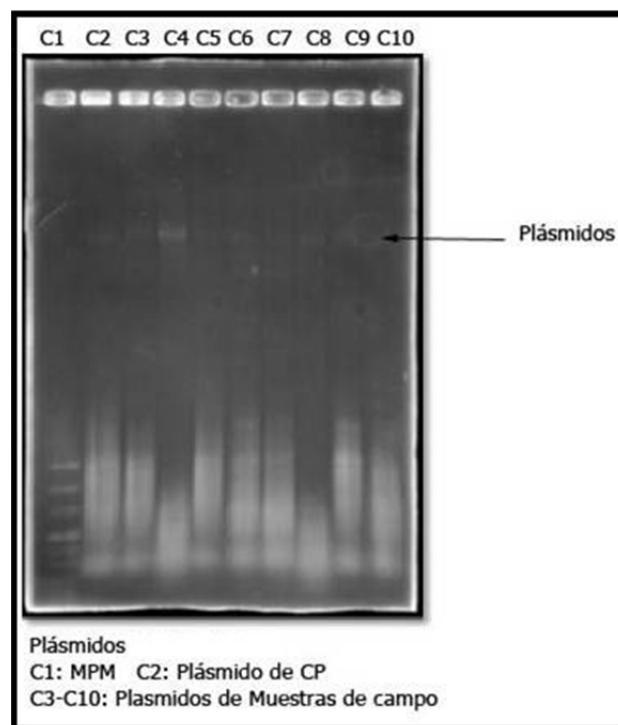


Figura 3. Extracción de plasmido de aislados de *Escherichia coli*. Muestras positivas

Validación del PCR

Es de suma importancia comentar que la validación de cada uno de los PCRs realizados, se hizo detectando la amplificación de los controles positivos de cepas productoras de factores de virulencia. (Figura 4)

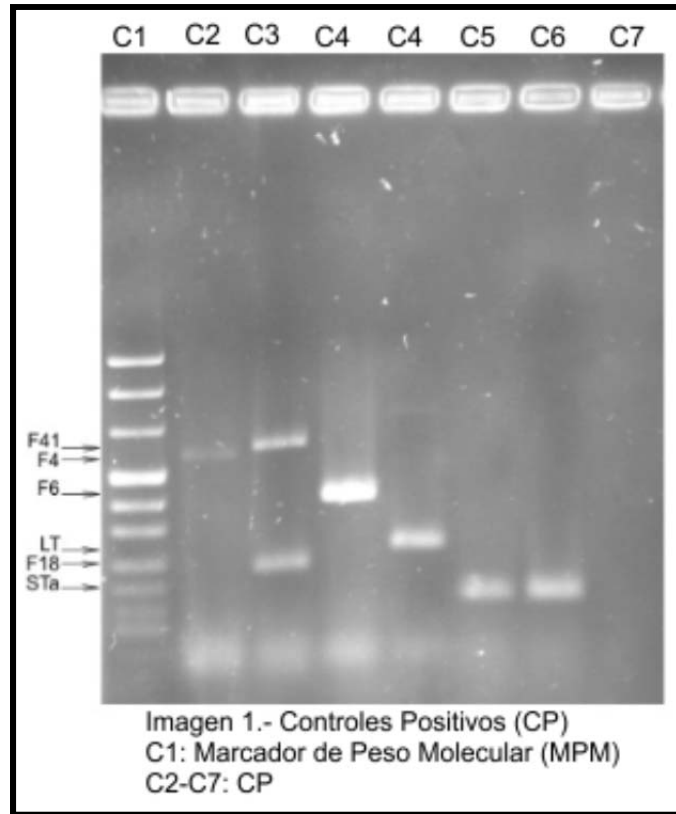


Figura 4. PCR para controles positivos.
C1-marcador de peso molecular; C2- cepa productora de F4
C3- cepa productora de F41 y F18; C4-cepa productora de F6
C5- cepa productora de STa; C6- cepa productora de STa

PCR de las cepas de *E. coli*

Del total de las muestras procesadas para detección de factores de virulencia, 2 (2/569) de ellas fueron positivas a STb (0.3%). (Figura 5)

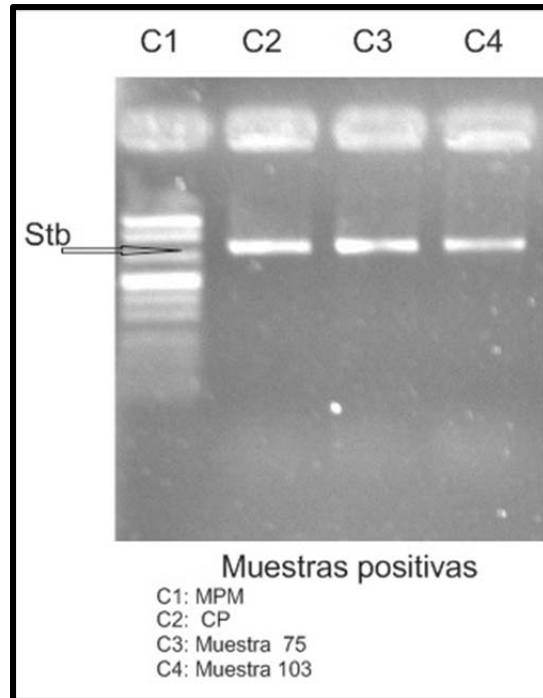


Figura 5. PCR para STb de ETEC. Muestras positivas.
C1- marcado de peso molecular; C2- control positivo de cepa Productora de STb; C3- muestra 75 positiva a STb;
C4-muestra 103 positiva a STb

RFLP

- Digestión con la enzima FastDigest® *Hpy* 8I

Usando la técnica ya descrita en material y métodos, las muestras positivas a la toxina STb (75 y 103), fueron sometidas a digestión con la enzima *Hpy* 8I, dichas muestras, así como el control positivo presentan 3 bandas de diferentes tamaños, la primer banda es un segmento genómico de aproximadamente 240 pb, la segunda de 217 pb y la tercera de 200 pb. Lo cual indica que no existe variación genética demostrada con esta enzima. (Figura 6)



Figura 6. PCR-RFLP con la enzima *Hpy* 8I de muestras positivas a STb de aislamientos de *E. coli*.

- Digestión con la enzima FastDigest® *Mbo* II

Usando la técnica ya descrita en Material y Métodos, las muestras positivas a la toxina STb, fueron sometidas a digestión con la enzima de digestión *Mbo* II, tanto el control positivo como las muestras 75 y 103 presentan 2 bandas de diferente tamaño, la primera de aproximadamente 404 pb y la segunda de aproximadamente 217 pb. La muestra 103 presenta además una tercera banda de aproximadamente 180 pb. Estos cortes demuestran que el control positivo y la muestra 75 no tienen variación genética en STb, sin embargo la muestra 103 sí presenta una variación genómica en los lugares de corte de dicha enzima. (Figura 7)

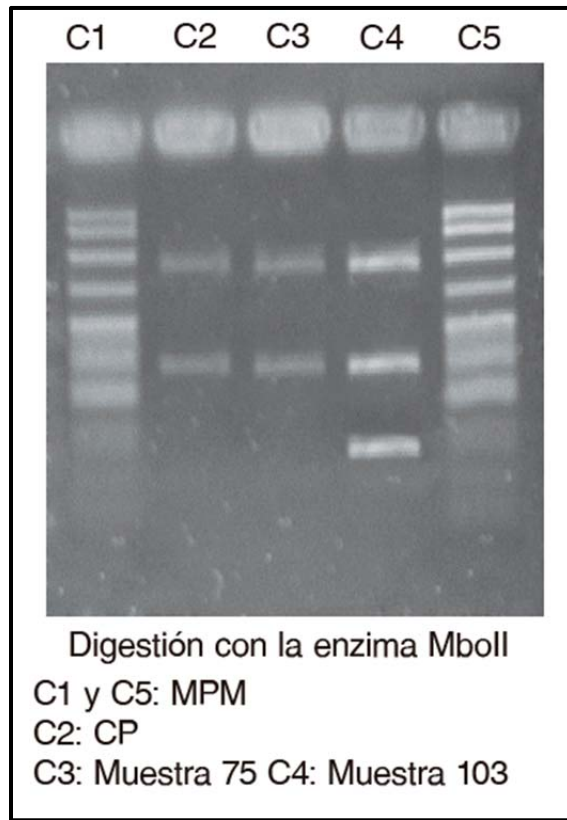


Figura 7. PCR-RFLP con la enzima *MboII* de muestras positivas a STb de aislamientos de *E. coli*.

DISCUSIÓN

La diarrea es uno de los signos más comunes en cerdos recién nacidos y destetados generado por trastornos gastroentéricos. Es sabido que los factores de virulencia presentes en la bacteria *E.coli* están relacionados en problemas de diarrea neonatal y post destete.

La expresión y producción de varios determinantes de virulencia permite a los diferentes grupos de *E. coli* atacar las células epiteliales del intestino del hospedero por medio de fimbrias y otras adhesinas. Lo cual permite a la bacteria proliferar en el tracto digestivo y como resultado de la acción de toxinas en el enterocito, la inducción de diarrea.

Sin embargo no podemos dejar de lado que en ocasiones las causas primarias de la diarrea son factores predisponentes como falta de higiene, mal manejo o malas condiciones en las salas de partos. Por ejemplo la falta de higiene puede provocar que el lechón ingiera fácilmente bacterias que provienen de las heces maternas, dichas bacterias colonizan el intestino, y cuando se producen cambios sustanciales en la dieta o en el ambiente de la sala de maternidad las bacterias se desencadena la diarrea.^(40, 42, 42)

De la misma forma un porcentaje elevado de diarreas en lechones son causadas por hipogalaxia o agalaxia de las cerdas. En muchas granjas que no tienen control de la temperatura en las salas de partos aparecen diarreas en verano que afectan a la mayoría de camadas cuyo origen es la hipogalaxia, así como en clima frío los lechones no maman correctamente y esto puede desencadenar una diarrea secundaria.^(40, 41, 42)

Como ya se mencionó anteriormente los agentes etiológicos que pueden causar diarrea son muy diversos por lo cual el diagnóstico diferencial es imprescindible. En la mayoría de las ocasiones el agente es *E. coli*, aunque *Clostridium perfringens* tipo C y A también provocan diarrea en cerdos lactantes y destetados. Los paracitos son otra causa de diarrea en lechones, criptosporidium y coccidiosis principalmente. Entre las gastroenteritis víricas,

la gastroenteritis transmisible, rotavirus e incluso el virus de PRRS están asociados a diarrea en lechones, donde el último provoca diarreas muy similares a las provocadas por *E. coli*.^(40, 41, 42)

Además, durante los últimos años ha aumentado el número de casos sospechosos de colibacilosis entéricas en lechones por las técnicas estándar. Recientes estudios han reportado un número creciente de aislamientos de *E. coli* de cerdos con diarrea que fueron positivos a toxinas relacionadas a ETEC pero negativas a las clásicas adhesinas, estos resultados dejan a la especulación que existe un grupo emergente de *E. coli* diarreico de los lechones, que está causando daños, pero que aún no se genera suficiente información al respecto⁽⁴⁴⁾

Autores como Chen D *et al.*⁽⁴⁵⁾ buscan además de los FV conocidos como pertenecientes a ETEC, intimina o gen *EAE* y proteína de alto peso molecular tipo 2, las cuales encontraron con un porcentaje de 16.67 y 35% respectivamente. Vu Khac *et al.*⁽²⁵⁾ busca el gen *EAE*, el cual se presenta en 0.9% de los aislados. Zang *et al.*⁽²⁰⁾ además busca los genes EAST-1, AIDA-I, gene *paa* y *EAE*, los cuales se presentaron en 35%, 26.9%, 60% y 1.1% respectivamente. Zajacova *et al.*⁽⁴⁶⁾ refiere que estuvieron muy interesados en genes de virulencia como EAST1, AIDA, PAA y *EAE* y su presencia y relación con los otros factores de virulencia conocidos que causan enfermedad en los cerdos. Los resultados fueron que la adhesina AIDA se encontró en 5.05% de los aislados, PAA en 51.26% y *EAE* en 2.2%.

EAE es uno de los mecanismos centrales de EPEC la cual se caracteriza por la formación de lesiones de ataque y desaparición (A/E), ataca de forma íntima la membrana del enterocito y desaparece las microvellosidades del mismo. Los determinantes antigénicos de

la producción de las lesiones A/E están localizados en una larga isla de patogenicidad llamada locus LEE.⁽¹⁴⁾

Se ha reportado que el Factor asociado a las lesiones A/E en cerdos (PAA) es necesario para el desarrollo de las lesiones A/E en humanos, pero recientemente ha sido implicado en asociación con diarrea porcina, aunque su significancia y asociación con ETEC para producir la diarrea en cerdos es incierta.⁽⁴⁶⁾

AIDA-I es un sistema auto transportador requerido en la producción de una proteína de 100-kd que es responsable del ataque bacteriano a los receptores de las células epiteliales del huésped. Aunque originalmente era detectado en *E. coli* que causa diarrea en humanos, el sistema AIDA-I ha sido detectado también en cepas aisladas de cerdos con enfermedad del edema y diarrea postdestete.⁽⁴⁴⁾

La Toxina Termoestable Entero Agregativa (EAST-1) es un péptido de 38 aminoácidos o 4.1kDa, esta codificado en el gen *astA*. Epidemiológicamente se ha asociado con diversos patotipos de *E. coli* como EAEC, ETEC y EHEC. El gen *astA* ha sido aislado de cepas de *E. coli* pertenecientes a hospederos animales incluyendo cerdos, bovinos y ovejas. EAST-1 es comúnmente comparado con la toxina STa la cual es conocida como la causante de la diarrea secretora, ambas tienen estructuras similares.⁽⁴⁷⁾

Un estudio cuyo objetivo fue determinar si existen diferencias significativas entre animales vacunados contra *E. coli* y animales no vacunados, en base a lesiones histopatológicas y determinación de la presencia del patógeno mediante PCR. En este estudio los cerdos utilizados fueron cruza comerciales nacidos de cerdas vacunadas al menos 2 veces contra *E. coli* con una vacuna comercial, se dividieron en 2 grupos, vacunados y no vacunados. Los resultados bacteriológicos mostraron la presencia de la bacteria *E. coli*, sin embargo

todos los animales vacunados fueron negativos a los FV de este patógeno, dentro del grupo de animales no vacunados 2 animales fueron positivos a la toxina STb.⁽⁴³⁾

Este estudio es muy importante ya que justifica la baja frecuencia de factores de virulencia encontrados en nuestros resultados.

Existe un importante mecanismo regulatorio desarrollado por las bacterias que se basa en la activación y desactivación de un grupo de genes cuyos productos tienen funciones relacionadas, que se encuentran organizados en una región del genoma de forma de regular su expresión en conjunto. Los genes de virulencia se activan e inactivan simultáneamente en todas las bacteria de una población en función de factores del entorno como la escasez de un nutriente o la temperatura, diferentes autores en diferentes regiones del mundo han realizado estudios similares, obteniendo resultados muy diferentes, esto se podría deber a que otros FV podrían estar asociados.⁽⁴⁴⁾

Muchos investigadores han desarrollado ensayos para la identificación de variantes de los Factores de Virulencia. De Baets *et. al.*⁽³⁰⁾ desarrolló un ensayo de PCR- RFLP que permite la rápida tipificación y conocimiento de nuevas variantes del gen *stx₂* el cual codifica la toxina STx2, dicha toxina es un FV muy importante en las cepas de STEC. Dicha clasificación se basa en la variabilidad antigénica y diferencias en cuanto a su toxicidad. Se han descrito diferentes variantes del el gen *stx₂*, este sistema discrimina 8 diferentes variantes y permite la identificación de nuevas variantes utilizando las enzimas de restricción PvuII, HaeIII, HincII y AccI.

En este trabajo se identifica 1 variante de la toxina STb de ETEC con la enzima MboII, lo cual nos puede encaminar a diferencias en la toxicidad de esta toxina, que deberá contemplarse en estudios posteriores, ya que si se llega a demostrar esta hipótesis, será necesario establecer medidas necesarias para el control de la única toxina encontrada en

más de 500 *E.coli* que procesamos en nuestro estudio, lo cual implicaría que las diarreas y su mortalidad en lechones recaería en el manejo de los lechones para evitar la transmisión de dicha toxina, ya que ninguna bacterina actual presenta en su contenido STb, esto está generando la circulación de ésta asociado a la falta de protección.

Teniendo en cuenta los diversos organismos causantes de diarrea en los lechones no se puede descartar que la diarrea

CONCLUSION

En este trabajo se identifica 1 variante de la toxina STb de ETEC con la enzima MboII.

La prueba molecular PCR-FRLP son herramientas que confirman la presencia de variantes en los Factores de Virulencia de ETEC.

Se recomienda encaminar estudios futuros a diferencias en la toxicidad de la toxina STb, así como a la búsqueda de otros FV relacionados a la diarrea de los lechones.

Se recomienda en estudios futuros además de el diagnostico de E. coli realizar diagnósticos diferenciales de la causa de la diarrea.

Es importante contemplar dentro de las bacterinas la región STb de ETEC para generar anticuerpos que minimicen la expresión de esta toxina, que con cambios genéticos pudiera generar problemas clínicos aún no descritos.

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., 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.
- 4- Carranza A. I., Corrales J. P., Ambrogi A. Enfermedades que producen diarrea en cerdos en las etapas de desarrollo y terminación, Vº Congreso de Producción Porcina del Mercosur. 2006.
- 5- Taylor D.J, Pig Diseases, 7th edition, Book Production Consultants PLC, USA, 1999, 132-145.
- 6- Pritchard J., Ngeleka M., Middleton D., In vivo and in vitro colonization patterns of AIDA-I-positive *Escherichia coli* isolates from piglets with diarrhea, 2004, J. Vet. Diagn. Invest., 16:108-115.
- 7- 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, 2005, Veterinary Microbiology 110: 113–123.

- 8- Zamora J., Reinhardt G., Polette M., Macias T., Diagnóstico de la diarrea colibacilar porcina mediante tinciones inmunoquímicas., 1999, Archivos de Medicina Veterinaria, 31(1) :135-139.
- 9- Varley M.A, El lechón Recién Nacido. Desarrollo y Supervivencia, Acribia S.A., España, 1996, 247-273.
- 10- Murray R. G., et al, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, USA, 1984, 420-423.
- 11- Schierack P., Steinrück H., Kleta S., Vahjen W., Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs, 2006 Applied and Environmental Microbiology, 72(10): 6680-6686.
- 12- 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, 2000, Rev. Vet., 10-11 (1-2): 11-13.
- 13-Blanco M., Lazo L., Blanco J. E., Dhabi 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, 2006, International Microbiology, 9:53-60.
- 14-Blanco M., Blanco J. E., Gonzales E. A., Mora A., Jansen W., Gomes T.A., Zerbini F., Yano T., Pestana A.F., Blanco J., Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes, 1997, Journal of Clinical Microbiology, 35 (1): 2958-2963.
- 15- Basulto R., Calzada L, Junco J. A., Olivera T, Caracterización fenotípica de cepas autóctonas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas 987P,2000, Rev. Prod. Anim. 12 : 83-86.

- 16- Zamora J., Reinnadt G., Polette M., Macias P., Neonatal diarrhea of piglets isolation of toxigenic *Escherichia coli* strains producing STa, LT and VT, 1999, Archivos de Medicina Veterinaria, 31(2) : 237-242.
- 17- Madoroba E., Van Driessche E., De Greve H., Mast J., Ncube I., Read J., Beeckmans S., Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence genes from scouring piglets in Zimbabwe, 2009, Trop. Anim. Health Prod., 41: 1539-1547.
- 18- Chapman T., Wu X., Barchia I., Bettelheim K., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J., Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine, 2006, Applied and Environmental Microbiology, 72(2): 4782-4795.
- 19- Canal A.M., Cubillos V., Zamora, J., Reinhardt G., Paredes E., Idelfonso R., Alberdi A., Macias P., Immunohistochemical identification of enteropathogenic *Escherichia coli* fimbriae in suckling pigs with diarrhoea, 1999, Arch. med. 31 (1):37-44.
- 20- 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, 2007, Veterinary Microbiology, 123(1-2):145-152.
- 21- Ochi S., Shimizu T., Ohtan K., Ichinose Y., Arimitsu H., Tsukamoto K., Kato M., Tsuji T., Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid, 2009, DNA Reserch, 16: 299-309.
- 22- Jhonson T., Nola L., Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*, 2009, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73 (4): 750-774.

- 23- Rasschaert K., Verdonck F., Goddeeris B., Duchateau L., Cox E., Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection, 2007, *Veterinary Microbiology*, 123: 249-253.
- 24- Nataro J., Kaper J., Diarrheagenic *Escherichia coli*, 1998, *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.
- 25- Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Dhabhi G., Mora A., Lòpez C., Gonzàlez E.A., Blanco J., Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia, 2007, *The Veterinary Journal* 174: 176–187.
- 26- Anderson D, Moseley S, *Escherichia coli* F41 adhesin: Genetic organization, Nucleotid sequence and Homology with the K88 determinant, 1988, *Journal of Bacteriology*, 170 (10):4890-4896.
- 27- Lasaro M., Rodrigues J., Mathias C., Guth B., Balan A., Sborgio M., Ferreira L., Genetics of Heat-Labile toxin expressed by *Escherichia coli* strains isolated from humans, 2008, *Journal of Bacteriology*, 190(7): 2400-2410.
- 28- Jhonson A., Kaushik R., Francis D., Fleckenstein J., Haerwidgw P., Heat-Labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells, 2009, *Journal of Bacteriology*, 191(1): 178-186.
- 29- Böling I., Wiklund G., Qadri F., Torres O., Louis A., Savarino S., Svennerholm A., Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers, 2006, *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (17):3872-3877.

- 30- De Baets L., Van der Taelen I., De Filette M., Piérard D., Allison L., De Greve H., Hernalsteens J., Imberechts H., Genetic typing of Shiga toxin 2 variants of *Escherichia coli* by PCR-Restriction Fragments Length Polymorphism analysis, 2004, Applied and Environmental Microbiology, 70 (10): 6309-6314.
- 31- Sonntag A., Bielaszewska M., Hellamn A., Dierksen N., Schierack P., Wieler L., Schmidt A., Karch H, Shiga Toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells, 2005, Applied and Environmental Microbiology, 71(12): 8855-8863.
- 32- Cicuta M.E., Miranda A.O., Roibón W. L., Benitez M.C., Boehringer S. I., Barceló M.C., Aragón L. R., Kunert J.A., Colibacilosis en lechones: Prueba de eficacia de una vacuna. Comparación con una vacuna comercial.
- 33- Morilla A., Control inmunológico de la diarrea de los cerdos lactantes, 1991, Ciencia Veterinaria 5:89-118.
- 34- Osek J., Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, 2001, J Vet Diagn Invest 13:308-311.
- 35- Reischl U., Yousef M., Wolf H., Hyytiä E., Strockbine N., Real-Time fluorescence PCR assay for detection and characterization of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin *Escherichia coli*, 2004, Journal of Clinical Microbiology, 42(9): 4092-4100.
- 36- Moller N., Thorup A., Detection and Characterization of Verocitotoxin-producing *Escherichia coli* by Automated 5'Nuclease PCR Assay, 2003, Journal of clinical microbiology, 41(7):2884-2893.

37- 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). 2005, Braz. J Microbiol., 36 (4): 363-367.

38- Báez F., Estandarización de la técnica de Reaccion en Cadena de la Polimerasa para detectar factores de virulencia de *Escherichia coli* toxigénica de lechones (Tesis de Licenciatura), Distrito Federal, México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

39- Silhavy T. J., Berman M. L., Enquist L. W., Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory. 1984.

40- Cura, A., Enfermedades entéricas de los lechones lactantes, disponible en http://www.axoncomunicacion.net/criaysalud/revistas/39/cys_39_enfermedades_lechones_lactantes.pdf

41- Revilla, E, Diagnóstico clínico diferencial de las diarreas en los lechones lactantes, 2009, disponible en porcicultura.com

42- Rubio, P., Diagnóstico diferencial de las diarreas de los lechones lactantes, disponible en http://www.3tres3.com/los-expertos-opinan/diagnostico-diferencial-de-las-diarreas-en-lechones-lactantes_101/

43- Ramis G., Herrero J., Mendoça L., Pallares F., Toledo M., Martínez J., Garrido A., Quereda J., Gonzales J., Muños A., Vacunación directa de lechones frente a *E. coli* resultados preliminares, Facultad de Murcia.

- 44- Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D., Farrbrothe J., Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglet and antibiotic sensitivity of isolates, 2003, J. Vet. Diagn, 15: 242-252.
- 45- 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, 2005, Veterinary Microbiology, 110(1-2): 35-39.
- 46- Zcajova Z., Konstantinova L., Alexa P., Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in *astA* positive strains, 2012, Veterinary Microbiology, 154 (3-4): 369-375.
- 47- Veilleux S., Dubreuil D., Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals, 2006, Vet. Res., 37: 3-13.