

Trabajo de Fin de Grado.

Estudio de factores de virulencia en *Escherichia coli*.

Nutrición humana y dietética



Autora: Laura Sanz López

Tutora: Irma Caro Canales

Curso 2020/2021

Facultad de Medicina

Universidad de Valladolid

Resumen

E. coli comprende una amplia diversidad de cepas que forman parte de la microbiota intestinal de humanos y animales de sangre caliente. Entre esas cepas podemos encontrar diversas variantes patógenas que pueden causar infecciones intestinales y extraintestinales. Entre las cepas patógenas de *E. coli* extraintestinales encontramos a las *E. coli* uropatógenas (UPEC) que pueden producir toxinas como el factor necrotizante. Este microorganismo se ha aislado de animales con sintomatología diarreica y pueden llegar al hombre por el consumo de alimentos contaminados. En este trabajo se ha estudiado la presencia de los genes *cnf1*, *cnf2* y *HlyA* en 101 cepas *E. coli* aisladas de conejos con sintomatología diarreica, así como la resistencia a cuatro antibióticos de las cepas que albergaron el gen *cnf2*. Ninguna de las cepas estudiadas fue positiva a los genes *cnf1* y *HlyA*, el 7,9% fueron positivas al gen *cnf2* y de estas cepas positivas, todas fueron resistentes por lo menos a un antibiótico.

Palabras clave

E. coli, PCR, gen *cnf1*, gen *cnf2*, gen *HlyA*, carne, conejo.

Abstract

E. coli comprises a large variety of strains that are part of the gut microbiota of humans and warm-blooded animals. Among these strains, we can find various pathogenic variants that can cause intestinal and extra-intestinal infections. In addition, we find uropathogenic *E. coli* (UPEC) between these variants that can produce toxins, such as necrotizing factor. This microorganism has been isolated from animals with diarrheal symptoms and can reach humans through the consumption of contaminated food. In this work, the presence of the *cnf1*, *cnf2* and *HlyA* genes has been studied in 101 *E. coli* strains isolated from rabbits with diarrheal symptoms and resistance to four antibiotics of the strains that harbored the *cnf2* gene. None of the strains studied was positive for the *cnf1* and *HlyA* genes. However, the 7.9% of isolates strains were positive for the *cnf2* gene, and these positive strains were all resistant to at least one antibiotic.

Key words

E. coli, PCR, *cnf1* gene, *cnf2* gene, *HlyA* gene, meat, rabbit.

Índice

| | |
|---|----|
| JUSTIFICACIÓN | 4 |
| INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| Características generales de <i>E. coli</i> | 4 |
| Enfermedades clínicas..... | 7 |
| Factores de virulencia: Factores necrotizantes (<i>cnf1</i> y <i>cnf2</i>)..... | 14 |
| Hemolisina..... | 17 |
| Métodos de detección molecular | 18 |
| Antibióticos. | 21 |
| OBJETIVOS..... | 21 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| Cepas estudiadas..... | 22 |
| Cepas control..... | 22 |
| Recuperación de las cepas | 22 |
| Extracción de ADN..... | 22 |
| Detección de los genes <i>cnf1</i> , <i>cnf2</i> y <i>HlyA</i> | 23 |
| Amplificación de fragmentos del ADN para los genes necrotizantes | 23 |
| Análisis de los productos de la reacción de PCR | 26 |
| Antibiogramas | 26 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 4 |
| CONCLUSIONES. | 32 |
| ANEXOS | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |

JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra en el aparato digestivo del ser humano y de animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son forma parte habitual de la microbiota intestinal. Sin embargo, algunas de ellas pueden causar enfermedades. Esta bacteria se puede transmitir al humano por el consumo de alimentos sin cocinar contaminados o que no han sido apropiadamente cocinados. En España, la carne es uno de los alimentos más consumidos, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación la ingesta de este alimento fue de 45,2 kg/per cápita en el 2019, y dentro de esta, la carne de conejo ocupó el sexto puesto. Estos animales son considerados un reservorio de este tipo de bacterias por lo tanto también puede contener cepas patógenas que podrían ser transmitidas a las personas por medio del consumo de carne contaminada. Según la OMS, algunas cepas de *E. coli* patógenas transmitidas por los alimentos causaron hasta 34 muertes en el 2011.

Para establecer el posible potencial patógeno de las cepas aisladas de animales enfermos, es de vital importancia conocer los tipos de genes que contienen, por ello la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las técnicas más usadas y sensibles que permiten conocer las cepas que contienen estos genes y establecer de esta manera la incidencia de esos genes de virulencia.

La elección del tema de este TFG fue personal, ya que la microbiología es un campo de investigación muy interesante, además de estar ligado a la nutrición a través de la seguridad alimentaria. También me pareció importante la ampliación de conocimientos adquiridos en esta rama, ya que sino de otra manera no hubiera sido posible.

INTRODUCCIÓN

Características generales de *E. coli*

La *Escherichia coli*, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, mesófilo, ubicuo, móvil o inmóvil y no forma esporas. Su principal reservorio es el intestino de los animales de sangre caliente, donde se encuentra

en altas concentraciones. Debido a este hecho, forma parte de la microflora normal del ser humano, aunque algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones. El género *Escherichia* agrupa cinco especies, de las que *E. coli* es la más frecuente y la más relevante desde el punto de vista clínico. (1)

Escherichia coli puede causar graves intoxicaciones alimentarias. Esta bacteria se transmite al ser humano principalmente por el consumo de alimentos contaminados como: los productos cárnicos, carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, hortalizas, semillas germinadas crudas contaminadas con heces de animales, así como, aunque en menor medida, entre contacto persona-persona. El principal reservorio de este patógeno es el ganado bovino, aunque también se consideran reservorios importantes otros rumiantes, como ovejas, cabras y ciervos, otros mamíferos (como cerdos, caballos, conejos, perros y gatos) y aves (como pollos y pavos). (1) (9)

Un número creciente de brotes, 59 en 2018, y 62 en 2019, en USA (41), causados por esos microorganismos se asocian al consumo de frutas y verduras (como las coles de Bruselas, las espinacas, la lechuga, brotes de alfafa, etc.), contaminadas por el contacto con las heces de animales domésticos o salvajes en algún momento durante su cultivo o manipulación. Así mismo, se ha observado la transmisión persona a persona en niños que se encuentran en instituciones de cuidados especiales y en edades comprendidas entre 1-4 años, y 15-39 años en hogares. (54)

Las buenas prácticas de manufactura y la adecuada implementación del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) son las medidas más importantes, tanto en los hogares como en la industria alimentaria, para evitar la infección por esta bacteria. (9). Más aún, teniendo en cuenta que la dosis mínima infectiva de algunos serotipos de *E. coli* patógenos, como el serotipo O157:H7, se ha establecido entre 10-100 ufc/ g o ml de alimento (54) (55).

Serotipado

La identificación de cepas patógenas es compleja. Una de las formas más utilizada para su identificación es la serotipación. Ésta ocupa un lugar central en la identificación de estas bacterias, incluso antes de la identificación de los factores de virulencia específicos que

podrían albergar las cepas de *E. coli* diarreogénicas, el serotipado era la forma predominante por el cual se diferenciaban las cepas patógenas. (4)

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman White desarrolló un esquema de serotipado que se va actualizando con el tiempo y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" se refiere al número de antígeno de la pared celular, mientras que el antígeno H, determina el número del antígeno del flagelo. (4)

Una combinación específica de antígenos O y H define el "serotipo" de una cepa. Los serogrupos son un conjunto de variantes dentro de una especie de microorganismos que están antigénicamente relacionados de forma estrecha, es decir, comparten un antígeno común. Los serogrupos específicos de *E. coli* pueden asociarse con determinados síndromes clínicos, pero en general no son los propios antígenos serológicos los que confieren virulencia. Más bien, los serotipos y serogrupos sirven como marcadores cromosómicos, fácilmente identificables, que se correlacionan con clones virulentos específicos. (5)

Las cepas de *E. coli* que presentan patogenicidad se agrupan en "patotipados" es decir, de acuerdo con la enfermedad clínica producida y los genes de virulencia que albergan proporcionan un rasgo de patogenicidad más o menos concreto. (5)

Clasificación *E. coli*

Las diferentes cepas de *E. coli* se pueden clasificar de diferentes maneras, ya sea por su capacidad de producir sintomatología, (como se verá más adelante), o bien por su clasificación filogenética.

Los análisis filogenéticos han demostrado que las cepas de *E. coli* se dividen en cuatro grupos principalmente (A, B1, B2 y D). (10) De esta manera las cepas extra-intestinales virulentas pertenecen principalmente al grupo B2 y, en menor medida, al grupo D. Mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A. Además, se ha observado que el grupo B2 tienen mayor capacidad para persistir en el tracto intestinal que las cepas de los otros grupos filogenéticos, este hecho puede ser debido, al menos en parte, a la

presencia de genes de virulencia patógenos extra-intestinales y a los genes albergados en islas de patogenicidad. (10) (11) (12)

Enfermedades clínicas

Las cepas de *E.coli* pueden causar diversas enfermedades como la septicemia, la infección del aparato urinario y diarreas.

La septicemia producida por los bacilos gramnegativos *E. coli* proviene de infecciones del aparato urinario o digestivo. La mortalidad que se asocia a la septicemia por *E. coli* es elevada en pacientes cuya inmunidad está alterada, o en los que la infección primaria se localiza en el abdomen o en el sistema nervioso central (SNC). (1)

Las bacterias del tipo uropatógenas, son especialmente virulentas debido a su capacidad para producir adhesinas, las cuales se unen a las células que recubren la vejiga y el aparato urinario superior (evitando la eliminación de las bacterias durante la micción). Además pueden contener hemolisinas, que lisan los hematíes y otros tipos células, provocando la liberación de citocinas y la estimulación de la respuesta inflamatoria. (1) (2) (5)

Las cepas de *E. coli* que producen diarreas, aunque inicialmente fueron clasificaron en 7 grupos (6), actualmente se consideran 6 grupos denominados: EPEC, ECET, ECEH, ECEI, ECEA y UPEC.

1. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas enteropatógenas de *E. coli* son la principal causa de diarrea infantil en los países pobres. La infección se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado, con la destrucción posterior de las microvellosidades. Los genes responsables de esta patogenicidad son más de 40 y su función es la unión y la destrucción de la superficie mucosa del huésped. (1) (3)

El mecanismo de acción de estas cepas se inicia con el receptor de la intimina translocada (Tir), una proteína, que se inserta en la membrana epitelial. Este proceso está mediado, además por otras dos proteínas secretadas en la membrana, que actúan como receptor de una adhesina bacteriana en la membrana externa, la intimina. Dicha proteína está codificada por el gen cromosomal *eaeA* que tiene la capacidad de inducir la histopatología

A/E (adherencia y eliminación), este gen está integrado en una isla de patogenicidad denominada locus de borramiento de enterocitos (LEE). La diarrea acuosa típica de esta sintomatología se debe a una inadecuada absorción de iones en el intestino derivada de la destrucción de las microvellosidades. La adherencia está mediada por pili o fimbrias rizadas cuya información genética está codificada en un plásmido denominado EAF (EPEC *adherence factor*) y de algunos genes cromosomales. (3) (4) (13)

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eaeA* que, como ya se mencionó anteriormente, codifican la producción de intimina, que participa en A/E (Eliminación/ Adhesión), y el plásmido EAF (Factor de adherencia). Las cepas consideradas atípicas son aquellas que contienen el gen *eaeA* pero no el plásmido EAF. (4) (13). La sintomatología que produce las EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. (1) (5)

2. *E. coli* enterotoxígena (ECET)

La enfermedad producida por *E. coli* enterotoxígena se observa con mayor frecuencia en los países en vías de desarrollo (se ha estimado que se registran unos 650 millones de casos al año) (1). Las infecciones afectan a niños pequeños de los países en vías de desarrollo o a los que viajan a estas zonas. Las infecciones se adquieren fundamentalmente a través del consumo de alimentos o de agua contaminada con restos fecales. No se produce transmisión de una persona a otra (1).

El mecanismo de acción de ECET comienza con la síntesis de dos clases de enterotoxinas: toxinas termolábiles (LT-I, LT-II) y toxinas termoestables (STa y STb):). Mientras que la LT-II no se asocia a enfermedad en el ser humano, la toxina LT-I es estructuralmente semejante a la toxina del cólera y sí se asocia a enfermedad en el ser humano. Esta toxina está formada por una subunidad A y por cinco subunidades B idénticas. Las subunidades B se unen al mismo receptor que la toxina del cólera, así como a otras glucoproteínas de superficie en las células epiteliales del intestino delgado. (1) (14) (15). La subunidad A tiene actividad difosfato de adenosina (ADP)-ribosiltransferasa e interacciona con una proteína de membrana (Gs) que regula la adenil ciclasa. El resultado neto es el aumento de las

concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), con un incremento de la secreción de cloro y disminución de la absorción de cloro y de sodio, que se manifiestan con diarrea acuosa. La exposición a la toxina estimula también la secreción de prostaglandinas y la producción de citocinas inflamatorias, lo que da lugar a una mayor pérdida de líquidos. (4). También la toxina STa causa enfermedad en el ser humano. Esta toxina tiene un peso molecular bajo, es monomérica y se une al receptor transmembrana de la guanilato ciclasa, lo que provoca un aumento de las concentraciones de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) y la posterior hipersecreción de líquidos (15).

Las cepas ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias denominadas CFA (colonization factor antigens), estos factores reconocen a los receptores gluco-proteicos de la célula anfitriona. Por su parte, los genes de *LT-I* y *STa*, codifican la producción de enterotoxinas, y estas se encuentran en un plásmido transferible. La aparición de la enfermedad requiere la actuación de la toxina y los factores de colonización.

Las ETEC son importantes patógenos en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La principal fuente de contaminación el agua contaminada y alimentos contaminados (1) (14) (15).

3. *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)

Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica son las cepas que causan con mayor frecuencia enfermedad en los países desarrollados. La gravedad de la enfermedad producida por ECEH varía desde una diarrea leve hasta una colitis hemorrágica con dolor abdominal grave, diarrea sanguinolenta, sin fiebre o con febrícula y síndrome urémico hemolítico (SUH). La enfermedad por ECEH es más frecuente en los meses cálidos, y su mayor incidencia se registra en los niños menores de 5 años. La mayoría de los casos de esta enfermedad se ha

atribuido al consumo de carne de vaca o de otros productos: piezas cárnicas poco cocinadas, agua, leche no pasteurizada o zumos de frutas, verduras crudas y frutas. (1)

Las cepas de ECEH expresan la toxinas *Shiga-Like* (*Stx-1*, *Stx-2*, o ambas) (4). Estas toxinas inducen lesiones en las células epiteliales. *Stx-1* es idéntica a la toxina *Shiga-Like* producida por *Shigella dysenteriae*, y *Stx-2* presenta solamente una homología del 60% con esa toxina. Ambas poseen una subunidad A y cinco subunidades B, y estas últimas se unen a un glucolípido específico de la célula del organismo huésped (Globotriacilceramida, GB3). Hay una alta concentración de receptores de GB3 en las vellosidades intestinales y en las células endoteliales del riñón. Las *Stx* que se producen en el colon y viaja por el torrente sanguíneo a los riñones. Este daño puede provocar SUH. Tras la internalización de la subunidad A, la toxina se escinde en dos moléculas, y el fragmento Ai se une al ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 28S e interrumpe la síntesis de proteínas. La destrucción de las vellosidades intestinales da lugar a la disminución de la absorción intestinal y aumento relativo de la secreción de líquidos. Las lesiones en las células endoteliales inducen activación de las plaquetas y acumulación de trombina, lo que a su vez da lugar a disminución del filtrado glomerular e insuficiencia renal aguda. Las toxinas *Stx* estimulan además la expresión de citocinas inflamatorias (p. ej., factor de necrosis tumoral- α [TNF- α], interleucina-6), que entre otros efectos, aumentan la expresión de GB3. (1) (16)

En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes de STX1 y STX2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas. Además de estas toxinas, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como la de adherencia y eliminación (A/E), y el gen *eaeA* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP), llamada intimina, como ya se mencionó anteriormente

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es de ellas es si presentan factores de patogenicidad:

- a) Cepas típicas, aquellas que poseen el plásmido de 60 MDa y presentan el factor de A/E

- b) Cepas atípicas, son aquellas que poseen el plásmido 60 MDa y no producen lesiones de A/E

Otra clasificación es de acuerdo al serotipo:

- a) Cepas O157:H7. Este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y expresa la β -glucuronidasa. Esta bacteria puede producir principalmente SUH y CH.
- b) Cepas no-O157:H7 que comprenden cepas que pertenecen a un serotipo distinto a O157:H7 . Estas cepas se aíslan cuatro veces más que las O157:H7. Además suelen ser sorbitol positivo.(16)

La sintomatología que causan las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea. (1) (17). El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas EHEC no-O157:H7 es la producción de las toxinas Shiga-Like *STXStx*. También tienen el factor de A/E. (4)

4. *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)

Esta cepa se describió a principios de 1970, como cepas invasoras que causaban una diarrea disenteriforme. Se encuentra de manera endémica en muchos países en vías de desarrollo con cierta similitud epidemiológica a la observada en la *Shigelosis*. Su incidencia se encuentra entre 1 y 5% en la población (51). Las bacterias son capaces de invadir y destruir el epitelio colónico para producir una enfermedad que se caracteriza inicialmente por diarrea acuosa. Una minoría de pacientes evoluciona a la forma disentérica de la enfermedad, la cual presenta fiebre, espasmos abdominales, diarrea con sangre y leucocitos en las heces. (1)

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 microvellosidades de la mucosa intestinal requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y la posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula e invasión de las células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está tanto en los cromosomas como en plásmidos, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. (4) (18)

5. *E. coli* enteroagregativa (ECEA)

Las cepas de *E. coli* enteroagregativo se han visto implicadas en una diarrea acuosa, persistente y con deshidratación en niños menores de dos años de los países en vías de desarrollo y en personas que han viajado a estos países. (1). También está asociada a diarrea crónica y puede causar diarrea persistente (51)

Estas bacterias se caracterizan por su capacidad de aglutinarse entre sí en una organización de «ladrillos apilados». Este proceso está mediado por unas fimbrias formadoras de haces (fimbrias de adherencia agregativa I y II), las cuales están codificadas en plásmidos. ECEA estimula la secreción de mucosidad, y atrapa a las bacterias en una biopelícula que recubre el epitelio del intestino delgado. Se ha observado que acortan las microvellosidades, produciendo una infiltración mononuclear y producen hemorragia. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. (1) (4) (19)

6. *E. coli* uropatógena (UPEC).

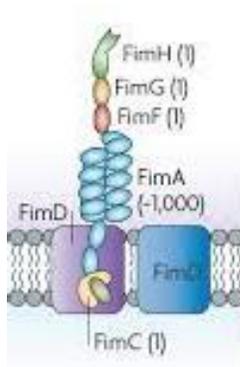
Escherichia coli es el agente causal más común de infecciones en el tracto urinario (ITU), incluyendo cistitis aguda, pielonefritis y urosepsis (los tres síndromes más comunes). Es considerado como un subgrupo de las *E. coli* extraintestinales. Las infecciones causadas por *E. coli* extra-intestinales, son la principal causa de enfermedad en el aparato urinario. También es la principal causa de morbilidad, mortalidad e implica altos costes asociados a la salud. La diseminación de un solo grupo clonal de aislados de UPEC puede ocurrir dentro de una comunidad a través de alimentos contaminados u otros consumibles. Una vez dentro del tracto urinario, UPEC coloniza preferentemente la vejiga y causa cistitis, pero también puede ascender a través de los uréteres hasta los riñones, causando pielonefritis. En respuesta a la brecha de UPEC en el tracto urinario, se desencadenan respuestas inflamatorias en el huésped que conducen a la producción de citocinas, la entrada de neutrófilos, la exfoliación de las células epiteliales de la vejiga infectadas y la generación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno junto con otros compuestos antimicrobianos. Además, las cepas de UPEC aisladas de pacientes sexualmente activos a menudo coinciden

con los aislados fecales de sus parejas, lo que indica que las infecciones urinarias pueden transmitirse sexualmente. (20)

La capacidad de UPEC para unirse a los tejidos del huésped es uno de los factores primordiales que facilitan la colonización de UPEC del tracto urinario, permitiendo que las bacterias resistan el flujo masivo de orina y promoviendo la invasión de UPEC de las células uroteliales. Las células de la vejiga que contienen una gran cantidad de UPEC están preparadas para exfoliarse, proporcionando un mecanismo mediante el cual el huésped puede eliminar rápidamente muchas bacterias del tracto urinario con el flujo de orina. Sin embargo, durante este proceso, se dejan expuestas las capas subyacentes de células epiteliales de la vejiga inmadura, siendo más susceptibles a la infección. (20) (21)

Los factores de virulencia de estas bacterias son principalmente de dos tipos: los que se encuentran en la superficie celular (que desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos además de formación de biopelículas e inducción de citosinas) y los producidos dentro de la célula bacteriana y son exportados al sitio de infección.

Los principales facilitadores de la invasión a células epiteliales de la vejiga son los *pili* tipo 1, los cuales se expresan en más de un 90% en todos los aislamientos de *E. coli*, incluyendo tanto cepas patógenas como comensales.



Los *pili* tipo 1 están compuestos por repeticiones de subunidades de *pilina FimA*. La parte distal del *pili* está formada por 2 adaptadores (proteínas *FimF* y *FimG*) y la adhesina unida a manosa *FimH*. Esta adhesina, *FimH*, permite la adherencia de la bacteria a una serie de glucoproteínas en el epitelio de la vejiga que conducen a la internalización de la bacteria, favoreciendo la infección. (20) (21) (22)

Figura 1. Imagen tomada de Nature Reviews (21)

Las adhesinas fimbriales, que son proteínas de superficie, participan en el proceso de adherencia de los microorganismos Gram positivos y negativos. Estas proteínas intervienen en la unión estrecha de la bacteria huésped después de la unión inicial mediada por adhesinas fimbriales.

Los toxinas producidas por *E. coli* uropatógenas (UPEC) ayudan a la propagación de patógenos en los tejidos más profundos después de la interrupción de la integridad celular; para obtener acceso a los nutrientes dentro de la célula huésped; o para destruir las células efectoras inmunes:

- La alfa **hemolisina** (*HlyA*), también denominada «toxina formadora de poros», se inserta dentro de la membrana celular del huésped provocando lisis celular, facilitando la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano.
- **Factor citotóxico necrotizante tipo 1** (*cnf1*) conduce a una activación constitutiva de los miembros de la familia Rho GTPasas que provocan cambios celulares basados en reordenamiento del citoesqueleto de actina de la célula huésped, provocando apoptosis de las células de la vejiga y estimulando su exfoliación.
- **Toxina secretada auto-transportadora** *Sat*, es una serina-proteasa que se encuentra en cepas de UPEC y se caracteriza por tener efectos citopáticos en riñón y vejiga y se asocia a cepas de *E. coli* que producen pielonefritis.

Existen ciertas evidencias de que ciertos serotipos *E. coli* se asocian con ITU entre los que encontramos: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 (23) (24)

Factores de virulencia: Factores necrotizantes (*cnf1* y *cnf2*)

Se han descrito dos tipos de toxinas denominadas factores necrotizantes CNF1 y CNF2. Caprioli et al. (52) fueron los primeros en demostrar la presencia del gen *cnf1* en cepas de *E. coli* aisladas de humanos. Ambos factores necrotizantes son proteínas monoméricas de 110 a 115 kDa que inducen la multinucleación de las células eucariotas. El mecanismo de acción de estas toxinas, especialmente CNF1, se basa principalmente en la desaminación de la glutamina en la posición 63 de la proteína diana RhoA, formando ácido glutámico. Éste inhibe la hidrólisis intrínseca del GTP, estimulada por la GTPasa, activando la proteína (GAP). Por lo tanto, la desaminación de la glutamina 63, por el CNF1 permite la activación de la proteína Rho GTP e induce la reorganización de las fibras de estrés de la actina (53).

Factor necrotizante citotóxico 1 (producido por el gen *cnf1*) de *Escherichia coli*: biología de la toxina.

CNF 1 es una toxina proteica bacteriana producida por ciertas cepas patógenas de *E. coli* siendo responsable de infecciones extra-intestinales, particularmente en el tracto urinario (ITU). CNF 1 pertenece a la denominada familia de toxinas necróticas

CNF1 es una proteína multidominio monocatenario de 1.014 aminoácidos, que contiene

- Un dominio de unión al receptor N-terminal
- Un dominio catalítico C-terminal, que modifica una diana celular específica en el citosol de la célula huésped. Alberga la actividad catalítica completa.

La diana citoplasmática de CNF1 son proteínas de unión a Rho GTP, que son importantes interruptores moleculares (24). Estos interruptores oscilan entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP, que, a su vez, activa proteínas efectoras. En la forma unida a GTP, la proteína Rho interactúa con moléculas efectoras iniciando una respuesta en cascada. La activación de Rho GTPasas se produce por estimulación con un factor de intercambio de guanina (GEF) que provoca la liberación de GDP y la unión de GTP. El control de la transición entre las dos formas de interruptores esta principalmente regulado por las proteínas Rho y las proteínas GAP. Tan pronto como la GTPasa activada ha iniciado la respuesta celular, una proteína activadora de GTPasa (GAP), al hidrolizar GTP en GDP, devuelve estas proteínas a su estado de unión a GDP, para completar el ciclo y terminar la transducción de señales.

Los cambios conformacionales, inducidos por la unión de GTP o GDP, ocurren dentro de dos dominios moleculares de la proteína Rho llamados "interruptores" que son responsables del acoplamiento de las proteínas GTPasa con sus efectores "interruptor 1" o permiten la interacción de la GTPasa activada con las GAP "interruptor 2" (24)

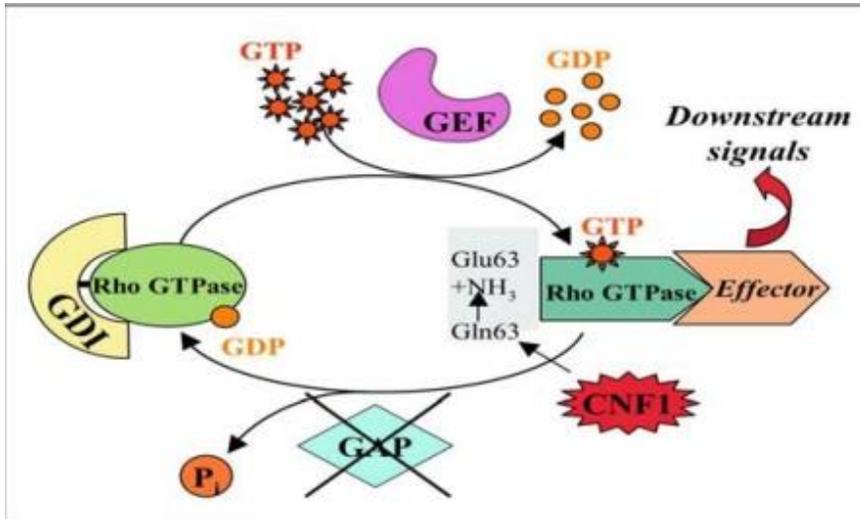


Figura 2. Imagen tomada de los autores Alessia Fabbri et al. (24).

La actividad enzimática de CNF1 consiste en la desaminación de un residuo de glutamina, ubicado en el *interruptor 2*, que modifica la glutamina y forma ácido glutámico. Este cambio altera la función del GAP y bloquea permanentemente la proteína Rho en su estado activado, es decir se une a la GTPasa (ver Figura 2). Esto provoca la actividad constitutiva (activación apreciable del receptor, aunque no haya ningún ligando presente) de estas proteínas en sus efectores. Además, de las proteínas GEF y GAP, un tercer factor que regula la actividad de Rho GTPasas es el inhibidor de la disociación de guanina (GDI), que mantiene a Rho en el citoplasma en forma inactiva (ligada a GDP). (24)

CNF1 Y CNF2 son toxinas que comparten un 90% de residuos conservados en 1.014 aminoácidos El gen *cnf1* está codificado por el cromosoma, mientras que el gen *cnf2* se encuentra codificado en un plásmido transmisible llamado pVir codifica. Las CNF 1 y CNF2 son altamente letales en ratones y comparten la capacidad de inducir multinucleación en diferentes líneas celulares y de producir necrosis en la piel del conejo. Sin embargo, el CNF1 es más potente que el CNF2 para inducir la multinucleación, pero menos necrótico en la prueba cutánea de conejo y la almohadilla de la pata del ratón. (24) (25) (26)

La participación de la vía de señalización Rho en la toxicidad de CNF fue sugerida por primera vez debido a la reorganización de actina-F del citoesqueleto en fibras de estrés después del tratamiento de células cultivadas con CNF1 o CNF2, se demostró que CNF1

desamina directamente Rho en el 63, un aminoácido presente en el dominio G-3 conservado en pequeñas GTPasas y que es esencial para la actividad de GTPasa. El Rho desaminado mostró una marcada disminución en la actividad GTPasa intrínseca y, por lo tanto, el Rho permaneció en una forma constitutivamente activa. CNF2 también desamina Rho en el residuo 63 y suprime la actividad de GTPasa en presencia o ausencia de Rho GAP. CNF2 desamina preferentemente a RhoA y Rac1, tiene un nivel bajo sin actividad enzimática en Cdc42. CNF1 y CNF2 comparten la misma actividad catalítica y desaminación de los miembros de la familia Rho pero sus especificidades de sustrato son distintas. (25) (26) (27)

Respecto a la presencia de *E. coli* que albergan los genes *cnf1* y *cnf2*, se ha asociado el gen *cnf2* a cepas de *E. coli* aisladas de terneros y corderos con diarrea, mientras que el gen *cnf1* ha sido asociado con cepas de *E. coli* aislados de humanos (52). Los estudios de PCR mostraron que el gen de *cnf1* es más común que el de *cnf2*. (24) (25)

Hemolisina

La toxina alfa hemolisina (*HlyA*) es un importante factor de virulencia producido por cepas uropatógenicas de *Escherichia coli*. Su expresión se correlaciona con una mayor severidad de las infecciones renales.

La síntesis, maduración y secreción de *HlyA* está determinada por el operón *hlyCABD*. El gen estructural *HlyA* codifica para un polipéptido. Este polipéptido, denominado *proHlyA*, es la forma inactiva de la toxina, que se convierte en lítica luego de una activación postraducciona en el medio extracelular. (28)

Estructuralmente, *HlyA* tiene 2 dominios, uno es el dominio N-terminal, y el otro es el de unión a calcio. Aunque se asume que la interacción de *HlyA* con membranas ocurre principalmente a través del dominio N-terminal, recientemente se ha propuesto que ambos dominios están involucrados en la interacción con la membrana. (29)

El primer paso en el mecanismo de acción de la *HlyA* es la unión a la membrana de la célula blanco. *HlyA* produce la liberación del contenido de liposomas de muy variada composición lipídica.

El microambiente en el huésped es extremadamente pobre en nutrientes, de allí que una de las funciones de *HlyA* es la destrucción de las células blanco, facilitando de esta manera su aporte de nutrientes y otros factores críticos para su crecimiento como hierro. El mecanismo de acción lítica es un mecanismo complejo que finaliza en la lisis celular. En este proceso, se han reconocido al menos 3 etapas:

- Unión a la membrana de la célula blanco
- Inserción
- Oligomerización.

El paso siguiente en la etapa hemolítica sería la inserción de la toxina en la membrana. En el medio extracelular, *HlyA* debe unirse calcio para adoptar una conformación tal que haga que la unión sea irreversible y transforme a la toxina en una forma activa. Una vez activada, se adsorbe reversiblemente para finalmente insertarse en la membrana. La forma de *HlyA* insertada en la membrana se comporta como una proteína integral que no puede ser extraída sin el uso de detergentes. (28) (29)

Tras la inserción, se lleva a cabo la oligomerización, que a altas dosis de toxina, es progresiva y lleva a la fusión de pequeños poros con una rápida destrucción de la célula. En contraste, a bajas concentraciones de toxina, los poros serían de menor tamaño, de manera tal que las células, si bien están dañadas, podrían sobrevivir el tiempo suficiente como para que se activen las rutas apoptóticas. (29)

Métodos de detección molecular

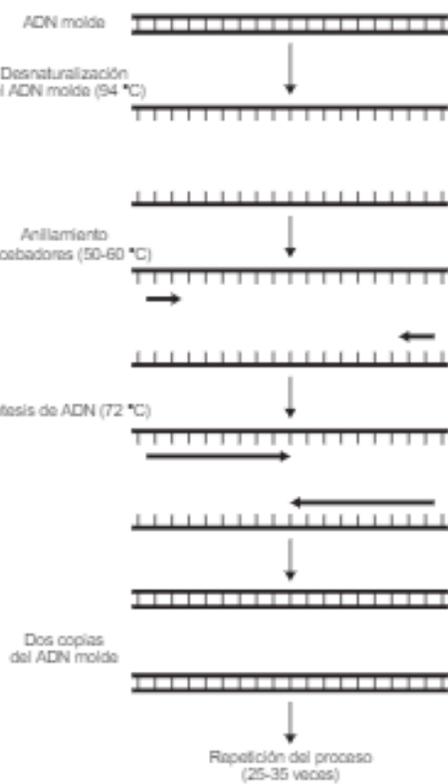
Las cepas de *E. coli* diarreogénicas estuvieron entre los primeros patógenos para los que se desarrollaron métodos de diagnóstico molecular. Se han logrado avances sustanciales tanto en el desarrollo de tecnologías de sondas basadas en ácidos nucleicos como en los métodos de PCR.

Sondas de ácido nucleico.

Una sonda es un fragmento de ADN de pequeño tamaño usado en biología molecular como herramienta para detectar la presencia de secuencias complementarias al ADN o ARN diana

u objetivo. La sonda suele unirse a la secuencia diana monocatenaria (ADN1c o ARN) mediante un mecanismo de hibridación que forma una estructura bicatenaria, una de las hebras pertenece a la sonda, y la otra a la secuencia diana. Esta unión se establece porque tanto la sonda como la diana tienen secuencias parcial o totalmente complementarias en sus pares de bases. (35)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



La PCR es un avance importante en el diagnóstico molecular de microorganismos patógenos, incluida *E. coli*. Se han desarrollado con éxito cebadores de PCR grupos de *E. coli* diarreogénica. Las ventajas de la PCR incluyen una gran sensibilidad en la detección in situ de los moldes diana. Sin embargo, se ha demostrado que las sustancias contenidas en las heces interfieren con la PCR, disminuyendo así su sensibilidad. (3)

La PCR es un método versátil, que tiene aplicación en todas las áreas donde se haga uso de la biología molecular. Expresado de una manera simple, todo lo que la PCR consigue es obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN mediante un proceso de amplificación que llega a permitir la obtención de microgramos de ADN a partir de cada molécula inicial. Cualquier segmento de ADN o de ARN puede ser amplificado siempre que se conozcan las secuencias cebadores de

la región diana o, lo que es lo mismo, podemos amplificar cualquier porción de ácido nucleico, conocido o no, siempre que quede comprendido entre dos secuencias conocidas con las que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actuarán como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde. (30) Figura 3. Imagen tomada de los autores Méndez-Álvarez S. et al. (42).

Por tanto, para que la reacción tenga lugar, los componentes básicos e indispensables de la misma son: ADN molde que se desea amplificar, ADN polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN y una solución tampón de reacción

que incluye las distintas sales requeridas por la enzima. Las etapas básicas de PCR constan de los siguientes pasos fundamentales:

1. Separación térmica (95°C) de la doble cadena de ADN que se va a usar como molde.
2. A una temperatura menor que la de desnaturalización, hibridación de cebadores sintéticos cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
3. Extensión por parte de la ADN polimerasa que agrega los oligonucleótidos la secuencia inicial de los cebadores.
4. Este proceso de tres pasos es entonces repetido un número determinado de veces (25-35), multiplicándose cada vez el número de moléculas de producto.

Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN. De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar cantidades muy bajas de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia del gen que se quiera amplificar para la que han sido diseñados los cebadores. Sin embargo, en este proceso teórico que hemos descrito pueden influir numerosos factores que hagan que la reacción no sea realmente específica o que su eficiencia no sea la adecuada, de manera que la amplificación no ocurra en la progresión esperada y, por tanto, no sea sensible. Entre los muchos factores que pueden influir en el resultado final de la PCR, son destacables el diseño apropiado de los cebadores, la calidad y concentración del ADN, la concentración de magnesio, el tipo y la cantidad de ADN polimerasa y el programa de amplificación. (30)

Además de la PCR simple existen otros tipos de PCR, como la PCR múltiple y la PCR en tiempo real. En el caso de la PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en una única reacción distintos genes específicos, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. La PCR en tiempo real es una variante utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del ADN. Para ello emplea los mismos reactivos que en una simple. A dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador provisto de sensores de fluorescencia, tras

excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación, y es por esto que se le denomina PCR en tiempo real. (30)

Antibióticos.

Los antibióticos son usados para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades que afectan a humanos y animales. El uso indiscriminado de los antibióticos en la medicina y en la producción de alimentos tiene un efecto adverso en el incremento de la resistencia a los antibióticos, no solamente por las bacterias patógenas, sino también por las bacterias no patógenas o comensales (50). Es importante destacar que no solamente es necesario tener conocimientos sobre la susceptibilidad a los antibióticos para seleccionar los más apropiados en un tratamiento clínico, sino también es necesario conocer la resistencia a los antibióticos de las bacterias aisladas de alimentos para establecer la transferencia de esa resistencia a las bacterias no patógenas. Más aun, teniendo en cuenta que los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* albergan genes en plásmidos que transfieren resistencia para casi todos los antibióticos a bacterias de la misma especie e incluso entre especies. (31)

OBJETIVOS.

Objetivo principal

Estudiar la presencia de genes que determinan la posible virulencia en cepas de *Escherichia coli* de conejos con sintomatología diarreica.

Objetivos específicos

Establecer las condiciones de la PCR para estudiar los factores de virulencia (*cnf1* y *cnf2*)

Estudiar la presencia de los genes *cnf1*, *cnf2* y *HlyA* en cepas de *E. coli* aislados de conejos de granjas con sintomatología diarreica mediante técnicas genéticas y fenotípicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas estudiadas

Se estudiaron un total de 101 cepas que pertenecen a la colección de cultivos del Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia. Estas cepas se aislaron de la zona colorrectal de 12 conejos de 35 días de edad, de raza californiana y neozelandesa que presentaban sintomatología diarreica, provenientes de explotaciones de la región de Tulancingo (México). Las cepas fueron identificadas como *E. coli* en un trabajo anterior (32)

Cepas control.

Las cepas utilizadas como controles positivos para los genes *cnf1* (*E. coli* O4:H; C136b) y *cnf2* (*E. coli* O76; M8a) fueron cedidas amablemente por Dr. José Antonio Orden Gutiérrez, del área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, las dos cepas fueron obtenidos de animales con sintomatología diarreica.

Recuperación de las cepas

Todos aislamientos fueron sembrados agar triptona de soja (GranuCult), mediante siembra en superficie con ayuda de un asa de cultivo y se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 horas.

Extracción de ADN

Después del crecimiento durante 24 se recogieron las bacterias a través del método de recogida por arrastre con ayuda de un asa redonda y se introdujeron en un tubo de centrífuga (Eppendorf) que contenía 200 µL de agua MiliQ esterilizada. Posteriormente, se agitó con ayuda de un agitador de tubos (P-Selecta), seguidamente se introdujo en un bloque térmico (Tembloc) durante 5 minutos a 100 °C. Posteriormente, se introdujo en una centrífuga de mesa (modelo Eppendorf) a 12.600 rpm durante 4,5 minutos. Finalmente, con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante, evitando tocar el pellet, y se conservó a -18°C hasta su análisis.

Detección de los genes *cnf1*, *cnf2* y *HlyA*

Todos los aislamientos fueron sometidos a una PCR para determinar la presencia de los genes *cnf1*, *cnf2* que codifican para el factor necrotizante citotóxico (CNF1, CNF2), y el gen *HlyA* que codifica para la hemolisina. Se utilizaron dos pares de cebadores para cada uno de los genes amplificados. La codificación, la secuencia de los “primers” o cebadores (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlín, Alemania) utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados, así como, las referencias bibliográficas se encuentran recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la técnica PCR para la amplificación de la secuencia de fragmentos correspondiente a los genes de virulencia *cnf1*, *cnf2* y *HlyA*. Elaboración propia.

| Gen de virulencia | Secuencia del cebador | Fragmento amplificado | Referencia |
|--------------------|----------------------------|-----------------------|------------|
| <i>cnf1</i> | F- GAACTTATTAAGGATAGTAGT | 543 | (33) |
| | R- CATTATTTATAACGCTGCTG | | |
| <i>cnf2</i> | F- AATCTAATTAAGAGAAC | 543 | (33) |
| | R- CATGCTTTGTATATCTA | | |
| <i>HlyA</i> | F- AGCTGCAAGTGCGGGTCTG | 569 | (34) |
| | R-TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC | | |

Amplificación de fragmentos del ADN para los genes necrotizantes

Ajustes previos a PCR final

Las condiciones y características de la PCR utilizada para la amplificación de los genes *cnf1*, *cnf2* en primera instancia fueron las descritas por Blanco et al (33) que se recogen en la Tabla 1 con algunas modificaciones. El volumen total de la mezcla de reacción de la PCR fue de 25 µL. Esta mezcla estaba compuesta por: 2X Master Mix, cebadores, DNA molde y agua MiliQ. La Master Mix contenía una DNA polimerasa termoestable, Mg⁺ (cofactor), dNTPS (desoxirribonucleósidos trifostato), TAE 1% y un pH 7,8-8,3 (tampón Sigma). Posteriormente, fueron adicionados 0,5 µL de cada cebador directo (F) e inverso (R) en una concentración

0,8 nmolar para los *primers* del gen *cnf1* y 16,29 nmolar para los *primers* del gen *cnf2*, al tubo con la mezcla de la reacción. Posteriormente, se agregó una cantidad de agua MiliQ estéril necesaria para completar un volumen final de 25 μ L (mezcla de la reacción más la muestra) en cada tubo de microcentrífuga. Finalmente, se agregaron los 5 μ L de DNA de cada cepa obtenido de la alícuota de sobrenadante de la etapa anterior. Finalmente, en cada PCR se utilizó un control positivo para cada gen, y un blanco (no contenía ADN). La amplificación de fragmentos del ADN se llevó a cabo en un termociclador modelo “Eppendorf”, las condiciones de la PCR se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de PCR según Blanco et al (33) para los genes *cnf1* y *cnf2*. Elaboración propia.

| Ciclos | Periodo | Temperatura | Tiempo |
|--------|--------------------------|-------------|------------|
| - | Calentamiento | 95°C | 2 minutos |
| 30 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 55°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |
| - | Elongación final | 72°C | 10 minutos |
| | Conservación | 4°C | ∞ |

Debido a que no se obtuvo ningún fragmento de amplificación genes *cnf1* y *cnf2* siguiendo las condiciones antes descritas, éstas fueron cambiadas para el gen *cnf1* según se recoge en la Tabla 3 y para el gen *cnf2* de acuerdo descrito en la Tabla 4.

Tabla 3. Condiciones para la amplificación del gen *cnf1* (PCR *cnf1*). Elaboración propia.

| Ciclos | Periodo | Temperatura | Tiempo |
|--------|--------------------------|-------------|-----------|
| - | Separación | 95°C | 2 minutos |
| 10 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 45°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |
| 15 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 48°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |

| | | | |
|-----------|--------------------------|------|------------|
| 15 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 50°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |
| - | Elongación final | 72°C | 10 minutos |
| | Conservación | 4°C | ∞ |

Además en las condiciones tiempo y temperatura recogidas en la Tabla 4 también se llevaron a cabo los siguientes cambios; en primer lugar, se utilizaron 7µL ADN molde, en segundo lugar, se incrementó 2°C en cada grupo de ciclos (ver Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones para la amplificación del gen *cnf2*. Elaboración propia.

| Ciclos | Periodo | Temperatura | Tiempo |
|---------------|--------------------------|--------------------|---------------|
| - | Calentamiento | 95°C | 2 minutos |
| 10 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 47°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |
| 15 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 50°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |
| 15 | Separación cadenas ADN | 95°C | 1 minuto |
| | Hibridación de cebadores | 52°C | 1 minuto |
| | Elongación de cebadores | 72°C | 1 minuto |
| - | Elongación final | 72°C | 10 minutos |
| | Conservación | 4°C | ∞ |

Las condiciones de la PCR para la amplificación del gen *HlyA* utilizadas en este trabajo de investigación fueron las descritas por Paton and Paton (36). Las muestras se sometieron a 35 ciclos de PCR, cada uno de los cuales consistió en 1 min de desnaturalización a 95 ° C; 2 min de recocido a 65 ° C durante los primeros 10 ciclos, disminuyendo a 60 ° C en el ciclo 15; y 1,5 min de alargamiento a 72°C, incrementándose a 2,5 min desde los ciclos 25 a 35.

Análisis de los productos de la reacción de PCR

Los productos amplificados por la PCR fueron separados por electroforesis utilizando un gel de Agarosa "Sigma Aldrich" al 2% en un tampón TAE al 1% (Tris base 2M, ácido acético glacial 5,7% y EDTA 0,025 M ajustado a pH 7,9) agregando 0,4 μ /L de colorante Gel RED[®] con el objetivo de visualizar las bandas de ADN.

Para la elaboración de este gel se diluyó TAE 50X, hasta conseguir una concentración de 1X. Posteriormente se adicionaron 2 gramos de agarosa a 100 ml de agua y se llevó a ebullición. Posteriormente, se agregó el colorante y se dejó polimerizar. Finalmente, el gel se sumergió en una dilución de TAE al 1x, de 600 ml. Una vez realizado el gel se lleva a cabo la electroforesis.

Para la llevar a cabo la electroforesis, depositaron 0,5 μ L de colorante (GelGreen) y 10 μ L del ADN amplificado. Posteriormente, se colocaron los electrodos, teniendo en cuenta una correcta disposición de estos, para realizar una diferenciación de potencial desde el polo negativo hacia el polo positivo. El voltaje al que llevó a cabo la electroforesis estuvo comprendido entre 70-100 V durante una hora aproximadamente. Finalmente, el resultado de la electroforesis se realizó observando los geles en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio Rad)

Antibiogramas

Las cepas positivas al *cnf2* fueron sembrados en Triptona soja caldo (TSB) a 37°C durante 24 horas. Tras se tiempo Este cultivo de 24 horas se sembró en Agar Triptona de Soja (TSA) a 37°C durante 24 horas. A partir de este cultivo se realizó una suspensión bacteriana en una solución de Na Cl 0.85 % estéril (p/v) hasta conseguir una turbidez de 0.5, en la escala de MacFarland. A partir de esta suspensión, se humedeció un hisopo, con el que se sembró la superficie de una placa Muller Hinton Agar (MHA). Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguidamente se colocaron las tiras de antibióticos (E-test) para: Ampicilina (AM), amoxicilina (AC), enrofloxacina (EF), y vancomicina (VA). Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 20 horas y a continuación se midió la concentración mínima inhibitoria. Se valora la zona de inhibición

alrededor de cada tira, tomándose como CMI el punto más bajo del círculo que presente el crecimiento.

Las concentraciones mínimas inhibitorias estudiadas para cada antibiótico fueron:

- Ampicilina: 0,016-256 µg/mL
- Enrofloxacin: 0,02-32 µg/mL
- Amoxicilina: 0,016-256 µg/mL
- Vancomicina: 0,016-256 µg/mL

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 5 se recogen los resultados de diversas condiciones realizadas para la amplificación de tres genes de virulencia. Como se puede observar cuando se siguieron las condiciones de la PCR, para la amplificación de los genes hibridación *cnf 1* y *cnf 2* por Blanco et al (33) no se amplificó ninguno de los productos correspondientes a los genes antes mencionados. Aunque esos autores describieron condiciones de PCR iguales de hibridación para los dos genes, en este estudio fue necesario cambiar las temperaturas de hibridación a lo largo de la PCR para cada gen. Debido a esto, durante el desarrollo de la PCR se realizaron varios ciclos con temperaturas de hibridación distintas para amplificar los genes *cnf1*, ver Tabla 3 y *cnf2*, ver Tabla 4. La falta del producto de amplificación cuando se siguieron las condiciones de Blanco et al. (33) puede deberse a que la temperatura de hibridación que estos autores proponen era 10°C superior a la indicada por el proveedor. Como indica L. Espinosa (37) si la temperatura de hibridación es muy alta, la unión de los oligonucleótidos con ADN molde es inestable y la DNA polimerasa no puede llevar cabo la síntesis del ADN complementario. Sin embargo, cuando la temperatura de hibridación usada fue la recomendada por el proveedor, 45°C, la PCR mostró diversos fragmentos inespecíficos en la amplificación del gen *cnf1*, pero no se observaron esos fragmentos para gen *cnf2* (ver Figura 4). De acuerdo con Espinosa (37) cuando la temperatura de hibridación es baja los fragmentos amplificados son inespecíficos. Respecto a la amplificación del gen *HlyA* no fue necesario cambiar las indicaciones descritas por Paton y Paton (36).

Tabla 5. Resultados de las diversas condiciones de la PCR en función del tipo de gen y según lo descrito en materiales y métodos. Elaboración propia.

| Condiciones | <i>cnf1</i> | <i>cnf2</i> | <i>HlyA</i> |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| PCR Blanco et al (33) | - | - | ND |
| PCR <i>cnf1</i> | + | - | ND |
| PCR <i>cnf2</i> | - | + | ND |
| PCR <i>HlyA</i> | ND | ND | + |

PCR Blanco et al (33) ver Tabla 2 (materiales y métodos); PCR *cnf1* ver Tabla 3 (materiales y métodos); PCR *cnf2* Tabla 4 (materiales y métodos); PCR *HlyAci* son las que describen Paton y Paton (36); (-) producto no amplificado; (+) producto amplificado; (ND) no determinado.

En la Figura 4 se muestran los productos obtenidos de la amplificación de los genes *cnf1* (figura 4A), *cnf2* (figura 4B), *HlyA* (figura 4C), a partir de las cepas usadas como control positivo para cada uno de los genes. La figura 4D se muestran dos de las cepas de *E. coli* aisladas de conejo que contenían el gen de *cnf2*.

Además las figuras 4A, 4B, y 4C, muestran el tamaño de los productos amplificados para los genes *cnf1*, *cnf2* y *HlyA*, que fue de 543 pb para los dos primeros genes (33), y 569 pb para el último gen (36). Debido a que los *primers* utilizados amplificaban fragmentos de peso molecular muy similares para los genes *cnf1* y *cnf2* no fue posible diseñar una PCR múltiple. Los genes *cnf1* y *cnf2* son los responsables de la formación de los factores necrotizantes (CNF1 y CNF2), que inducen la desaminación de la glutamina formando ácido glutámico produciendo una reorganización de las fibras del estrés de la actina en el citoesqueleto, provocando apoptosis celular (25). La presencia del gen *cnf2*, se ha encontrado asociado a cepas de *E. coli* aisladas de terneros y corderos con diarrea, mientras que el gen *cnf1* ha sido asociado con cepas de *E. coli* aislados de humanos (52). Knust et al. (38) indican que es menos común encontrar cepas de *E. coli* que contengan el gen *cnf2*, que el gen *cnf1* en muestras de sangre y heces de humanos. Además, parece ser que existe una asociación entre la presencia del gen *HlyA* y el gen *cnf1* en cepas aisladas de humanos con infecciones en el tracto urinario (ITU), proporcionando un mayor carácter de patogenicidad (38). En este trabajo no se ha encontrado en ninguna de las cepas positivas para el gen *cnf2* la presencia del gen *HlyA*, esto podría indicar una menor virulencia de las cepas aisladas en conejo con sintomatología diarreica.

Figura 4. Controles positivos de los diferentes genes estudiados, y resultados positivos de diferentes cepas del gen *cnf2*. Elaboración propia.

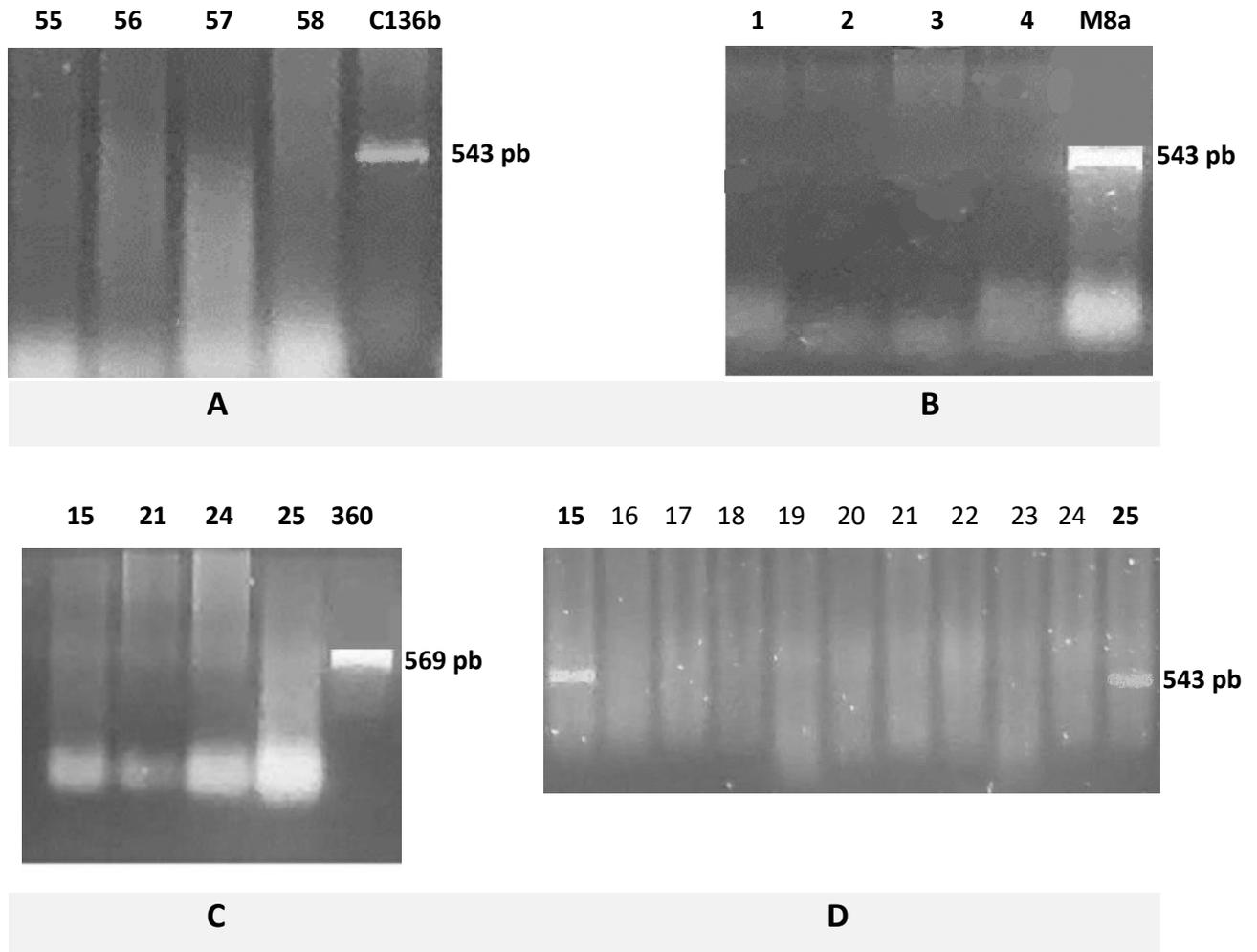


Figura 4A, códigos de cepa de 55 a 58; C136b control positivo gen *cnf1*; **Figura 4B**, códigos de cepa de 1 a 4; M8a control positivo gen *cnf2*. **Figura 4C**, códigos de cepa de 15, 21, 24, 25 (cepas positivas del gen *cnf2*); 360 control positivo gen *HlyA*; **Figura 4D**, códigos de cepa de 15 a 25.

En la Tabla 6 se recogen el número de cepas que resultaron ser positivas para todos los genes ensayados. De un total de 101 cepas de *E. coli* ensayadas, solo 8 fueron positivas para el gen *cnf2*, corresponde al 7,9% del total de cepas, y ninguna para los genes *cnf1* y *HlyA*. Todas las cepas que resultaron positivas se pueden ver en el Anexo 2. Estos resultados fueron inferiores a los encontrados por Pohl et al, 1993 (45) quienes encontraron un 11% de las cepas aisladas de ganado bovino albergaban el gen *cnf2* y fueron superiores a los encontrados por Blanco et al (33), estos autores encontraron una incidencia de 0,66 % en conejos con sintomatología diarreica.

Tabla 6. Resultados positivos de los diferentes genes. Elaboración propia.

| No. de cepas positivas | <i>cnf1</i> | <i>cnf2</i> | <i>cnf1 + cnf2</i> | <i>HlyA</i> |
|------------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|
| <i>E. coli</i> | | | | |
| 0 | - | - | - | - |
| 8 | - | + | - | - |
| 0 | - | - | - | - |
| 0 | - | - | - | - |

cnf1, gen *cnf1*. *cnf2*, gen *cnf2*; *cnf1 + cnf2*, genes *cnf1 + cnf2*; *HlyA*, gen *HlyA*; (-) negativo; (+) positivo.

En la Tabla 7 se recoge la resistencia a antibióticos (concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) de los aislamientos de *E. coli* positivas al gen *cnf2*. Como se puede observar, respecto a la ampicilina, únicamente 3 cepas mostraron una concentración mínima inhibitoria (CMI) por debajo del punto de corte ($8 \mu\text{g}/\text{mL}$), y 5 cepas mostraron una CMI superior al punto de corte considerado, siendo estas resistentes a este antibiótico. Todas las cepas de *E. coli* mostraron concentraciones mínimas inhibitorias para la enrofloxacin por debajo del punto de corte considerado para establecer la resistencia a este antibiótico. Respecto a la amoxicilina, 3 cepas mostraron concentraciones mínimas inhibitorias superiores a $8 \mu\text{g}/\text{mL}$, el punto de corte establecido para indicar la resistencia a este antibiótico. Todas las cepas mostraron una CMI mayor de $256 \mu\text{g}/\text{mL}$ a la vancomicina, es decir, todas las cepas fueron resistentes a este antibiótico. Cabe destacar que las cepas 62, 63 y 64 mostraron resistencia a más de un antibiótico (ampicilina, amoxicilina y vancomicina), además la cepa 62 fue la que mostró la mayor concentración mínima

inhibitoria para la ampicilina (128 µg/mL) y la amoxicilina (32 µg/mL). En este estudio se comprueba la resistencia intrínseca de *E. coli* a la vancomicina, este antibiótico se incluyó en este trabajo de investigación porque los criadores de conejo lo usan frecuentemente para tratar enfermedades gastrointestinales.

Los resultados de Shahrani et al. (48) fueron superiores a los encontrados en este trabajo de investigación, estos autores encontraron que el 35% de las cepas de *E. coli* aisladas de terneros diarreicos fueron resistentes a la enrofloxacin. Respecto a la ampicilina los resultados de estos autores, y de los autores Nader et al. (49), fueron igualmente superiores a los encontrados en este estudio, presentando porcentajes de 51%, 54,5% y de 45% de cepas resistentes, respectivamente. Los resultados de estos autores para este antibiótico no fueron muy distintos a los de este trabajo. Esto quiere decir que puede haber una transferencia de la resistencia a los antibióticos estudiados a *E. coli* potencialmente patógena en este trabajo cuando los animales son tratados con antibióticos para el tratamiento de enfermedades.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de diversos antibióticos de las cepas de *E. coli* positivas al gen *cnf2** Elaboración propia.

| Cepa | Ampicilina | Enrofloxacin | Amoxicilina | Vancomicina |
|------|------------|--------------|-------------|-------------|
| 21 | 8 | 4 | 3 | >256 |
| 25 | 8 | 0,094 | 3 | >256 |
| 26 | 12 | 0.064 | 3 | >256 |
| 31 | 4 | 0,125 | 2 | >256 |
| 33 | 8 | 2 | 3 | >256 |
| 34 | 6 | 0.064 | 3 | >256 |
| 62 | 128 | 0,38 | 32 | >256 |
| 63 | 12 | 0,094 | 12 | >256 |

| | | | | |
|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------|
| 64 | 12 | 0,094 | 12 | >256 |
| 73 | 12 | 0,094 | ND | >256 |
| Resistencia | 5(8 ^a) | 0(10 ^b) | 3(8 ^a) | 11(ND) |

Los superíndices indica la referencia bibliográfica de los puntos de corte considerados: (a) EUCAST (2020) (46); (b): Piras et al. (2015) (47); ND: no determinado; Etest, AB BioDisk. El número entre paréntesis hace referencia a la concentración mínima inhibitoria, y el número situado a la izquierda del paréntesis hace referencia al número de cepas que supera este límite. ND: punto de corte no determinado por organismos oficiales.

Figura 5. En la Figura 5 se muestran las CMI realizadas en agar Muller Hinton para cepas de *E. coli* positivas al gen *cnf2*. La CMI de cada uno de los antibióticos se muestra con la flecha negra. Por ejemplo, la CMI para AM se sitúa en 4 y para EF 0,094. Elaboración propia.

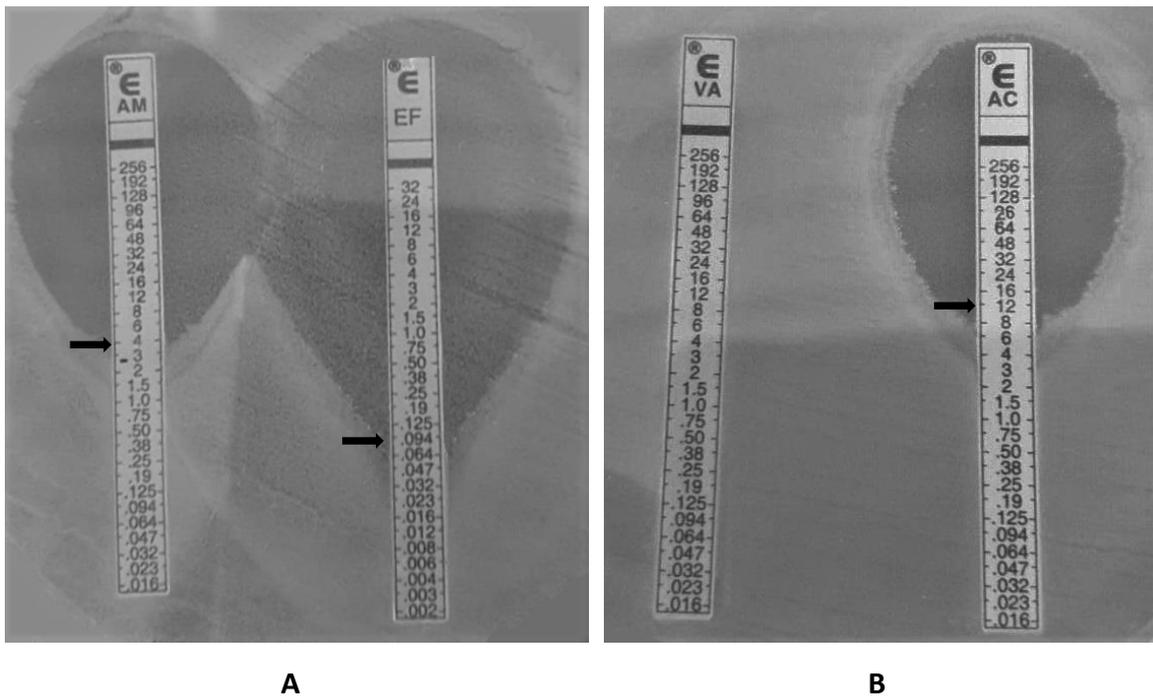


Figura 5A: CMI para los antibióticos **AM:** Ampicilina;
EF: Enrofloxacin (cepa 21)

Figura 5B: CMI para los antibióticos **VA:**
Vancomicina; **AC:** Amoxicilina (cepa 63)

CONCLUSIONES.

En este trabajo se indican las etapas de la PCR que deberán de usarse con los cebadores descritos en materiales y métodos para la amplificación de los genes: *cnf1*, *cnf2* y *HlyA*

Del total de 101 cepas de *E. coli* aisladas de conejo con sintomatología diarreica un 7,9% fueron positivas al gen *cnf2*, es decir, fue el gen mayoritario en las cepas de estudio.

Las *E. coli* positivas al gen *cnf2* (ocho cepas) mostraron mayor resistencia a los antibióticos ampicilina y amoxicilina. Se observó una baja resistencia de estos microorganismos a la enrofloxacin, y todos mostraron una CMI superior a 256 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para la vancomicina. La baja CMI observada en la enrofloxacin podría suponer que este antibiótico pueda ser utilizado para tratar infecciones gastrointestinales en estos animales.

ANEXOS

Anexo 1: Tabla de serotipos y serogrupos de *E. coli* más comunes causantes de diarrea.

| ETEC | EIEC | EPEC | EAEC | STEC | | | | |
|------------|-----------|------------|----------|----------|-----------------|----------|-------------------|----------|
| O6:H- | O28ac:H- | O18 | O3:H2 | O1:MN | O23:H7 | O85:H10 | O117:H14 | O166:H15 |
| O6:H16 | O29:H- | O26:H- | O15:H18 | O1:H1 | O23:H16 | O85:H23 | O117:H19 | O166:H28 |
| O8:H- | O112ac:H- | O26:H11 | O44:H18 | O1:H2 | O25:H- | O85:H10 | O118:H16 | O168:H- |
| O11:H27 | O124:H- | O55:H- | O77:H18 | O1:H20 | O25:H11 | 85:H23 | O117:H30 | O169:H- |
| O20:H- | O124:H7 | O55:H6 | O86:H- | O1:HNT | O26:H- 26:H2 | O86:H10 | 119:H- | O171:H2 |
| O25:H- | O124:H30 | O55:H7 | O111:H21 | O2:H1 | O26:H8 | O88:H- | O119:H5 | O172:H- |
| O27:H- | O135:H- | O86:H- | O127:H2 | O2:H2:K1 | O26:H11 | O91:H- | O120:H19 | OX3:H2 |
| O27:H7 | O143:H- | O86:H34 | ONT:H10 | O2:H6 | O26:H21 | O91:H10 | O121:H- | ONT:H21 |
| O27:H20 | O144:H- | O111:H- | | O2:H7 | O26:H32 | O91:H14 | O121:H8 | ONT:H25 |
| O80 | O152:H- | O111ab:H2 | | O2:H27 | O27:H- | O91:H21 | O126:H- | ONT:H28 |
| O85:H7 | O167:H5 | O119:H6 | | O4:H40 | O39:H4 | O98:H- | O126:H8 | ONT:H47 |
| O114:H21 | O135:H- | O125ac:H21 | | O5:H- | O39:H8 | O98:H8 | O126:H21 | OR:H- |
| O115:H21 | | O126:H- | | O5:H16 | O45:H- | O103:H- | O126:H27 | OR:H20 |
| O126:H9 | | O126:H2 | | O6:H- | O45:H2 | O103:H2 | O128:H12 | OR:H21 |
| O128ac:H27 | | O126:H27 | | O6:H1 | O45:H7 | O103:H4 | O137:H41 | |
| O139 | | O127:H21 | | O6:H29 | O50:H- | O103:H6 | O141:H- 144:H- | |
| O148:H28 | | O128ab:H2 | | O8:H- | O55:H- | O103:H25 | O145:H- | |
| O149:H4 | | O128:H12 | | O8:H14 | O55:H6 | O104:H7 | O145:H16 | |
| O149:H10 | | O142:H6 | | O8:H21 | O55:H7 | O109:H2 | O145:H25 | |
| O153:H45 | | O158:H23 | | O9ab:H- | O55:H10 | O110:H- | O145:H28 | |
| O159:H- | | | | O11:H49 | O55:H? | O110:H19 | O146:H- | |

Anexo 2: Tabla de resultados

| Cepas | <i>cnf1</i> | <i>cnf2</i> | <i>HlyA</i> |
|-------|-------------|-----------------|-------------|
| 1 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 2 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 3 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 4 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 5 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 6 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 7 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 9 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 10 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 13 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 14 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 15 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 16 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 17 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 18 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 19 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 20 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 21 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 22 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 23 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 24 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 25 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 26 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 27 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 28 | Negativo | Negativo | Negativo |

| | | | |
|----|----------|-----------------|----------|
| 29 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 30 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 31 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 32 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 33 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 34 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 35 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 36 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 37 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 38 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 39 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 40 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 42 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 43 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 44 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 45 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 46 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 47 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 49 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 50 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 52 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 53 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 54 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 55 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 56 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 58 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 59 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 60 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 62 | Negativo | Positivo | Negativo |

| | | | |
|----|----------|-----------------|----------|
| 63 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 64 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 65 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 67 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 69 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 70 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 71 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 72 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 73 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 74 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 75 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 77 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 79 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 80 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 81 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 82 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 85 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 86 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 87 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 88 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 89 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 90 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 91 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 92 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 93 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 94 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 95 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 96 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 97 | Negativo | Negativo | Negativo |

| | | | |
|------------|----------|----------|----------|
| 98 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 99 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 100 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 101 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 102 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 104 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 105 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 107 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 108 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 110 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 117 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 118 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 119 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 120 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 121 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 122 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 123 | Negativo | Negativo | Negativo |

BIBLIOGRAFÍA.

1. Patrick R. Murray P, Ken S. Rosenthal P, Michael A. Pfaller M. Microbiología Médica. 2014. 996 p.
2. McLandsborough L. Food microbiology laboratory. Food Microbiology Laboratory. 2004. 1-173 p.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123-40 p.
4. Rodríguez-Angeles MG. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 2002;44(5):464-75 p.
5. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):142-201 p.
6. Clarke SC. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*--an emerging problem? Diagn Microbiol Infect Dis. 2001 Nov;41(3):93-8 p.
7. Donnenberg MS. Genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. Rev Microbiol. 1996;27(SUPPL. 1):104-8 p.
8. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Virulence of Enteropathogenic. 2003;16(3):365-78 p.
9. Organización Mundial de la Salud. *E. coli*. 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
10. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000 Oct;66(10):4555-8 p.
11. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1990 Nov;172(11):6175-81.
12. Nowrouzian FL, Clermont O, Edin M, Östblom A, Denamur E, Wold AE, Adlerberth I. *Escherichia coli* B2 Phylogenetic Subgroups in the Infant Gut Microbiota: Predominance of Uropathogenic Lineages in Swedish Infants and Enteropathogenic

- Lineages in Pakistani Infants. *Appl Environ Microbiol*. 27 de noviembre de 2019; 85 (24): e01681-19.
13. Silveyra, I. M., Pereyra, A. M., Alvarez, M. G., Villagran, M., Baroni, A., Deza, N., Carbonari, Claudia C., Miliwebsky, Elizabeth, Rivas, Marta, Aislamiento de *Escherichia coli* enteropatógeno O157:H16 de un caso de diarrea infantil y sus contactos familiares en La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* [Internet]. 2015;47(4):317-321 p.
 14. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2016 Oct;7(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016.
 15. Algammal AM, El-Kholy AW, Riad EM, Mohamed HE, Elhaig MM, Yousef SAA, Hozzein WN, Ghobashy MOI. Genes Encoding the Virulence and the Antimicrobial Resistance in Enterotoxigenic and Shiga-toxigenic *E. coli* Isolated from Diarrheic Calves. *Toxinas (Basilea)*. 10 de junio de 2020; 12 (6): 383.
 16. Barnett Foster D. Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence*. 2013 May 15;4(4):315-23 p.
 17. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *J Clin Microbiol*. 1998 Feb;36(2):598-602.
 18. Pasqua M, Michelacci V, Di Martino ML, Tozzoli R, Grossi M, Colonna B, Morabito S, Prosseda G. The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Microbiol delantero*. 2017 5 de diciembre; 8: 2390.
 19. Flores-Sanchez F, Chavez-Dueñas L, Sanchez-Villamil J, Navarro-Garcia F. Pic Pic Protein From Enteroaggregative *E. coli* Induces Different Mechanisms for Its Dual Activity as a Mucus Secretagogue and a Mucinase. *Front Immunol*. 2020, 17 de noviembre; 11: 564953.
 20. Blanco J. *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC . Elsevier. 2012;30(2): 84-89.

21. Estructuras de adhesión y locomoción. Nature Reviews. Microbiology. Disponible en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U2d_EstructurasAdhesionLocomocion_19694.pdf
22. Miranda-Estrada LI, Ruíz-Rosas M, Molina-López J, Parra-Rojas I, González-Villalobos E, Castro-Alarcón N. Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Aug-Sep;35(7):426-433 p.
23. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008 Aug;85(1):11-9 p.
24. Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential. *Toxinas (Basilea)*. Febrero de 2010; 2 (2): 283-96.
25. Sugai M, Hatazaki K, Mogami A, Ohta H, Pérès SY, Hérault F, Horiguchi Y, Masuda M, Ueno Y, Komatsuzawa H, Suginaka H, Oswald E. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a gln residue in the conserved G-3 domain of the rho family and preferentially inhibits the GTPase activity of RhoA and rac1. *Infect Immun*. 1999 Dec;67(12):6550-7.
26. Prada J, Baljer G, Rycke J, Steinrück H, Zimmermann S, Stephan R, Beutin L. Characteristics of α -hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. *Veterinary Microbiology*. 1991; 29(1): 59-73.
27. Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P, Hérault, F., Tasca, C., De Rycke, J., Oswald, E. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol*. 1997 Jun;24(5):1095-107.
28. Bakás, Laura; Maté, Sabina; Vazquez, Romina; Herlax, Vanesa. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2013; 47(2): 353-361.

29. Florencia R. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. 2015. Tesis de doctorado. Universidad de la plata.
30. Heid, C.A., Stevens J., Livak K.J, Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
31. Lee DS, Lee SJ, Choe HS. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int.* 2018 Sep 26;2018:7656752.
32. Suárez S. Identificación y caracterización de *E. coli* aisladas de conejos con sintomatología diarreica. 2020. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.
33. Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Mora A, Balaguer L, Mouriño M, Juarez A, Jansen WH. O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J Clin Microbiol.* 1996 Dec;34(12):3101-7.
34. Wang G, Clark CG, Rodgers FG. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Oct;40(10):3613-9.
35. Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios J. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005.
36. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):598-602.
37. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. 2007; 530(17).
38. Knust Z, Schmidt G. Factores necrotizantes citotóxicos (CNF): una familia de toxinas en crecimiento. *Toxinas (Basilea).* Enero de 2010; 2 (1): 116-27.
39. Oswald E, De Rycke J. A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Mar 15;56(3):279-84.

40. Travis J. Wiles, Richard R. Kulesus, Matthew A. Mulvey. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*. 2008;85(1): 11-19.
41. Centers for disease control and prevention, USA. 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-11-18/map.html>
42. Méndez-Álvarez S., Eduardo Pérez-Roth. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;22(3): 183-192 p.
43. Oswald E, Sugai M, Labigne A, Wu HC, Fiorentini C, Boquet P, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci US A*. 26 de abril de 1994; 91 (9): 3814-8.
44. Blanco, J. E., Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M. P. & W. H. Serotypes of CNF1-producing *Escherichia coli* strains that cause extraintestinal infections in humans. 1994. 0: 707-711 p.
45. Pohl P, Oswald E, Van Muylem K, Jacquemin E, Lintermans P, Mainil J. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet Res*. 1993;24(4):311-5.
46. European committee on antimicrobial susceptibility testing. Guía para la redefinición de las categorías clínicas S, I y R. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/EUCAST_Guia_para_la_redefinicion_de_las_categorias_clinicas_SIR.pdf
47. Piras, C., Soggiu, A., Grco, V., Martino A.P. Del Chjerico, F., Putignani, L., Urbani, A., Nally, E.P, Bonizzi, L., Roncada, P (2015) Mechanisms of antibiotic resistance to enrofloxacin in uropathogenic *Escherichia coli* in dog *Journal Proteomic*, 127, 365-376 p.
48. Shahrani M, Dehkordi FS, Momtaz H. Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biol Res*. 2014 Jun 23;47(1):28.

49. Nader M. Sobhy, Sarah G. A. Yousef, Hamada A. Aboubakr, Muhammad Nisar, Kakambi V. Nagaraja, Sunil K. Mor, Robert J. Valeris-Chacin, Sagar M. Goyal. Virulence factors and antibiograms of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves of Egyptian cattle and water buffaloes. 2020; 15(5).
50. Shabana II, Al-Enazi AT. Investigation of plasmid-mediated resistance in *E. coli* isolated from healthy and diarrheic sheep and goats. Saudi J Biol Sci. 2020 Mar;27(3):788-796.
51. Morales V. G., Huerta J. *Escherichia coli* diarregénica. Conocimientos vigentes. 2010;77(6): 271-276
52. Oswald E, Tabouret M, Boivin R, De Rycke J. Detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type two (CNF2) by enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Microbiol. 1994 Jun;40(3-4):209-18.
53. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. Nature. 1997 Jun 12;387(6634):729-33. Pennington H. *Escherichia coli* O157. Lancet. 2010 Oct 23;376(9750):1428-35 p.
54. Buchanan, Robert & Doyle, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. Food Technology. 1997; 51. 69-76.