

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

TESIS:

FRECUENCIA Y PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICA EN TERNEROS LACTANTES CON DIARREA

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

Presentada por:

M.Cs. JOSÉ LUIS BAZÁN ARCE

Asesor:

Dr. MARCO ANTONIO CABRERA GONZÁLEZ

Cajamarca, Perú

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador:
José Luis Bazán Arce
DNI: 26601984
Escuela Profesional/Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Programa de Doctorado, Mención: Ciencias Veterinarias
2. Asesor: Dr. Marco Antonio Cabrera González
3. Grado académico o título profesional
☐ Bachiller ☐ Título profesional ☐ Segunda especialidad
☐ Maestro ☒ Doctor
4. Tipo de Investigación:
☒ Tesis ☐ Trabajo de investigación ☐ Trabajo de suficiencia profesional
☐ Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica en terneros lactantes con diarrea
6. Fecha de evaluación: 12/03/2025
7. Software antiplagio: ☒ TURNITIN ☐ URKUND (ORIGINAL) (*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: 12%
9. Código Documento: 3117: 438772444
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
☒ APROBADO ☐ PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 12/05/2025

Firma y/o Sello Emisor Constancia	
 Dr. Marco Antonio Cabrera González DNI: 26698011	 Dr. José Antonio Niño Ramos DNI: 26613371

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

COPYRIGHT@ 2025 by
JOSÉ LUIS BAZÁN ARCE
Todos los derechos reservados



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 090-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

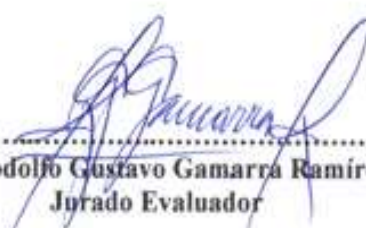
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 10:00 horas, del día 12 de Febrero de dos mil veinticinco, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **DR. RODOLFO GUSTAVO GAMARRA RAMÍREZ**, **DR. JOSÉ FERNANDO CORONADO LEÓN**, **DR. GILBERTO FERNÁNDEZ IDROGO**, y en calidad de Asesor el **DR. MARCO ANTONIO CABRERA GONZÁLEZ**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestrías y Doctorados de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se inició la Sustentación de la Tesis titulada **"FRECUENCIA Y PATOTIPOS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICA EN TERNEROS LACTANTES CON DIARREA "**, presentada por el Maestro en Ciencias con Mención en Desarrollo y Medio Ambiente **JOSÉ LUIS BAZÁN ARCE**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó aprobar (17) con la calificación de 17 la mencionada Tesis; en tal virtud, el Maestro en Ciencias con Mención en Desarrollo y Medio Ambiente, **JOSÉ LUIS BAZÁN ARCE**, se encuentra apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de **Ciencias Veterinarias**, con Mención en **CIENCIAS VETERINARIAS**.

Siendo las 11:35 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Dr. Marco Antonio Cabrera González
Asesor


.....
Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez
Jurado Evaluador


.....
Dr. José Fernando Coronado León
Jurado Evaluador


.....
Dr. Gilberto Fernández Idrogo
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

A mis padres, por haber sido el cimiento
de mi vida y mi fortaleza.

A mi hermana Lucy, por haberme inspirado
y guiado para estudiar.

A mi esposa Alicia, por haberme
acompañado y acompañarme durante
tantos años, en este viaje llamado vida.

A mi hijo e hijas Luis Diego, Luz Raquel
y Fátima Denís, Bazán Medina, por ser
parte de mí.

A mis hermanos, Flavio, Mary, Manuel,
Balbina, Flor y Guillermo Bazán Arce, por
la fuerza que me inspiran para cumplir mis
metas.

José Luis

AGRADECIMIENTOS

Al M.V. Dr. Marco Antonio Cabrera Gonzales, por haber concebido y guiado este trabajo.

A los Biólogos, Deysi Rojas Valdez y Antony Taica Saldaña y a la M.V. Medalí Cueva Rodríguez, por haber participado en el análisis molecular.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Estación Experimental Agraria Baños del Inca, por el apoyo prestado para llevar a cabo el trabajo de investigación.

A los ganaderos que facilitaron la toma de muestras.

ÍNDICE

Página

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIACIONES	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
1. OBJETIVO GENERAL.....	2
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3. HIPOTESIS	2
CAPÍTULO II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. ANTECEDENTES TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
2.1.1. Identificación de genes de virulencia de <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.2. Identificación de patotipos de <i>Escherichia Coli</i>	4
2.1.3. Diarrea en terneros.	5
2.1.4. Agentes etiológicos productores de diarrea.	6
2.1.5. Patotipos de <i>E. coli</i>	7
2.1.6. Diagnóstico de <i>E. coli</i> mediante (PCR)	9
2.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	9
2.1.8. Patogenicidad.....	10
2.1.9. Virulencia.....	10

2.1.10. Factores de virulencia:	11
CAPÍTULO III	12
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	12
3.1. Ubicación.....	12
3.2. Unidad de análisis, universo y muestra.....	12
3.3. Tipo y descripción del diseño de contrastación de la hipótesis.....	13
3.4. Descripción del diseño metodológico.....	13
3.4.1. Toma de muestras de heces	13
3.4.2. Aislamiento de cepas de <i>Escherichia coli</i>	14
3.4.3. Extracción de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i>	14
3.4.4.2. Extracción de ADN con (Wizard® Genomic DNA Purification Kit).....	15
3.4.4.3. Identificación de <i>E. coli</i> por PCR, mediante la amplificación del gen (<i>uidA</i>).....	17
3.4.6. Amplificación de los genes de virulencia utilizando PCR	18
3.4.7. Análisis del producto amplificado por PCR.	20
CAPÍTULO IV	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Genes de virulencia de <i>Escherichia coli</i>	22
4.2. Patotipos de <i>E. coli</i>	26
4.3. Patotipos de <i>E. coli</i> , según sexo.	36
CAPITULO V	37
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	38
LISTA DE REFERENCIAS.....	39
ANEXOS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Identificación del gen <i>uid</i> mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cajamarca 2022.....	45
Figura 2.- Placas en colonias de <i>E. coli</i> , aisladas en agar MacConkey con sorbitol. Cajamarca 2022.....	46
Figura 3.- Perfil térmico de la PCR por 25 ciclos para la identificación del gen <i>uid</i> . Cajamarca 2022.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Frecuencia de genes y factores de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> , aislados de heces de terneros con diarrea de la Región Cajamarca 2022.....	25
Tabla 2.- Frecuencia de patotipos de <i>Escherichia coli</i> y sus factores de virulencia encontrados en heces de terneros con diarrea la Región Cajamarca 2022.....	26
Tabla 3.- Frecuencia de patotipos mixtos de <i>Escherichia coli</i> , aislados de heces de terneros con diarrea de la Región Cajamarca, 2022.....	33
Tabla 4.- Frecuencia de patotipos de <i>Escherichia coli</i> , por provincia encontrados en heces de terneros con diarrea en la Región Cajamarca, 2022	36
Tabla 5.- Medición del ADN genómico extraído de <i>Escherichia coli</i> , aislado de muestras de heces de terneros con diarrea. Cajamarca 2022	45
Tabla 6.- Frecuencia de genes de <i>Escherichia coli</i> , por provincia, en terneros con diarrea. Cajamarca 2022	46
Tabla 7.- Frecuencia de patotipos de <i>Escherichia coli</i> por provincia en terneros con diarrea. Cajamarca 2022	47

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1.-	Preparación de la mix de PCR con kit Green Go Tag® (Promega USA) Cajamarca 2022.....	17
Cuadro 2.-	Nombre de primers, genes diana y secuencia de oligonucleótidos sintetizados utilizando PCR Cajamarca 2022.....	19
Cuadro3.-	Componentes y condiciones, para determinar los genes que codifican factores de virulencia, mediante PCR Cajamarca, 2022.....	20

LISTA DE ABREVIACIONES

Antígeno H:	Antígeno flagelar
Antígeno K:	Antígeno capsular
Antígeno O:	Antígeno somático
GV :	genes de virulencia
DEC:	<i>E. coli</i> diarreogénica
DAEC:	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
EAEC:	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC:	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EPEC:	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC:	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
STEC:	<i>E. coli</i> shigatoxigénica
ExPEC:	<i>E. coli</i> extraintestinal patógena
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa
GTP :	Guanosín trifosfato
GMPC:	Guanosín monofosfato cíclico

RESUMEN

El estudio se realizó en hatos lecheros de 4 provincias de Cajamarca, con la finalidad de identificar los patotipos de *Escherichia coli* (*E. coli*), presentes en terneros con diarrea, mediante la detección de genes que codifican factores de virulencia, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se colectaron 80 muestras de heces de terneros lactantes, con síntomas clínicos de diarrea, de los cuales se identificaron *astA* 28.4%. (n = 66), *st* 23.6% (n = 55), *f5* 21.5% (n = 50), *stx1* 14.2% (n = 33), *eaE* 8.2% (n = 19), *lt* 3.9% (n = 9) y *stx2* 0.4% (n = 1) por medio de estos genes se aislaron cuatro patotipos de *E. coli*: enterotoxigénica ETEC 37.4% (n = 71), enteroagregativa EAEC 34.7% (n = 66), shigatoxigénica STEC 17.9% (n = 34) y enteropatógena EPEC 10.0%. (n = 19). También se identificaron 11 grupos de patotipos híbridos, siendo la combinación EAEC/ETEC la más frecuentemente 42.9%. De acuerdo a los resultados obtenidos se asumen que la mayoría de los cuadros de diarrea presentes en los terneros muestreados son del tipo secretorio, debido a que los patotipos ETEC y EAEC se encontraron con mayor frecuencia y a los factores de virulencia que portan, que son las toxinas LT, ST y EAST1, que inducen la salida de sodio y agua al lumen intestinal.

Palabras clave: *Escherichia coli*, patotipos, diarrea, terneros.

ABSTRACT

The study was conducted in dairy farms across four provinces of Cajamarca, aiming to identify the pathogenic types of *Escherichia coli* (*E. coli*) present in calves with diarrhea, through the detection of genes encoding virulence factors using the polymerase chain reaction (PCR) technique. A total of 80 fecal samples were collected from lactating calves exhibiting clinical signs of diarrhea. The identified genes included *astA* at 28.4% (n = 66), *st* at 23.6% (n = 55), *f5* at 21.5% (n = 50), *stx1* at 14.2% (n = 33), *eae* at 8.2% (n = 19), *lt* at 3.9% (n = 9), and *stx2* at 0.4% (n = 1). Based on these genes, four pathogenic types of *E. coli* were isolated: enterotoxigenic ETEC at 37.4% (n = 71), enteroaggregative EAEC at 34.7% (n = 66), shiga toxin-producing STEC at 17.9% (n = 34), and enteropathogenic EPEC at 10.0% (n = 19). Additionally, 11 groups of hybrid pathogenic types were identified, with the EAEC/ETEC combination being the most frequent at 42.9%.

According to the results obtained, it is assumed that the majority of the diarrhea cases in the sampled calves are of the secretory type, due to the higher frequency of the ETEC and EAEC pathogenic types and the virulence factors they carry, which include the LT, ST, and EAST1 toxins that induce the efflux of sodium and water into the intestinal lumen.

Keywords: *Escherichia coli*, pathogenic types, diarrhea, calves

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La crianza de terneros en Cajamarca, Perú, enfrenta importantes desafíos, siendo la diarrea neonatal una de las principales causas de morbi-mortalidad y de deterioro del crecimiento. Factores como prácticas de manejo inadecuadas, deficiencias nutricionales y malas condiciones higiénicas, aumentan la susceptibilidad de los terneros a infecciones bacterianas. Según (Canton et al., 2021), es fundamental determinar el patotipo de *Escherichia coli* (*E. coli*) y su sensibilidad a los antibióticos cuando se presentan casos de diarrea de terneros en un hato, ya que esta enfermedad no solo afecta al bienestar animal, sino que también tiene repercusiones económicas. Estudios previos han demostrado que la mortalidad neonatal debida a diarrea en terneros alcanza el 57 % en Estados Unidos y el 53 % en Corea (Cho & Yoon, 2014). Asimismo (Margueritte et al, 2007) reportan que la prevalencia de diarrea neonatal en terneros de Argentina puede llegar hasta el 60 %, con una tasa de mortalidad que alcanza el 20 %.

La diarrea en terneros es un problema significativo en Cajamarca, sin embargo, no se han realizado estudios para determinar cómo los diferentes patotipos de *E. coli* intervienen en su patogenia. En este estudio se pretende ampliar los conocimientos sobre cómo están involucrados los patotipos *E. coli* en la presentación de diarrea de terneros en los hatos lecheros, Este estudio tuvo como objetivo principal, identificar los patotipos de *E. coli* presentes en los casos de diarrea en la Región Cajamarca, a través de la identificación de sus genes de virulencia.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los patotipos de *Escherichia coli* presentes en los casos de diarrea en terneros, mediante la identificación de los genes que codifican a factores de virulencia, en hatos lecheros de la Región Cajamarca.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Identificar los genes que codifican para factores de virulencia de patotipos de *Escherichia coli*, en los aislados de muestras de heces de terneros con diarrea en hatos lecheros de la Región Cajamarca.
- b. Determinar los patotipos más frecuentes de *Escherichia coli*, en terneros con diarrea en hatos lecheros de la Región Cajamarca

3. HIPOTESIS

Mediante el estudio de los genes que codifican para factores de virulencia se pueden determinar la frecuencia y patotipos de *Escherichia coli*, diarreogénica en terneros lactantes con diarrea de los hatos lecheros de la Región Cajamarca.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes teóricos de la investigación

2.1.1. Identificación de genes de virulencia de *Escherichia coli*.

En un trabajo sobre perfiles de virulencia de *E. coli* en las heces de 252 terneros de leche en Uruguay, 149 con síntomas de diarrea neonatal (DNT) y 103 asintomáticos, se detectó un alto número de genes de virulencia asociados a factores que participan en la patogenicidad, adherencia, agregación y colonización intestinal. Sin embargo, los genes *eae*, *stx1* y *stx2* estuvieron poco representados (Umpierrez et al., 2021).

En diferentes granjas la gobernación de El-Sharqia Egipto, se recolectaron 274 muestras fecales de terneros con diarrea entre abril de 2018 y febrero de 2019, para determinar la prevalencia de STEC y ETEC, con especial referencia a los genes *stx1* y *stx2* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); la prevalencia de STEC fue del 20,2% (n = 16), mientras que la prevalencia de ETEC fue del 30,4% (n = 24). Los genes, *stx1* y *stx2*, fueron los genes de virulencia más prevalentes asociados con STEC, que son responsables de la patogénesis de la enfermedad, ayudados por el gen de la intimina (*eaeA*) (Algammal et al., 2020).

En un estudio realizado en 100 bovinos criados en la prefectura de Hyogo -Japón, durante noviembre de 2012 y agosto de 2013, se investigaron los genes *stx1* y *stx2* de *E. coli*; Se detectaron *stx1* y *stx2* en seis de las 45 cepas de STEC, y se detectó

stx2 en solo 19 cepas; 17 cepas de STEC portaban el gen *stp*, *astA* o *cdt* junto con *stx1* o *stx2* (Akiyama et al., 2014).

2.1.2. Identificación de patotipos de *Escherichia coli*.

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) diarreogénicas fueron identificadas por primera vez en 1889, sin embargo, la caracterización de sus mecanismos de patogenicidad y su posterior clasificación en las seis categorías reconocidas hoy en día no se logró hasta muchos años después, ya que los métodos de microbiología convencional no permitían distinguir entre cepas patógenas y no patógenas de *E. coli*. El primer patotipo de *E. coli* asociado a enfermedad diarreica aguda (EDA) en lactantes humanos, fue denominado *E. coli* enteropatógena (ECEP) y fue descrito por primera vez en 1938. (Clarke, 2001).

En este estudio se desarrolló una PCR múltiple para la identificación de *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC). Esta PCR multiplex pudo identificar cepas EPEC, STEC, EIEC y ETEC porque los genes de virulencia *eae* para EPEC, *stx* para STEC, *elt* y *est* para ETEC y *ipaH* para EIEC, están bien definidos. (Toma et al., 2003)

En El-Sharqia, Egipto se utilizó la técnica de PCR para determinar la prevalencia de STEC en terneros diarreicos y fue de 20,2 % (n = 16), mientras que la de ETEC fue del 30,4 % (n = 24). (Algammal et al., 2020).

En un estudio realizado en Egipto con el objetivo de caracterizar los patotipos de *E. coli*, se obtuvieron 150 aislamientos de 100 bovinos y terneros de búfalo que

presentaban diarrea, así como de 50 animales aparentemente sanos que eran criados en conjunto. Se emplearon análisis de PCR diseñados para identificar secuencias de genes de virulencia específicos, que codifican fimbrias *f5* (K99), toxinas Shiga *stx1* y *stx2*, enterotoxinas termoestables *st*, termolábil *lt*, intimina *eae*, hemolisina *hlyA* y la enterotoxina termoestable *astA*. Con base en la caracterización de los genes de virulencia, los aislados de *E. coli* se clasificaron en los siguientes patotipos: STEC 30,7 %, ETEC (12,7 %), EAEC (7,3 %) y EPEC (2,7 %). Además, se identificaron patotipos mixtos, como ETEC/STEC (14,7 %) y ETEC/EPEC (2,7 %), donde la mayoría de estas combinaciones atípicas se encontraron en terneros de búfalo. Si bien los aislamientos de STEC y EPEC se detectaron más en terneros de ganado que en terneros de búfalo, los aislamientos de ETEC fueron los mismos en ambas especies. (Awad et al., 2020)

Bases teóricas de la investigación

2.1.3. Diarrea en terneros.

La diarrea es una de las principales enfermedades de los terneros recién nacidos, tanto en la producción de leche como en la de carne, su impacto económico es significativo, ya que se traduce en un aumento de la morbilidad y la mortalidad, así como en mayores costos de tratamiento y una reducción en las tasas de crecimiento. Por estas razones, la diarrea neonatal en terneros se considera un problema común a nivel mundial, debido a que este síndrome diarreico presenta una etiopatogenia compleja, ya que puede estar asociado a múltiples agentes infecciosos que pueden actuar de manera aislada o en combinación, contribuyendo así a la aparición de brotes de enfermedades diarreicas, (Ok et al., 2009)

La diarrea neonatal es una enfermedad multifactorial y compleja de los terneros recién nacidos. Clínicamente, suele presentarse desde las 12 horas posparto hasta los primeros 35 días de vida y se caracteriza por la excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y en casos graves, muerte, (Margueritte et al., 2007)

2.1.4. Agentes etiológicos productores de diarrea.

La diarrea es una de las enfermedades infecciosas más significativas en los terneros, generando enormes pérdidas económicas a nivel mundial, por lo tanto, es fundamental determinar cuál es la prevalencia de *E. coli* shigatoxigénica (STEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), que están asociadas a la diarrea en estos animales. En particular, se debe prestar especial atención a los genes que codifican las toxinas Shiga, *Stx1* y *Stx2*, así como a las enterotoxinas *Lt* y *Sta*, que son claves en la patogenia de estas infecciones. Además, es importante investigar los genes de virulencia, como *eae*, que codifica para la intimina, ya que estos factores son determinantes en la capacidad patogénica de estas cepas bacterianas (Algammal et al., 2020)

Numerosos agentes infecciosos han sido implicados en la diarrea de terneros, lo que ha llevado a técnicos y productores de ganado a reconocer que múltiples patógenos entéricos están involucrados en esta enfermedad, se han identificado al menos diez patógenos entéricos diferentes, entre los cuales los principales son: rinotraqueítis viral bovina (BRV), diarrea viral bovina (BVDV), *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Cryptosporidium parvum*. (Blanchard, 2012).

Los patógenos más comunes asociados con la diarrea en terneros incluyen *Cryptosporidium*, rotavirus, coronavirus, *Salmonella*, así como diversas cepas de *Escherichia coli*, entre las que se encuentran la *E. coli* adherente difusa (DAEC), la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la *E. coli* enteropatógena (EPEC), la *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y la *E. coli* F5 o K99, (Cho and Yoon, 2014).

Los agentes etiológicos que causan diarrea neonatal son diversos, siendo los virus los más relevantes, la acción de estos virus frecuentemente actúa como un factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias, existe un número limitado de cepas de *E. coli*, capaces de colonizar la mucosa intestinal y producir enterotoxinas y se comportan como enteropatógenos primarios. Estas cepas provocan diarrea en terneros de menos de una semana de vida a través de un mecanismo de hipersecreción intestinal. (Margueritte et al., 2007).

2.1.5. Patotipos de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* patógenas han sido divididas en diferentes patotipos, sobre la base de las enfermedades que causan, los factores de virulencia que poseen y el hospedero de la cual fueron aisladas; así por los tipos de enfermedad que causan son clasificados en intestinales y extra intestinales, donde seis patotipos de cepas de *E. coli* diarreogénica son reconocidos, por sus factores de virulencia asociados a sus características de patogenicidad, (Kaper et al., 2004).

Las *E. coli* diarreogénica (ECD) requiere una diferenciación cuidadosa de las *E. coli* comensales, que forma parte de la microbiota intestinal. Las ECD se clasifican

en función de criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares. Actualmente, se reconocen seis tipos patogénicos de ECD:

1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
2. *E. coli* entero invasiva (EIEC)
3. *E. coli* enteropatogénica (EPEC)
4. *E. coli* shigatoxigénica (STEC)
5. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)
6. *E. coli* adherente difusa (DAEC)

Cada uno de estos tipos tiene características distintivas que contribuyen a su patogenicidad y a la presentación clínica de las infecciones que causan, (Yacarini & Martínez, 2020; Ochoa et al., 2011).

Las cepas de *E. coli* diarreogénicas (DEC), están entre los agentes etiológicos más comunes de la diarrea y, en función de sus factores de virulencia específicos y los rasgos fenotípicos, se dividen en *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina Vero/productora de toxina Shiga (VTEC/STEC), que incluye su conocido subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Jafari, Mm and Bouzari, 2012).

Las *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) se designan por su sitio de aislamiento y se agrupan en función del tipo de huésped y la enfermedad que causan, la mayoría de las *E. coli* diarreogénicas (DEC) se subdividen en patotipos

de acuerdo a sus genes de virulencia específicos directamente relacionados a su patogenia. La presentación del brote alemán de 2011 cambio la visión de una *E. coli* bien categorizada, debido a que éste fue causado por una cepa de *E. coli* que portaba los factores de virulencia de dos patotipos de DEC diferentes (EAEC y STEC). A partir de este brote, se ha demostrado que este fenómeno es más frecuente de lo que se creía. Por lo tanto, se han acuñado los términos *E. coli* híbrida, mixta y heteropatógena para describir nuevas combinaciones de factores de virulencia entre los patotipos clásicos de *E. coli*, (Santos et al., 2020)

2.1.6. Diagnóstico de *E. coli* mediante (PCR)

En la última década se han reportado técnicas de biología molecular para la identificación rápida de patotipos de *E. coli*, incluyendo el uso de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR) (Rúgeles et al., 2010).

El diagnóstico de estos patógenos se puede realizar por métodos moleculares mediante la identificación de genes de virulencia, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que sirve para identificar a cada uno de los seis patotipos de *E. coli* que se clasifican en: Enteroagregativo, enterohemorrágico, productor de toxina Shiga, enteroinvasivo, enteropatógeno, enterotoxigénico y adherente difuso (Guion et al., 2008).

2.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son una forma rápida y muy precisa de diagnosticar ciertas enfermedades infecciosas y cambios genéticos, estas pruebas detectan el ADN o el ARN de un patógeno; a diferencia de muchas otras pruebas, las de PCR pueden encontrar signos de una enfermedad

en las fases más tempranas de la infección. Otras pruebas pueden no detectar los primeros signos de la enfermedad porque no hay suficientes virus, bacterias o patógenos en la muestra, o porque su organismo no ha tenido tiempo suficiente para desarrollar una respuesta de anticuerpos. Las pruebas de PCR pueden detectar una enfermedad cuando hay sólo una cantidad muy pequeña de patógenos en el organismo, mediante la prueba de PCR, una pequeña cantidad de material genético de una muestra se copia varias veces, este proceso se conoce como amplificación, si en la muestra hay patógenos, la amplificación hace que sean mucho más fáciles de ver; los nombres alternativos también son: (RCP), PCR de transcripción inversa, (qPCR), PCR cuantitativa, (rtPCR Real-Time PCR), PCR en tiempo real, (Rockville, 2021).

2.1.8. Patogenicidad.

Es un término que describe la capacidad de un microorganismo, para causar enfermedad en un huésped, Clínica Universidad de Navarra, (2023)

2.1.9. Virulencia.

Es el grado de patogenicidad de los microorganismos patógenos que se refiere a su capacidad para infectar, causar enfermedades y daño en un organismo huésped, se mide por el número de microorganismos necesarios para provocar la enfermedad. La virulencia determina la gravedad y el curso clínico de las enfermedades infecciosas, Clínica Universidad de Navarra, (2023)

2.1.10. Factores de virulencia:

Son moléculas o estructuras producidas por microorganismos patógenos (adhesinas, toxinas.) que contribuyen a su capacidad para invadir, colonizar y causar daño en el huésped. Estos factores incluyen proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos que desempeñan funciones específicas en la interacción patógeno-huésped, Clínica Universidad de Navarra, (2023)

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Ubicación

Los lugares de la toma de muestras fueron:

Cajamarca. - Jesús, Tartar, Namora, La Encañada.

Chota. - Chalamarca, El Verde, La Paccha, Chiguirip.

Celendín. - Sendamal, Sucre, José Gálvez, Sorochuco.

San Miguel. - Tongod, Quilcate, Catilluc, El Empalme.

El análisis de las muestras de heces se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal, de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito de Baños del Inca, en la provincia de Cajamarca.

3.2. Unidad de análisis, universo y muestra

Unidad de análisis. - gen que codifica a los factores de virulencia de cepas de *E. coli* diarreogénica aislada de heces de un ternero con diarrea.

Universo. - genes que codifican para factores de virulencia de *E. coli* enteropatógeno.

Muestra. - ADN genómico de cepas de *E. coli* aisladas de heces provenientes de terneros con diarrea reportados en hatos lecheros de las zonas en estudio.

3.3. Tipo y descripción del diseño de contrastación de la hipótesis

Tipo de investigación. - investigación adaptativa, no experimental, descriptiva y transversal.

3.4. Descripción del diseño metodológico

3.4.1. Toma de muestras de heces

Se tomaron 80 muestras de heces de terneros de hasta 75 días de edad, con síntomas clínicos de diarrea, de cuatro provincias ganaderas de Cajamarca, distribuidas en 20 muestras por provincia. Siguiendo las recomendaciones del Manual veterinario de toma y envío de muestras, (PANAFTOSA - OPS/OMS, 2017), que son las siguientes:

- 1.- Las heces se recogerán directamente del recto, nunca del suelo.
- 2.- Usar envases estériles.
- 3.- Cantidad mínima recomendada entre 10 - 50 gr.
- 4.- Conservar y transportar refrigeradas.

Las muestras recogidas fueron de aproximadamente 10 gramos cada una, solo de animales con signos de diarrea, que no hayan recibido tratamiento con antibióticos, en los 7 días previos a la recolección, a fin de evitar la alteración de la flora intestinal e inhibición del crecimiento bacteriano, que podrían llevar a errores en la interpretación de los resultados.

Las heces fueron recolectadas en bolsas de polietileno, debidamente rotuladas con la información del animal, el lugar, el propietario y la fecha. La recolección se realizó directamente del recto del animal, utilizando la bolsa como un guante para cubrir la mano; posteriormente, las muestras identificadas se colocaron en un

contenedor de espuma de polietileno con hielo, manteniéndose a una temperatura aproximada de 4 °C, y fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental Baños del Inca, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria. El proceso de cultivo se llevó a cabo dentro de las 12 horas posteriores a la recolección de las muestras.

3.4.2. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli*.

Se tomó una muestra de heces, que fue diluida en suero fisiológico y aisló en agar MacConkey, que es un medio de cultivo selectivo y diferencial, que se utiliza principalmente para el aislamiento y la identificación de bacterias gramnegativas, especialmente las del género *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, la siembra se hizo en placas con agar MacConkey, con una asa de siembra, utilizando el método de estría, para poder obtener colonias aisladas; las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se seleccionaron las colonias de color fucsia, correspondientes a *E. coli*, que es una bacteria lactosa positiva, produciendo ácido láctico que reduce el indicador rojo neutro del medio de cultivo, generando el color fucsia característico para *E. coli*. Estas colonias fueron utilizadas para la extracción de ADN.

3.4.3. Extracción de ADN genómico de *Escherichia coli*.

Material y equipo para la extracción de ADN genómico de *Escherichia coli*

1. Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
2. Puntas de micropipeta de 10 µL, 100 µL y 1000 µL
3. Baño de agua, 80 ° C
4. Baño de agua, 37 ° C

5. Isopropanol, temperatura ambiente
6. Etanol comercial al 70%, temperatura ambiente

Para la extracción de ADN genómico se cultivaron dos colonias de *E. coli* en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con medio de cultivo líquido 2XYT (Yeast Extract Tryptone) (Sigma, REF. Y2377) y se incubó a 37 °C por 18 horas. Después de este tiempo se evaluó en un espectrofotómetro (Nanodrop Lambda®); el número de unidades formadoras de colonias (UFC) a 600 nm (2,5 a 6, UFC /mL).

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo del kit de purificación Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA.REF. A1120).

3.4.4.2. Procedimiento para la extracción de ADN con (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)

1. Añadir 1 mL. del cultivo de *E. coli* en medio líquido a un tubo de micro centrífuga de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 14.0000 *g* (gravidades) durante 2 minutos para sedimentar las células, luego retirar el flotante
3. Añadir 600 µL de solución de lisis de núcleos, agitar para homogenizar de 2 a 5 veces.
4. Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células; luego enfriar.
5. Agregar 3 µL de solución de RNAsa (nucleasa que cataliza la degradación del RNA en componentes más pequeños que permite obtener un producto quede limpio de ARN) al lisado celular; luego invierta el tubo.
6. Incubar la muestra a 37 ° C durante 30 minutos y enfriar la muestra a temperatura ambiente.

7. Añadir 200 μL de solución de precipitación de proteínas al lisado de células tratadas con RNAsa. Agitar en el vortex vigorosamente a alta velocidad, para para mezclar la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular.
8. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a $14.000 \times g$ durante 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL, que contenga 600 μL de isopropanol.
11. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN en forma de hilo formen una masa visible.
12. Centrifugar a $14.000 \times g$ durante 2 minutos.
13. Verter con cuidado el sobrenadante y escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio, agregue 600 μL de etanol al 70% e invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
14. Centrifugar a $14.000 \times g$ durante 2 minutos; aspirar con cuidado el etanol.
15. Drenar el tubo sobre papel absorbente limpio y dejar que el gránulo de ADN se seque al aire durante 10 a 15 minutos.
16. Añadir 100 μL de solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a la temperatura de 4°C .
17. Almacenar el ADN entre 2 y 8°C .
18. Se midió la cantidad de ADN en $\mu\text{g/mL}$ y su calidad en la ratio 260/280 donde se consideró que un ADN de pureza óptima estuvo entre estos valores

3.4.4.3. Identificación de *E. coli* por PCR, mediante la amplificación del gen (*uidA*).

La identificación de *E. coli* se realizó mediante la amplificación del gen *uidA* que codifican para betalactamasa; utilizando los primers
F5'-TCAGCGCGAAGTCTTTCTTTCTTTATACC-3',
R5'- CGTCGGTAATCACCATTCCC-3'

Procedimiento:

Dilución de primers

1. Centrifugar los primers a 3000 rpm por 5 minutos
2. Agregar agua ultrapura de acuerdo a la concentración de nMoles de cada uno de los primers.
3. Agitar en el vortex a 2000 rpm durante 1 minuto.
4. Tomar 10µL a una concentración de 100 pmol/µL de cada primer y agregar 90 µL de agua ultrapura para tener los primers diluidos a una concentración de trabajo de 10 pmol/µL.

Cuadro 1. Preparación de la MIX de PCR con el kit Green Go Taq® (Promega, USA) Cajamarca, 2022.

Componentes	Para 1(muestra)
Buffer	4.0 µl
Agua	1.6 mL
Cl2 Mg	0.8 mL
dNTPs	0.6 µL
Forward <i>uidA</i>	1.0 µL
Reverse <i>uidA</i>	1.0 µL
Taq polimerasa	0.2 µL
ADN g	2.8 µL
Total	12.0 µL

Una vez preparada la solución con la MIX de PCR, se toma 9.2 µL y se agrega 2.8 µL de ADN genómico diluido y se coloca el termociclador según el siguiente protocolo.

Perfil térmico de la PCR 94°C/2 minutos (desnaturalización inicial), 94 °C/30 segundos (desnaturalización), 70°C/45 segundos (hibridación), 70 °C/1 minuto (elongación) (25 ciclos) y 72°C/1 minuto (elongación final).

3.4.5. Evaluación por electroforesis.

- 1 Correr en gel de agarosa al 1.5 % con TAE (Tris + EDTA) a 100 voltios por 40 minutos. Se utilizó un marcador molecular de 100 pb (Promega®, USA) para verificar el peso molecular del gen *uidA*.
- 2 Se observó las bandas del gen *uidA* de 248 pb en el gel de agarosa en el foto documentador **GelDoc Go** Imagin System®

3.4.6. Amplificación de los genes de virulencia utilizando PCR

Los primers para la amplificación de los genes fueron adquiridos de MacroGen Inc®. de Corea, (cuadro 2).

Cuadro 2. Nombres de primers, genes diana y secuencia de oligonucleótidos sintetizados utilizando PCR, Cajamarca 2022.

Patotipo	Gen	Primer	PB	Referencias
EPEC	<i>eae</i>	F:TCAATGCGATTCCGTTATCAGTT	482	Vidal et al. (2005)
		R: GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG		
STEC	<i>stx1</i>	F: CGATGTTACGCTTTGTTACTGTGACAGC	244	Muller et al. (2007)
		R: AATGCCACGCTTCCCAGAATTG		
	<i>stx2</i>	F: CCATGACAACGGACAGCAGTT	779	Gannon et al. (1992)
		R: CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG		
ETEC	<i>hlyA</i>	F: AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	569	Wang et al. ((2002)
		R: TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC		
	<i>lt</i>	F: GGCGACAGATTATACCGTGC	450	Stacy.Phipps et al. (1995)
		R: CGGTCTCTATATCCCTGTT		
	<i>st</i>	F: ATTTTMTTCTGTATTRCTT	190	Stacy.Phipps et al. (1995)
		R: CACCCGGTACARCAGGATT		
EAEC	<i>k99</i>	F: TATTATCTTAGGTGGTATGG	314	Frank et al. (1998)
		R: GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC		
	<i>astA</i>	F: TGCCATCAACACAGTATATCCG	102	Muller et al. (2007)
		R: ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT		

Adaptado de Caracterización molecular de *Escherichia coli* patógena aislada de bovinos y búfalos diarreicos y en contacto (Awad et al., 2020)

Los volúmenes, concentraciones y el perfil térmico finales de la reacción de PCR, para cada grupo; que se emplearon en la estandarización son las recomendadas por el fabricante Core System de Promega®; según se indican en el cuadro 3.

Cuadro 3. Componentes y condiciones, para determinar los genes que codifican factores de virulencia, mediante PCR. Cajamarca 2022

Genes	Componentes	Volumen	Condiciones para la PCR		Referencias
<i>eae, hlyA, stx1, astA</i>	Master mix	12.5 µL	1 ciclo	Desnaturalización inicial 94°C, 5 min	Chamdra et al. (2013)
	agua de grado molecular	3.5 µL			
	eae F (10 µM)	0.5 µL			
	eae R (10 µM)	0.5 µL			
	hlyA F (10 µM)	0.5 µL	35 ciclos	Desnaturalización 94°C, 30 seg Hibridación 62°C, 30 seg Elongación 72°C, 1 min	
	hlyA R (10 µM)	0.5 µL			
	stx1 F (10 µM)	0.5 µL			
	stx1 R (10 µM)	0.5 µL			
	astA F (10 µM)	0.5 µL	1 ciclo	Elongación final 72°C, 1 min	
	astA R (10 µM)	0.5 µL			
	ADN (50 µg /mL)	5 µL			
	Volumen total	25 µL			
<i>stx2</i>	Master Mix	12.5 µL	1 ciclo	Desnaturalización inicial 94°C, 3 min	Gannon et al. (1992) Kamel et al. (2015)
	Stx2 F (10 µM)	1 µL	35 ciclos	Desnaturalización 95°C, 20 seg Hibridación 58°C, 40 seg Elongación 72°C, 90 seg	
	Stx2 R (10 µM)	1 µL			
	agua de grado molecular	5.5 µL			
	ADN (50 µg/ mL)	5 µL			
	Volumen Total	25 µL	1 ciclo	Elongación final 72°C, 5 min	
<i>lt, st, f5</i>	Master Mix	12.5 µL	1 ciclo	Desnaturalización inicial 95°C, 5 min	Aranda et al. (2004)
	lt F (10 µM)	0.5µL			
	lt R (10 µM)	0.5 µL			
	st (10 µM)	0.5 µL			
	st (10 µM)	0.5 µL	35 ciclos	Desnaturalización 94°C, 30 seg Hibridación 95°C, 45 seg ElongaciOon 72°C, 1 min	
	f5 (10 µM)	0.5 µL			
	f5 (10 µM)	0.5 µL			
	agua de grado molecular	4.5 µL			
	ADN (50 µg/ mL)	5 µL	1 ciclo	Elongación final 72°C, 7 min	
	Volumen Total	25 µL			

Adaptado de Caracterización molecular de *Escherichia coli* patógena aislada de bovinos y búfalos diarreicos en contacto (Awad et al., 2020) Walid S. et al. (2020)

3.4.7. Análisis del producto amplificado por PCR.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, con tampón TAE 1X, (Tris + EDTA), teñido con el colorante Cyber® green de Sigma-Aldrich 0,06 – 0.07 mg/mL.

La corrida se realizó en tampón TAE 1X a un voltaje constante de 100 voltios por 30 minutos. Para determinar la talla aproximada del producto se incluyó un patrón de peso molecular 100pb DNA Ladder® (Promega) con un rango de tallas de 100-1500 pb.

Para la observación de las bandas se utilizó la foto documentador de la marca **GelDoc Go** Imagin System®.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Genes de virulencia de *Escherichia coli*.

De las 80 muestras de heces colectadas de terneros con diarrea, todas resultaron positivas a *E. coli* identificadas usando la técnica de PCR mediante la identificación del del gen *uidA*, que es un marcador enzimático de uso frecuente para la identificación de *E. coli* (Farnleitner et al., 2000). Utilizando pruebas de PCR multiplex y singleplex, se identificaron 233 genes de virulencia de *E. coli*, *astA* 28,4 % (n = 66); *st* 23,6 % (n = 55); *f5* 21,5 % (n = 50); *stx1* 14,2 % (n = 33); *eae* 8,2 %; (n = 19); *lt* 3,9 % (n = 9) y *stx2* 0,4 % (n = 1). Todas las cepas colectadas presentaron al menos uno de los genes de virulencia, a excepción del gen *hlyA*, que no se encontró en ninguna cepa. Este gen codifica para alfa hemolisina, implicada en casos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Schwidder et al., 2019), que afecta principalmente a humanos, este gen no se encontró en los terneros muestreados, por lo que se deduce que su incidencia es muy baja o ausente en terneros de las zonas muestreadas de la Región Cajamarca.

- 1) El gen *astA*, se identificó como el más frecuente, codifica para una proteína de adherencia (enterotoxina agregativa termoestable EAST-1) (Pariz et al., 2016), por lo que se considera el principal factor de virulencia de *E. coli*, productor de diarrea en terneros de los hatos lecheros estudiados. La acción patogénica de EAST-1 se debe a su capacidad para unirse a los receptores de guanilato ciclasa en la membrana de los enterocitos del hospedador (Ríos-Muñoz et al., 2019), lo que facilita la fijación de *E. coli* a la superficie intestinal y la formación de agregados que favorecen la colonización. La

infección por cepas que expresan EAST-1 representa un problema de salud pública, ya que se ha demostrado que inducen diarrea no solo en terneros, sino también en humanos y lechones (Ménard y Dubreuil, 2002).

- 2) El segundo gen más frecuente fue *st*, que codifica para la enterotoxina termoestable (ET) (Konno et al., 2012). La acción de la ET se basa en su capacidad para activar el guanilato ciclasa, lo que cataliza la conversión de GTP en GMPc, lo que produce diarrea acuosa debido al aumento de la secreción de electrolitos y agua hacia el lumen intestinal.
- 3) El gen *f5* o *k99* mostró una alta prevalencia y codifica para el antígeno flagelar (H), que son proteínas estructurales denominadas flagelinas, que proporcionan movilidad a *E. coli*, favoreciendo la colonización intestinal de la bacteria, estas estructuras son de mucha utilidad para su identificación serológica. (Ok et al., 2009). En otros estudios realizados los genes *k99*, *stx1* y *stx2*, que también fueron estudiados en este trabajo, se identificaron como marcadores genéticos de virulencia más comunes de cepas de *E. coli* aisladas de terneros con diarrea; sin embargo, (Keykhaei et al., 2021) mencionan que en un estudio realizado en terneros con diarrea en Irán no portaban el gen *k99*.
- 4) Otro de los genes estudiados es *stx1*, codifica para la enterotoxina Shiga toxina 1 (Stx1) y es específica para STEC. Este gen fue identificado con una frecuencia moderada respecto a los otros genes de virulencia estudiados (14,2 %), lo cual difiere de lo reportado por Awad et al. (2020), quienes informaron una tasa de 37,3 % en terneros de búfalo en el delta del Nilo-

Egipto. La toxina Shiga tipo 1 es una exotoxina que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas, provocando la muerte celular y esta está asociada a enfermedades como la diarrea hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (SUH), que pueden tener consecuencias graves, especialmente en niños y personas con el sistema inmunitario comprometido.

- 5) El gen *eae*, presentó una frecuencia relativamente baja (8.0%), codifica una proteína de adhesión, conocida como Intimina, que es una toxina que se une a un receptor conocido como Tir (translocated intimin receptor), produce lesiones de unión y borrado en las células intestinales y cambios en la permeabilidad de la membrana del enterocito produciendo diarrea, está presente en las cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC). La frecuencia encontrada de este gen, contrasta con el estudio de (Algammal et al., 2020), quienes señalan que el gen y *eaeA* es uno de los más predominantes encontrados en un estudio de terneros con diarrea en Egipto.
- 6) El gen *lt*, codifica la enterotoxina termolábil, (LT), que incrementa los niveles de cAMP (adenosín monofosfato cíclico) en las células del intestino delgado, provocando pérdida de líquidos y electrolitos, que resulta en diarrea. Este gen es el más prevalente en la mayoría de las cepas patógenas de *E. coli* implicadas en la diarrea de los terneros (Algammal et al., 2020) .
- 7) Menor frecuencia presentó el gen *stx2*, que codifica para Stx2, o toxina Shiga tipo 2, presente en ciertas cepas de *E. coli*, especialmente en las que pertenecen al serotipo O157:H7 de mayor importancia en humanos. Esta

toxina interfiere en la síntesis de proteínas al inactivar el ribosoma 60S, lo que puede producir apoptosis. Stx2 está relacionada con enfermedades gastrointestinales, como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (SUH), cuando invaden el torrente sanguíneo y causan daño en riñones y otros órganos.

- 8) Un caso particular es el gen *hlyA*, que no se encontró en ninguna de las muestras analizadas en este estudio; causa hemólisis y es responsable de la virulencia de ciertos tipos de *E. coli* patógenos. Se considera un factor de patogenicidad por la capacidad de producir una toxina denominada enterolisina.

Los genes de virulencia encontrados son determinantes clave en la patogenicidad de los patotipos de *E. coli* diarreogénica, lo que indica que están involucrados en menor o mayor medida en la presentación de los cuadros diarreicos de los terneros estudiados, a excepción del gen *hlyA*, causante de disentería y/o síndrome urémico hemolítico que no fue detectado en este estudio.

Tabla 1. Frecuencia de genes y factores de patogenicidad de *Escherichia coli*, aislados de heces de terneros con diarrea de la Región Cajamarca, 2022.

Gen	Factor de patogenicidad	%	Total
<i>astA</i>	Enterotx. agregativa termoestable EAST.1	28.4	66
<i>st</i>	Toxina termoestable	23.7	55
<i>f5</i>	Antígeno flagelar	21.6	50
<i>stx1</i>	Toxina shigatoxina 1	14.0	33
<i>eaA</i>	Adesina – Intimina	8.0	19
<i>lt</i>	Toxina termolábil	3.9	9
<i>stx2</i>	Toxina shigatoxina 2	0.4	1
<i>hlyA</i>	Toxina hemolisina	0.0	0
Total		100.0	233

4.2. Patotipos de *E. coli*.

Se colectaron 80 muestras de *E. coli* de las que se aislaron 190 patotipos que fueron distribuidos en cuatro grupos de acuerdo a la presencia de sus genes de virulencia, (tabla 2). También se identificaron 11 grupos de patotipos mixtos o combinados (tabla 3).

Tabla 2. Frecuencia de patotipos de *Escherichia coli* y sus factores de virulencia encontrados en heces de terneros con diarrea en Cajamarca, 2022.

Patotipos	Factores de virulencia	%	N°
Enterotoxigénica	Lt, St, F5	37.4	71
Enteroagregativa	AstA	34.7	66
Shigatoxigénica	Stx1, Stx2	17.9	34
Enteropatógena	Eae	10.0	19
TOTAL		100	190

1. La mayor frecuencia encontrada corresponde a ETEC, con 37.4% (71/190), es similar a lo encontrado por (Chekole et al., 2023) con 32% de ocurrencia para ETEC, en terneros diarreicos en Etiopia, (Algammal et al., 2020), reporta una prevalencia de ETEC de 30.4% (n = 24) en terneros con diarrea en Egipto; sin embargo, es mayor a lo reportado por (Naderi et al., 2024) con 23.7% en terneros de Irán y (Awad et al., 2020) 12.7 % en el delta del Nilo. Los resultados encontrados en este trabajo son similares a los reportados por (Picco et al., 2015) que reportan que la mayoría de los perfiles de virulencia encontrados en terneros con diarrea en Argentina, fueron compatibles con ETEC. Este patotipo se adhiere al enterocito produciendo sus toxinas termolábil, termoestable y antígeno flagelar que activan la enzima guanilato ciclasa (GC), que provoca un aumento de la secreción de iones de cloruro, sodio y agua al lumen intestinal

produciendo su característica diarrea acuosa (Ríos-Muñiz et al., 2019); uno de los factores de virulencia de ETEC es *f5* o *k99*, sin embargo (Keykhaei et al., 2021) mencionan que en un estudio de terneros con diarrea en Irán no portaban el gen *k99*; este gen codifica para el antígeno flagelar H que son proteínas estructurales denominadas flagelinas y proporcionan movilidad a *E. coli*, que favorece la colonización intestinal pero no tiene actividad diarreogénica (Ok et al., 2009), este patotipo se adhiere a la mucosa intestinal mediante fimbrias y produce las toxinas termoestable, termolábil, (Ríos-Muñiz et al., 2019) aumentan la secreción de iones cloruro, sodio y agua al lumen intestinal debido al incremento del cAMP (adenosín monofosfato cíclico). ETEC, no invade la mucosa intestinal, por lo que no causa lesiones patológicas ni cambios morfológicos en los enterocitos; siendo la deshidratación y pérdida de electrolitos el factor que causas la muerte de los terneros. Los resultados encontrados muestran que en las zonas lecheras de Cajamarca ETEC estaría implicado en la mayoría de casos de diarrea en terneros. Asimismo, este patotipo es importante desde el punto de vista de salud pública ya que es causante de la enfermedad denominada “Diarrea del viajero” en humanos, (Nataro & Kaper, 1998).

2. El segundo patotipo más frecuente encontrado en los aislados de terneros con diarrea fue EAEC con 34.7% (66/190). Estos resultados son diferentes a los reportados por, (Awad et al., 2020) con 7.3% de EAEC, en terneros de vacunos y búfalos en Egipto, asimismo, (Chekole et al., 2023) en un estudio llevado a cabo en Etiopia en terneros con diarrea, reportan 2.0% de EAEC, que muestran una gran diferencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por otro

lado, (China et al., 1998) menciona que en un estudio en Bélgica el 66% de terneros presentaron correlación entre la presencia de EAEC y diarrea. Estos márgenes tan grandes en las diferencias encontradas no pueden explicarse fácilmente, por lo tanto, se puede considerar que estas variaciones de deben a las diferentes condiciones ambientales y sistemas de crianza, que influyen directamente en la presencia de este patotipo. La acción patógena de EAEC se debe a que la bacteria se une al epitelio intestinal, formando una biopelícula que induce a la formación de moco, libera toxinas y promueve la inflamación, (Ménard y Dubreuil, 2002). EAEC produce una enterotoxina termoestable de bajo peso molecular llamada enteroagregativa termo estable (EAST1), que es característica de EAEC, produce diarrea tipo acuosa, frecuentemente con moco, con o sin sangre, sin embargo, las toxinas en la EAEC aún no están del todo identificadas ya que esta bacteria se define por la presencia de un grupo regulador maestro que modula varios genes de virulencia, (Ríos-Muñoz et al., 2019). Hasta ahora, una característica común que define las cepas EAEC es la capacidad de producir una apariencia de "ladrillos apilados" en las células epiteliales, pero no distingue entre cepas patógenas y no patógenas. Se han descrito numerosas adhesinas, toxinas y proteínas asociadas con la virulencia, así como múltiples factores que contribuyen a la inflamación inducida por EAEC. Ninguno de estos factores se encuentra en todos los aislados de EAEC y nunca se ha implicado ningún factor por sí solo en la virulencia de EAEC, (Estrada-García & Navarro-García, 2012) sin embargo debería considerarse la interacción de los otros factores, debido a que el gen, *astA*, no solo está presente en EAEC, sino en otras categorías de *E. coli* diarreogénico, (Ménard y Dubreuil, 2002); una de las dificultades para la caracterización e identificación de estos

patotipos sería la gran versatilidad de *E. coli* y su facilidad para intercambiar genes.

3. En el presente estudio STEC, 17,9% (34/190), ocupa el tercer lugar en cuanto a la frecuencia encontrada, este resultado es similar al reportado por, (Algammal et al., 2020) con 20.2% (n = 16) de prevalencia para STEC en un estudio de terneros con diarrea en Egipto; pero es menor a lo reportado por, (Naderi et al., 2024), con 27.4% de STEC en terneros diarreicos en Irán, y a 23% de STEC que mencionan, (Chekole et al., 2023), en un estudio de terneros con diarrea en Etiopía. Por otro lado, nuestro resultado es mucho menor que lo reportado por (Awad et al., 2020), que encontraron (30.7%) de STEC, en un estudio realizado con terneros de vacunos y búfalos en el delta del Nilo. STEC se caracteriza por que los bovinos y otros rumiantes son el principal reservorio, (Gyles et al., 2010) y su propagación puede producirse a través de la ruta fecal-oral, ya sea directamente a través del contacto con heces de animales colonizados, o indirectamente a través de alimentos y agua contaminados, (Caprioli et al., 2005; Daly et al, 2016). STEC es responsable de casos esporádicos y brotes de diarrea con o sin sangre y síndrome urémico hemolítico (SUH) debido a Stx1 y Stx2, también llamadas verotoxina1 (Vtx1) y verotoxina2 (Vtx2) que pueden causar infecciones gastrointestinales graves en humanos y los bovinos (Rivas et al., 2006). De acuerdo a información de estudios realizados en otros países, no debería descartarse la fuente de contaminación intramamaria principalmente en casos de mastitis por *E. coli*, (Farrokh et al., 2012). Este patotipo STEC; también llamada *E. coli* productora de verotoxinas o VTEC se ha visto involucrado en casos esporádicos y brotes de enfermedades, (Farrokh et al., 2012). La frecuencia de STEC encontrada en el presente estudio es menor a lo reportado

por otros investigadores, posiblemente debido a que, en la mayoría de los hatos de nuestro estudio, el sistema de alimentación del ternero es por lactación, lo que disminuye la posibilidad de contaminación de la leche al utilizar recipientes para alimentar a los terneros. En el caso de STEC, la toxina desempeña un papel importante en el síndrome urémico hemolítico y la colitis hemorrágica, porque el riesgo de complicaciones está relacionado con el tipo de toxina, siendo Stx2 el más virulenta (Guion et al., 2008), esto concuerda con (Fernández, 2021) que mencionan que un ternero de 12 días de vida, reportado previamente y remitido muerto, a la necropsia presentó congestión y coágulos de sangre en colon y recto, donde, mediante la detección de los genes *stx1* y *stx2* por PCR determinaron 5 aislamientos de STEC; asimismo concuerda con (Canton et al., 2023) que mencionan que en un caso de septicemia en terneros encontraron que el patotipo con mayor frecuencia de aislamiento en su estudio fue STEC, estos estudios sirven para confirmar la capacidad invasiva y la acción extraintestinal de STEC, reconociendo a este patotipo como el más virulento.

STEC cobra gran importancia desde el punto de vista de salud pública debido a que O157:H7, un serotipo de STEC, presenta alta virulencia y es motivo de gran preocupación para la industria láctea (Farrokh et al., 2012), por el riesgo que presenta para la contaminación a humanos. Los resultados de este estudio no concuerdan con (Canton et al, 2023), que mencionan que el patotipo con mayor frecuencia de sus aislamientos fue STEC, tanto en terneros con diarrea como en septicemias. Según los reportes de estos estudios es evidente que existen diferencias en la prevalencia e incidencia de los diferentes patotipos de *E. coli* debido posiblemente a diversos factores como geográficos, climáticos y de manejo.

4. Este estudio muestra que EPEC presenta una frecuencia de 10,0% (19/190); este resultado es similar a los reportados por (Naderi et al., 2024) 15.7% en terneros diarreicos en Irán y (Canton et al, 2023), que mencionan que de 34 casos de diarrea el 30.3 % fueron patógenos y de estas el 10.0 % fueron EPEC, sin embargo es mucho mayor a lo reportado por (Chekole et al., 2023), con 2.0 % de frecuencia para EPEC en terneros con diarrea en Etiopía, y 2.7 para EPEC en terrenos con diarrea de vacunos y búfalos (Awad et al., 2020). EPEC utiliza una proteína, llamada adhesina o EAF (Factor de adherencia), para adherirse a las células intestinales y causar daño mediante un mecanismo complejo conocida como la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento), produciendo lesiones histopatológicas que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito (Vidal-Graniel, 2003). EPEC son cepas diarreogénicas que pueden causar lesiones de adhesión y borrado en el epitelio intestinal, su patogenicidad radica en la producción de lesiones de adhesión y borrado que causa al adherirse los enterocitos provocando la destrucción (borrado) de las microvellosidades. Todas las EPEC son identificadas por el factor de virulencias Eae (Mare et al., 2021).

Las frecuencias de los patotipos encontrados en el presente estudio, muestran marcadas diferencias con los resultados reportados por otros investigadores. Esto se puede atribuir a diversos factores como la influencia estacional del verano y el invierno, (Awad et al., 2020), la geografía, variaciones en las metodologías de estudio, edad de los animales, sistemas de crianza, las características sociodemográficas, o los sesgos en la toma de muestras

4.3. Patotipos mixtos, híbridos o heteropatogenos de *Escherichia coli*.

Los patotipos híbridos, también llamados mixtos de *E. coli* reúnen diversos factores de virulencia, que les confieren diferentes patrones patogénicos. Esta diversidad de los patotipos puede producir cuadros clínicos más graves y complejos. En este estudio se identificaron 11 grupos de patotipos mixtos, que presentan diferentes frecuencias de aparición, (tabla 3). Los patotipos mixtos más prevalentes fueron EAEC/ETEC, STEC/EAEC/ETEC, con frecuencias del 42.9% y 25.7% respectivamente. Las combinaciones EPEC/STEC/EAEC/ETEC, EPEC/EAEC/ETEC, presentaron frecuencias intermedias, con 10.0% y 7.1%. STEC/EAEC, EPEC/ETEC fueron menos comunes, representando un 4.3% y 2.9% respectivamente; mientras que los patotipos EPEC/EAEC/ETEC, EPEC/STEC/EAC, EPEC/STEC, EAEC/STEC y EPEC/EAEC, presentaron frecuencias de, 1.4%, (tabla 3).

Los resultados de este estudio muestran que el 87.5% de los terneros estudiados presentaron infecciones mixtas, lo que coincide con los resultados reportados por (Chekole et al., 2023) quienes encontraron que el 18.2% de sus muestras analizadas eran STEC/ETEC. De igual manera (Awad et al., 2020), documentaron un alto rango de ETEC/STEC y ausencia de ETEC/EPEC en terneros diarreicos en Egipto. Otros estudios han detectado STEC/EPEC en los alimentos sugiriendo que estos pueden actuar como reservorio de *E. coli* con potencial patogénico, así como la capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (Shen et al., 2022).

Tabla 3. Frecuencia de patotipos mixtos de *Escherichia coli*, aislados de heces de terneros con diarrea de la Región Cajamarca, 2022

N°	Combinaciones	Frecuencia	%
1	EAEC/ETEC	30	42.9
2	STEC/EAEC/ETEC	18	25.7
3	EPEC/STEC/EAEC/ETEC	7	10.0
4	EPEC/EAEC/ETEC	5	7.1
5	STEC/EAEC	3	4.3
6	EPEC/ETEC	2	2.9
7	EPEC/EAEC	1	1.4
8	EAEC/STEC	1	1.4
9	EPEC/STEC	1	1.4
10	EPEC/STEC/EAEC	1	1.4
11	EPEC/STEC/ETEC	1	1.4
Total		70	100.0

(Chekole et al., 2023) informaron sobre la presencia de un patotipo mixto STEC/ETEC en terneros afectados por diarrea en áreas de bajos recursos, sugiriendo que los sistemas de manejo de esas zonas podrían ser diferentes a las zonas evaluadas en este estudio. (Aref et al., 2018) mostraron que la alta frecuencia de ECEH y la presencia de un nuevo patotipo híbrido STEC/ETEC, enfatizando su relevancia en la etiopatogenia de la diarrea en terneros, reforzando el papel de estos animales como reservorio de *E. coli* potencialmente patógena para los humanos. (Naderi et al., 2024) también documentaron tres patotipos combinados incluido STEC/ETEC, mientras que (Awad et al., 2020) detectaron combinaciones atípicas de STEC/ETEC 14.7 % y ETEC/EPEC 2,7 %, siendo este último resultado que similar a lo encontrado en nuestro estudio 2.9 %. Además, se afirman que la mayoría de estas combinaciones se presentaron en terneros de búfalo que en terneros de ganado vacuno.

Es relevante señalar que la combinación STEC/ETEC no fue encontrada en nuestro estudio, lo que podría atribuirse a la acción de la toxina shiga (Stx)

presente en STEC, que puede provocar cuadros clínicos severos y una rápida mortalidad de los terneros. Sin embargo, como mencionan (Naderi et al., 2024) y (Aref et al., 2018) la presencia de patotipos mixtos también fue confirmada en terneros sanos y diarreicos siendo la mayor prevalencia en terneros diarreicos. Esto sugieren que los terneros sanos podrían actuar como reservorios de estos patotipos mixtos.

El número de patotipos mixtos o híbridos observados en nuestro estudio es mayor a los reportados por otros autores, lo que podría servir como indicativo del desarrollo de resistencia a los antibióticos de las cepas de *E. coli* en los hatos estudiados. Además, los patotipos mixtos pueden presentar un riesgo mayor debido a que una sola cepa presenta genes que codifican varios factores de virulencia. Los resultados obtenidos indican una considerable variabilidad entre estos patotipos mixtos, y que su frecuencia en caso de diarrea en terneros no se puede determinar con exactitud debido a que, la mayoría de los casos, no son notificados ni se realizan exámenes de laboratorio, esto significa un gran riesgo para la presentación de cuadros diarreicos, que son comunes en los hatos lecheros de la región, ya que según (Aref et al., 2018) los patotipos híbridos puede ampliar su capacidad patogénica al combinar varios factores de virulencia.

Los resultados encontrados en este estudio indican que la presencia de *E. coli* es un factor determinante en la presentación de diarreas en los terneros en la zona; lo que resalta la necesidad de considerar a estos animales como reservorios de patotipos, que podrían estar involucrados incluso en la presentación de cuadros diarreicos en humanos. (Chekole et al., 2023), advierten que existe un

considerable riesgo de transmisión zoonótica de terneros a humanos, lo que subraya la importancia de mejorar los sistemas de manejo de terneros para reducir las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad.

En los últimos años la investigación genómica ha aumentado, por lo que está claro que los genes que codifican algunos factores de virulencia, como la toxina Shiga, se encuentran entre patotipos de *E. coli* diferentes a los que tradicionalmente no han sido asociados con este tipo de patogenicidad. Esto podría anticipar la aparición de nuevos brotes causados por esas cepas híbridas. Por lo tanto, son necesarios más estudios sobre aislamientos de *E. coli* heteropatógenos o híbridos patógenos para comprender y controlar mejor la propagación de estos patógenos. (Santos et al., 2020)

No obstante, es importante considerar que la combinación de los factores de virulencia no necesariamente conduce al desarrollo de nuevas características de patogenicidad o mayor virulencia ya que algunas de las cepas híbridas/mixtas/heteropatógenas identificadas por métodos moleculares no expresan ambos rasgos, (Santos et al., 2020)

4.4. *E. coli*. por provincia.

Se observó una ligera variación en el número de patotipos de *E. coli* entre las provincias estudiadas. La mayor prevalencia se registró en Celendín, con 27.9 % (53/190), seguida de Cajamarca y Chota con 24.2 % (46/190) y o San Miguel con 23.7 % (45/190). A pesar de las diferencias, la frecuencia de los patotipos de *E. coli*, mostró una tendencia similar en las cuatro provincias analizadas. El patotipo ETEC fue el más frecuente, seguido de EAEC, STEC y EPEC. Sin embargo, es

importante señalar que, en Cajamarca, EPEC presentó una frecuencia ligeramente mayor que STEC. Estos hallazgos sugieren que, a pesar de la diferencia en la prevalencia total de patotipos entre provincias, la distribución de las frecuencias de los patotipos de *E. coli* es similar en las cuatro localidades estudiadas.

Tabla 4. Frecuencia de patotipos de *Escherichia coli*, por provincia encontrados en heces de terneros con diarrea en la Región Cajamarca, 2022.

Provincia	EPEC	STEC	EAEC	ETEC	Total	%
Celendín	6	10	18	19	53	27.9
Cajamarca	6	5	17	18	46	24.2
Chota	2	10	16	18	46	24.2
San Miguel	5	9	15	16	45	23.7
Total	19	34	66	71	190	100.0

4.3. Patotipos de *E. coli*, según sexo.

En el análisis de las muestras recolectadas, se observó que el 65.00 % (52 de 80) de los animales muestreados eran machos, mientras que el 35.00 % (28 de 80) correspondían a hembras. En relación con la frecuencia de patotipos de *Escherichia coli*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sexos. Sin embargo, se mantuvo la tendencia general hacia un mayor porcentaje de casos de ETEC. En contraste, EPEC presentó una ligera predominancia en machos. Estos hallazgos sugieren que, aunque la distribución de patotipos no se ve significativamente afectada por el sexo de los animales, existen variaciones en la prevalencia de ciertos patotipos que merecen ser investigadas más a fondo.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Existe una alta prevalencia de patotipos de *E. coli*, distribuidos en cuatro grupos según sus genes de virulencia; siendo ETEC y EAEC las más prevalentes con (37.4%), (34.7%), respectivamente, STEC (17.9%) y EPEC (10.0%). Estos resultados indican que en la región de Cajamarca ETEC y EAEC están significativamente asociadas a cuadros de diarrea en terneros.
- Los cuadros diarreicos que se presentan en los terneros de las áreas estudiadas, son en su mayoría de tipo secretorio, producidas por ETEC y EAEC, debido a que estos patotipos poseen, los genes *Lt*, *St* y *AstA* que codifican para los factores de virulencia LT, ST y EAST1 respectivamente, que promueven la salida de sodio y agua al lumen intestinal.
- Se identificaron 11 combinaciones de patotipos híbridos, siendo la más prevalente la asociación EPEC/EAEC. Este hallazgo subraya la capacidad de *Escherichia coli* para adquirir y combinar genes de virulencia, lo que podría representar un riesgo considerable para la aparición de cuadros diarreicos más graves y complejos.

RECOMENDACIONES.

- Realizar estudios para analizar la interacción entre patotipos mixtos y su impacto en la patogenicidad.
- Se sugiere realizar más investigaciones para evaluar la incidencia de los patotipos de *E. coli* en terneros, especialmente en aquellos que presentan diarrea recurrente o crónica, que ayudarían a determinar si hay cambios en sus perfiles de virulencia según el transcurso del tiempo.
- Es importante la capacitación permanentemente a las personas que manejan los animales, con la finalidad de contar con personal capacitado en los temas de manejo de terneros, alimentación, sanidad y bienestar animal, desarrollando el concepto de “One Health”.
- Implementar buenas prácticas de manejo de los terneros, que incluyan, la toma de calostro, buena alimentación, higiene, sanidad y bienestar de los terneros con la finalidad de prevenir la diarrea, especialmente en la etapa de lactación.
- En el tratamiento de cuadros de diarrea en terneros, implementar terapias de rehidratación, debido a que la mayoría de los casos las diarreas serían de tipo secretoria y la principal complicación es la deshidratación, que podría ser la principal causa de muerte.

LISTA DE REFERENCIAS

- Akiyama, Y., Saito, E., Futai, H., Ogita, K., Sakae, H., Fukunaga, M., Tsuji, H., Chikahira, M., & Mimura, M. (2014). Comprehensive Study of Pathogenic Genes Distributed in Escherichia coli Isolated from Cattle. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 56(3), 118. <https://doi.org/10.3358/shokueishi>
- Algammal, A. M., El-Kholy, A. W., Riad, E. M., Mohamed, H. E., Elhaig, M. M., Al Yousef, S. A., Hozzein, W. N., & Ghobashy, M. O. I. (2020a). Genes encoding the virulence and the antimicrobial resistance in enterotoxigenic and shiga-toxigenic E. coli isolated from diarrheic calves. *Toxins*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/toxins12060383>
- Aref, N. E. M., Abdel-Raheem, A. R. A., Kamaly, H. F., & Hussien, S. Z. (2018). Clinical and sero-molecular characterization of escherichia coli with an emphasis on hybrid strain in healthy and diarrheic neonatal calves in Egypt. *Open Veterinary Journal*, 8(4), 351–359. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i4.1>
- Awad, W. S., El-Sayed, A. A., Mohammed, F. F., Bakry, N. M., Abdou, N. E. M. I., & Kamel, M. S. (2020). Molecular characterization of pathogenic Escherichia coli isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. *Tropical Animal Health and Production*, 52(6), 3173–3185. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02343-1>
- Blanchard, P. C. (2012). Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(3), 443–464. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.07.002>
- Canton, S. Cacciato. (2021). Septicemia causada Shiga en por Escherichia terneros de tambo coli. I Congreso de Microbiología Veterinaria. Libro de

Resúmenes, 356–357.

https://www.academia.edu/114520891/I_Congreso_de_Microbiolog%C3%ADa_Veterinaria

Chekole, W. S., Adamu, H., Sternberg-Lewrein, S., Magnusson, U., & Tessema, T. S. (2023). Occurrence of *Escherichia coli* Pathotypes in Diarrheic Calves in a Low-Income Setting. *Pathogens*, 12(1).

<https://doi.org/10.3390/pathogens12010042>

China, B., Pirson, V., & Mainil, J. (1998). *Prevalence and molecular typing of attaching and effacing Escherichia coli among calf populations in Belgium.*

Cho, Y. il, & Yoon, K. J. (2014). An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15(1), 1–17.

<https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.1>

Clarke, S. C. (2001). *Diarrhoeagenic Escherichia coli — an emerging problem ?* 41, 93–98. [https://doi.org/10.1016 / s0732-8893 \(01\) 00303-0](https://doi.org/10.1016 / s0732-8893 (01) 00303-0)

Clínica Universidad de Navarra (2023) disponible en <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/virulencia>, consultado el 16 febrero 2025.

Estrada-Garcia, T., & Navarro-Garcia, F. (2012). Enteropathogenic *Escherichia coli* pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 66(3), 281–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x>

Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., Reu, K. De, Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., & Cerf, O. (2012). *International Journal of Food*

- Microbiology Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>
- Fernandez, D. et al. (2021). Caracterización de *Escherichia Coli* shigatoxigénica asociada a colitis hemorrágica en un ternero neonato. *I Congreso de Microbiología Veterinaria. Libro de Resúmenes, Ciencias Veterinarias*, 239–240.
- Guion, C. E., Ochoa, T. J., Walker, C. M., Barletta, F., & Cleary, T. G. (2008). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1752–1757. <https://doi.org/10.1128/JCM.02341-07>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Keykhaei, N., Salari, S., & Rashki, A. (2021). Frequency of k99, stx1, and stx2 virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and clinically healthy suckling calves in Sistan and Baluchistan province, Iran. *Archives of Razi Institute*, 76(2), 283–292. <https://doi.org/10.22092/ari.2019.124040.1268>
- Mare, A. D., Ciurea, C. N., Man, A., Tudor, B., Moldovan, V., Decean, L., & Toma, F. (2021). Enteropathogenic *Escherichia coli* - A summary of the literature. *Gastroenterology Insights*, 12(1), 28–40. <https://doi.org/10.3390/GASTROENT12010004>
- Margueritte, J., Mattion, N., Blackhall, J., Fernández, F., Parreño, V., Vagnozzi, A., Odeón, A., & Combessies, G. (2007). Diarrea Neonatal En Terneros De

- Rodeos De Cría: Su Prevención Y Tratamiento. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1, 3.
- Ménard, L.-P., & Dubreuil, J. D. (2002). Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 (EAST1): A New Toxin with an Old Twist. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 28, Issue 1).
- Naderi, Z., Ghanbarpour, R., Jajarmi, M., Dehdashti, S., Bagheri, M., Eskandarzade, N., Mohseni, P., & Alizade, H. (2024). Antibiotic resistance profiling and phylotyping of human-diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes detected from diarrheic and non-diarrheic calves in Iran. *Molecular Biology Reports*, 51(1). <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09494-6>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). *Diarrheagenic Escherichia coli*. 11(1), 142–201.
- Ochoa, T. J., Mercado, E. H., Durand, D., Rivera, F. P., Mosquito, S., Contreras, C., Riveros, M., Lluque, A., & Barletta, F. (2011). *Frecuencia y patotipos de Escherichia coli diarrOgénica en niños peruanos con y sin diarrea Peruvian children with and without diarrhea*. 28(1), 13–20.
- Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, Ü., Şen, I., Gündüz, I. K., Birdane, M. F., & Güzelbekteş, H. (2009). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56(2), 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01156.x>
- Picco, N. Y., Alustiza, F. E., Bellingeri, R. V., Grosso, M. C., Motta, C. E., Larriestra, A. J., Vissio, C., Tiranti, K. I., Terzolo, H. R., Moreira, A. R., & Vivas, A. B. (2015). Detección molecular de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de terneros neonatos de tambo en la provincia de Córdoba,

- Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.01.006>
- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., & Estrada-García, T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta Médica de México*, 155(4), 410–416.
<https://doi.org/10.24875/GMM.19004716>
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., & Leotta, G. A. (2006). Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina*, 66(SUPPL. 3), 27–32.
- Rúgiles, L. C., Bai, J., Martínez, A. J., Vanegas, M. C., & Gómez-Duarte, O. G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stool samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 282–286.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.034>
- Santos, A. C. de M., Santos, F. F., Silva, R. M., & Gomes, T. A. T. (2020). Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Schwidder, M., Heinisch, L., & Schmidt, H. (2019). Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. In *Toxins* (Vol. 11, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins11090502>

- Shen, J., Zhi, S., Guo, D., Jiang, Y., Xu, X., Zhao, L., & Lv, J. (2022). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Whole Genome Sequencing Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Imported Foods in China during 2015–2021. *Toxins*, *14*(2). <https://doi.org/10.3390/toxins14020068>
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M., & Iwanaga, M. (2003). Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(6), 2669–2671. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2669-2671.2003>
- Umpiérrez, A., Ernst, D., Fernández, M., Oliver, M., Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C., Giannitti, F., Fraga, M., & Zunino, P. (2021). Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Revista Argentina de Microbiología*, *53*(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.004>
- Vidal-Graniel, M. (2003). Salud en Tabasco. *Salud En Tabasco*, vol. 9, núm 1. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48709108>
- Yacarini-Martínez, A. E. (2020). *Causantes de Diarrea Infantil de Establecimientos de Salud de la Región Lambayeque-Perú , 2018 Detection of Patotypes of Escherichia coli Strains*. *13*), 299–302.

ANEXOS

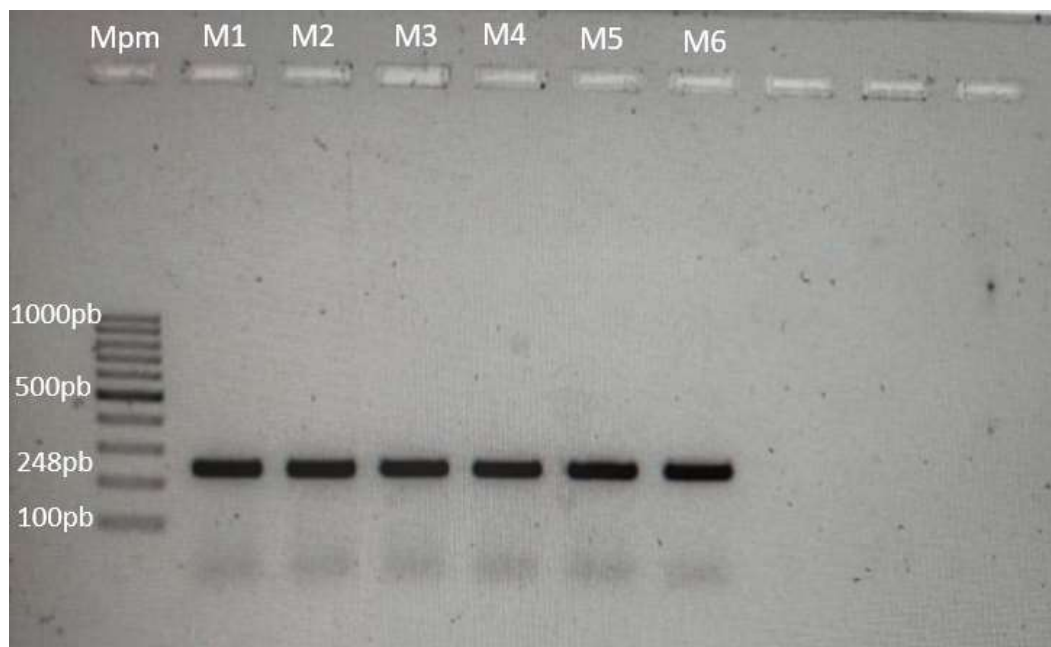


Figura 1. Identificación del gen *uiDA* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %: Mpm: marcador de peso molecular 100-1000 pb, líneas M1, M2, M, M4, M5, M6, positivas al gen *uiDA* 248 pb. Cajamarca 2022.

Tabla 5. Medición del ADN genómico extraído de *Escherichia coli*, aislado de muestras de heces de terneros con diarrea. Cajamarca 2022.

Muestras de ADNg de terneros positivos a colibacilosis	Absorbancia 260/280nm	Cantidad de ADNg ug/ml
1	1.989	1080.1
2	1.951	556.16
3	2.023	656.71
4	1.850	295.97
5	1.959	502.09
6	1.862	334.67
7	1.965	354.28
8	1.795	147.89
9	1.937	656.49
10A	1.962	783.15



Figura 2. Placas con colonias de *E. coli* asiladas en agar Mac Conkey con sorbitol, Cajamarca 2022.



Figura 3. Perfil térmico de la PCR por 25 ciclos para la identificación del gen *uid*. Cajamarca 2022.

Tabla 6. Frecuencia de genes de *Escherichia coli*, por provincia, en terneros con diarrea. Cajamarca 2022.

Provincia	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>hlyA</i>	<i>astA</i>	<i>stx2</i>	<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>f5/k99</i>	Total
Cajamarca	6	5	0	17	0	5	18	11	62
Celendín	6	10	0	18	0	1	18	14	67
Chota	2	9	0	16	1	2	8	14	52
San Miguel	5	9	0	15	0	1	11	11	52
Total	19	33	0	66	1	9	55	50	233
%	8.19	14.22	0.00	28.45	0.43	3.88	23.71	21.55	100.43

Tabla 7. Frecuencia de patotipos de *Escherichia coli* por provincia en terneros con diarrea. Cajamarca 2022.

Provincia	EPEC		STEC		EAEC		ETEC		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Cajamarca	32	6.0	15	5.0	26	17.0	30	34.0	62	26.6
Celendín	32	6.0	29	10.0	28	18.0	29	33.0	67	28.8
Chota	11	2.0	29	10.0	25	16.0	21	24.0	52	22.3
San miguel	26	5.0	26	9.0	23	15.0	20	23.0	52	22.3
Total	100	19.0	100	34.0	102	66.0	100	114.0	233	100.0

|