

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Efectividad antimicrobiana de *Artemisia ludoviciana*, (Estafiate) sobre cepas de *E. coli* aisladas de becerros con síndrome diarreico post-natal**

**POR  
JORGE ALBERTO ANCHONDO REGALADO**

**TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**AGOSTO DE 2016**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efectividad antimicrobiana de *Artemisia ludoviciana*, (Estafiate) sobre cepas de E. coli aisladas de becerros con síndrome diarreico post-natal

POR  
JORGE ALBERTO ANCHONDO REGALADO

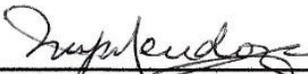
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

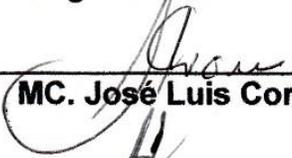
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:

  
MC. Margarita Yolanda Mendoza Ramos

VOCAL:

  
MC. José Luis Corona Medina

VOCAL:

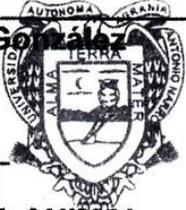
  
Dr. Ramiro González Avalos

VOCAL SUPLENTE:

  
MC. Ramón Alfredo Delgado González

  
MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

  
Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

AGOSTO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efectividad antimicrobiana de *Artemisia ludoviciana*, (Estafiate) sobre cepas de E. coli aisladas de becerros con síndrome diarreico post-natal

POR  
JORGE ALBERTO ANCHONDO REGALDO

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

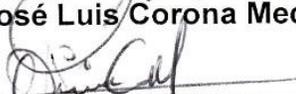
ASESOR PRINCIPAL:

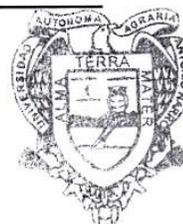
  
MC. Margarita Yolanda Mendoza Ramos

ASESOR:

  
MC. José Luis Corona Medina

ASESOR:

  
M.C. Olivia García Morales



  
MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TORREÓN, COAHUILA

AGOSTO DE 2016

## AGRADECIMIENTOS

**A mi madre,** Lucy Regalado Marin por su apoyo desde el día uno, que me dio la vida hasta la fecha, su apoyo ha sido incondicional a pesar de la distancia y mejor regalo de graduación no pude haber tenido. Gracias por confiar en mi madre.

**A mi padre,** Jorge Alberto Anchondo Medrano por su apoyo en todo lo largo de mi carrera y mi formación académica, y permitirme convertirme en un profesional, por ustedes soy lo que soy.

**A mis hermanos y hermanas,** Ivon Anchondo especialmente por ser parte de mi familia y tener tanta esperanza y fe en mí, gracias por tu apoyo, regaños y consejos.

**A mi familia,** familia Anchondo, fam. Regalado, fam. Núñez, fam. Chacon, fam. Meza, a cada uno de ustedes que durante lo largo de mi vida, carrera y trayectoria se preocuparon por mí y se tomaron el tiempo por un par de palabras solo para mi bien, jamás se olvida de quien lo ayuda a uno cuando más lo necesita y muchos estuvieron presentes.

**A mi novia,** Margarita Cano Lerma por ser mi acompañante y novia durante esta etapa de mi vida apesar de tantas altas y bajas.

**Mis amigos,** y compañeros de universidad con los cuales pase el mayor de mi tiempo.

**Familia Monsiváis Nuño,** Leonardo Monsiváis Núñez, Leonardo Monsiváis, Carlos Monsiváis, Lily Cepada y Janeth Valencia le agradezco a dios por haberlos puesto en mi camino durante mi vida profesional gracias por su apoyo incondicionalmente.

**Sra. Angélica Nuño,** como un hijo adoptivo sabría lo orgullosa que se hubiera sentido de mí, Dios la tenga en su santa gloria. Gracias por la oportunidad que me dio de convivir con usted, y a cada una de las personas que hoy en día se nos han adelantado y prometí este logro, nos vemos pronto. DEP.

**A todos los maestros,** M.C Margarita Mendoza Ramos, M.C José Luis Corona, M.C Ramiro Avalos Gonzales y M,C Ramón Delgado Gonzalez y a todos los profesores de la UAAAN-UL que contribuyeron en mi formación académica y aportaron su granito de arena en esta Institución para darme la oportunidad de ser profesional.

## DEDICATORIAS

**A mi padres**, Lucy Regalado Marin y Jorge Alberto Anchondo que día con día su apoyo fue incondicional durante mi vida y mi vida profesional.

**A mis hermanos**, Julián Moreno y Andrés Anchondo que dios les volvió a prestar la vida para acompañarme un tiempo más. Pronto estaremos todos juntos.

**A toda mi familia**, gracias a todos por sus consejos, toda su ayuda y su apoyo, mil gracias a todos los que estuvieron en su momento y los que siguen estando conmigo.

## Resumen

La diarrea de terneros es una fuente importante de pérdidas económicas a la industria ganadera y es la principal causa de mortalidad de terneros láctantes siendo la causa más importante de morbilidad en el ganado vacuno de carne en la mayoría de los países. *Escherichia coli* es un patógeno importante en los terneros recién nacidos capaz de causar cuadros diarreicos agudos debido a su mecanismo de producción de enterotoxinas, como su mecanismo de adherencia al epitelio intestinal que interrumpe la integridad y funcionamiento de las microvelocidades intestinales. Se aislaron 28 cepas de *E. coli* a partir de 109 muestras de diarrea en becerros neonatos clínicamente enfermos en la Región Lagunera que comprende los estados de Coahuila y Durango. Dichas cepas fueron sometidas a prueba de inhibición de crecimiento frente a distintas diluciones de un extracto alcohólico de *Artemisia ludoviciana* (Estafiate) *in vitro*, con el fin de encontrar un remedio natural para controlar las diarreas producidas por *E. coli* en las becerras. Debido a la resistencia antimicrobiana que los microorganismos han adquirido con el lapso del tiempo, el uso inapropiado de agentes antimicrobianos y la tendencia del mercado hacia la no utilización de antibióticos, se ha sugerido el uso de productos herbolarios o naturales para el control de varias enfermedades infecciosas a nivel mundial tanto en humanos como en animales domésticos especialmente los productos animales de importancia para consumo humano. *Artemisia ludoviciana* o nombre común "Estafiate" pertenece la familia Asteraceae y se encuentra ampliamente distribuido en el hemisferio norte. Es empleado para el tratamiento de disentería, parásitos, dolor abdominal y diarreas en humanos. Debido a sus metabolitos secundarios y componentes volátiles se han documentado como agente anti-protozoario y antimicrobiano así mismo su propiedades anti-diarreica ha sido ampliamente documentada en ratones. La conclusión de esta investigación es que el efecto bactericida de la *Artemisia ludoviciana* es sumamente bajo en extractos alcohólicos, se sugiere probar con la extracción de aceites para mejorar dicho efecto.

**PALABRAS CLAVE:** *E. coli* Enterotoxigenica, plantas medicinales, Síndrome Diarreico Neonatal, Estafiate

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>IV</b>
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>2</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>2</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>5. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
5.1 <i>ARTEMISIA LUDOVICIANA</i> .....	3
5.1.1 Usos .....	4
5.1.2 Componentes principales de <i>Artemisia ludoviciana</i> (Estafiate) .....	4
5.1.3 Resistencia antimicrobiana ante agentes causales .....	5
5.2 PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSANTE DE SÍNDROME DIARREICO EN TERNEROS .....	6
5.3 IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE DIARREAS EN TERNEROS .....	6
5.4 DIARREA POR <i>E. COLI</i> EN TERNEROS. ....	7
5.4.1 Tipos y características de <i>E. coli</i> .....	8
5.4.1.1 <i>E. coli</i> Enterotoxigenica (ETEC):.....	8
5.4.1.2 <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC) .....	8
5.4.1.3 <i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC).....	9
5.4.1.4 <i>E. coli</i> Enterohemorrágica(EHEC) o Verotoxigenica (VTEC) .....	9
5.4.1.5 <i>E. coli</i> Enteroadherente (EAEC) .....	9
5.4.2 Principales <i>E. coli</i> aisladas en bovinos. ....	9
5.4.3 Epizootiología .....	10
5.4.4 Signos en diarrea por <i>E. coli</i> .....	11
5.4.5 Lesiones en diarrea por <i>E. coli</i> .....	12
5.4.6 Factores Predisponentes .....	12
5.4.7 Fisiopatología por <i>E. coli</i> .....	12
5.4.8 Colonización de <i>E. coli</i> .....	12
5.4.9 Adherencia de <i>E. coli</i> en epitelio intestinal.....	13
5.4.10 Diarrea secretora mediada de Toxina termo estable (STa) .....	13
5.5 Principales Métodos de Diagnostico .....	15
5.5.1 Cultivos de bacterias fecales .....	16
5.5.2 Pruebas ELISA .....	16

5.5.3 PCR.....	16
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
6.1 ELABORACIÓN DE TINTURA DE ESTÁFIATE ( <i>ARTEMISIA LUDOVICIANA</i> ).....	17
6.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. COLI</i> .....	18
6.3 PRUEBA DE SENSIBILIDAD .....	18
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>8 DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>9 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>10 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>23</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### CUADROS:

Cuadro 1: Composición de aceites esenciales de <i>Artemisia ludoviciana</i> .....	5
Cuadro 2: Serotipos de <i>E. coli</i> en animales.....	11
Cuadro 3: Comportamiento bactericida de diluciones alcohólicas de <i>Artemisia ludoviciana</i> frente a cepas de <i>E. coli</i> aisladas de becerras con diarrea.....	21

### FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Estructura antigénica de <i>E. coli</i> .....	8
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de acción <i>E. coli</i> K99.....	15
<b>Figura 3:</b> Porcentaje de <i>E. coli</i> aislados de terneras con diarrea en fincas de la Región Lagunera.....	20

## 1. INTRODUCCIÓN

Los efectos de extractos de plantas sobre las bacterias han sido estudiados por un gran número de investigadores en diferentes partes del mundo. Los vegetales y productos herbolarios son ampliamente explotados en la medicina tradicional y sus potencialidades curativas han sido bien documentadas. Alrededor del 61% de los nuevos medicamentos desarrollados entre 1981 y 2002 se basa en productos naturales y han tenido mucho éxito, especialmente en las aéreas donde han existido enfermedades infecciosas y cáncer. Sin embargo, las tendencias recientes muestran que la tasa de descubrimientos de nuevas entidades químicas está disminuyendo. Los productos naturales de plantas superiores pueden dar una nueva fuente de agentes antimicrobianos, con posibles nuevos mecanismos de acción (Bhalodia y Shukla, 2011).

Uno de los Extractos probado ante varios tipos de microorganismos es "Estafiate" o su nombre científico *Artemesia ludoviciana*, pertenece a la familia *Asteraceae* y se encuentra ampliamente distribuida en el hemisferio norte (Zavala-Sanchez *et al.*, 2002). Los principales constituyentes de muchas de estas plantas medicinales son compuestos fenólicos (terpenoides y fenilpropanoides) como timol, carvacrol o eugenol, de los cuales las actividades antimicrobianas y antioxidantes están bien documentadas (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

La diarrea neonatal de terneros es una fuente importante de pérdidas económicas en la industria ganadera y es la principal causa de mortalidad de terneros lecheros y una causa importante de morbilidad en ganado de carne en la mayoría de los países. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos estima que el 7.8 % de novillas lecheras mueren entre el día dos de la vida y el destete, siendo en la mayoría de los casos muerte por diarrea u otros problemas digestivos (Goodell *et al.*, 2012). Se estima que la mortalidad de terneros y los costos de tratamiento representan una enorme pérdida económica para la industria láctea, que se estima superan los \$ 250 millones de dólares al año en los Estados Unidos (Ahmed *et al.*, 2009).

Los microorganismos clínicamente dañinos pueden ser controlados con antibióticos que pueden provocar la aparición de bacterias resistentes a los fármacos, lo cual ha llevado

a situaciones clínicas alarmantes en el tratamiento de infecciones. Las industrias farmacológicas han producido una serie de nuevos antibióticos provocando un aumento en la resistencia microbiana de dichos microorganismos. En general, las bacterias tienen la capacidad para transmitir y adquirir resistencia a los fármacos sintéticos que se utilizan como agentes terapéuticos (Bhalodia, 2011). El desarrollo de resistencia a los medicamentos y la aparición de efectos secundarios no deseables de ciertos antibióticos (publicación de la OMS 2001 ) han llevado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, principalmente entre los extractos de plantas, con el fin de encontrar nuevas estructuras químicas para superar las desventajas antes mencionadas (Soberon et al. 2007).

## 2. Objetivo

Evaluar *in-vitro* el efecto bactericida de extractos de *Artemisia ludoviciana* sobre cepas de *E.coli* aisladas de muestras diarreicas de terneras.

## 3. Hipótesis

*Artemisia ludoviciana* debido a sus componentes esenciales tiene un efecto antimicrobiano sobre patógenos causantes de la diarrea neonatal en terneras principalmente *E. coli*.

## 4. Justificación

La población de bovinos en territorio nacional se incremento año con año, debido a su importancia en el sector Agropecuario y la demanda de productos a nivel mundial de dicho origen. Se ha registrado en el año 2005 una población de 30,989, 968 cabezas de ganado en todo el territorio Mexicano, llegando a un incremento para el año 2014 de 32,939,629 cabezas, las cuales 2,430,581 están dedicadas a la producción láctea y sus derivados, siendo el resto 30,508,948 bovinos de carne. Tan solo en la Región Lagunera que comprende Gómez Palacio y Cd. Lerdo ambos correspondientes al Estado de Durango, Torreón y Matamoros pertenecientes al estado de Coahuila existe una población de 598, 196 cabezas, siendo una de las mayores cuencas lecheras a nivel nacional (SAGARPA, 2014).

Debido al alza de población a nivel nacional de ganado bovino, al igual se ha visto incrementada la población de terneros, ya que en ambas explotaciones tanto de leche como de carne la principal finalidad es la producción de terneras para remplazo o ventas respectivamente. La incidencia de la Diarrea Neonatal en el sistema de cría de bovinos es de un 45%, pudiendo superar el 60%, llegando la mortalidad en algunos casos al 20%. Esto conlleva a un aumento en los gastos por tratamiento veterinario, un incremento en la mano de obra y tiempo dedicado por la especial atención que se le debe dar a los rodeos afectados. Es importante saber que el ternero enfermo padecerá un retraso en el desarrollo corporal, perjudicando tanto en su peso al destete como en una futura producción láctea (Butler, 2012). Se ha reportado que los terneros que presentaron signos diarreicos antes del día 28 de vida pesaron 16.0 kg menos que los terneros que permanecieron sanos (Paourjafar *et al.*, 2011).

*Escherichia coli* es un patógeno importante en los recién nacidos de la especie bovina, capaz de causar infecciones intestinales y extraintestinales. Cepas de *E. coli* bovina pueden producir toxinas Shiga, enterotoxina termolábil (LT) o térmicamente estables (ST). La infección mediante *E. coli* (ETEC), resulta en las secreciones diarreicas debido a la acción de una o más enterotoxinas, y puede conducir a la deshidratación y la muerte (Rigobelo *et al.*, 2006).

Debido a la resistencia antimicrobiana de dichos microorganismos causantes de diarreas en neonatos bovinos y el uso inapropiado de antibióticos como terapia de tratamiento ante dicho problema, incluso a la tendencia de producción futura en el cual se está limitando el uso de antimicrobianos para combatir enfermedades infecciosas, se ha sugerido el uso de productos naturales utilizando sus componentes principales como tratamiento y control de diversas enfermedades infecciosas. (Berge *et al.*, 2008)

## **5. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **5.1 *Artemisia ludoviciana***

*Artemisia ludoviciana* o también conocido por su nombre común "Estafiate", es una hierba que puede medir hasta un metro de altura, sus hojas contienen una pubescencia

en el envés y muy aromáticas al estrujarse; sus flores son de color amarillo. El clima cálido y seco es considerado como su hábitat principal, mediante una propagación por semilla y disponible durante todo el año ya sea por medio cultivado o silvestre (Jimenez Merino, 2011).

Es considerada como una de los más grandes géneros de *Asteraceae*, que se encuentra ampliamente distribuida en el hemisferio norte. La mayoría de sus especies son aromáticos y el rendimiento de los aceites esenciales de uso en perfumería y medicina (Zavala-Sanchez *et al.*, 2002).

#### 5.1.1 Usos

Se emplea para el tratamiento de la diarrea, la disentería, parásitos, dolor abdominal, vómitos y dolor de estómago. Además, se utiliza como agente antiespasmódico. Por otra parte, debido a sus propiedades antiespasmódicas, se determinó su efecto vasodilatador sobre su actividad relajante del endotelio intacto y anillos del endotelio de aorta de rata, y modo de acción y en los anillos traqueales (Estrada-Soto *et al.*, 2012).

#### 5.1.2 Componentes principales de *Artemisia ludoviciana* (Estafiate)

Las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, tales como taninos, terpenoides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, etc., que se han encontrado in vitro que tienen propiedades antimicrobianas (Bhalodia, 2011).

Los componentes volátiles de las hojas de *A. ludoviciana* de EE.UU. y México fueron identificados previamente por cromatografía de gases y espectrometría de masas como: alfa-pineno, canfeno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, nonanal, linalol, carvacrol y para- alfa-dimetilbencilo alcohol. Los componentes volátiles identificados representaron el 71 a 98.8 % de la composición de los aceites. Los aceites contienen altas cantidades de monoterpenos oxigenados (48.8-75.6 %), con 1.8-cineol y alcanfor siendo los más representativos. Canfeno y alphapinene fueron los componentes dominantes en las fracciones de hidrocarburos monoterpenos. Este último aceite también se caracterizó por un alto contenido de los sesquiterpenos oxigenados (17,8 %) (Lopes-Lutz *et al.*, 2008), como se reafirma en (Zavala-Sanchez *et al.*, 2002). Cuadro 1.

Cuadro 1: Composición de aceites esenciales de *Artemisia ludoviciana* (Zavala-Sanchez *et al.*, 2002)

Retention time (min)	Compound	Composition (%)	Retention time (min)	Compound	Composition (%)
8.85	Ocimene	0.8	15.38	Thymol	1.3
9.20	Eucalyptol	0.7	16.72	Eugenol	0.3
10.27	Linalool	14.9	18.30	C-12 aldehyde	1.0
10.51	C-9 Aldehyde	4.6	19.63	$\alpha$ -Tujone	1.5
11.43	Camphor	44.9	20.42	Acetyl eugenol	1.7
12.33	<i>p</i> - $\alpha$ -Dimethylbenzyl Alcohol	15.5	21.45	Glyceryl Butirate	1.6
12.86	Methyl carvacrol	1.4	21.77	Nerolidol	1.9
13.60	$\alpha$ -Terpineol	1.2	22.33	$\alpha$ -Phellandrene	0.2
15.64	Borneol	0.9	26.09	Benzoyl Benzoate	0.8
15.02	Carvacrol	4.7			

Como se ha demostrado el Nonanal es uno de los componentes principales de *Artemisia ludoviciana* se ha encontrado que nonanal inhibe el efecto de sulfato de magnesio. Estos hallazgos sugieren mecanismos distintos de la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas también debe ser considerado como una serie de factores que contribuyen a las funciones del intestino. Este compuesto mostró un alivio sintomático de la diarrea inducida químicamente. Nonanal se utiliza como agente aromatizante. Sin embargo, esta es la primera vez que la actividad anti-diarreica de este compuesto ha sido reportado (Zavala-Sanchez *et al.* 2002).

### 5.1.3 Resistencia antimicrobiana ante agentes causales

Los microorganismos clínicamente dañinos pueden ser controlados con medicamento, especialmente antibióticos cuando existe sospecha de procedencia bacteriana, estos resultados provocan la aparición de bacterias resistentes a los fármacos, lo cual ha llevado a situaciones clínicas alarmantes en el tratamiento de infecciones. Las industrias farmacológicas han producido una serie de nuevos antibióticos provocando un aumento en la resistencia microbiana de dichos microorganismos. En general, las bacterias tienen la capacidad para transmitir y adquirir resistencia a los fármacos sintéticos que se utilizan como agentes terapéuticos (Bhalodia, 2011).

Los antibióticos son ocasionalmente asociados con efectos adversos para el huésped, incluyendo hipersensibilidad, supresión inmune y reacciones alérgicas. Estos acontecimientos exigen que se haga un esfuerzo renovado para buscar agentes antibacterianos eficaces contra las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos

actuales. Una estrategia posible es la localización racional de los productos bioactivos a partir de medicinas populares, con la esperanza de que el cribado sistemático de éstos resultará en el descubrimiento de nuevos compuestos eficaces con actividades potentes y útiles contra los microbios. Existe una demanda cada vez mayor de productos terapéuticos basados en plantas, tanto en países desarrollados como en subdesarrollados, para su uso en el ámbito de medicina humana como medicina veterinaria. Debido a un creciente reconocimiento de que son productos naturales, no narcóticos y, en la mayoría de los casos, son fácilmente disponibles y con precios accesibles (Ghosh *et al.*, 2008).

Además, el desarrollo de resistencia a los medicamentos y la aparición de efectos secundarios no deseables de ciertos antibióticos (publicación de la OMS 2001 ) han llevado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, principalmente entre los extractos de plantas, con el fin de encontrar nuevas estructuras químicas para superar las desventajas antes mencionadas (Soberon *et al.*, 2006).

### **5.2 Principales agentes etiológicos causante de Síndrome Diarreico en terneros**

La diarrea en terneros puede ser causada por una variedad de patógenos incluyendo bacterias, virus, protozoos y parásitos intestinales. Entre las bacterias, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Salmonella* son conocidos por ser los agentes más comunes y económicamente importantes, y también han sido identificados como causa de la enfermedad entérica y diarrea en terneros. En la diarrea neonatal aguda, una importante enfermedad de los terneros, cuatro microorganismos, en particular, son de ocurrencia generalizada y con enteropatogenicidad probada: rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* y entre ellas *E. coli* enterotoxigénica (Acha *et al.*, 2004).

### **5.3 Importancia de la presencia de diarreas en terneros**

La diarrea neonatal de terneros es una fuente importante de pérdidas económicas a la industria ganadera y es la principal causa de mortalidad de terneros lactantes y una causa importante de morbilidad en ganado de carne en la mayoría de los países. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos estima que el 7,8 % de novillas lecheras mueren entre los días 2 de la vida y el destete, con la mayoría de las muertes por diarrea u otros problemas digestivos. La diarrea de ternera tiene los costes anuales

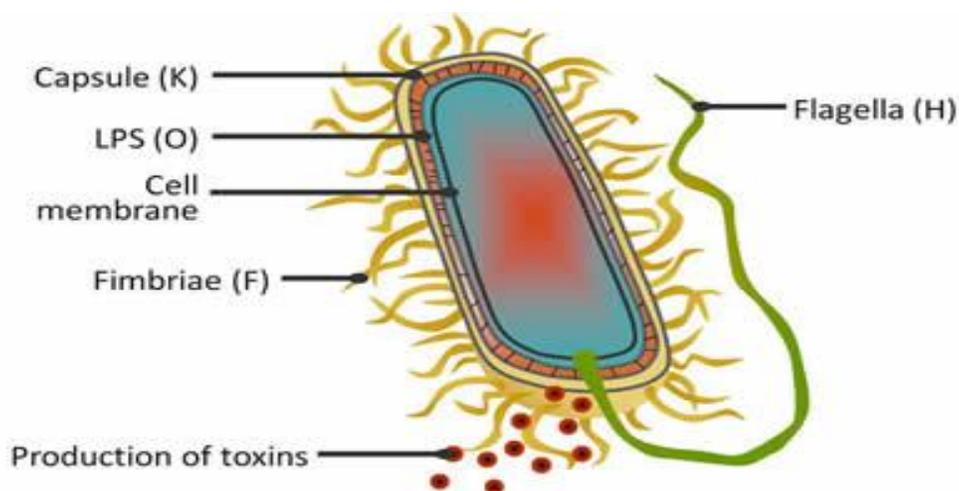
más altas por el tratamiento y control de cualquier enfermedad en el ganado lechero de los Estados Unidos, superior a los costes de tratamiento y control de la mastitis, enfermedades respiratorias, o cojera (Goodell *et al.*, 2012).

Existe una importante tasa de mortalidad debido a que una diarrea en los terneros recién nacidos puede conducir a la deshidratación, acidosis, hiperpotasemia lo cual conlleva al deterioro de la función, cardiovascular y renal, y con ello la muerte (Goodell *et al.*, 2012) Se estima que la mortalidad de terneros y de los costos de tratamiento representan una enorme pérdida económica para la industria ganadera, que se estima superar los \$ 250 millones de dolares al año en los Estados Unidos (Ahmed *et al.*, 2009).

#### 5.4 Diarrea por *E. coli* en terneros.

Aunque es un patógeno potencial, *E. coli* es un habitante normal del tracto gastrointestinal de la mayoría de los animales de sangre caliente y una de las representantes más comunes de la microbiota aerobia gram negativa (De Verdier *et al.*, 2012).

La infección o colonización excesiva por *E. coli* produce en los 10 primeros días de vida la colibacilosis o enfermedad de la diarrea blanca de los terneros. *E. coli* posee varios antígenos mayores: antígeno "O" (pared celular), "H" (flagelar), "K" (capsular), y "F" (fimbriales). Las diversas combinaciones de estos forman más de 1.000 tipos antigénicos de *E. coli* (Hoet *et al.* 2005). Ver figura 1.



## Figura 1: Estructura antigénica de *E. coli*

### 5.4.1 Tipos y características de *E. coli*

Tradicionalmente las cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea se han dividido en cinco grupos: Enterotoxigenica (ETEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteropatogena (EPEC), Enteroadherente (EAEC) y Enterohemorrágica (ECEH) (Valdivia Anda *et al.*, 2000).

#### 5.4.1.1 *E. coli* Enterotoxigenica (ETEC):

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es una causa importante de la colibacilosis en terneros recién nacidos que se caracteriza por diarrea profusa líquida blanco-amarillenta, la deshidratación y la depresión. Para causar la enfermedad diarreica en los terneros recién nacidos que se ha caracterizado y se encontró que está estrechamente relacionado con la toxina del cólera funcional y estructuralmente, y la enterotoxina termoestable (ST). Hay dos subtipos de ST: STa y STb. STa se asocia con la enfermedad en los seres humanos y animales y tiene una masa molecular pequeña (2 kDa) considerada poco inmunogénica, por lo tanto, no se espera que la inmunidad puede desempeñar un papel en la protección de los terneros recién nacidos contra esta enfermedad diarreica (Al-Majali *et al.*, 2000).

#### 5.4.1.2 *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)

El grupo EIEC y *Shigella* spp están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea (Rodríguez-Angeles, 2002).

La colibacilosis enteroinvasiva es rara en los animales domésticos, pero cuando se relaciona con la colibacilosis sistémica, frecuente en los rumiantes, se debe a cepas invasivas de *E. coli* que llegan a los tejidos y la circulación general por medio de la luz del intestino (Rodríguez Vivas, 2005).

#### **5.4.1.3 *E. coli* Enteropatógena (EPEC)**

EPEC induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (adherencia y eliminación). La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocitó. Para fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: a) adherencia inicial, b) inyección de factores y transducción de señales, y c) contacto íntimo (Vidal *et al.*, 2007).

#### **5.4.1.4 *E. coli* Enterohemorrágica(EHEC) o Verotoxigenica (VTEC)**

La producción de verotoxinas (Stx1 y STx2) con capacidad de destruir células eucariotas, representan el principal mecanismo de patogenicidad, estas cepas no producen toxina termoestable(ST) ni termolábil (LT) y no son invasivas (Valdivia Anda *et al.*, 2000).

#### **5.4.1.5 *E. coli* Enteroadherente (EAEC)**

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa, la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se auto aglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea (Rodríguez-Angeles, 2002).

EAEC tiene la propiedad de colonizar el intestino delgado no produciendo una enterotoxina reconocida, pero se relaciona con la atrofia de las vellosidades intestinales, cabe destacar que se discute su presencia en los animales domésticos (Rodríguez Vivas, 2005).

#### **5.4.2 Principales *E. coli* aisladas en bovinos.**

Es común que la diarrea neonatal sea más el resultado de una infección combinada de diferentes enteropatógenos que la infección con un solo agente, siendo muy importante *Escherichia coli* enterotoxigénica cepa F5 (K99) y F41. También se encuentran involucrados patógenos como la *Escherichia coli* verotoxigénica (O157:H7) causal de enterocolitis en terneros (Baquero-Parrado, 2008). La prevalencia de *E. coli* O157 en el ganado es variable entre rebaños y animales individuales, con un rango en el ganado

estabulado del 10 al 28%, pudiendo ser tan elevada como el 80% en los meses de verano (Castillo Cuenca *et al.*, 2011).

La causa más común de la diarrea neonatal producida por *E. coli* es por cepas ETEC K99 (F5) (comúnmente conocida como *E. coli* K99) debido a su mecanismo de patogenicidad produciendo una enterotoxina termoestable. (Cho y Yoon, 2014) Al igual se compara y se muestra en la (tabla 4) los principales serotipos de *E. coli* comunes para terneros (Rodríguez Vivas, 2005) menciona que los principales serotipos encontrados son: O8:K85:F5(K99), O101:K30:F5(K99), O101:K32:F5(K99). O101:K28:F5(K99) y O20:K104:F5, lo cual es confirmado por (Vadillo *et al.*, 2002).

### 5.4.3 Epizootiología

*E. coli* puede sobrevivir en el medio ambiente en heces, polvo y agua durante semanas y meses. Su distribución es mundial y se presenta sobre todo en explotaciones de tipo de ganado, donde la morbilidad en becerros puede llegar hasta un 75% y la mortalidad entre 10 y 50%. La *E. coli* es más común en animales recién nacidos (2 a 10 días de edad) aunque puede ocurrir entre 12 y 18 horas de nacido y ocasionalmente en becerros hasta las 3 semanas de edad (Hoet *et al.* 2005).

**Tabla 2:** Serotipos de *E. coli* en animales

Serotipos de <i>E. coli</i> diarreagénicas para los animales			
Porcinos	Rumiantes (Bovinos y Ovinos)	Perros	Conejos
<b>ECET Y ECVT</b>	<b>ECET</b>	<b>ECET</b>	<b>ECEP</b>
O8:K85:H2	O8:K25,K85,K208	O4	O2:H6
O8:K87:	O9:K30,K35,K37	O5	O15:H-
O8:K201:H6,H9.H14	O20	O6	O20:H7
O8:K-:H11	O64:K-	O8	O26:H11,H-

O8:K48:H31	O101:K27,K28,K30	O17	O49:H2
O8:K103:H-		O20	O92:H2
O20:K101:H-		O23	O103:H2
O45:		O25	O109:H2,H7
O64:K:-H-	<b>ECVT</b>	O42:H37	O110:H6
O101:K30:H9	O5:H-	O70:H-	O119:H2
O101:K:-H9	O8:H8.H9	O105	O126:H2,H-
O101:K103:	O20:H19		O128:H2,H-
O138:K81:H14,H-	O26:H11	<b>ECEP</b>	O132:H2
O139:K82:H1	O103:H2	O45	O153:H7
O141:K85:H4,H-	O111:H8,H11,H-	O49:H10	
O141:K87	O118:H16	O115	
O147:K8:	O145	O118:H-	
O147:K89			
O149:K89			
O149:K91:H10,H19			
O157:K:-H7,H43			

(Vadillo *et al.*, 2002).

#### 5.4.4 Signos en diarrea por *E. coli*

Los signos en diarrea por *E. coli* varían desde la diarrea ligera con curación espontánea resultante hasta los síndromes sobreagudos caracterizados por diarrea y deshidratación que avanza hasta el shock en un tiempo de 4-12 horas. También varía la naturaleza y el color de las heces pero generalmente son voluminosas, acuosas, y de color amarillo, verde o blancas. Los casos sobreagudos pueden producir terneros débiles, deshidratados y comatosos en horas a partir del comienzo de la enfermedad. Las mucosas se encuentran secas, frías y pegajosas. En algunos casos sobreagudos, acompañan a los signos sistémicos, bradicardia y arritmia cardíaca que son consecuencia de la hipocalcemia (Rebhun, 1995).

En los casos agudos presenta una diarrea acuosa evidente, deshidratación progresiva y debilidad durante un periodo de 12-48 horas. Estos terneros pueden presentar fiebre de poco grado o temperatura normal y un empeoramiento del estado sistémico y del reflejo a la succión, teniendo como consecuencia una pérdida de condición corporal (Rebhun, 1995).

#### 5.4.5 Lesiones en diarrea por *E. coli*

Las lesiones producidas por cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas, ocurren principalmente en ciego y colon distal: con la presencia de erosiones y úlceras, histológicamente los enterocitos se presentan cuboides y no parecen existir predisposición particular por algún tipo de célula en la mucosa. También se puede observar edema extenso, erosiones, úlceras y hemorragias en otros sitios del tracto gastrointestinal (Valdivia Anda *et al.*, 2000).

#### 5.4.6 Factores Predisponentes

ETEC depende de varios factores, la primera es la exposición al microorganismo y la ingestión del organismo. Una vez ingerido, ETEC debe sobrevivir el pH ácido del abomaso. Esto se facilita en terneros neonatos debido a que el nivel de pH de su abomaso varía de aproximadamente 6-7, lo que permite la supervivencia de ETEC. El pH del abomaso disminuye a 2 para los 5 días de edad, que es lo suficientemente bajo como para matar cepas de ETEC (Foster y Smith, 2009).

#### 5.4.7 Fisiopatología por *E. coli*

Los terneros recién nacidos son más susceptibles a la infección por ETEC durante los primeros cuatro días después del nacimiento y desarrollan diarrea acuosa si están infectados. Después de la ingestión, ETEC infecta el epitelio intestinal y se multiplica en los enterocitos de las vellosidades intestinales. La porción distal del intestino delgado ofrece el entorno más favorable para la colonización de ETEC debido al pH bajo (menos de 6,5). Existe atrofia de las vellosidades debido a una pérdida de las células infectadas y el daño a la lamina propia, se observan comúnmente en el intestino delgado afectado. Las bacterias expresan el antígeno K99 para la unión, después de la colonización del epitelio intestinal, la producción de toxina termoestable inducida por ETEC conduce a la sobre regulación de la secreción de cloruro en el intestino. Esto desecha osmóticamente agua en el lumen intestinal y conduce al desarrollo de la diarrea secretora en los terneros (Cho y Yoon, 2014).

#### 5.4.8 Colonización de *E. coli*

Inmediatamente después del nacimiento, la exposición oral a coliformes fecales conduce a la colonización del intestino con el comensal de la flora normal, y estos organismos

continúan moviéndose en sentido caudal a través del tracto gastrointestinal con la ingesta. Si la contaminación del medio ambiente es alta, los organismos de ETEC son ingeridos en este mismo tiempo y son capaces de producir enfermedad causada por la presencia de dos factores de virulencia, fimbria K99 y la toxina termoestable (Foster y Smith, 2009).

#### **5.4.9 Adherencia de *E. coli* en epitelio intestinal**

La adherencia al epitelio intestinal permite que las bacterias se mantengan en el intestino delgado y se multiplican en lugar de ser eliminadas. Los estudios han demostrado que hasta un 80% de los organismos se adhieren en los terneros con diarrea por ETEC, en lugar de sólo el 10% a 20% en terneros normales. Esta unión es mediada por la presencia de antígenos fimbriales. Debido a que el antígeno K99 sólo se expresa en un nivel de pH del medio ambiente de menos de 6,5, el intestino delgado distal es el lugar inicial de la colonización. Esto es porque el nivel de pH del fluido aumenta a medida que se mueve en sentido caudal, y sólo alcanza este umbral en el íleon. La capacidad de K99 ETEC para unirse al epitelio del intestino delgado es dependiente de la edad y disminuye gradualmente de 12 horas de edad a las 2 semanas de edad. Sin embargo, no hay una caída en picada de la capacidad de unión que explicaría la resistencia a la edad de ETEC. La unión de ETEC permite que las bacterias colonicen el íleon, proliferen, y se extienden proximalmente a través del intestino delgado. Una vez establecido en el intestino, ETEC produce toxina termo- estable que conduce a la diarrea secretora (Foster y Smith, 2009).

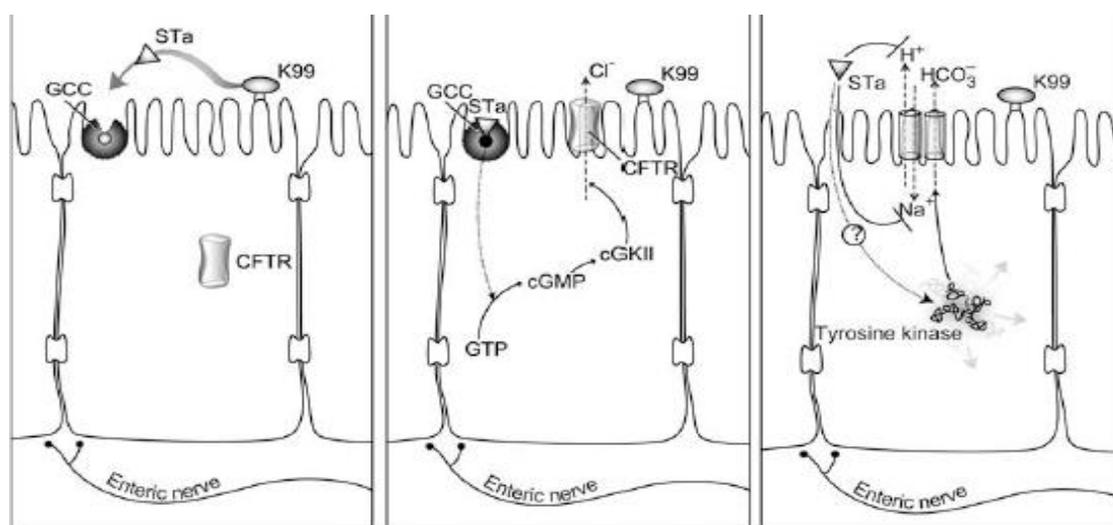
#### **5.4.10 Diarrea secretora mediada de Toxina termo estable (STa)**

Clásicamente, las discusiones mecanicistas de la diarrea secretora mediada por enterotoxina se han centrado en la toxina del cólera de *Vibrio cholerae* y la toxina termolábil (LT) de *E. coli*. Los modelos de diarrea humana tienen menos que ver con la diarrea secretora mediada por toxinas en las becerras debido a que la toxina termoestable (STa) de ETEC es el principal mediador. STa es un péptido de 18 o 19-amino-ácido que es secretada por muchas cepas de ETEC; sin embargo, la producción puede variar hasta 1000 veces entre cepas cuando se cultiva en condiciones idénticas. Después de ser secretada por *E. coli*, STa se une al receptor adenilato-c-ciclase (GCC), una enzima de la membrana del borde en cepillo que está presente a lo largo de las vellosidades y criptas. En contraste con los roedores y los seres humanos, en el que las

concentraciones de GCC disminuye en el intestino delgado distal, GCC está presente en todo el tracto gastrointestinal de los terneros y se concentra en el íleon. En ambos ratones y seres humanos, la densidad de este receptor disminuye después del nacimiento, y permanece presente en los cerdos hasta un máximo de 7 semanas de edad. No existe ninguna investigación específica sobre esto que detalle la expresión de GCC para las diferentes edades de los terneros, sin embargo, la inoculación con TSa induce diarrea en animales de hasta 15 días de edad. Esto indica que GCC está presente hasta por lo menos 2 semanas de edad y la baja regulación del receptor no es la razón de la resistencia dependiente de la edad a la diarrea por ETEC (Foster y Smith, 2009).

La unión de STa a GCC conduce a la producción intracelular de guanosin monofosfato cíclico (cGMP), que actúa como un segundo mensajero para activar cGMP dependiente de la proteína quinasa II (cGKII). Esta quinasa fosforilada CFTR, induce el movimiento de la proteína a la superficie celular y la activación, que a su vez conduce a la secreción de cloruro. Esta regulación de la secreción de cloruro desecha osmóticamente agua en el lumen intestinal, sobre pasando la capacidad de absorción de las vellosidades intestinales. El bloqueo de la CFTR disminuye drásticamente la secreción de fluido intestinal, lo que indica la importancia de esta proteína en la patogénesis de la diarrea por ETEC. Sin embargo, la secreción no está completamente impedido, lo que indica que STa puede tener efectos adicionales en el intestino delgado. Como se muestra en Figura 2

2



**Figura 2:** Mecanismo de acción *E. coli* K99

La investigación adicional ha demostrado que STa puede inducir la secreción de bicarbonato a través de una tirosina quinasa que es independiente de la vía, cGMP, CFTR, GCC, y este bicarbonato secretado puede actuar como un agente osmótico para extraer agua en el lumen del intestino. Se ha propuesto un modelo opuesto de la diarrea inducida STa que no se basa en la secreción de líquido causada por el movimiento de cloruro o bicarbonato, sino que es causada por una disminución de la absorción de líquido. Además de la activación del CFTR y la.

Este fracaso de la absorción de sodio reduce el movimiento de fluido desde el lumen intestinal al espacio intersticial. La importancia de este mecanismo de la diarrea en terneros producida por ETEC se desconoce porque esto se ha demostrado más concluyente en el yeyuno y el duodeno proximal de modelos de roedores. Similar a la expresión de K99, la producción de STa es dependiente del pH. Cuando el pH del medio ambiente es menor que 7.0, la producción de toxina está severamente limitada. Por lo tanto, la producción de toxina se maximiza en el intestino delgado distal debido a que el nivel de pH es mayor en este segmento. Aunque no se ha investigado directamente, se puede teorizar que la secreción mediada por STa de bicarbonato y la inhibición del intercambiador de Na<sup>+</sup>-H tendría el efecto neto de alcalinizar el intestino delgado proximal. Esto crearía un entorno más acogedor para ETEC promoviendo su difusión en el intestino delgado proximal (Foster y Smith, 2009).

### **5.5 Principales Métodos de Diagnostico**

El diagnóstico de las *E. coli* diarreogénicas es difícil. Se basa en el aislamiento de la bacteria en el coprocultivo, criterios bioquímicos, identificación de serotipos/serogrupos y sobretodo la identificación de factores de virulencia específicos de cada bacteria (ej. toxinas, genes de adherencia, de invasividad). Hoy en día, la identificación basada únicamente en la determinación de los serotipos, no es del todo correcta, pues muchas de estas bacterias pueden intercambiar material genético y con ello genes de virulencia que sí determinan su patogenicidad. Para el diagnóstico de STEC los laboratorios clínicos usan las placas de MacConkey-sorbitol y la determinación de las toxinas Shiga usando pruebas comerciales como ELISA y aglutinación en látex (Nataro y Kaper, 1998).

### 5.5.1 Cultivos de bacterias fecales

Es el método de laboratorio de uso general para el aislamiento y la identificación de patógenos bacterianos en heces y el contenido intestinal. Con el fin de evitar cualquier contaminación o pérdida de viabilidad cruzada, las heces deben recogerse directamente de los terneros diarreicos utilizando hisopos rectales o estimulación rectal. Una vez recogidas, las muestras fecales se deben almacenar en un medio de transporte o contenedor especial de materia fecal en un refrigerador. Agar sangre, Agar MacConkey, Agar MacConkey con sorbitol, y placas de xilosa lisina desoxicolato (XLD) son utilizadas para el cultivo bacteriano. Varios tipos de medios enriquecidos y selectivos tales como la infusión de cerebro y corazón (BHI) debido a que es un medio altamente nutritivo para uso como agar general. El agar sangre es utilizado con mayor frecuencia debido a que la mayoría de las bacterias puede crecer en este medio. El agar MacConkey se utiliza selectivamente para cultivos de bacilos gram negativos que comúnmente están presentes en el tracto gastrointestinal. El agar MacConkey -sorbitol puede ayudar a distinguir *E. coli* no patógenas de *E. coli* O157:H7 que no puede fermentar el sorbitol (Cho y Yoon, 2014).

### 5.5.2 Pruebas ELISA

Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Nataro y Kaper, 1998).

### 5.5.3 PCR

Reacción en cadena de la polimerasa es actualmente la técnica, capaz de detectar los genes de patogenicidad más representativos de ETEC, EIEC, EPEC, EHEC, VTEC y

EAEC así mismo como los genes específicos de los pilis, adhesinas y toxinas (Rodriguez Vivas, 2005).

Técnicas de PCR convencionales para la investigación de *E. coli* diarreogénicas han sido relatadas, pero, la investigación de los aislados bacterianos requiere un gran número de reacciones individuales para la detección de 20 distintos factores de virulencia, lo que la vuelve laboriosa. Para reducir el número de test necesarios para la identificación, han sido desarrollados varios sistemas de PCR de detección múltiple (multiplex) para la amplificación simultánea de dos o más loci en una única reacción (Fusco da Costa *et al.*, 2010).

## 6 Materiales y Métodos

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Diagnóstico de Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicado en la Ciudad de Torreón, Coahuila C.P. 27059 con dirección Periférico Raúl López Sánchez Km 2 y Carretera a Santa Fe, durante el periodo enero-diciembre del año 2015. Se recolectaron un total de 109 muestras de heces provenientes de Becerras de la Raza Holstein con edades entre 2-30 días de edad, con signos clínicos de diarrea y sin tratamientos previos en sistema intensivo de jaulas individuales. Las muestras fueron tomadas de seis establecimientos ganaderos dedicados a la producción láctea de la Región de la Comarca Lagunera que comprende Torreón, Gómez Palacio y Matamoros.

### 6.1 Elaboración de Tintura de Estáfiate (*Artemisia ludoviciana*)

*Artemisia ludoviciana* o "Estafiate" fue recolectado en Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua a nivel de traspatio, lo cual indica su fácil crecimiento en cualquier parte del territorio norte del País. Un total de 7.2<sub>gr</sub> se utilizaron para la elaboración de la tintura. Las partes aéreas de la planta fueron reducidas de tamaño manualmente hasta llegar a tamaño de 1cm x 1cm. Se decidió elaborar los extractos a base de tinturas de *Artemisia ludoviciana* usando las partes aéreas de la flor, utilizando alcohol y agua destilada (2:1) respectivamente, para la extracción de sus contenidos alcaloides. Dejando reposar por tiempo de 4 meses para después ser filtrado y obtener solo el material acuoso.

## 6.2 Aislamiento e identificación de *E. coli*

Se obtuvieron las muestras de heces por método de hisopado, introduciendo dos hisopos (sirviendo uno como control) en el recto y tomando muestra de heces para ser introducido en medio de transporte (Stuart: elaborado y esterilizado en Lab. Diagnostico UAAAN), previa limpieza de cavidad perianal para eliminar posible contaminación cruzada. Cabe destacar la presencia de agentes refrigerantes en transportadora térmica y evitando la posible pérdida de cadena fría. Las muestras de heces en medio de transporte fueron trasladadas en menos de 6 horas al Laboratorio de Diagnostico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Unidad Laguna ubicado en Periférico Raúl López Sánchez y carretera a Santa Fe. Se realizó la siembra directa de las muestras en Agar Sangre 5% (Posible crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas spp.* y *Bacillus cereus*), Agar McConkey (Posible crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena), Agar Salmonella-Shigella (Posible crecimiento de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*), EMB (Eosina y Azul de Metileno como método de diagnóstico para diferenciación de bacilos gram negativos entéricos) que permitieron la identificación de muestras positivas a *E. coli* fecal. Al igual se realizó un frotis de tinción gram directo de la muestra en laminillas. Después de siembra directa de cada muestra obtenida se puso a incubación a 37°C por 24 hrs.

Se tomó como referencia para muestras positivas para *E. coli* la presencia de colonias de color de rosa a rojo que pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis en Agar McConkey al igual que colonias de 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja en Agar EMB. Muestras positivas fueron almacenadas en tubos con 3ml de agar MacConkey horizontales y puesto en refrigeración, hasta concluir con dicha identificación de todas las muestras. Cabe destacar una resiembra de cada muestra en lapsos de cada 21 días, y así evitar pérdida de microorganismos positivos.

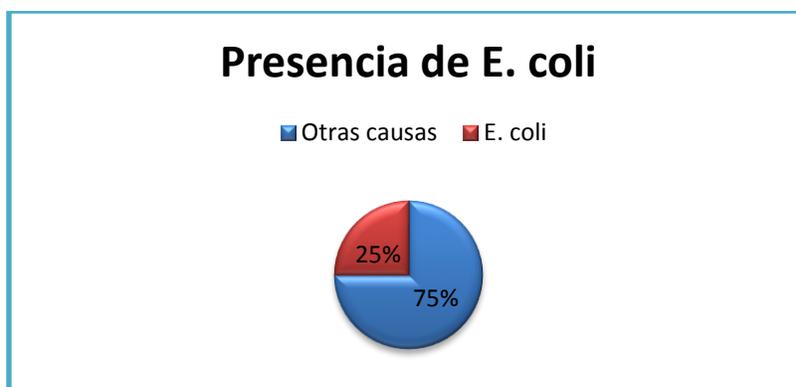
## 6.3 Prueba de sensibilidad

La prueba de sensibilidad al producto natural se llevó a cabo utilizando el método de difusión en agar. Se elaboraron cuatro diluciones diferentes de la tintura de estafiate utilizando agua destilada y la tintura elaborada. Se realizaron diluciones al 100, 75, 50 y

25% ubicados en diferentes tubos de ensayo e identificados correctamente, utilizando material previamente esterilizado. El ensayo de sensibilidad se realizo en placas de Agar Mueller- Hinton, Las superficies de los medios se inocularon con bacterias de las muestras confirmadas positivas a *E. coli*. Se colocaron los discos (elaborados en Unidad de Diagnostico con papel filtro impregnados con las cuatro diferentes diluciones que se elaboraron y puestos sobre el medio sólido y las placas se incubaron a continuación a una temperatura específica (37°C) por 24 h. Las zonas claras de inhibición formadas alrededor de los discos se midieron (mm).

## 7 Resultados

Un total de 109 muestras fueron utilizadas para el presente trabajo, calculando una incidencia de *E. coli* productora de diarrea con signos clínicos en becerras con menos de treinta días de edad de acuerdo a morfología colonial y tinción gram cumpliendo las características de crecimiento al igual que confirmación de bacilos gram negativos. Encontramos que un 25% (Veinte y ocho muestras) de las muestras fueron positivas a *E. coli* y solo un 3.6% (cuatro muestras) positivas a Salmonella en muestras recolectadas en la Región de la Comarca Lagunera que comprende de Gómez Palacios, Torreón y Matamoros. Mostrándose en Figura 3. Veinte y ocho muestras positivas a *E. coli* fueron sometidas a prueba de sensibilidad en diferentes diluciones de estafiate (25,50, 75 y 100%) donde después de incubar a temperatura de crecimiento 37.5°C se calculo el área de inhibición (mm). Los resultados mostraron solo dos muestras, en la dilución al 100% muestra una inhibición de 5mm, once muestras mostraron una No Inhibición(NI) mientras quince muestras solo 1mm de inhibición. Se puede observar la cantidades de inhibición por numero de muestra en tabla 3. Dando como resultado el rechazo de la hipótesis debido que no se obtuvo una inhibición significativa ante el crecimiento en cepas de *E. coli* aisladas de terneros presentando cuadros diarreicos ante diluciones de *Artemisia ludoviciana*.



**Figura 3:** Porcentaje de *E. coli* aislados de terneras con diarrea en fincas de la Región Lagunera.

No. de Muestra	DILUCIONES			
	25%	50%	75%	100%
2a	NI	NI	NI	NI
9r	NI	NI	NI	2mm
10r	NI	NI	NI	1mm
11r	NI	NI	NI	1mm
11a	NI	NI	NI	NI
12r	NI	NI	NI	NI
13r	NI	NI	NI	NI
13a	NI	NI	NI	5mm
14a	NI	NI	NI	NI
14r	NI	NI	NI	1mm
15r	NI	NI	NI	NI
16r	NI	NI	NI	NI

22r	NI	NI	NI	1mm
28a	NI	NI	NI	1mm
30a	NI	NI	NI	2mm
31r	NI	NI	NI	NI
34a	NI	NI	NI	2mm
37a	NI	NI	NI	2mm
38a	NI	NI	NI	2mm
41r	NI	NI	NI	1mm
42a	NI	NI	NI	1mm
43a	NI	NI	NI	1mm
46a	NI	NI	NI	NI
51a	NI	NI	NI	NI
53r	NI	NI	NI	2mm
54r	NI	NI	NI	5mm
54a	NI	NI	NI	1mm
55r	NI	NI	NI	1mm
<b>TOTAL: 28</b>				

**Tabla 3:** Comportamiento bactericida de diluciones alcohólicas de *Artemisia ludoviciana* frente a cepas de *E. coli* aisladas de becerras con diarrea.

## 8 Discusión

Las explotaciones ganaderas dedicadas a la producción de bovinos día con día se ven aumentadas en sus exigencias productivas, debido a que la demanda de sus productos y subproductos cada vez es superior por la poblaciones regionales, nacionales e internacionales. Las becerras en su inicio de vida son expuestas a múltiples factores de producción que conllevan al inicio de enfermedades infecciosas. La diarrea en terneras en sus primeras semanas de vida es un problema de rebaño sumamente importante que ocurre como consecuencia de la interacción de factores relacionados como la vaca, el ternero, el estado inmune, las prácticas de manejo, los factores ambientales y la infección con enteropatógenos. Se le ha atribuido a la causa de diarrea de los terneros una amplia variedad de patógenos como pueden ser bacterias (*E. coli* Enterotoxigenica K99, *Salmonella* spp), virus (Rotavirus y Coronavirus), protozoarios (*Cryptosporidium parvo*) y parásitos intestinales. Encontrándose una incidencia del 40% (22/55) de *E. coli* K99 en terneras clínicamente enfermas por diarrea y terneras clínicamente sanas (Acha

*et al.*, 2004). Así mismo resultados semejantes han sido dados a conocer en Australia donde se muestra una incidencia de *E. coli* K99 del 17.4%, 104 muestras positivas de 579 muestras, (Izzo *et al.*, 2011) siendo este patógenos uno de los de mayor incidencia e importancia en explotaciones lecheras. Los resultados de nuestra investigación muestran una incidencia del 25%(28/109) de *E.coli*, lo cual es similar a los estudios antes mencionados, a pesar que influyen varios factores, como son: el clima, el tipo de manejo, la genética, entre otros ocasionando que el rango de incidencia pueda ser muy variable entre las explotaciones.

Por otro lado las cepas de *E. coli* provenientes de terneros enfermos que se analizaron ante diferentes diluciones alcohólicas de *Artemisia ludoviciana* resultaron ser resistentes a las mismas, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por (García *et al.*, 2006) con cepas de *Vibrio colera* frente a extractos de *Artemisia ludoviciana*. y con los resultados obtenidos por Kalemba y Kusewicz que probaron extractos de aceites de *Artemisa* spp ante diferentes cepas bacterianas entre ellas *E. coli* que resulto ser sensible (Kalemba, Kusewicz *et al.* 2002).

Existe una amplia variedad de técnicas empleadas para la extracción de los componentes de las diferentes plantas utilizadas con finalidades medicinales. El empleo de otras técnicas para lograr extracción completa de sus contenidos, como lo son los aceites esenciales, pudiera ser la razón que nos llevara a lograr una mayor eficiencia del efecto bactericida del "Estafiate" y así lograr la inhibición de crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* ocasionantes de diarreas en terneros.

## 9 Conclusión

La utilización de extractos alcohólicos de la *Artemisia ludoviciana* para probar su efecto bactericida *in vitro* de patógenos causantes de diarrea aisladas de terneros clínicamente enfermos no fue suficientemente significativo, debido a que solamente se observo una inhibición del crecimiento de dos cepas de *E. coli* en extractos realizados al 100%, donde 18 muestras de 28 totales mostraron una inhibición de menos de 2 mm de diámetro alrededor del sensi-disco elaborado de papel filtro impregnado al 100% de dilución elaborada de estafiate. Al termino de esta investigación se puede concluir que los

extractos alcohólicos de *A. ludoviciana* no son lo suficientemente eficientes *in vitro* ante cepas de *E.coli* causantes de diarrea en terneras. Por lo cual no se recomienda para el control o eliminación de signos causados por *E.coli* una de la principal causa de mortalidad como lo es la diarrea en establecimientos ganaderos dedicados a la producción bovina. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que el empleo de otros tipos de extractos (aceites) de la misma planta pudieran tener mayor efecto bactericida.

## 10 Literatura Citada

- ACHA, S. J., KUHN, I., JONSSON, P., MBAZIMA, G., KATOULI, M. y MOLLBY, R. (2004) Studies on calf diarrhoea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. *Acta Vet Scand*, 45, 27-36.
- AHMED, A. M., YOUNIS, E. E., OSMAN, S. A., ISHIDA, Y., EL-KHODERY, S. A. y SHIMAMOTO, T. (2009) Genetic analysis of antimicrobial resistance in Escherichia coli isolated from diarrheic neonatal calves. *Vet Microbiol*, 136, 397-402.
- AL-MAJALI, A. M., ASEM, E. K., LAMAR, C. H., ROBINSON, J. P., FREEMAN, M. J. y SAEED, A. M. (2000) Characterization of the interaction of Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn calves. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 28, 97-104.
- BAQUERO-PARRADO, J. R. (2008) Diarrea neonatal indiferenciada en terneros: consideraciones sobre su prevención en campo. *Vet Zootec*, 2, 59-68.
- BERGE, A. C., TOHORNBERG, E., ADASKA, J. M. y MOELLER, R. B. (2008) Antimicrobial resistance in Salmonella enterica subspecies enterica serovar Dublin from dairy source calves in the central San Joaquin Valley, California (1998–2002). *J Vet Diagn Invest*, 20, 497-500.
- BHALODIA, N. R. y SHUKLA, V. J. (2011) Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of Cassia fistula L.: An ethnomedicinal plant. *J Adv Pharm Technol Res*, 2, 104-9.
- BUTLER, L. Diarrea Neonatal en Terneros.(INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) [Fecha de recuperación: Mayo 2016<<http://inta.gob.ar/documentos/diarrea-neonatal-en-terneros>>]
- CASTILLO CUENCA, J. C., SILVEIRA PRADO, E. A., MAYA GARCIA, M. y CEPERO RODRIGUEZ, O. (2011) Prevalencia de Escherichia coli enterohemorrágica en terneros lactantes de ganado lechero. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12, 1-6.
- CHO, Y.-I. y YOON, K.-J. (2014) An overview of calf diarrhoea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15, 1-17.
- DE VERDIER, K., NYMAN, A., GREKO, C. y BENGTSSON, B. (2012) Antimicrobial resistance and virulence factors in Escherichia coli from Swedish dairy calves. *Acta Vet Scand*, 54, 1-10.
- ESTRADA-SOTO, S., SANCHEZ-RECILLAS, A., NAVARRETE-VAZQUEZA, G., CASTILLO-ESPANA, P., VILLALOBOS-MOLINA, R. y IBARRA-BARAJAS, M. (2012) Relaxant effects of Artemisia ludoviciana on isolated rat smooth muscle tissues. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 513-518.
- FOSTER, D. M. y SMITH, G. W. (2009) Pathophysiology of diarrhoea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 25, 13-36.
- FUSCO DA COSTA, A. R., BATISTALIMA, K. V., OLIVEIRA DESOUSA, C. y BRITTOLOUREIRO, E. C. (2010) Desarrollo de PCR multiplex para detección e diferenciación de categorías de Escherichia coli diarrheogénicas. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1, 77-83.

- GARCÍA, S., ALARCÓN, G., RODRÍGUEZ, C. y HEREDIA, N. (2006) Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 669-674.
- GHOSH, A., DAS, B. K., ROY, A., MANDAL, B. y CHANDRA, G. (2008) Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J Nat Med*, 62, 259-62.
- GOODELL, G. M., CAMPBELL, J., HOEJVANG-NIELSEN, L., STANSEN, W. y CONSTABLE, P. D. (2012) An alkalinizing oral rehydration solution containing lecithin-coated citrus fiber is superior to a nonalkalinizing solution in treating 360 calves with naturally acquired diarrhea. *J Dairy Sci*, 95, 6677-86.
- IZZO, M. M., KIRKLAND, P. D., MOHLER, V. L., PERKINS, N. R., GUNN, A. A. y HOUSE, J. K. (2011) Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J*, 89, 167-73.
- JIMENEZ MERINO, A. (2011) *Herbolaria Mexicana*. Primera Edicion ed. Primera Edicion. Biblioteca Basica de Agricultura. Estado de Mexico, Mexico, pp. 136-138.
- LOPES-LUTZ, D., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S. y KOLODZIEJCZYK, P. P. (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69, 1732-8.
- NATARO, J. P. y KAPER, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11, 142-201.
- PAOURJAFAR, M., BADIEI, K., NADALIAN, M. C. y JAFARI JOZANI, R. (2011) Effect of Long Term Administration of Frozen and Fermented Colostrums of Vaccinated Cows on Performance and Prevention of Neonatal Calf Diarrhea. *Pakistan Veterinary Journal*, 31, 199-202.
- REBHUN, W. C. (1995) *Enfermedades del ganado Vacuno Lechero*, Primera Edicion. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España, 660 p.
- RIGOBELLO, E. C., GAMEZ, H. J., MARIN, J. M., MACEDO, C., AMBROSIN, J. A. y ÁVILA, F. A. (2006) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 305-310.
- RODRIGUEZ-ANGELES, G. (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, 44, 464-474.
- RODRIGUEZ VIVAS, R. I. (2005) *Enfermedades de Importancia Economica en Produccion Animal*, Primera Edicion. McGraw-Hill Interamericana. Yucatan, Mexico, pp. 525-536.
- SAGARPA (2014) Poblacion de Ganado Bovino en Mexico 2005-2014. IN SIAP (Ed.) Mexico.
- SOBERON, J. R., SGARIGLIA, M. A., SAMPIETRO, D. A., QUIROGA, E. N. y VATTUONE, M. A. (2006) Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1450-1461.
- VADILLO, S., PIRIZ, S. y MARTEOS, E. (2002) *Manual de Microbiologia Veterinaria*, Primera Edicion. McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U. Madrid, España, pp. 301-324.
- VALDIVIA ANDA, G., CERVANTES ROSALES, R., SORIANO BECERRIL, D. M., ALBA HURTADO, F., MONTARAZ CRESPO, J. A. y TÓRTARA PÉREZ, J. L. (2000) Interacción de cepas verocitoóxicas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros. *Veterinaria México*, 31, 293-300.
- VIDAL, J. E., CANIZALEZ-ROMAN, A., GUTIERREZ-JIMENEZ, J. y NAVARRO-GARCIA, F. (2007) Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Publica de Mexico*, 49, pp. 376-386.
- ZAVALA-SANCHEZ, M. A., PEREZ-GUTIERREZ, S., PEREZ-GONZALES, C., SANCHEZ-SALDIVAR, D. y ARIAS-GARCIA, L. (2002) Antidiarrhoeal Activity of Nonanal, an Aldehyde Isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology*, 40, 263-268.

