

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**FRECUENCIA DE *Escherichia coli* EN BECERRAS DE 9 ESTABLOS
LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

**POR:
ALEJANDRA SARAHI GARCÍA PÉREZ**

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

JUNIO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

**FRECUENCIA DE *Escherichia coli* EN BECERRAS DE 9 ESTABLOS
LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

**FRECUENCIA DE *Escherichia coli* EN BECERRAS DE 9 ESTABLOS
LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ PARTICULAR DE
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISISTO PARCIAL PARA OBTENER

EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL

DR. CARLOS LEYVA ORASMA.

VOCAL

M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTINEZ.

VOCAL SUPLENTE

M.V.Z ESEQUIEL CASTILLO ROMERO

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Dedicatoria.	i
Agradecimientos.	ii
Resumen.	iii
I. Introducción.	1
1. Objetivos.	2
1.1 Objetivo General.	2
1.2 Objetivo específico.	3
II. Recopilación bibliográfica.	3
1. Historia.	3
2. Etiología.	4
2.1. <i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).	5
2.1.1. Factores de virulencia de ETEC.	5
2.2. <i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC).	6
2.3. <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).	7
2.4. <i>E. coli</i> Enteroagresiva (EAaggEC).	7
2.5. <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).	7
3. Epidemiología.	8
4. Inmunidad .	8
5. Patogenia.	10
5.1. Fimbria.	11
5.2- Enterotoxinas.	12
6. Métodos de Diagnóstico .	12
7. Control y Tratamiento.	14
8. Justificación.	15
III. Material y Métodos	16
3.1. Marco de referencia.	17
IV. Resultados y Discusión .	19
V. Conclusiones.	22
VI. Literatura Citada .	23

Índice de Figuras.

Figura 1 Cantidad de animales con diarrea que resultaron positivos a *E. coli* enterotoxigénica, diagnosticados por el método de ELISA en 9 hatos muestreados en la Comarca Lagunera. 19

Figura 2 Edades de los animales que presentaron diarrea en 9 hatos muestreados, para determinar la presencia *E. coli* enterotoxigénica, en la Comarca Lagunera. 20

Abreviaturas

AMP. Adenosín Monofosfato Cíclico.

DAEC. *Escherichia coli* enteroadherente.

EAggEC. *Escherichia coli* enteroagresiva.

EHEC. *Escherichia coli* Enteroinvasiva.

EIEC. *Escherichia coli* Enterohemorrágica.

ELISA. Inmunoabsorbente ligado a enzima.

EPEC. *Escherichia coli* Enteropatógena.

ETEC. *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

GMP. Guanosin Monofosfato Cíclico.

IFAT. Prueba de Anticuerpos Fluorescente Indirecto.

LT. Termolábiles.

PAGE. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

QLAT. Técnica de Aglutinación de Látex.

ST. Termoestables.

STEC. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

Resumen

De las enfermedades éntéricas que afligen a los terneros recién nacidos la *E. coli* enterotoxigénica sigue siendo una infección que contribuye a causas de mortalidad en los lechones y terneros (Ascon *et al* 1998).

El presente estudio se realizó en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, para determinar la frecuencia de *Escherichia coli* K99 en el síndrome diarreico de las becerras, para lo cual se utilizaron muestras de heces de becerras de 1 y 35 días de edad que presentaban diarrea. Las muestras fueron recolectadas de 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera. Se obtuvieron 90 muestras y posteriormente fueron trasladadas a la Unidad de Diagnóstico de la Universidad para determinar la frecuencia de infección por *E. coli* K99 por la técnica de ELISA, utilizando un paquete comercial. Los resultados obtenidos, mostraron que del total de las muestras analizadas el 84.4% (76) resultaron negativos a la prueba de ELISA, mientras que el 15.6% (14) de las muestras analizadas resultaron positivas. De los 9 establos muestreados, uno de ellos presentó el 28% de *E. coli* K99, 4 de ellos 14.3%, 2 de solo un 7.1%, y los 2 hatos restantes de 0%. Se obtuvieron rangos de infección por *E. coli* de 0 a 40%. De los 9 establos, 7 (77.8%) fueron positivos concluyendo que la prevalencia de infecciones por *E. coli* K99 en los establos de la Comarca Lagunera es alta.

I. Introducción

Una serie de agentes infecciosos como bacterias, virus, y parásitos causan diarrea en las especies animales. La etiología de la diarrea del ternero es compleja, involucrando a menudo varios agentes infecciosos, muchos de estos enteropatógenos causan lesiones intestinales severas, alterando la actividad de las enzimas, el transporte de nutrientes o la combinación de ambos (Holland, 1990). La etiología de tales infecciones son multifactoriales y la diarrea en el becerro puede atribuirse a infecciones con un solo agente o agentes múltiples (Cabalar *et al.*, 2001; Cabalar *et al.*, 2001). Aunque se han implicado muchos agentes infecciosos en la etiología de diarrea en los terneros jóvenes, entre los principales agentes causales están las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, y *Clostridium perfringens* tipos B y C, virus como Rotavirus, Coronavirus, Torovirus, Calicivirus, y Parvovirus, y protozoarios de los géneros *Eimeria* spp (coccidias) y *Cryptosporidium* spp (Hoet y Boscan, 2005; Snodgrass *et al.*, 1982;). Estos agentes afectan a bovinos de todas las edades, sin embargo, son los becerros recién nacidos y menores de 3 meses los que presentan la enfermedad entérica en forma más manifiesta (Hoet y Boscán 2005).

Varios estudios a lo largo del mundo han establecido su importancia en las infecciones entéricas en los terneros a los 60 días de nacidos (Snodgrass *et al.*, 1982; Nussbaum *et al.*, 1999).

Las bacterias pueden causar la diarrea por producción de enterotoxinas que inducen el agua y los electrolitos, que influyen en la hipersecreción de las criptas de las células, invadiendo la mucosa del intestino y provocando una

respuesta inflamatoria que produce la hipersecreción a través de las prostaglandinas y otros productos de la inflamación y la destrucción de la absorción de las vellosidades de las células epiteliales y causando así una diarrea por mala absorción (Holland, 1990., Berberov *et al.*,2004).

La *Escherichia coli* enterotoxigénica es un problema mundial que causa diarreas en animales y humanos y es la responsable de producir 400,000 a 800,000 muertes por año (Yu, *et al.*, 2002).

La diarrea en los terneros es una enfermedad multifactorial, que causa uno de los problemas sanitarios más relevantes en las primeras semanas de vida del becerro. Para manifestar la diarrea se conjugan varios factores epidemiológicos, como los ambientales, la transferencia de la inmunidad de la madre hacia el becerro, una inadecuada ingestión de calostro, mala sanidad y el sistema de crianza, los cuales causan grandes pérdidas económicas en las lecherías, manifestándose con una baja producción de leche, por tal motivo, es importante conocer la frecuencia de la enfermedad en la Región con la finalidad de conocer el impacto para que posteriormente se tomen medidas adecuadas para su control.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General.

Investigar la prevalencia de infecciones causadas por *Escherichia coli* en el síndrome diarreico de las terneras en 9 hatos lecheros de bovinos Holstein de la Comarca Lagunera.

1.2. Objetivo Especifico.

Utilizar la técnica inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA) para identificar antígenos de *E. coli* K99 en heces de becerros lactantes con diarrea.

II. Recopilación Bibliográfica

1.- Historia

Entre las seis categorías reconocidas de *Escherichia coli* (*E. coli*) diarreogénica, la *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) es la más común, en humanos particularmente en el mundo en vías de desarrollo (Qadri *et al.*, 2005). La historia de ETEC inicia en Calcuta en 1956, donde se inyectaron cepas vivas de *E. coli* aisladas de niños y adultos con la enfermedad del cólera, dentro del ileon de conejos y se encontró gran cantidad de fluido similar al de *Vibrio cholerae* (Nataro y Kaper, 1998; Qadri *et al.*, 2005;). ETEC es una causa común de diarreas en los terneros recién nacidos, así como en otras especies (Mills y Tietze, 1984), además es la causa más importante de diarrea aguda en los humanos y en los animales jóvenes del ganado (Lee e Isaacson, 1995). La ETEC es uno de los principales agentes causantes de diarrea en los terneros de dos semanas de edad y puede ser patógeno todavía para los terneros de 6 semanas cuando está asociado con otros agentes como el rotavirus; las infecciones de ETEC son a menudo mortales o fatales en los terneros recién nacidos, corderos y cerdos (Figueredo *et al.*, 2004; Garg *et al.*, 2007).

2. Etiología.

La *E. coli* es un habitante natural del intestino de animales domésticos saludables y frecuentemente es encontrado en los rumiantes (Beutil, *et al* 1995; Giammanco, *et al.*,1996; Yamamoto y Nakazawa, 1997). Es un bacilo Gram negativo, aeróbico y anaeróbico facultativo, corto, móvil, de la familia de las *Enterobacteriaceae* que puede producir en los 10 primeros días de vida la colibacilosis o enfermedad de la diarrea blanca de los terneros (Smith y Callihan, 1992., Nataro y Kaper, 1998., Hoet, y Boscán 2005) que frecuentemente causa bacteremia (Maslow *et al.*, 1994; Weintraub, 2007). Esta bacteria puede recuperarse fácilmente mediante la selección de muestras clínicas bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C (Nataro y Koper, 1998), a menudo crecen en medios selectivos como Agar McConkey y Agar Eosina Azul de Metileno, donde crecen los miembros de *Enterobacteriaceae* y permite diferenciar el organismo en base a su morfología (Nataro y Koper, 1998).

Los serotipos de la *E. coli* son O (somático), H (flagelos), K (capsular) F (fimbrias) Los antígeno somáticos son polisacarido y se localiza en la superficie de la pared celular, el antígeno flagelar son proteínas fimbriales que actúan como adhesiones del antígeno facilitando pegarse a las mucosas (Nataro y Koper 1998).

La ETEC pertenece a una familia heterogénea lactato fermentativo, perteneciendo a una variedad de antígenos, los cuales producen enterotoxinas que pueden ser termolábiles y/o termoestables, y factores de colonización que

permiten a los organismos empezar a colonizar el intestino delgado y así causar la diarrea (Mammarappallil y Elsinghorst, 2000; Qadri *et al.*, 2005,).

Comúnmente la *E. coli* permanece inofensiva en el lumen del intestino; sin embargo, si se debilita el hospedador o se inmunodeprime, cuando se alteran las barreras gastrointestinales normales, hasta las cepas de *E. coli* “no patógenas” pueden causar la infección (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de *E. coli* asociadas con enfermedad con signos de diarrea han sido divididas en cinco categorías en base a los mecanismos de patogenicidad: La *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), y *E. coli* Eteroagresiva (EAggEC), Hay una sexta categoría denominada difusa *E. coli* Enteroadherente (DAEC) (Jallat, *et al.*, 1993, Weintraub, 2007).

2.1. *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC).

Las cepas de ETEC causan diarrea a través de las enterotoxinas, elaboran por lo menos dos grupos definidos de enterotoxinas, termoestables (ST) y termolábiles (LT) (Yammamoto y Nakazawa, 1997; Nataro y Koper, 1998., Qadri, *et al.* 2005).

2.1.1 Factores de virulencia de ETEC.

La *E. coli* requieren una estrategia para la infección. El sitio de la colonización de la mucosa, la evasión de las defensas del huésped, la multiplicación y el daño al hospedador. La característica más conservadora de la *E. coli* es su capacidad para colonizar la superficie del intestino a pesar del peristaltismo y la competencia de los nutrientes de la flora del intestino. La

presencia de fimbrias en la superficie de adhesión es una propiedad de casi todas las *E. coli* incluyendo las variedades no patógenas (Nataro y Koper, 1998).

Las investigaciones de las cepas de *E. coli* asociados a diarrea en neonatos, corderos, cerdos y humanos han ayudado a determinar los factores específicos de virulencia que pueden usarse para distinguir entre patógeno y cepas del huésped. Dos de los factores de virulencia más prominentes identificados para la ETEC es la expresión de antígeno fimbrial la cual une la bacteria a las células del mamífero, elaboran una o más enterotoxinas que influye en la secreción de fluidos intestinales a través del incremento de la concentración celular o del ciclo de AMP o gGMP (Holland, 1990).

2.2 *E. coli* Enteropatógena (EPEC)

La EPEC no produce enterotoxinas, característicamente se fija un número grande de bacterias en el intestino delgado, causando un desaparecimiento de las microvellosidades (Giammanco *et al.* 1996). La EPEC es una categoría importante de *E. coli* diarreogénica que se ha unido a la diarrea infantil en países en vías de desarrollo. EPEC se define ahora en base a las características del patógeno (Nataro y Kaper, 1998).

La característica de esta lesión se debe a una estrecha adherencia de la bacteria a los eritrocitos de la membrana. Este fenotipo se caracteriza por el adelgazamiento de microvellosidades y la adhesión íntima entre la bacteria y el epitelio la membrana celular. Estas lesiones son diferentes a la ETEC y a *V. cholerae* en que los organismos se adhieren a las células de las criptas íntimamente sin afectar las microvellosidades (Nataro y Kaper 1998).

2.3. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

El reconocimiento de EHEC es una clase distinta de *E. coli* patógena (Nataro y Kaper, 1998)

La infección incluye la hemorragia y el edema de la lámina propia. Hay necrosis focal e infiltración de neutrofilos, Es transmitida por los alimentos, el agua y de persona a persona. La mayoría de los casos son causados por la ingesta de los alimentos contaminados especialmente los alimentos de origen bovino (Nataro y Kaper 1998).

2.4. *E. coli* Enteroagresiva (EAggEC)

Característicamente incrementa la secreción de moco de las mucosas con la captura de las bacterias de un aditivo bacteriano. Además el epitelio intestinal muestra alteraciones en las células caliciformes lo que sugiere la hipersecreción y la estimulación de moco. Las lesiones se caracterizan por acortamiento de las vellosidades, hemorragia, necrosis en las vellosidades y leve respuesta inflamatoria con edema e infiltración mononuclear de la submucosa. Hay tres etapas de la patogenicidad. Implica la adherencia a la mucosa intestinal, una mayor producción de moco, la elaboración de citoxinas lo que resulta daños a las células intestinales y esto da lugar al síndrome de la diarrea (Nataro y Koper, 1998).

2.5. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas de EIEC son bioquímicamente, genéticamente y patológicamente iguales con la *Shigella*. Ambos organismos invaden el epitelio del colon. La *E.coli* EIEC y *Shigella* elaboran una o más enterotoxinas

secretoras. El modo de la patogenicidad de la *Shigella* y la EIEC es la penetración de las células epiteliales, la lisis de la vacuola endocítica, multiplicación intracelular, movimiento direccional a través del citoplasma y la ampliación de las células epiteliales adyacentes. Cuando la infección es severa, hay reacción inflamatoria que se manifiesta con ulceraciones (Nataro y Kaper 1998).

3. Epidemiología.

La epidemiología de la enfermedad es determinada principalmente por varios factores. La inmunidad de la infección de las mucosas con ETEC en los individuos expuestos, en los individuos asintomáticos inmunes puede haber gran número de organismos de ETEC en las heces, y la infección requiere relativamente una dosis de infección alta (Nataro y Kaper 1998).

La contaminación por ETEC en el medio ambiente de áreas endémicas y donde la infección es sumamente prevalente en áreas donde se encuentran neonatos al destete. Las infecciones de ETEC en áreas endémicas tienden a ser en los meses calurosos, húmedos, por la multiplicación de ETEC en la comida y el agua. Aunque la infección de ETEC ocurre frecuentemente en neonatos la inmunológica de los adultos también son susceptibles (Nataro y Kaper 1998).

4. Inmunidad.

Los mecanismos de defensa en el bovino recién nacido no están completamente desarrollados, debido a esta deficiencia junto con el estrés involucrado en el proceso del parto, el becerro es altamente susceptible a un

amplio espectro de patógenos, lo que provoca que la morbilidad y mortalidad sean muy elevadas en esta etapa inicial (Olgin y Bernal)

La temprana inmunidad del neonato en animales de granja depende completamente de los anticuerpos obtenidos en el calostro. La transferencia de las inmunoglobulinas del calostro es la forma más importante de la protección del ternero, cerdo y cordero. El calostro sirve de suplemento del becerro para su primer línea de defensa, nutrientes y factores de crecimiento (Holland, 1990).

Wattiaux (2005) describe que las infecciones virales alteran la digestión y absorción normal de leche. Esto resulta en un incremento de la cantidad de leche parcialmente digerida en el intestino que es capaz de producir una proliferación bacteriana. El epitelio intestinal puede ser dañado y las bacterias pueden entrar al organismo. En general, la presencia de rotavirus incrementa el impacto y la patogenicidad de *E. coli*, además provoca severa deshidratación y la muerte ocurre de 12 a 24 horas después del inicio de la diarrea. Es evidente que la heterogenicidad del antígeno es asignar la existencia de múltiples antígenos fimbrial, eso es un obstáculo para el desarrollo de una eficaz vacuna, la fimbria de ETEC otorga una especificidad patógena a la especie. Por ejemplo las cepas ETEC K99 son patógena para los terneros, corderos y cerdos, mientras que la K88 es solamente patógena en los cerdos (Nataro y Koper, 1998).

En el rumiante, la inmunidad a las infecciones de ETEC está promovida por los anticuerpos anti-fimbriales del calostro, principalmente la inmunoglobulina G (IgG), que inhibe la adherencia de esta bacteria al tracto

gastrointestinal por el bloque de los receptores a la interacción de la fimbria (Figueiredo, *et al.*, 2004).

5. Patogenia.

En cerdos y becerros se establecen las bacterias estrictamente después de las 24 horas de nacimiento, sin embargo, el intestino delgado del neonato contiene pocas bacterias, la peristaltis del intestino es fuerte, las vellosidades, y la ingesta de fluidos hacen que las bacterias viajen al intestino delgado y esto regula el establecimiento de las bacterias. (Nataro y Koper, 1998).

La patogénesis de la ETEC esta determinada por la adherencia bacteriana al intestino delgado y por la inducción de la hipersecreción intestinal por la cual se promueve la fimbria y las enterotoxinas, respectivamente (Figueiredo, *et al.*, 2004).

Las cepas de ETEC representan un prototipo patogénico, los organismos colonizan la mucosa de la superficie del intestino delgado y elaboran sus enterotoxinas, mientras cambian un estado secretor estable (Nataro y Kaper, 1998).

Se piensa que ETEC causa la diarrea predominantemente a través de la producción de enterotoxinas termoestable (ST) o termolábil (LT) y ambas causan las pérdidas de fluidos y desequilibrio electrolítico en el intestino (Ascon, *et al.*, 1998, Yu *et al.*, 2002, Berberov, *et al.*, 2004, Garg, *et al.*, 2007).

Este organismo posee factores de virulencia los cuales producen enterotoxinas, que producen diarrea mediante un mecanismo de hipersecreción de las vellosidades y antígenos en la superficie, es porque se adhieren las bacterias al

epitelio del intestino delgado, mediante un evento de las fimbrias (también llamados pili) que facilitan la colonización del intestino delgado y participan en la enfermedad (Isaacson, 1978., Sherman *et al.*, 1983., Chu H., *et al.*, 2005,).

Estudios han demostrado que K99 depende de varios factores para el crecimiento, temperatura, alanina, AMP cíclico (AMPC) y la proteína del receptor y la respuesta a la proteína de leucina (Lee y Isaacson., 1995).

La observación en el microscopio electrónico de las cepas de ETEC típicamente revelan muchas flagelos de fimbria en torno a la bacteria, a menudo la morfología puede tener múltiples fimbrias que puede visualizarse en la bacteria. La ETEC se ha caracterizado por un número grande de antígenos fimbriales aunque las fimbrias de las cepas de ETEC aun no se han identificado solo se supone que existen (Nataro y Koper, 1998., Yu *et al.*, 2002).

5.1. Fimbria.

La unión de la bacteria al tejido del huésped susceptible es el paso inicial para inducir a la enfermedad por la bacteria. La unión es por los filamentos proteínicos pegados llamados Pili o fimbrias, la adhesión a la superficie, y los factores de la colonización esto se localiza en la superficie de la bacteria. La *E. coli* es capaz de sintetizar varios tipos de fimbrias y esto permite colonizar al organismo y al tracto gastrointestinal de diferentes especies animales (Holland, 1990).

5.2. Enterotoxinas.

Las ETEC después de colonizar producen una o más enterotoxinas lo que causa diarrea e hipersecreción y activa los receptores intracelulares sistema mensaje segundo cAMP o cGMP. Dos clases biológicas de enterotoxinas se producen y son termolábil y/o termoestable. La producción de ambas clases de enterotoxinas es controlado por la transmisión de LT. Es una toxina de alto peso molecular que esta funcionalmente y estructuralmente relacionada con la toxina *Cholerae Vibrio*. Esta inactivada a 60°C por 30 min (Nataro y Koper, 1998).

6. Métodos de Diagnóstico.

El diagnóstico utilizado para el agente etiológico responsable de diarrea puede realizarse en el laboratorio porque los signos clínicos no permiten la diferenciación del los microorganismos causales (Nussbaum, *et al.*, 1999).

El identificar a un agente etiológico en particular como causal de un brote de diarrea usando solo hallazgos clínicos no es posible. Las infecciones múltiples tienden a ser más comunes en producir cuadros clínicos diarreicos que infecciones causadas por un solo agente; un becerro con infecciones mixtas (dos o más patógenos) es 6 veces más probable de presentar un cuadro clínico (diarrea) que en becerros con infecciones simples. Responsabilizar a un solo agente causal del brote diarreico en condiciones de campo es casi imposible y no se ajusta a la realidad (Hoet y Boscan., 2005).

Do *et. al.*, (2006) refieren que en un estudio realizado en cerdos destetados con diarrea de 5 explotaciones intensivas, la ETEC era la responsable del 43% casos de diarreas en aquellos animales que tenían 4 días

de nacidos y el 23,9% de las diarreas causadas por ETEC se presentaban en animales que ya estaban destetados (Do *et. al.*, 2006).

Otro estudio mostró que la *E. coli* K99 esta presente en el 32.1% de las becerras con presencia de diarrea y el 25.5% carece de esta (Emre., y Fidanci, 1998).

El método PCR múltiple es utilizado para detectar ETEC, EPEC, y STEC para la amplificación de los virus (Franck, *et al.*, 1998)

Los ensayos de PCR para detectar ETEC, son bastante sensibles y específicos y se utilizan para detectar o aislar colonias de bacterias (Nataro y Koper,1998).

Francis (1985) uso acetona fría e inmunoflorecencia indirecta para detectar cepas K88, K99 y 987P que se cambiaron a F-4 F-5 y F-6 respectivamente. (Francis y Wilson,1985).

E. coli Enterotoxigénica infecta a los cerdos, terneros y corderos pueden ser identificadas por la adherencia del Pili. Las pruebas de seroaglutinación, pruebas de ELISA, prueba de anticuerpo de inmunoflorecencia (IFAT) se han usado para la detección de antígenos del Pili (Mullaney, *et al.*, 1991).

Otro estudio realizado para detectar *E. coli* enterotoxigénica revelo de 312 muestras de heces, 235 cepas de *Escherichia coli* fueron obtenidas con animales sin diarrea, y de 235 cepas 28 resultaron positivas a K99 (Cabalar, *et al.*, 2001).

El microscopio electrónico, el cultivo de virus y células mononucleares, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), inmunoensayo enzimático

(ELISA), y la técnica de flotación complementaria de cepas ayuda a la detección de rotavirus, *E. coli* y *Cryptosporidium* estos métodos en parte son muy complicados requieren equipo especial y consumen mucho tiempo. El nuevo método de diagnóstico desarrollado es la técnica de aglutinación de latex (QLAT) (Nussbaum, *et al.*, 1999).

Otro estudio demostró que de 602 muestras, con la prueba de ELISA los resultados fueron 46 (15.3%) muestras de heces salieron positivas, 225 (84.7%) son negativas, con ELISA, estos datos fueron analizados por la sensibilidad y la especificidad de el método de ELISA (Nussbaum, *et al.*, 1999).

La *E. coli* se distribuye ampliamente no solo con diarrea, sino también en animales sanos los resultados fueron 32,1% con diarrea y en 25,5 sin diarrea (Emre y Fidanci, 1998).

7. Control y Tratamiento.

La infección de *E. coli* puede ser interrumpida por la limpieza y desinfección de los locales (Cabalar, *et al.*, 2001).

E. coli ha sido resistente a las drogas, sobre todo a las drogas normalmente usadas para tratar la diarrea del ternero (Emre y Fidanci, 1998).

Figueiredo (2004) menciona que el Pili de la bacteria ETEC puede ser utilizado como una vacuna eficiente para la diarrea. Se han desarrollado vacunas diferentes usando cepas de ETEC K99 y F41. Las vacunas pueden consistir en bacterias (Figuereido *et al.*, 2004).

En estos estudios, el método mas empleado para la evaluación de estas vacunas fue el análisis serológico antes de vacunar. Sin embargo, algunos de

los aspectos mas importantes de la inmunización de los terneros recién nacidos contra ETEC, es la persistencia de anticuerpos pasivos después de la ingestión de calostro, que es como responden las vaquillas a la vacunación e inmunidad natural antes de la vacunación (Figueiredo, *et al.*, 2004).

Vacunas de fimbrias se han administrado a vacas gestantes, ovinos y porcinos con el fin de proteger al recién nacido contra ETEC de colibacilosis. Esta vacuna induce anticuerpos anti-fimbriales detectados en la leche y el calostro de animales de granja en lactación, se forma protección pasiva en la colonización del intestino contra ETEC (Byrd, *et al.*, 2003).

Las vacunas convencionales contra ETEC administradas por vía parenteral o subcutánea purificada K99 proteína fimbrial inactivada con formalina, han demostrado que logran una protección limitada debido a la falta de inmunidad en la mucosa. Hay vacunas orales de bacterias que se usan para generar fimbrias de ETEC inactivadas para que se adhieran en el intestino (Grag *et al.*, 2007, Chu *et al.*, 2005).

8. Justificación.

De acuerdo a estos antecedentes y tomando en cuenta que en la Comarca Lagunera no hay estudios sobre la diarrea de las terneras en bovinos Holstein específicamente de *E. coli* y considerando que en la Región, en los Laboratorios de Diagnóstico y en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, se han diagnosticado casos de colibacilosis, se considera importante investigar la prevalencia de la colibacilosis involucrada en el Complejo Diarreico de las terneras.

III. Material y Métodos.

3.1. Marco de Referencia. El Municipio de Torreón se localiza en la parte oeste del sur del Estado de Coahuila, en las coordenadas 103° 26' 33" longitud oeste y 25° 32' 40" latitud norte, a una altura de 1,120 (msnm). Limita al norte al este con el municipio de Matamoros y al sur y al oeste con el Estado de Durango.

La comarca o región lagunera (La Laguna) esta ubicada en la parte centro norte de la República Mexicana en los límites del Estado de Coahuila y Durango. Se encuentra a una altitud de 1,120 (msnm), a una altitud de 24° 22' Norte, a una longitud de 102° 22' Oeste, cuenta con una extensión de 44,887 km² (17,330 mi²) y se encuentra conformada por 15 Municipios, de los cuales 10 pertenecen a Durango, Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo, Mapimi, Rodeo, Nazas, Simón Bolívar, San Juan de Guadalupe, San Luís del Cordero y San Pedro del Gallo; y cinco municipios pertenecen a Coahuila: Torreón, San Pedro, Matamoros Francisco I Madero y Viesca.

La Región Lagunera colinda al norte con el Estado de Chihuahua y los municipios de Sierra Mojada y Cuatrociénegas del Estado de Coahuila, al oeste de los municipios de Inde y Villa Hidalgo del Estado de Durango, al Sureste con el Estado de Zacatecas y al este con el Municipio de Parras, Coahuila.

Se llevó a cabo un estudio dirigido y por conveniencia en dos fases:

Fase de campo. Se estudiaron las áreas de crianza de 9 establos lecheros de la Comarca Lagunera y se tomaron muestras de heces de becerras con signos clínicos de diarrea. Las muestras se colectaron directamente del ano estimulando para que salieran las heces líquidas y se depositaron en bolsas de

Cuando la muestra no se pudo homogenizar se utilizaron perlas de vidrio dentro del recipiente y se diluyó agitando vigorosamente.

Se depositaron 100 µl de las diluciones en los pasillos

Se cubrió la placa con una lámina de aluminio y se dejó incubando a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm (5^{\circ}\text{C})$ durante 30 minutos.

Se preparó una solución concentrada (X20) de lavado 1:20 con agua destilada, eliminando los cristales que se forman a $5\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C})$ con tal de utilizar 100 ml.

Se llenaron los pocillos de la placa con 300 µL de la solución de lavado, se vació el líquido de la placa con un golpe sobre una superficie firme con tela absorbente y se repitió este paso un total de 3 lavados, evitando la formación de burbujas.

Se depositaron en cada pocillo 100 µL de conjugado (Anticuerpo anti IgG) y se dejó incubar la placa a $21^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$ durante 30 minutos ($\pm 3\text{min}$).

Se llenaron los pocillos de la placa con 300 µL de la solución de lavado, se vació el líquido de la placa con un golpe sobre una superficie firme con tela absorbente y se repitió este paso un total de 3 lavados, evitando la formación de burbujas.

Se depositaron 100 µL de solución reveladora y se incubaron durante 10 minutos a $21^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ fuera de la luz.

Criterios de validación. El resultado fue considerado positivo cuando:

- A) El control positivo presentó un color azul bien marcado.
- B) El control negativo no presentó color o un color azul ligero.

Interpretación. La placa fue validada cuando:

- A) Fue considerada como positiva cualquier muestra que presentó un color azul, que sea más oscuro que el color del control negativo.

B) es considerada como negativa cualquier muestra que presente un color equivalente o ligeramente menor que el control negativo.

IV. Resultados y Discusión.

Del total de las muestras analizadas 14/90 (15.5%) resultaron positivas a la presencia de antígeno K99 de *E. coli* enterotoxigénica con la técnica de ELISA y por lo tanto 76/90 (84.4%) fueron negativas, con un rango de 0 a 40% en los 9 establos (Figura 1).

De las 14 muestras positivas, un hato presentó un 28.6%, mientras que 4 de estos tuvieron porcentajes de 14.3%, 2 hatos un 7.1% y otros dos restantes no mostraron al antígeno.

De los 9 establos estudiados 7 (77.7%) fueron positivos

Del total de los animales infectados por *E. coli*, la mayor cantidad de estos tuvieron edades que oscilaron entre 1 y 15 días (Figura 2).

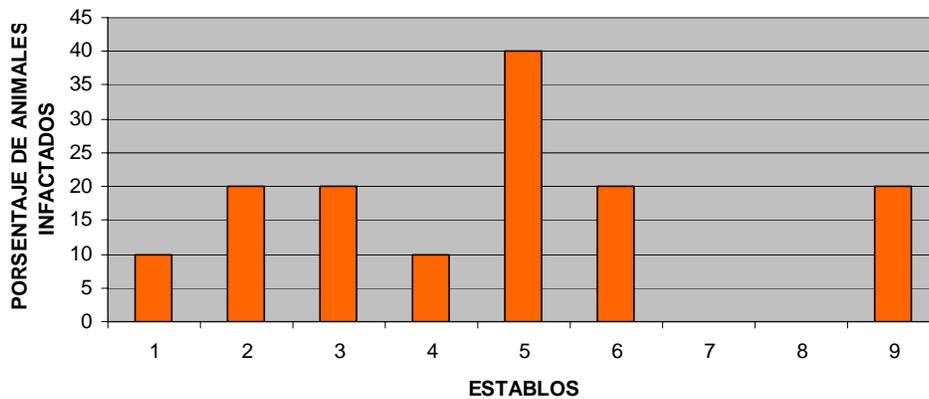


Figura 1.- Porcentaje de *E. coli* enterotoxigénica, por establo muestreado en becerras con diarrea.

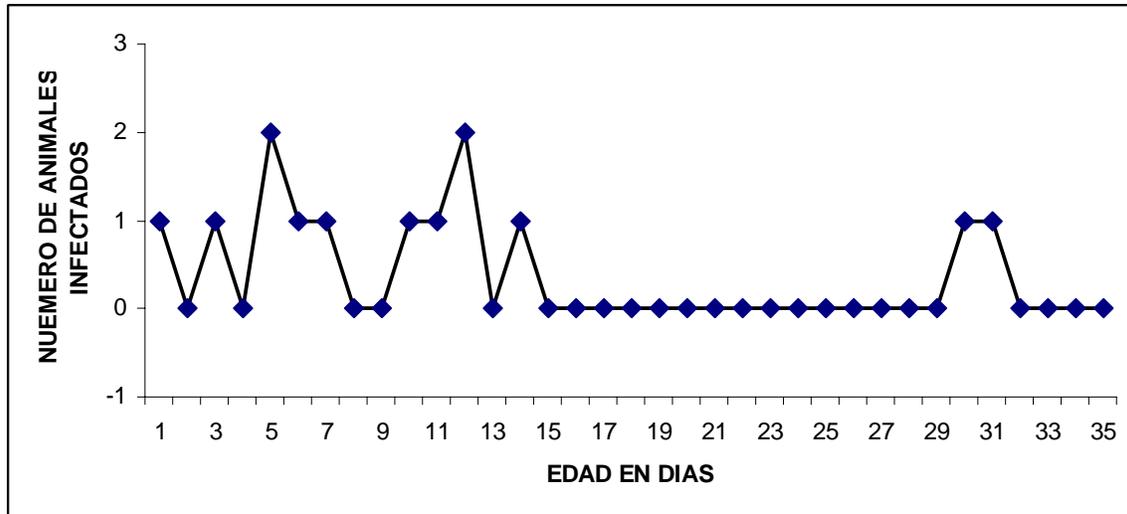


Figura 2.- Edad de los animales que presentaron diarrea, con la *E.coli* en los 9 hatos lecheros de la Comarca Lagunera.

En un estudio patológico retrospectivos de 1995 a 1999 en la Comarca Lagunera, se reportaron lesiones características de enteritis catarral compatibles con infecciones causadas por *E. coli* en un 14.9% de intestinos observados histológicamente (Delgado, 2000). En el presente estudio estos porcentajes, analizados con la técnica de ELISA muestran valores de (15.5%) en animales de 1 a 15 días de edad.

Van Zijderveld y Overdijk (1983) han usado el paquete de diagnóstico de ELISA para la detección de *E. coli* K99 en heces de becerras desde inicios de la década de los 1980's. También estos investigadores encontraron que en becerros inoculados experimentalmente con una cepa de *E. coli* Enterotoxigénica, la prueba de ELISA resulto negativa en forma abrupta después de 6 días postinfección. Esto explica porque no encontramos a *E. coli* como un agente infeccioso común en esta investigación, ya que es bien conocido que

esta bacteria afecta a animales recién nacidos y por lo tanto no es una prueba de gran valor para detectar al microorganismo en becerros mayores, pero si es una herramienta para uso en gran escala en estudios de campo para diagnosticar la etiología de la diarrea del becerro neonato.

Posteriormente la técnica de ELISA se ha modificado agregando otros antígenos que permiten el diagnóstico de las diarreas indiferenciadas de las terneras. Para ello se utiliza una mezcla de tres anticuerpos monoclonales específicos para detectar antígenos de Rotavirus, Coronavirus y *E. coli* K99 (Czerny y Eichhorn 1989; Thorns *et al.*, 1992).

El método de diagnóstico usado por nosotros (ELISA) muestra un alta sensibilidad y especificidad para determinar *E. coli* Enterotoxigénica, esto debido a que de las 90 muestras utilizadas solo 14 reaccionaron positivamente a la prueba, lo que nos hace pensar que aun cuando los signos y probablemente las lesiones encontradas en el tracto gastrointestinal pudieron ser causadas por alguna de las *E. coli* existentes, el método de diagnóstico utilizado por nosotros discriminó a estas y fue específico para aquellas que fueron causadas por *E. coli* Enterotoxigénica.

La edad influye en la infección por *E. coli*, ya que los animales más susceptibles están dentro de un rango de 1 a 15 días de edad, sin embargo, hay evidencias de infecciones por esta bacteria en animales mayores de 30 días observadas en becerras estudiadas en la región. La presentación de estas infecciones pueden deberse probablemente por un proceso de inmunosupresión

que los animales pueden sufrir. Habrá que realizar estudios posteriores que nos muestren la causa de esta inmunosupresión.

V. Conclusiones.

Del total de los 9 establos muestreados el 77.7% resulto positivo a *E. coli*.

El rango mayor a la susceptibilidad de *E. coli* fue de 1 a 15 días de nacidos.

La prevalencia de la infección por *E. coli* en becerras con diarrea de la Comarca Lagunera es de 15.5% considerándose alta.

Hay una influencia de establo en la prevalencia de *E. coli* en becerras con diarrea desde cero (0) al 40%.

VI. Literatura Citada.

1. Ascon, M. A., Hone, D. M., Walters, N., y Pascual D. W. (1998). "Oral Immunization with a *Salmonella typhimurium* Vaccine Vector Expressing Recombinant Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 Fimbriae Elicits Elevated Antibody Titers for Protective Immunity." Infect. Immun. 66(11): 5470-5476.
2. Berberov, E. M., Zhou, Y., Francis, D. H., Scott, M. A., Kachman, S. D., y Moxley R. A. (2004). "Relative Importance of Heat-Labile Enterotoxin in the Causation of Severe Diarrheal Disease in the Gnotobiotic Piglet Model by a Strain of Enterotoxigenic *Escherichia coli* That Produces Multiple Enterotoxins." Infect. Immun. 72(7): 3914-3924.
3. Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., y Karch, H. (1995). "Virulence Markers of Shiga-like Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Originating from Healthy Domestic Animals of Different Species." J. Clin. Microbiol. 33(3): 631-635.
4. Byrd, W., Mog, S. R., y Cassels, F. J. (2003). "Pathogenicity and Immune Response Measured in Mice following Intranasal Challenge with Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains H10407 and B7A." Infect. Immun. 71(1): 13-21.
5. Cabalar, M., Boynukara, B., Gulhan T., Ekin, I. H. (2001). "Prevalence of Rotavirus, *Escherichia coli* K99 and O157:H7 in Healthy Dairy Cattle Herds in Van, Turkey." Turk J Vet Anim Sci 25: 191-196.
6. Chu, H., Kang, S., Ha, S., Cho, K., Park, S.-M., Han, K.-H., Kang, S.K., Lee, H., Han, S. H., Yun, Ch. H., y Chol, Y. (2005). "*Lactobacillus acidophilus* Expressing Recombinant K99 Adhesive Fimbriae Has an Inhibitory Effect on Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli*." Microbiol Immunol 49(11): 941-8.
7. Czerny, C.P. y Eichhorn, W. (1989). Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to bovine enteric coronavirus: establishment of an efficient ELISA for antigen detection in feces. Vet Microbiol. 20(2): 111-122.
8. Delgado, G.R. (2000). Diarrea de las terneras en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera. Memorias del IX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C. Gomez Palacion, Dgo. Pag 44-45.
9. Do, T. N., Wilkie, I., Druesen, S. J., Fahy, V. A., Trott, D. J. (2006). "Pathogenicity of Vietnamese Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in Colostrum-deprived One-day-old Piglets." Vet Pathol 43(2): 150-160.
10. Emre, Z., y Fidanci, H. (1998). "Prevalence of mix infections of *Cryptosporidium spp.*, *Escherichia coli* K99 and Rotavirus in the faeces of diarrhoeic and healthy cattle in Ankara, Turkey and in vitro resistance of

Escherichia coli K99 to antimicrobial agents." J. of Veterinary and Animal Sciences 22: 175-178.

11. Figueiredo, H.C.P., Lage, A. P., Junior, F. N. P., Leite., R.C. (2004) "Passive immunity in cattle against enterotoxigenic *Escherichia coli*: serologic evaluation of a bacterin containing K99 and F41 fimbriae in colostrum of vaccinated females and calf serum" Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 56(4): 425-432.

12. Francis, D. H. y Wilson, R. A. (1985). "Concurrent Infection of Pigs with Enterotoxigenic *Escherichia coli* of Different Serogroups" J. Clin. Microbiol. 22(3): 457-458.

13. Franck, S. M., Bosworth, B. T. Moon H. W. (1998). "Multiplex PCR for Enterotoxigenic, Attaching and Effacing, and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Calves." J. Clin. Microbiol. 36(6): 1795-1797.

14. Garg, R., Tolbert, M., Oakes, J. L. (2007). "Chloroplast targeting of FanC, the major antigenic subunit of *Escherichia coli* K99 fimbriae, in transgenic soybean." Plant Cell Rep 26(7): 1011-23.

15. Giammanco, A., M. Maggio, M., Giammanco, G., Morelli, R., Minelli, F., Scheutz, F., y Caprioli. (1996). "Characteristics of *Escherichia coli* Strains Belonging to Enteropathogenic *E. coli* Serogroups Isolated in Italy from Children with Diarrhea." J. Clin. Microbiol. 34(3): 689-694.

16. Hoet, E., A y Boscán M., L (2005). " Complejo Diarreico Bovino." Manual de Ganaderia Doble Proposito 340-347.

17. Holland, R. E. (1990). "Some Infectious Causes of Diarrhea in Young Farm Animals." Clin. Microbiol. Rev. 3(4): 345-375.

18. Isaacson R. E. (1978) K99 Surface Antigen of *Escherichia coli* Antigenic Characterization Infect. Immun 22(2): 555-559

19. Jallat, C., Livrelli, V, Michaud, A. D, Rich, Ch. y Joly, B. (1993). "*Escherichia coli* Strains Involved in Diarrhea in France: High Prevalence and Heterogeneity of Diffusely Adhering Strains." J. Clin. Microbiol. 31(8): 2031-2037.

20. Lee, J. H. y Isaacson, R. E. (1995). "Expression of the Gene Cluster Associated with the *Escherichia coli* Pilus Adhesin K99." Infect. Immun. 63(10): 4143-4149.

21. Mammarrappallil, J.G., y Elisinghorst, E. A. (2000) "Epithelial Cell Adherence Mediated by the Enterotoxigenic *Escherichia coli* Tia Protein". Infect. Immun. 68(12): 6595-6601.

22. Maslow, J. N., Mulligan, M. E. y Arbeit, R. D. (1994). "Recurrent *Escherichia coli* Bacteremia." J. Clin. Microbiol. 32(3): 710-714.
23. Mills, K. W. y Tietze, K. L. (1984). "Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for identification of K99-positive *Escherichia coli* isolates from calves." J. Clin. Microbiol. 19(4): 498-501.
24. Mullaney, C. D., Francis, D. H., Willgohs, J. A. (1991). "Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*." J Vet Diagn Invest 3(2): 115-118.
25. Nataro, J. P. y Koper, J. B. (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin. Microbiol. Rev. 11(1): 142-201.
26. Nussbaum, D. J., Salord, J. R., Rimmele D. D.(1999). "Evaluation of quantitative latex agglutination for detection of *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* K99, and rotavirus in calf feces." J Vet Diagn Invest 11(4): 314-318.
27. Olguin, A., and Bernal Diarraen Becerros. <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCli002.pdf>. verificado (10 abril 2008)
28. Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A. S. G., y Sack, R. B. (2005). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention." Clin. Microbiol. Rev. 18(3): 465-483.
29. Sherman, D. M., Acres, S. D., Sadowski, P. L., Springer, J. A., Bray, B., Raybould, T. J. G., y Muscoplat, C. C. (1983). "Protection of Calves Against Fatal Enteric Colibacillosis by Orally Administered *Escherichia coli* K99-Specific Monoclonal Antibody." Infect. Immun. 42(2): 653-658.
30. Smith, C. J. y Callihan, D. R (1992). "Analysis of rRNA Restriction Fragment Length Polymorphisms from *Bacteroides spp.* and *Bacteroides fragilis* Isolates Associated with Diarrhea in Humans and Animals." J. Clin. Microbiol. 30(4): 806-812.
31. Snodgrass, D. R., Nagy, L. K., Sherwood, D., y Campbell, I. (1982). "Passive immunity in calf diarrhea: vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus." Infect. Immun. 37(2): 586-591.
32. Thorns, C.J., Bell, M.M. Chasey, D., Chesham, J., y Roeder, P.L. (1992). Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and *Escherichia coli* K99 antigen in feces of calves. Am J Vet Res. 53(1): 36-43.

33. Van Zijderveld, F.G. y O verdijk, E. (1983). Experiences with the ELISA for detection of the *E.coli* K99 antigen in calf faeces. *Ann Rech Vet.* 14(4): 395-399.
34. Wattiaux, M. (2005) salud de las novillas lecheras. Guia tècnica lechera: crianza de terneras y novillas 5: 69-90.
35. Weintraub, A. (2007). "Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection." J Med Microbiol 56(1): 4-8.
36. Yamamoto, T. y Nakazawa, M. (1997). "Detection and Sequences of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene in Enterotoxigenic *E. coli* Strains Isolated from Piglets and Calves with Diarrhea." J. Clin. Microbiol. **35**(1): 223-227.
37. Yu, J., Cassels, F., Kersten, T. S., Hammond, S. A., Hartman, A., Angov, E., Corthesy, B., Alving, C., y Glenn, G. (2002). "Transcutaneous Immunization Using Colonization Factor and Heat-Labile Enterotoxin Induces Correlates of Protective Immunity for Enterotoxigenic *Escherichia coli*." Infect. Immun. 70(3): 1056-1068.
38. <http://es.wikipedia.org/wiki/Torreón> verifica