Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Detección de los genes *stx2e* y *fedA* en *Escherichia coli* asociadas a la enfermedad de los edemas en cerdos con diarrea

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Franco Jherson RAMOS BENDEZÚ

ASESOR

Mg. Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ramos F. Detección de los genes *stx2e* y *fedA* en *Escherichia coli* asociadas a la enfermedad de los edemas en cerdos con diarrea [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Franco Jherson Ramos Bendezú
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74643955
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-9009-7357
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Sonia Yenny Calle Espinoza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10321145
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4955-2378
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Juan José Siuce Moreno
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42807429
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luis Ramiro Luna Espinoza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41958220
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Mercy Gisela Ramírez Velásquez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10713781
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria

Grupo de investigación	Microbiología Aplicada a la Salud Pública, Animal y de Impacto Ambiental - MASPAIA
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). FONDECYT (PROCIENCIA). N° 413-2019-FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	Lugar: Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Latitud: -12.080917 Longitud: -76.987626
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024 - 2025
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Auditorio de Anatomía de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día jueves 13 de febrero de 2024, a las **13: 00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 000016-EPMV/FMV-2024 integrado por los siguientes profesores:

MV. Dr. SIUCE MORENO JUAN JOSÉ	**Presidente del Jurado**
Blga. Mg. CALLE ESPINOZA SONIA YENNY	**Asesor de Tesis**
MV. Dr. LUNA ESPINOZA LUIS RAMIRO	**Miembro del Jurado**
MV. Mg. RAMIREZ VELÁSQUEZ MERCY GISELA	**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **FRANCO JHERSON RAMOS BENDEZÚ,** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"DETECCIÓN DE LOS GENES STX2E Y FEDA EN ESCHERICHIA COLI ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS EN CERDOS CON DIARREA"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **Diecisiete (17).**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **14:30** horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

UNMSM Firmado digitalmente por SIUCE MORENO Juan Jose FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.03.2025 18:18:25 -05:00

Siuce Moreno Juan José: MV. Dr. Prof. Auxiliar DE

UNMSM Firmado digitalmente por CALLE ESPINOZA DE CAMACHO Sonia Yenny FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.03.2025 16:08:32 -05:00

Calle Espinoza Sonia Yenny Blga Mg. Prof. Principal DE

Luna Espinoza Luis Ramiro: MV. Dr. Prof. Auxiliar DE

UNMSM Firmado digitalmente por RAMIREZ VELASQUEZ Mercy Gisela FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.03.2025 15:51:42 -05:00

Ramírez Velásquez Mercy Gisela: MV. Mg. Prof. Asociado DE

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Sonia Yenny Calle Espinoza. en mi condición de asesor acreditado con la RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 000016-EPMV/FMV-2024 de la tesis, cuyo título es **Detección de los genes stx2e y fedA en Escherichia coli asociadas a la enfermedad de los edemas en cerdos con diarrea** presentado por el bachiller **FRANCO JHERSON RAMOS BENDEZÚ**., para optar el título de **MEDICO VETERINARIO.**

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 11% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**
Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

UNMSM Firmado digitalmente por CALLE ESPINOZA DE CAMACHO Sonia Yenny FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 10.03.2025 12:00:26 -05:00

Firma del Asesor _____

DNI: 10321145

Nombres y apellidos del asesor: Sonia Yenny Calle Espinoza

DEDICATORIA

A mis padres, Flor y Fredy, por sus esfuerzos y sacrificios incansables, sus enseñanzas han sido la base de todos mis logros. Gracias por creer en mí y por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos, Fredy y Fiorella, por ser mi fuerza y compañía constante, siempre alentándome a seguir adelante con sus palabras y acciones, por motivarme a alcanzar cada meta que me proponga.

A ti, Danae, por ser mi inspiración diaria, por tu paciencia, comprensión y por acompañarme en este camino lleno de retos. Tu apoyo ha sido fundamental para alcanzar este objetivo.

A mis amigos de la universidad (Los grises) y academia, por los momentos de risas, apoyo y comprensión. Su amistad hizo este camino más llevadero y divertido. Arigato!

A mis fieles compañeras Flopy, Felina y Kami, por su presencia en las noches desveladas, siempre llenándome de alegría y calma a mis días.

A todos ustedes, les dedico este esfuerzo con todo mi kokoro, porque sin ustedes, esta meta no habría sido posible.

¡Lo que hoy parece imposible, con esfuerzo… en un tiempo lo conseguirás!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Sonia Calle, mi asesora, por su guía, paciencia y dedicación a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y sugerencias han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

Agradezco a los docentes Joel Palomino y Luis Álvarez; miembros del equipo del Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección de Bacteriología y Micología de la UNMSM-FMV, por su invaluable apoyo, guía, conocimientos y por brindarme un espacio donde pude desarrollar este trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los miembros de mi jurado: Mercy Ramirez Velasquez, Luis Luna Espinoza y Juan Siuce; por su tiempo, dedicación y valiosas observaciones, las cuales han enriquecido este trabajo.

A mi familia, gracias por su confianza y por motivarme a seguir adelante incluso en los momentos más desafiantes. A Danae Riques, por su constante ánimo y motivación diaria, recordándome siempre la importancia de avanzar y no rendirme.

A mis amistades, por su compresión, compañía y palabras de ánimo, hicieron que este proceso fuera más llevadero.

INDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA ii
AGRADECIMIENTOS iii
RESUMEN vi
ABSTRACT vii
LISTA DE CUADROS viii
LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE ANEXOS x
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA 3
2.1 ESCHERICHIA COLI 3
2.1.1 TAXONOMÍA 3
2.1.2 MORFOLOGÍA 4
2.1.3 COMPOSICIÓN DE LA ENVOLTURA CELULAR 4
2.1.4 ESTRUCTURAS ACCESORIAS 6
2.1.5 GENOMA 8
2.1.6 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA 8
2.1.7 PATOGENICIDAD 10
2.2 *Escherichia coli* PRODUCTORA DE SHIGA TOXINA (STEC) 11
2.2.1 *E. coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA 2e (Stx2e-STEC) 13
2.2.2 GEN *fedA* 14
2.2.3 GEN *stx2e* 15
2.2.4 DETECCIÓN DE LA *Escherichia coli* PRODUCTORA DE LA SHIGA TOXINA stx2e EN CERDOS 16
2.3 ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS EN CERDOS 19
2.3.1 PATOGENESIS 20
2.3.2 SIGNOS CLÍNICOS 22
2.3.3 DIAGNÓSTICO 24
2.3.4 TRATAMIENTO 25
2.3.5 CONTROL Y PREVENCIÓN 25
2.4 PORCICULTURA EN EL PERÚ 26
III. MATERIALES Y METODOS 28
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN 28
3.2 DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL 28
3.2.1 MUESTRAS 28
3.2.2 CONTROLES 28

3.2.3 MATERIALES PARA REACTIVACIÓN DE CEPAS Y CULTIVO 29

3.2.4 MATERIALES PARA ENRIQUECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE ADN 29

3.2.5 MATERIRALES PARA PCR 30

3.2.6 MATERIALES PARA ELECTROFORESIS 31

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL 31

3.3.1 PRESERVACIÓN EN CONGELACIÓN DE CEPAS 31

3.3.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS Y CULTIVO 32

3.3.1 ENRIQUECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE ADN 32

3.3.2 DETECCIÓN DE LOS GENES *stx2e* Y *fedA* MEDIANTE PCR ... 33

3.3.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 35

IV. RESULTADOS 36

4.1 DETECCIÓN DE LOS GENES *stx2e* Y *fedA* – PCR 36

4.2 FRECUENCIA DE LOS GENES *stx2e* Y *fedA* 37

4.3 ASOCIACIÓN ENTRE LOS GENES *stx2e* Y *fedA* 38

V. DISCUSIÓN 40

VI. CONCLUSIONES 45

VII. RECOMENDACIONES 46

VIII. LITERATURA CITADA 47

IX. ANEXOS 60

RESUMEN

Las bacterias *Stx2e-STEC*, productoras de la toxina Shiga tipo 2e (Stx2e) y portadoras de fimbrias F18, son los principales agentes causantes de la enfermedad del edema en cerdos. Esta patología afecta a lechones destetados, ocasionando daño vascular severo por la toxina y la adhesión bacteriana. Se caracteriza por edemas subcutáneos, daño neurológico, alta letalidad y, en casos graves, muerte súbita, generando significativas pérdidas económicas en la granja. Este estudio tuvo como objetivo detectar los genes *stx2e* y *fedA* en *E. coli* asociadas a la enfermedad de los edemas en cerdos con diarrea. Se analizaron 119 muestras criopreservadas de *E. coli*, las cuales fueron reactivadas, cultivadas en Agar MacConkey y enriquecidas en caldo LB. Posteriormente, se extrajo el ADN mediante un kit comercial de purificación para su análisis. La detección de los genes *stx2e* y *fedA* se llevó a cabo utilizando la prueba molecular PCR convencional, realizándose análisis independientes para cada gen. Se identificaron 6 (5.04%) muestras positivas para el gen *stx2e* mediante PCR convencional; 3 (2.52%) de estas también portaban el gen *fedA*, mientras que las otras 3 (2.52%) eran positivas únicamente para *stx2e*. El análisis estadístico mostró una asociación significativa entre los genes *stx2e* y *fedA*, confirmando que las cepas que poseen ambos genes son las principales responsables de la enfermedad. Esto resalta la importancia de su detección temprana para prevenir brotes mediante vacunas o programas de manejo adecuados.

Palabras clave: Stx2e-STEC, Enfermedad del Edema, *stx2e*, *fedA*, Lechones

ABSTRACT

The Stx2e-STEC bacteria, producers of Shiga toxin type 2e (Stx2e) and carriers of F18 fimbriae, are the main agents causing edema disease in pigs. This pathology affects weaned piglets, causing severe vascular damage by the toxin and bacterial adhesion. It is characterized by subcutaneous edema, neurological damage, high lethality and, in severe cases, sudden death, generating significant economic losses on the farm. The objective of this study was to detect the *stx2e* and *fedA* genes in *E. coli* associated with edema disease in pigs with diarrhea. 119 cryopreserved samples of *E. coli* were analyzed, which were reactivated, cultivated on MacConkey Agar and enriched in LB broth. After that, DNA was extracted using a commercial purification kit for analysis. Detection of the *stx2e* and *fedA* genes were carried out using the conventional PCR molecular test, with independent analyses being performed for each gene. 6 samples positive (5.04%) for the *stx2e* gene were identified by conventional PCR; 3 of these (2.52%) also carried the *fedA* gene, while the other 3 (2.52%) were positive only for *stx2e*. Statistical analysis showed a significant association between the *stx2e* and *fedA* genes, confirming that strains possessing both genes are the main responsible for the disease. This highlights the importance of early detection to prevent outbreaks through vaccines or appropriate management programs.

Key Words: Stx2e-STEC, Edema disease, *stx2e*, *fedA*, piglets.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de ADN de primers para los genes *stx2e* y *fedA*

Cuadro 2. Componentes del PCR para el gen *stx*$_{2e}$ y *fedA* – ThermoScientific: DreamTaq™

Cuadro 3: Matriz de contingencia para la asociación entre Stx2e y F18.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la pared celular de una bacteria Enterobacteriaceae Gram negativa (Raetz y Whitfield, 2002).

Figura 2. Micrografía electrónica de la unión fimbrial típica de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en el intestino (Zimmerman *et al. 2019)*.

Figura 3. Representación esquemática de una bacteria *E. coli* mostrando factores de virulencia y antígenos de superficie (Fairbrother, 2015)

Figura 4. Representación esquemática de la Shiga toxina (Bergan *et al.*, 2012)

Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la inducción del fago Stx2. (Navarro, 2014).

Figura 6. Patogénesis de Stx2e-STEC (CEVA, 2020)

Figura 7. Hinchazón edematosa de los párpados en un cerdo con enfermedad del edema (Zimmerman, 2019)

Figura 8. Edema del mesenterio del colon espiral (White, 2017)

Figura 9. Cerebro visiblemente húmedo (White, 2017)

Figura 10. Amplificación del gen *stx2e* y *fedA,* control positivo (P5A – P2A) y negativo (ATCC 25922)

Figura 11. Gráfico de barras apiladas de las frecuencias absolutas de los genes s*tx2e* y *fedA*

Figura 12. Diagrama de Venn representando la distribución de muestras positivas

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Lista de número de muestras de *E. coli* según su distrito y región de procedencia

ANEXO 2. Lista de cada aislado de *E. coli* del banco del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNMSM-FMV con edad del animal y región de procedencia

ANEXO 3. Protocolo de purificación del ADN genómico de bacterias gramnegativas – GeneJET Genomic DNA purificarion kit

ANEXO 4. Lista de cada aislado de *E. coli* positivo o negativo a los genes *stx2e* y *fedA* mediante PCR convencional

I.INTRODUCCIÓN

El desarrollo de agentes patógenos en los sectores de producción porcina, afectan principalmente a los productores causando pérdidas económicas debido a que no solo afecta a un solo foco, sino que puede diseminarse por todo el corral alterando los parámetros productivos llegando a provocar la muerte de los animales de producción (Casanovas, 2015).

Uno de estos agentes es la *Escherichia coli* una de las bacterias con mayor distribución mundial, es una de las principales habitantes del microbiota intestinal de los humanos y animales (OMS, 2018), sin embargo, algunas cepas son patógenas, dentro de este grupo la *E. coli* productora de Shiga toxina 2e (Stx2e-STEC) es la causante de la enfermedad de los edemas, desarrollándose 5-7 días posdestete (FAO, 2010; Tseng *et al*., 2014). Son reconocidas como responsables de producir signos como edemas y trastornos de origen nervioso, debido a la capacidad de colonizar, adherirse y proliferar en el epitelio intestinal; desencadenando como causante de la enfermedad del edema porcino expresando principalmente adhesinas F18 y el gen stx_{2e} (Koláčková *et.al*, 2021).

La enfermedad de los edemas (EE) es causada por las cepas STEC que está asociada a la expresión de la toxina shiga 2e y de adhesinas fimbriales, siendo las más reportada con mayor frecuencia la adhesina F18 (Zhang, 2014; Baldo *et al*., 2020). Las medidas de prevención más utilizadas en el medio están dirigidas con el objetivo de reducir o minimizar el efecto de la colonización de estas cepas, mediante el uso de antibióticos, aunque esta estrategia no es recomendable debido a que a largo plazo la resistencia

antibiótica se produce naturalmente en las bacterias, siendo la opción más eficiente la aplicación de vacunas a partir de los serogrupos patógenos más frecuentes y distribuidos en el mundo, creando anticuerpos neutralizantes contra la toxina Shiga a nivel sanguíneo (Garcia, 2013; Casanovas, 2015).

En estudios realizados sobre la detección de genes *stx2e y fedA* (gen de la adhesina F18), se encontraron la presencia de STEC positivo en casos clínicos con diarrea en Argentina aportando nueva información para la implementación de medidas de prevención (Moredo *et.al*, 2012). Con respecto a la prevalencia y caracterización genotípica en el país, los estudios están más enfocados en el sector público y en la producción porcina no se encontró dicha información documentada, siendo necesaria para evaluar el contexto y desarrollar alternativas de prevención contra las cepas STEC típicas y atípicas presentes en el país. En el 2023 se realizó un estudio en porcinos sin manifestación clínica de diarrea para la detección de los genes *stx2e* y *fedA* en el cual no se encontró ningún positivo (Flores, 2023). En ese sentido, el objetivo de esta tesis es evaluar la detección de los genes *stx2e* y *fedA* provenientes de aislados criopreservados de cerdos con manifestación clínica de diarrea.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 ESCHERICHIA COLI

2.1.1 TAXONOMÍA

E. coli es considerado un organismo celular dentro del reino Eubacteria, de filo Pseudomonadota, de la clase Gammaproteobacteria, de la orden Enterobacterales, de la familia Enterobacteriaceae y el género Escherichia (UniProt, 2024).

La especie *Escherichia coli* es uno de los microrganismos mejor caracterizados y estudiados en los campos de la microbiología, genética y biología molecular; siendo de gran importancia en el microbiota del tracto gastrointestinal de los seres humanos, mamíferos, aves y reptiles como cepas comensales, sin embargo, algunas cepas son patógenas causando enfermedades (OMS, 2018; Yu *et al*., 2021).

E. coli se caracteriza por ser bacilos gram negativos no esporulantes, anaerobia facultativa, mesófilo con temperatura de crecimiento de 37°C, catalasa positiva, oxidasa negativa y rápido fermentador de glucosa y lactosa (Amasino, 2017).

2.1.2 MORFOLOGÍA

Escherichia coli son organismos celulares de forma de bacilo, recto y con una apariencia cilíndrica con extremos redondeados, estos organismos celulares tienen una longitud aproximada de 1.0 – 3.0 μm y un diámetro de 0.5 μm (McVey *et al*, 2022).

Esta enterobacteria se presenta solo o de a pares, se considera una gram negativa, generalmente con movilidad ya que presenta flagelos y factores de virulencia como las adhesinas (Amasino, 2017). Las adhesinas se pueden expresar de dos maneras, una es la adhesión fimbrial o pilus y la otra es la adhesión afimbrial; estas adhesinas están compuestas de proteínas que actúan como adherencia entre las células diana del tracto gastrointestinal y las células que comprenden a la bacteria (Hu *et al*., 2020).

2.1.3 COMPOSICIÓN DE LA ENVOLTURA CELULAR

La composición de la envoltura celular de las bacterias gram negativas es compleja, la *E. coli* consta tres capas: una membrana citoplasmática, una pared celular compuesta por peptidoglicano y una membrana externa (Moredo, 2012) **(Figura 1).**

La envoltura celular actúa como barrera fisicoquímica selectiva la cual otorga la morfología celular y actúa como un sistema protector ante grandes cargas mecánicas (Rojas *et al*, 2018).

La capa interna o denominada como la membrana citoplasmática está conformada por una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos y proteínas que delimitan todo el medio intracelular (citoplasma) con el medio extracelular, además es utilizada como anclajes de estructuras accesorias como pili, fimbria y flagelos (Bishop, 2020). Una de sus funciones más importantes es la de actuar como medio para la formación de la biosíntesis de los LPS de la membrana externa a partir de precursores en el citoplasma mediante las proteínas de ensamblaje de lipopolisacáridos LapB, el cual regula la biosíntesis de los LPS al promover la degradación del LpxC, una enzima que inicia el

primer paso para la síntesis de los LPS y su posterior transporte hasta la membrana externa (Shu *et al*, 2024).

La capa intermedia es una capa fina denominada periplasma que está conformada por el peptidoglicano o mureína, las cuales están compuestas por una lámina monomolecular de mureínas compuesta en cantidades equitativas de polisacáridos como la N-acetilglucosamina (GlcNaAc) y el ácido N-acetilmurámico (MurNac) y péptidos como la L-alanina, D- acido glutámico, L meso-ácido diaminopimelico (DAP) y D-analina, estas moléculas interconectadas entre si llegan a formar una molécula gigante que mantiene la morfología estructural de la célula y brinda protección a la bacteria de la lisis osmótica (Moredo, 2012).

La capa superficial denominada como membrana externa está conformada por una bicapa lipídica asimétrica (compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos), proteínas de membrana externa, lipoproteínas y porina; los lipopolisacáridos están formados por 3 dominios unidos, el primer dominio está conformado por el lípido "A", el segundo por el core que contiene oligosacáridos fosforilados no repetitivos y el tercer dominio contiene la expresión del antígeno "O", aunque no todos son tipificables (Scheutz *et al.*, 2005; McVey *et al*, 2022). La asimetría lipídica de la membrana es fundamental para la formación de una barrera impenetrable para las moléculas hidrofóbicas, además es esencial para la supervivencia de la bacteria ante entornos hostiles y proporciona resistencia intrínseca a los antibióticos (Lundstedt *et al*, 2021).

Las bacterias también pueden expresar una cápsula conformada por polisacáridos de elevado peso molecular, está capsula actúa como una forma de protección contra el proceso de fagocitosis debido a la carga negativa que presentan en sus superficies, esta capsula es antigénica, siendo clasificada como un tipo de antígeno "K" (McVey *et al*, 2022).

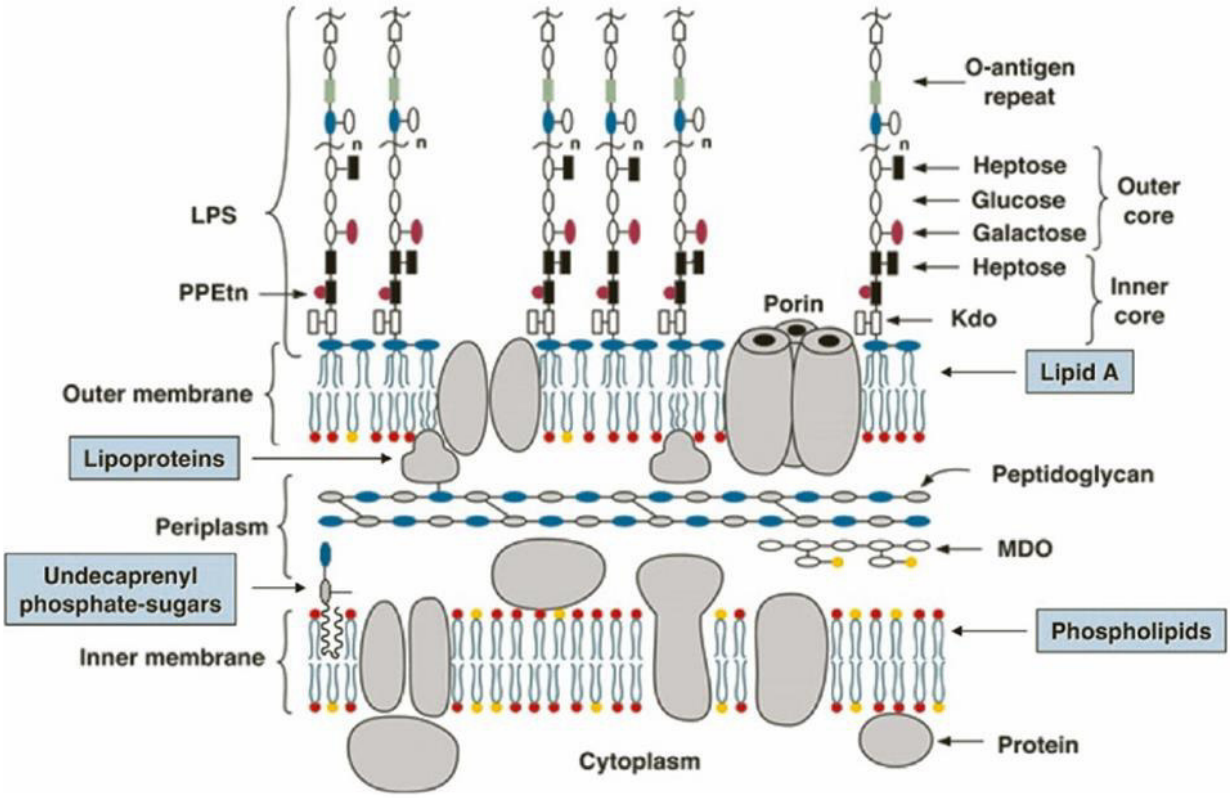

Figura 1. Esquema de la pared celular de una bacteria Enterobacteriaceae Gram negativa (Raetz y Whitfield, 2002).

2.1.4 ESTRUCTURAS ACCESORIAS

2.1.4.1 FLAGELOS

Los flagelos son estructuras que se disponen alrededor de la superficie de la pared celular, estas estructuras anexas confieren movilidad de tipo perítrico, estos flagelos están conformados por subunidades de unidad de proteína reconocida como la flagelina. Las células bacterianas frecuentemente poseen de 5 a 10 flagelos distribuidas de manera aleatoria por la superficie, cada filamento flagelar tiene un diámetro de 20nm y una longitud de 20 µm (Scheutz *et al.*, 2005).

2.1.4.2 FIMBRIAS

La fimbria es una estructura filamentosa que se proyecta desde la superficie de la *Escherichia coli,* esta estructura accesoria está conformada por el ensamblaje de múltiples

subunidades de proteínas siendo la vía chaperona-usher la más frecuente en cepas patógenas (Hu *et al.*, 2020).

Dentro de la estructura de la fimbria encontramos a las adhesinas compuestas por proteínas que actúan como adherencia entre la bacteria y la célula diana, estas están ensambladas en orgánulos o como proteína de membrana externa, considerándose como un antígeno de tipo "F" (Scheutz *et al.*, 2005).

Las adhesinas son factores de virulencia debido a la importancia de la adherencia a las superficies mucosas como de las células epiteliales en el tracto gastrointestinal, la *E. coli* presenta muchos tipos de adhesinas que difieren entre sí, la mayoría de ellas están asociadas a cepas patógenas provocando una enfermedad especifica (McVey *et al.*, 2022) **(Figura 2).**



Figura 2. Micrografía electrónica de la unión fimbrial típica de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en el intestino (Zimmerman *et al*., 2019*)*.

2.1.5 GENOMA

El genoma de *Escherichia coli* varía ligeramente dependiendo de la cepa, pero generalmente tiene un tamaño aproximado de 4.6 millones de pares de bases (Mb) y codifica entre 4,000 y 5,500 genes. Es circular y está compuesto principalmente por un cromosoma único, aunque algunas cepas pueden contener plásmidos que codifican genes adicionales, como factores de virulencia o resistencia a antibióticos (Durfee *et al.*,2008).

2.1.6 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

La anatomía del género Escherichia es típica de las enterobacterias. Pueden poseer cápsulas (antígeno K), flagelos (antígeno H), adhesinas (antígeno F), y una pared celular típica de las bacterias Gram negativas compuesta por lipopolisacáridos (antígeno O) y proteínas (Moredo, 2012) **(Figura 3)**.

La clasificación serológica continúa actualizándose continuamente con el esquema que diseño el científico Kauffman, en el que actualmente se conocen 60 antígenos capsulares, 112 antígenos flagelares y 176 somáticos (Rodriguez, 2002)

El antígeno "O" es responsable de definir el serogrupo, mientras que la identificación de los antígenos somático y flagelar (O:H) determina el serotipo, el cual en ciertos casos está relacionado con un cuadro clínico especifico (Amasino, 2017).

La tipificación serológica de la *E. coli* demanda una gran cantidad de antisueros, por lo cual es preferible identificar las cepas a través de sus factores de virulencia como las adhesinas y toxinas mediante pruebas moleculares, con el fin de evidenciar la presencia de genes implicados en el mecanismo de patogenicidad que puedan actuar como marcadores moleculares (Moredo, 2012).

2.1.6.1 Antígeno k

Los polisacáridos capsulares son clasificados como un tipo de antígeno "K", algunos de estos antígenos capsulares proporcionan resistencia sérica mediante sustancias producidas por la estructura capsular que brinda protección a la membrana externa de la

bacteria del ataque del complejo de membrana de la cascada del complemento, siendo esta característica crucial para la supervivencia de las cepas que provocan infecciones extraintestinales (Hu *et al*., 2020).

2.1.6.2 Antígeno O:

La membrana externa los lipopolisacáridos es una característica fundamental para la virulencia del lipido A y la unidad de antígeno "O", esta capa densa de antígeno "O" puede ofrecer efectos equivalentes a los de una capsula de antígeno "K", entre estos efectos se puede incluir la protección frente a la fagocitosis y del ataque del complejo de membrana (Rojas *et al.*, 2018).

2.1.6.3 Antígeno H:

El antígeno flagelar es conocido como antígeno "H", es una proteína termolábil presentes en los flagelos, estos radican de la flagelina la cual está conformada por varias subunidades de proteínas de unidad formando estructuras en forma de filamento que confieren movilidad de tipo peritrica. Este antígeno resulta útil en la determinación del serotipo de la *E. coli* junto al antígeno somático "O" (Scheutz *et al.*, 2005).

2.1.6.4 Antígeno F:

El antígeno de tipo "F" es considerado como un antígeno fimbrial una proteína presente en las fimbrias, estas son estructuras piliformes cortas con la propiedad de adherirse a las superficies de células diana, como las del tracto gastrointestinal, siendo esta característica crucial para el comienzo de un cuadro de infección. Los antígenos fimbriales están correlacionados con los factores de virulencia específicos de la *Escherichia coli*, existen una gran variedad de estos antígenos, siendo las fimbrias de tipo F4, F5, F6 y F18 las más relacionadas con el desarrollo de enfermedades especificas en los humanos y animales (Scheutz *et al.*, 2005; Moredo, 2012).

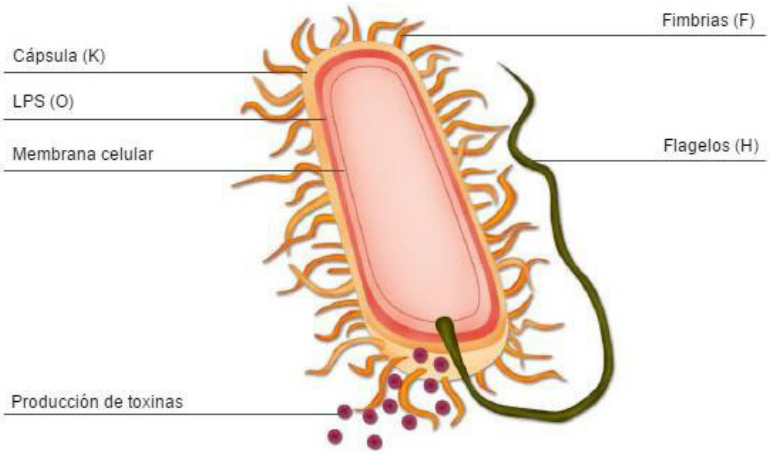

Figura 3. Representación esquemática de una bacteria *E. coli* mostrando factores de virulencia y antígenos de superficie (Fairbrother, 2015)

2.1.7 PATOGENICIDAD

Escherichia coli como se conoce es uno de los microorganismos bacterianos más comunes y de las mejor estudiadas, la mayor parte de las cepas son inofensivas y habitan de forma inofensiva en el tracto intestinal, no obstante, en hospedadores inmunodeprimidos o cuando se rompen las barreras gastro-intestinales, estas cepas pueden provocar infecciones (Casanovas, 2015).

Las infecciones causadas por las cepas *E.coli* patógenas pueden restringirse a las mucosas superficiales o diseminarse por todo el organismo, debido a esto se conoce algunas manifestaciones clínicas diferentes como las infecciones de las cepas extraintestinales (ExPEC) la cual está asociada a diversas manifestaciones como una meningitis, septicemia (SEPEC), infección urogenital (UPEC), etc; y las cepas de *E.coli* que producen un cuadro clínico gastroentérico asociada a las diarreas por lo general, por lo cual esta variedad patogénica está relacionada con la amplia diversidad de factores de virulencia que puedan expresar (Manges *et al*., 2019).

Las cepas de *Escherichia coli* que causan patologías gastrointestinales, se clasifican en seis grupos patógenos según sus características fenotípicas, mecanismo de patogénesis, manifestaciones clínicas que provocan en el huésped y sus factores específicos de virulencia (McVey *et al.*, 2022).

Los grupos patogénicos gastrointestinales de la *E. coli* reconocidos en la actualidad son: la enterotoxigénica (ETEC), enteropatogena (EPEC), de adherencia difusa (DAEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasivo (EIEC) y la enterohemorrágica (EHEC) también conocida como *E. coli* shigatoxigénica (STEC) o productora de toxina Vero (VTEC) (EFSA, 2024).

2.2 *Escherichia coli* PRODUCTORA DE SHIGA TOXINA (STEC)

Escherichia coli productora de la toxina shiga es la cepa patógena más relevante en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), la infección por este grupo patógeno está relacionada con la presentación de diarreas, enterocolitis hemorrágica y el síndrome de uremia hemolítica (SUH) en humanos que tiene una complicación grave y potencialmente mortal, por lo cual tiene gran relevancia en la salud pública (Bruyand *et al.*, 2018).

Los rumiantes como el bovino, caprino, ovino y ciervos son los principales hospedadores naturales de la STEC y suelen ser portadores asintomáticos de estos microorganismos (OIE, 2018). La STEC también ha sido aislada en otros animales portadores como el búfalo de agua, caballos, perros, gatos, conejos domésticos, pollos y cerdos (ISS, 2023; EFSA, 2024)

En animales, la infección por *Escherichia coli* productora de la toxina shiga suele ser asintomática, aunque ciertos tipos pueden desencadenar en un cuadro clínico de diarrea en terneros o cerdos, dentro de estos tipos la STEC - Stx2e es responsable de la enfermedad del edema en cerdos, en el cual sus factores de virulencia más relevantes incluyen a las adhesinas de las fimbrias F18 que participan en la adherencia y colonización, y la toxina stx, el cual es el principal factor de virulencia responsable de los signos clínicos asociada a esta patología (Koláčková *et al.*, 2021).

La toxina Shiga se divide en 2 tipos inmunológicamente diferenciados: Stx1 y Stx2 (Yang *et al.*, 2021). Estos dos grupos se clasifica a su vez en varios subtipos, con cuatro subtipos para stx1 (Stx-1a, Stx-1c, Stx-1d y Stx-1e), y 12 subtipos para Stx2 (Stx-

2a, Stx-2b, Stx-2c, Stx-2d, Stx-2e, Stx-2f, Stx-2g, Stx-2h, Stx-2i, Stx-2j, Stx-2k, Stx-2l) (Velez *et al.*, 2022).

La toxina Stx es una proteína compuesta por una toxina AB5, la cual contiene 5 subunidades B que se unen a los glicoesfingolípidos (GSL) expuestos en la superficie de las células vasculares, además es responsable de entregar la subunidad A al citoplasma, esta subunidad tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteína ribosómica y provocar la muerte celular (Yoshimura *et al.*, 2023) **(Figura 4)**.

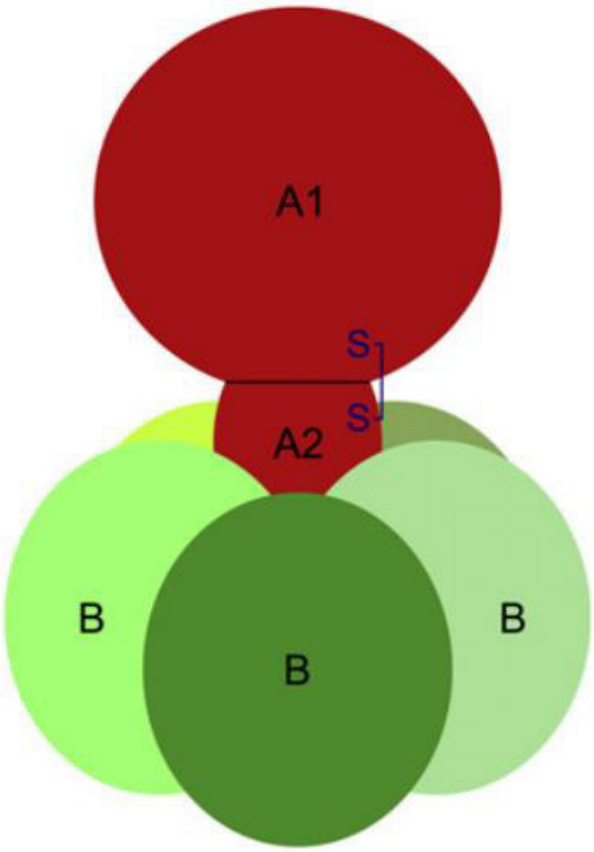

Figura 4. Representación esquemática de la Shiga toxina (Bergan *et al.*, 2012) **A1:** Fragmento A1 (enzimáticamente activo), **A2:** Fragmento pequeño A2; **S:** Enlace de disulfuro (mantiene unido los fragmentos A1 y A2); **B:** Fracción B no tóxica responsable de la unión a los receptores celulares (5 subunidades)

2.2.1 *E. coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA 2e (Stx2e-STEC)

Es importante señalar que los subtipos de Stx1 y la mayoría de los subtipos Stx2 se unen al receptor globotriaosilceramida 3 (Gb3), sin embargo, la Stx2e tiene una mayor afinidad por la Gb4 y puede reconocer de manera específica el receptor poco común Gb5 (Steil *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2021).

La Stx2e-STEC es el subtipo principal asociado con la enfermedad del edema (EE) porcino, esta patología es comúnmente observada en lechones poco después del destete, en la cual es causado por la unión de la toxina Stx2e con receptores específicos como la globotetraosilceramida (Gb4) (Melton, 2014). Esta toxina desencadena daño a nivel del endotelio vascular causando la muerte celular y extravasación del fluido de los vasos, que resulta en edema subcutáneo como en cabeza y cuello, lesiones en la mucosa gástrica y mesocolon, alteraciones sistémicas y en algunos casos desordenes neurológicos debido al edema cerebral (Casanova, 2018).

Los principales factores de virulencia del Stx2e-STEC es la adhesina fimbrial F18 y toxina Stx2e, la cuales son codificadas por los genes "*fedA"* y "stx_{2e}" respectivamente, estos factores son los principales responsables de la enfermedad del edema en porcinos, al ser cruciales tanto en la colonización como en la generación de los síntomas característicos de esta patología (Moredo *et al.,* 2012; Fairbrother, 2023).

Es importante destacar que no todas las cepas Stx2e-STEC poseen el gen *fedA* (gen que codifica la fimbria F18) (Gotter, 2014). Aunque ambos factores (Stx2e y F18) están fuertemente asociados con la enfermedad del edema en porcinos, en algunos casos de EE se han aislado cepas de Stex2e-STEC que no poseen el gen para la fimbria F18, sugiriendo que otras adhesinas fimbriales pueden estar implicados en la colonización y patogénesis de la enfermedad (Martineau *et al.*,2018; Baldo, 2020).

2.2.2 GEN *fedA*

El gen *fedA* permite a *Escherichia coli* produzca a la adhesina específicamente al intestino delgado, facilitando la colonización bacteriana, esta adhesión asegura que la *E. coli* permanezca en el sitio óptimo para liberar sus toxinas, evitando que pueda ser eliminada por el peristaltismo intestinal, lo que prolonga su presencia y potencia la expresión de las toxinas Stx2e amplificando los efectos patogénicos (Nicholas *et al.*, 2024).

El gen *fedA* codifica la subunidad mayor de la fimbria F18, una adhesina fimbrial que actúa como uno de los principales factores de virulencia asociada con la enfermedad del edema en cerdos. Existen dos variantes principales de esta fimbria: F18ab y F18ac, ambas implicadas en la adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal del hospedador, siendo la fimbria F18ab asociada con la enfermedad del edema en porcinos y la F18ac con la diarrea posdetete ocasionada por la cepa ETEC (Won y Lee, 2016; Baldo *et al.*, 2020).

Las fimbrias F18 son unas estructuras proteicas pilosas, están compuestas por las subunidades proteicas como la subunidad mayor FedA responsable de la formación del filamento principal y de la adhesión al receptor del hospedador, la subunidad menor FedE actúa como chaperona o estabilizador estructural y la subunidad FedF es la adhesina especifica, responsable de la interacción directa con el receptor del epitelio intestinal, como la globotetraosilceramida (Gb4) (Smeds *et al.*, 2003; Moonens *et al.*, 2014).

La expresión del receptor F18 en los cerdos es regulada genéticamente y está estrechamente relacionada a la edad, siendo más pronunciada después del destete (Coddens et al., 2007). Esta variabilidad en la expresión del receptor F18 de *E. coli* (ECF18R) está asociada con la susceptibilidad del cerdo a contraer infecciones por cepas patógenas como la Stx2e-STEC causando la enfermedad del edema en lechones jóvenes especialmente (Casey y Bosworth, 2009; Nicholas *et al.*, 2024).

2.2.3 GEN *stx2e*

Escherichia coli adquiere el gen *stx2e* a través de la inserción de un profago conocido como fago Shiga o Stx, se encuentra generalmente integrado en el cromosoma de *E. coli* o en plásmidos que facilitan su transmisión entre diferentes cepas bacterianas de *E. coli*, esta característica lo convierte en un impulsor de la transferencia de genes de *stx* entre serotipos de *E. coli* (Khalil *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021) **(Figura 5)**. Su expresión es regulada por factores específicos relacionados con la genética de la bacteria y las condiciones ambientales como el pH ligeramente ácido, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura pueden favorecer la producción de toxinas (Bonanno *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2021). Esta toxina tiene la capacidad de unirse a receptores en las células del endotelio vascular, lo que contribuye a la alteración de la función vascular y el daño tisular asociado a la enfermedad del edema (Baldo *et al.*, 2020).

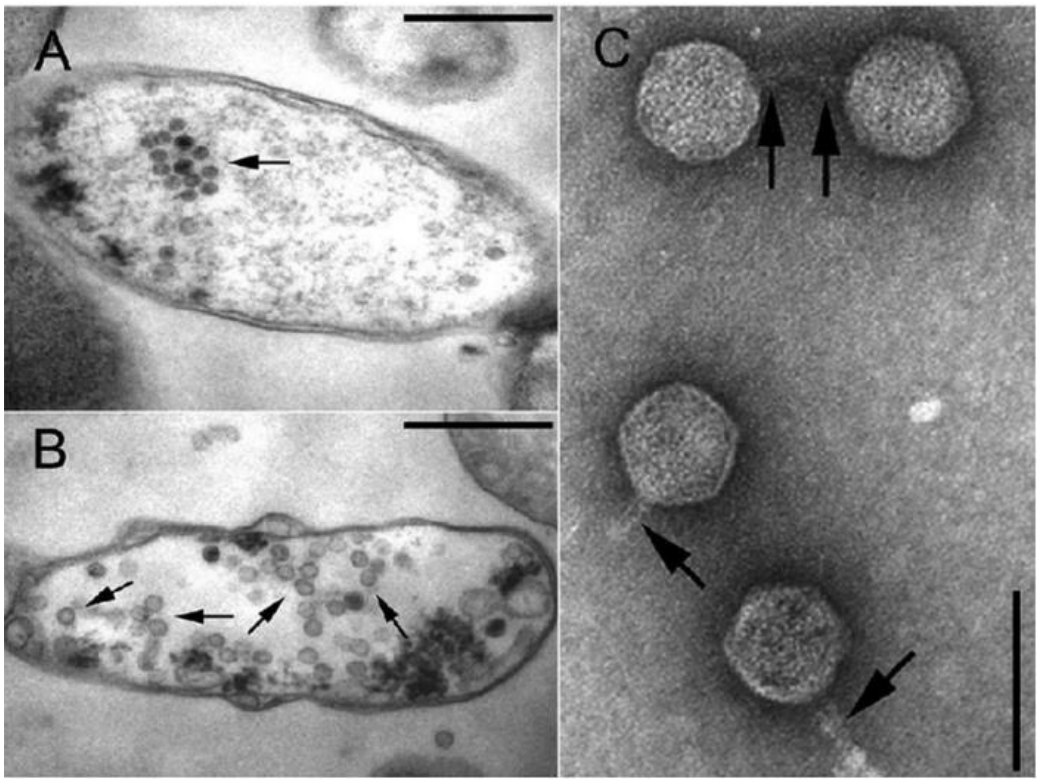

Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la inducción del fago Stx2. (A, B) Secciones ultrafinas de dos células bacterianas con partículas de virión en maduración dentro del citoplasma indicadas por flechas. (C) TEM de partículas de fago, se muestran colas cortas (flechas) y una cabeza hexagonal (Navarro, 2014).

El gen *stx2e* codifica la toxina Shiga 2e, la cual es una de las toxinas producidas por *Escherichia coli* patógenas, específicamente aquellas que pertenecen a las cepas STEC (Hostetter *et al*., 2014). La toxina Shiga 2e está implicada en la patogénesis de la enfermedad de edemas (EE) en porcinos, donde la toxina es responsable de causar daño endotelial provocando su muerte y un proceso degenerativo del mismo, generando posteriormente la extravasación de los fluidos sanguíneos hacia los tejidos, lo que lleva a la formación del signo clínico característico de la EE, causando edemas en tejidos como el estómago, los tejidos subcutáneos y el encéfalo, pudiendo causar desórdenes neurológicos en los animales infectados (Garcia, 2013; Sperling et al, 2021).

La Shiga toxina 2e (Stx2e) como otras toxinas Shiga, consta de dos subunidades: la subunidad A y la subunidad B (Fraser *et al.*, 2004). La subunidad A posee actividad enzimática, específicamente una actividad N-glucosidasa que altera la función de los ribosomas de las células, inhibiendo la síntesis proteica causando la muerte; la subunidad B se encarga de la unión de la toxina a los receptores celulares endoteliales, preferentemente a un receptor especifico conocido como globotetraosilceramida (Gb4), el cual la interacción con el receptor facilita la entrada de la subunidad A en el interior celular desencadenado sus efectos tóxicos que en cerdos se relacionan con la enfermedad de los edemas (Melton 2014, Casanova *et al.*, 2018).

2.2.4 DETECCIÓN DE LA *Escherichia coli* PRODUCTORA DE LA SHIGA TOXINA stx2e EN CERDOS

La cepa Stx2e-STEC posee dos factores principales de virulencia: la toxina Stx2e y la fimbria F18, que son codificadas por los genes *stx2e* y *fedA* respectivamente, estos están asociados con la enfermedad del edema en porcinos, aunque también se han reportado la detección de cepas que codifican solamente el gen *stx2e*, independientemente de la presencia del gen *fedA* (Zang, 2014; Berger *et al.*, 2023). Estos afectan frecuentemente a los lechones destetados debido a los cambios fisiológicos, ya que después del destete comienzan a aparecer y aumentar la expresión de los receptores F18 facilitando su adhesión para establecer la infección y aumentar la expresión de la toxina Stx2e (Casey y Bosworth, 2009). La enfermedad también suele ser exacerbada por

factores de manejo como cambios en la dieta, estrés por el destete o por la alta densidad animal, facilitando la proliferación de Stx2e-STEC en el tracto intestinal (Casanovas, 2015; Sperling, 2021).

La detección de Stx2e-STEC en cerdos es fundamental debido a su relación con la enfermedad de lo edemas, una patología altamente perjudicial para la industria porcina, una detección rápida de Stx2e puede mitigar las pérdidas económicas derivadas de la enfermedad e implementar medidas de control en granjas, evitando la diseminación del patógeno a otros animales (Berger *et al.*, 2021).

A nivel global, se sabe que la prueba *Gold estándar* para la detección de la Stx2e-STEC es mediante la prueba molecular PCR convencional o en tiempo real, ya que se considera como el método más confiable para identificar los genes específicos de virulencia (como los genes *stx2e* y *fedA*), debido a que garantiza una alta sensibilidad y especificad (Báez, 2009; Báez 2013; Skinner *et al.*, 2015; Fairbrother, 2023). Cabe mencionar que para la detección mediante la prueba molecular PCR, primero se debe realizar el aislamiento bacteriano mediante un cultivo selectivo y diferencial, como agar MacConkey y el caldo Luria-Bertani (caldo LB) respectivamente, el cultivo permite el aislamiento de las cepas viables de STEC, lo cual es esencial para estudios como la tipificación y caracterización genética (Rivera *et al.*, 2006).

En diversas investigaciones indican que las técnicas como cultivo y aislamiento bacteriano; y PCR son los métodos más adecuados para el monitoreo y la identificación de las cepas patogénicas en cerdos (Casey y Bosworth, 2009).

Un estudio realizado en Alemania con el objetivo de determinar la prevalencia de EE en lechones destetados, todas las muestras se analizaron mediante cultivo bacteriano combinado con una PCR múltiple para la presencia de los genes *stx2e* y *fedA*, teniendo como resultados la detección de ambos genes (*stx2e* y *fedA*) de manera simultánea y también muestras solamente positivas para la toxina Stx2e, independientemente de la adhesina fimbrial F18 (Berger *et al.*, 2023).

En Italia se realizó un estudio para determinar la prevalencia de Stxe2e-STEC a partir de aislamientos de cerdos sanos y cerdos con colibacilosis, en el cual tanto para los

cerdos sanos y con signos clínicos se analizaron mediante la prueba molecular PCR multiplex en tiempo real para la detección de 5 adhesinas (k88, k99, f41, 987p y F18) y 4 toxinas diferentes (LT, STaP, STb y Stx2e), teniendo como resultados que la Stx2e-STEC se asocia con mayor frecuencia con las formas clínicas, con una probabilidad mínima de aislarla en cerdos sanos, y la adhesina F18 fue el factor fimbrial más común en los aislamientos (Baldo *et al.*, 2020).

En china en dos estudios, uno con el objetivo de determinar la prevalencia y características del STEC en cerdos sanos y el otro estudio busco analizar la prevalencia y las características genéticas de la Stx2e-STEC de humanos, animales y carnes, en ambos estudios las muestras fueron aisladas y cultivadas previo análisis de PCR, teniendo como resultados el hallazgo de la cepa Stx2e-STEC en ambos estudios, lo que indico que los cerdos son un reservorio importante de cepas STEC, además de mostrar resistencia bacteriana a múltiples fármacos (Meng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2021). También se ha reportado la presencia del gen *stx2e* y *fedA* mediante cultivo y aislamiento para *E. coli* y PCR, en muestras aisladas de lechones que sufrían diarrea posdestete (PWD), indicando la presencia de cepas hibridas potencialmente virulentas para EPEC (Li *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019).

En argentina se han realizado estudios sobre la detección de Stx2e-STEC en cerdos, tanto en casos de diarrea posdestete (PWD) como en enfermedad del edema (EE) y en cerdos sanos sin manifestación clínica; la técnica utilizada para el análisis de las muestras fue el ERIC-PCR una técnica utilizada para la genotipificación útil para el estudio de STEC-ETEC, teniendo como resultados la detección de genes asociados a factores de virulencia como Stx2e y la adhesinas F18, de aislamientos provenientes de cerdos con PWD y EE; además se evidencio la presencia de STEC en cerdos asintomáticos (Moredo, 2012; Moredo *et al.*, 2012).

En Brasil se investigó la presencia de genes relacionados con fimbrias (K99, K88, 987P, F41 y F18) y toxinas (Stb, StaP, LT y Stx2e) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones con diarrea, para ello se utilizó la técnica de PCR multiplex, empleando cebadores específicos diseñados para identificar estos genes de virulencia de manera simultánea, donde las cepas de *E.coli* presentaron factores de virulencia tanto como

adhesinas F18 y toxinas Stx2e, detectadas solas o asociadas a otros factores (Macêdo *et al.*, 2007).

Actualmente no hay suficientes estudios específicos sobre la detección de *E. coli* productora de toxina Shiga 2e (Stx2e) en cerdos en Perú. Sin embargo, el estudio más reciente en Lima-Perú, tuvo como objetivo evaluar la presencia de genes *stx2e* y *fedA* en *E. coli* a partir de aislados de cerdos sanos de granjas tecnificadas en la región de Lima, utilizando los métodos de cultivo específicos, extracción de ADN y PCR convencional para la detección de cada gen, dando resultados que en ninguno de los aislados de *E. coli* en cerdos sanos pudo detectarse los genes *stx2e* y *fedA* (Flores, 2023; Flores *et al.*, 2024).

2.3ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS EN CERDOS

La enfermedad del edema (EE) es una enterotoxemia aguda y mortal, que afecta principalmente a los cerdos destetados, esta patología se caracteriza principalmente por la presentación de edema en muchas partes del cuerpo, como en cabeza, cuello, colon, estomago, intestino, cerebro (Fairbrother, 2023). La causa más frecuente de la muerte es un infarto cerebral, que suele presentarse tras los signos neurológicos como la inclinación de la cabeza, nistagmo, incoordinación y convulsiones, debido al daño producido por el edema cerebral (Hu *et al*., 2020; McVey *et al*, 2022).

La EE en cerdos suele progresar rápidamente, a las 12 horas de haber iniciado los signos, el animal puede estar decúbito lateral, con dificultad respiratoria e inconciencia, culminando con frecuencia en la muerte, lo que genera importantes pérdidas económicas en las granjas afectadas (Sperling et al, 2021). En los casos en que los animales logran recuperarse, pueden quedar con secuelas neurológicas permanentes, como ataxia leve o inclinación de la cabeza. (Jackson y Cockcroft, 2009; Lazo *et al*., 2009).

El agente patógeno responsable de esta patología es provocado por la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga tipo 2e (Stx2e-STEC) (Moser *et al.*, 2021). Estas bacterias colonizan el tracto intestinal de los lechones debido a sus factores de virulencia, en la cual sus adhesinas como la expresión fimbrial F18ab principalmente, facilita la colonización y la adhesión de *E. coli* para que permanezca y libere las toxinas Shiga tipo2e (Stx2e)

(Han *et al.*, 2007; Won y Lee, 2016). La toxina Stx2e es el factor de virulencia principal, debido a que es el causante del desarrollo de la enfermedad del edema, esta toxina se absorbe desde intestino hasta el torrente sanguíneo provocando daño al endotelio vascular, generando una angiopatía degenerativa, la extravasación de líquidos y provocando la acumulación de edemas en los tejidos (Baldo *et al.*, 2020; Fairbrother, 2023).

La transmisión ocurre principalmente por vía fecal-oral, aunque también el estrés al destete, el cambio del ambiente, la adaptación a la nueva dieta y la alta densidad animal, son considerados como factores de riesgo que pueden llegar a inmunosuprimir a los lechones con la consecuencia de facilitar la proliferación de la toxina Stx2e en el intestino (Zimmerman *et al.*, 2019). Las tasas de morbilidad y mortalidad pueden ser elevadas en brotes graves, llegando a 30-40% y hasta 90% (FAO, 2010; Fairbrother, 2023).

La EE es considerada como una patología de distribución mundial que afecta principalmente a cerdos en sistemas de producción intensiva (Zimmerman *et al.*, 2019). Ha sido reportada en países como Alemania, Italia, China, Argentina y Brasil, entre otros donde la prevalencia y efectos económicos varían según la región afectada (Berger *et al.*, 2023; Baldo *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021; Moredo *et al.*, 2012; Macêdo *et al.*, 2007). En Perú, aunque el impacto potencial de la EE es reconocido, su epidemiología aún está en proceso de estudio, lo que indica la necesidad de investigaciones locales para abordar la enfermedad (Flores *et al.*, 2024).

2.3.1 PATOGENESIS

La infección empieza con la ingestión de Stx2e-STEC, esta ingresa por el tracto digestivo hacia el intestino, en el cual *E. coli* coloniza y prolifera en el intestino (Moxley, 2000).

Los enterocitos contienen receptores específicos ECF18R para la unión con la adhesina fimbrial F18, esta se encarga de la adherencia al epitelio intestinal permitiendo la colonización bacteriana y potenciando la expresión de la toxina Stx2e, la colonización

se desarrolla durante 3 a 6 días en las puntas y en los lados de las vellosidades intestinales (Zimmerman *et al.*, 2019; Zhitnitskiy, 2021).

La Stx2e producido en el intestino se absorbe en el torrente sanguíneo y se disemina sistémicamente, uniéndose principalmente a las superficies de los eritrocitos, que son ricos en Gb4. Los eritrocitos entregan la toxina a las células endoteliales, que también expresan el receptor Gb4 (Lo et al., 2014; Casanova *et al.*, 2018).

La Stx2e ingresa a las células endoteliales como se describió anteriormente e inactivan los ribosomas, bloqueando la síntesis de proteína y causando la muerte celular desencadenando una angiopatía degenerativa, generando posteriormente la extravasación de fluidos sanguíneos hacia los tejidos y trombosis en algunos casos, causando edemas en tejidos como el estómago, los tejidos subcutáneos y el encéfalo, pudiendo causar signos neurológicos en los animales infectados (Zimmerman *et al.*, 2019, Fairbrother, 2023) **(Figura 6).**

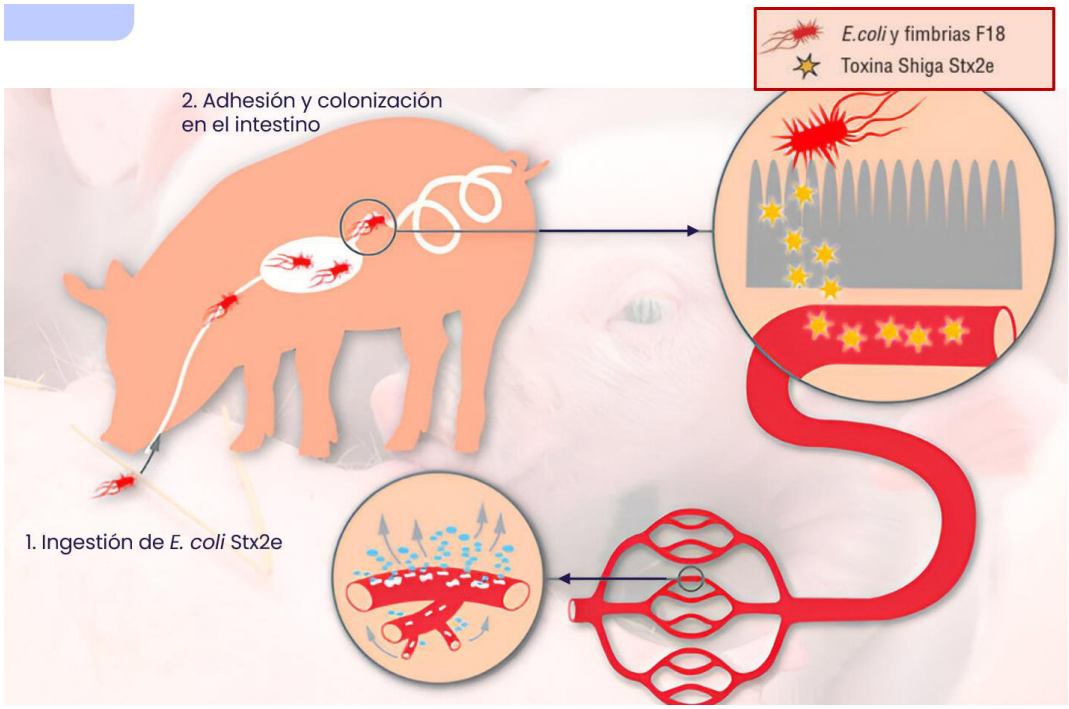

Figura 6. Patogénesis de Stx2e-STEC (CEVA, 2020)

2.3.2 SIGNOS CLÍNICOS

La EE puede presentarse de manera esporádica o afectar a múltiples animales en la granja. Las manifestaciones clínicas varían entre muerte hiperaguda sin signos previos, edema en tejidos subcutáneos debido al daño vascular, síntomas neurológicos y alteraciones sistémicas (Zimmerman *et al.*, 2019; Quyen, 2023).

En casos subclínicos, los lechones destetados parecen normales, pero desarrollan alteraciones en los vasos sanguíneos y muestran un menor crecimiento, lo que puede impactar negativamente la producción en granjas (Fairbrother, 2023).

Las manifestaciones clínicas inician a consecuencia del daño vascular, la muerte de las células endoteliales y la angiopatía degenerativa, con lleva a una extravasación de fluidos de los vasos hacia los tejidos circundantes (CEVA, 2024). Generando signos como:

- **Edema:** Hinchazón evidente en parpados, en el área nasal y frontal, en la región submandibular y gástrica, en casos graves llega afectar el encéfalo desencadenado alteraciones neurológicas (**Figura 6, Figura 7 y Figura 8)**.
- **Síntomas neurológicos:** Ataxia, temblores, decúbito lateral, inestabilidad al caminar, parálisis y convulsiones.
- **Dificultad respiratoria:** Respiración forzada y jadeo.
- **Alteraciones sistémicas:** Anorexia, inapetencia, letargo, retraso en el crecimiento.
- **Muerte súbita:** En casos hiperagudos, en el cual los cerdos pueden morir sin presentar signos clínicos.



Figura 7. Hinchazón edematosa de los párpados en un cerdo con enfermedad del edema (Zimmerman, 2019)

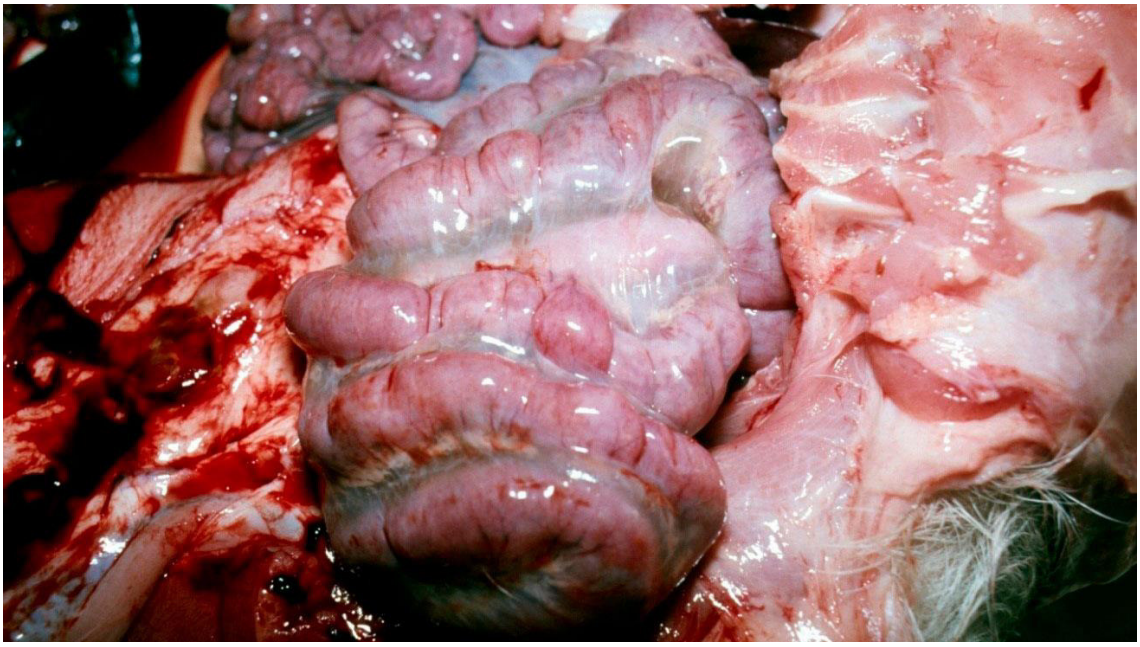

Figura 8. Edema del mesenterio del colon espiral (White, 2017)

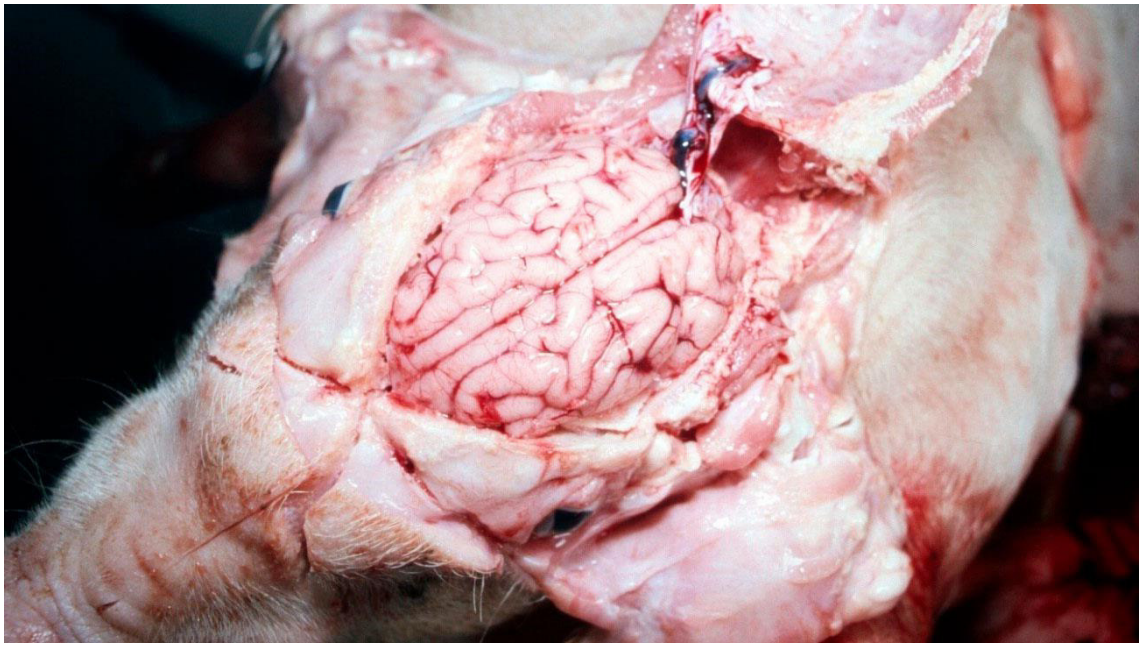

Figura 9. Cerebro con apariencia húmeda debido al edema cerebral, característico de la enfermedad del edema en cerdos. (White, 2017)

2.3.3 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la enfermedad de los edemas (EE) se realiza mediante una combinación pruebas, iniciando desde la historia clínica y el examen físico, con la observación de signos clínicos característicos de la enfermedad, como la presentación de edemas en los parpados o cara y alteraciones neurológicas, en caso de muerte súbita, se realiza un examen post mortem con hallazgos en la necropsia como edema subcutáneo facial, en la submucosa gástrica o mesocolon y cerebro (Fairbrother, 2023).

Para llegar a un diagnóstico definitivo, se requiere primero análisis microbiológicos como el aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* a partir de muestras biológicas como hisopados rectales, muestras de heces frescas o muestras intestinales recolectadas en la necropsia, en medios de cultivo selectivos y diferenciales como en Agar MacConkey y caldo Luria-Bertani (caldo LB) (Zimmerman *et al.*, 2019).

La prueba molecular PCR es considerada como test Gold estándar para la confirmación de *Escherichia coli* productora de Stx2e (Stx2e-STEC), en el cual se utilizan cebadores específicos para detectar el gen *stx2e* que codifica a la toxina Shiga 2e

y los genes asociados a la adherencia como *fedA* que codifica la adhesina fimbrial F18 (Báez 2013; Skinner *et al.*, 2015; Fairbrother, 2023). La PCR se puede realizar como un ensayo multiplex (permitiendo detectar varios genes a la vez) o convencional (Baldo *et al.*, 2020; Flores *et al.*, 2024). El seguimiento adecuado de estos métodos de manera combinada permite establecer un diagnóstico confiable de la enfermedad del edema (EE) (Berger *et al.*, 2023; CEVA, 2024).

2.3.4 TRATAMIENTO

El uso de antibióticos en infecciones por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga 2e puede ser ineficaz en casos hiperagudos o graves, debido a que la destrucción de las bacterias por el uso de antibióticos puede inducir a la lisis del fago stx que porta el gen *stx2e*, lo que resulta en la liberación y proliferación de más toxinas, agravando la enfermedad del edema (EE) en lugar de controlarla (Yang *et al.*, 2021).

En la EE, los antibióticos suelen considerarse parte del tratamiento debido a su capacidad de reducir la proliferación bacteriana, pero como se menciona anteriormente, su uso no es recomendado fases avanzadas debido al riesgo de estimular la liberación de las toxinas por lisis bacterianas, aunque se reporta que uso en etapas iniciales o de manera profiláctica, podría ser beneficioso (Fairbrother, 2023).

2.3.5 CONTROL Y PREVENCIÓN

La implementación de estrategias de control y prevención contra la enfermedad del edema (EE) reduce la dependencia de tratamientos farmacológicos (Gotter, 2014).

Las estrategias de manejo nutricional pueden minimizar la aparición de la EE, en la cual se recomienda dietas bajas en proteínas fermentables, ricas en fibra, además de la inclusión de aditivos como prebióticos y probióticos puede mejorar la salud intestinal reduciendo la adherencia bacteriana; y un control adecuado de la introducción de nuevos alimentos tras el destete como alimentos de fácil digestión, evitando cambios bruscos en la dieta tras el destete (Fairbrother, 2023). Otros aditivos como aceite esenciales ácidos orgánicos y zinc también son usados de manera preventiva, aunque el uso de óxido de

zinc (ZnO) en las dietas de los cerdos puede ser contraproducente para el medio ambiente, aunque es eficaz inhibiendo la actividad citotóxica, su impacto ambiental ha generado preocupaciones importantes, por lo cual su uso está prohibido en los países conformados por la Unión Europea (Ekhlas *et al*., 2021).

La bioseguridad y manejo sanitario en la granja es de gran importancia para la prevención y reducción de patógenos, por lo cual se recomienda tener una higiene y desinfección adecuada en las instalaciones, un manejo separado de animales jóvenes y adultos y tener un adecuado control del agua y alimentos libres de contaminantes (Zhitnitskiy, 2021).

En la actualidad, las estrategias de vacunación para prevenir la EE incluyen 3 enfoques principales como la inmunización pasiva en lechones mediante vacunación de cerdas y primerizas, con el objetivo reducir significativamente la incidencia de signos clínicos y mortalidad temprana, protegiéndolos hasta los 21 días; el uso de vacunas vivas bivalentes administradas oralmente o en agua de bebida, con el propósito de inducir inmunidad especifica contra la *Escherichia coli* patógena F4 y F18 positivas; por último el uso de vacunas inyectables con Stx2e recombinante, se aplican en cerdos jóvenes para prevenir los signos clínicos y reducir la mortalidad asociada a la EE (Fairbrother, 2023).

2.4 PORCICULTURA EN EL PERÚ

La producción porcina en Perú ha mostrado un crecimiento en su desarrollo en los últimos años, impulsado por la mayor demanda interna de carne de cerdo, que es una de las principales fuentes de proteína animal en el país, representando el tercer tipo de carne más consumido después del pollo y ganado vacuno (MIDAGRI, 2020; Salas, 2023).

El consumo de carne de cerdo ha ido aumentando en los últimos años, consolidándose como una actividad clave dentro del sector pecuario; en el 2023 el consumo per cápita alcanzó los 10.5kg/hab/año, mostrando un incremento de 1.9% respecto al 2022 (9.7 kg/hab/año); con respecto a la producción anual porcina alcanzó las 249,472 toneladas, representando un incremento del 3% respecto al año anterior; según los últimos registros hasta Nov 2024 se alcanzó 252,077 toneladas, superando al registro

anual del 2023 (SIEA, 2024, 2025). El país cuenta con alrededor de 3.4 millones de cerdos, concentrados principalmente en regiones como Lima (46.53%), La Libertad (10.49%), Ica (7.19%) y Arequipa (6.11%), estas cuatro regiones representan el 64.21% de la producción de carne de cerdo en el año 2023 (Salas, 2025).

Según datos de las Asociación Peruana de Porcicultores (APP), se estima una cantidad de 600 mil productores distribuidos en tres sistemas de producción, la producción tecnificada o intensiva (75% de la producción anual) este sistema se concentra en granjas grandes y tecnificadas que abastecen la mayor parte del mercado, la producción semi-itensivo (5% de la producción anual) combina técnicas modernas con prácticas tradicionales, es común en pequeños y medianos productores, y la producción de traspatio o autoconsumo (20% de la producción anual) predomina en zonas rurales donde los cerdos son criados de manera extensiva, este sistema es clave para la subsistencia de muchas familias rurales. Según la guía de buenas prácticas pecuarias elaborado por el SENASA (2020) los cerdos de engorde son criados hasta alcanzar un peso de 50-70 kg de peso vivo en un plazo de 6 meses, el lechón suele ser destetado a los 21 días, esta parte en el manejo es crucial ya que es la etapa más complicada en la vida del lechón, debido que el destete junto con el cambio de ambiente, la adaptación a una nueva dieta y la alta densidad animal, son factores de estrés que pueden causar inmunosupresión en los lechones, favoreciendo la susceptibilidad de enfermedades, como la proliferación de STEC y la liberación de la toxina Stx2e en el tracto gastrointestinal (Zimmerman *et al.*, 2019).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) ubicada en la Av. Circunvalación 2800, Lima – Perú.

3.2DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1 MUESTRAS

Las muestras utilizadas en el presente estudio de tipo descriptivo, provienen del banco del Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la FMV-UNMSM; son 119 cepas de *E.coli* aisladas y preservadas en congelación de hisopados rectales de porcinos entre 0 a 50 días de edad con diarrea con procedencia de granjas de producción porcina localizadas en las regiones como: 9 distritos de Lima (109 muestras), la ciudad de Ica (7 muestras) y el distrito de Tarapoto de San Martin (3 muestras) **(Anexo 1).** Los cuales fueron obtenidos a partir de un muestreo durante el año 2019 para un estudio preliminar; se tomaron la totalidad de las cepas **(Anexo 2)**.

3.2.2 CONTROLES

Se emplearon dos controles positivos identificados como P5A y P2A para la verificación de resultados positivos en los genes *stx2e* y *fedA*, respectivamente, obtenido

de casos de campo positivos al PCR. Estos controles aislados de *Escherichia coli* se mantuvieron previamente conservados en congelación (-20°C) en la Sección de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Por otro lado, como control negativo se utilizó la cepa estándar ATCC 25922 de *Escherichia coli*, es una cepa no patógena que se utiliza para control de calidad (Thermo Scientific Quanti-Cult Escherichia coli ATCC 25922).

3.2.3 MATERIALES PARA REACTIVACIÓN DE CEPAS Y CULTIVO

- Congeladora (-20°C)
- Aislados de *E. Coli*
- Placas Petri
- Agar triptona de soya (TSA)
- Agar Mac Conkey
- Ansa de bacteriología
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas descartables de tela
- Estufa (Precision Thelco)
- Mechero
- Micropipetas (10 µl, 100 µl y 1000 µl)
- Mechero
- Vórtex (IsoLab)
- Cabina de flujo laminar
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
- Glicerol 50%

3.2.4 MATERIALES PARA ENRIQUECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE ADN

- Caldo Luria-Bertani
- Viales esteriles
- Tubos de microcentrífuga

- Cabina de flujo laminar
- Viales enriquecidos con material biológico
- Micropipetas (10 µl, 100 µl y 1000 µl)
- Microcentrifuga (Thermo Scientific)
- Termomezclador
- Vortex
- Kit de purificación de ADN (GeneJET^{TM} Genomic DNA purification, Thermo Scientific)
- Spectrophotometer/Fluorometer DeNovix DS-11 FX

3.2.5 MATERIRALES PARA PCR

- DreamTaq Buffer (MgCl2 incluido)
- Nucleótidos (dNTPs)
- DreamTaq DNA polymerase
- Cebadores o primers (*stx2e y fedA*)
- Agua ultrapura
- ADN extraído de los aislados de *E. coli*
- Controles positivos (cepa P5A y cepa P2A)
- Control negativo (cepa ATCC 25922)
- Tips libres de ADN/ARN (10 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Viales estériles (200 µl, 500 µl y 1500 µl)
- Alcohol
- Gradillas
- Rack congelado
- Mascarillas descartables y Guantes de nitrilo
- Cabina de flujo laminar (DNA/RNA UV Cleaner BoxBiosan)
- Congeladora (-20°C)
- Refrigeradora (4°C)
- Micropipetas (10 µl, 100 µl y 1000 µl)
- Vórtex (IsoLab)

- Termociclador (Biometra Tone - Analytik Jena)

3.2.6 MATERIALES PARA ELECTROFORESIS

- Productos obtenidos de la PCR
- Solución tampón (Buffer TBE)
- Agarosa en polvo (Agarose, Type I)
- Marcador de peso molecular (100bp)
- Blue/Orange 6X Loading Dye
- Diamont™ Nucleic Acid Dye
- Safe-Green™
- Tips libres de ADN/ARN (10 µl)
- Cinta Parafilm
- Contenedor rojo de reciclaje para residuos
- Mascarillas descartables
- Guantes de nitrilo

3.3DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1 PRESERVACIÓN EN CONGELACIÓN DE CEPAS

Las muestras almacenadas en el cepario del banco del Laboratorio de Microbiología previamente fueron preservadas mediante la técnica de conservación de bacterias en glicerol al 50% y caldo de cultivo BHI, siguiendo el protocolo Escamilla (2022) de la UAEH. Se procede a inocular las muestras de *E. coli* aisladas en caldo BHI y se deja incubar a 37°C en la estufa por 12h, pasado las horas de incubación se procede a centrifugar a 10,000 rpm por 5min, se desecha el sobrenadante de cada vial y se adiciona 500 µL del caldo de cultivo (BHI), luego se adiciona 500 µL de glicerol al 50%, para tener una concentración final del 25%, para finalizar se homogeniza, se rotula los viales y se congela de inmediato en la congeladora a -20°C.

3.3.2 REACTIVACIÓN DE CEPAS Y CULTIVO

Para reactivar las 119 muestras congeladas de *Escherichia coli*, se procedió a utilizar el protocolo del manual de bacteriología y micología de la FMV-UNMSM (2018), empezamos a retirar el vial del congelador (almacenado a -20°C), colocándolo a temperatura ambiente, una vez descongelado se homogenizo el contenido del vial para obtener una distribución uniforme de las bacterias.

Con un asa bacteriológica estéril se tomó una pequeña cantidad del contenido del vial descongelado, inoculándolo sobre la superficie del agar TSA (Tryptic Soy Agar) mediante la técnica de estría por agotamiento, las placas se incubaron a 37°C durante 24h para favorecer el crecimiento. A partir de las colonias aisladas en el agar TSA, se realizó una resiembra en una placa de agar MacConkey para confirmar la presencia de *E. coli*, se incubo a 37°C por 24h, las colonias de *E. coli* aparecen de color rosaceo debido a la fermentación de la lactosa.

El agar TSA es un medio de cultivo de uso general, no selectivo para aislar y cultivar microorganismos. El agar MacConkey es un medio de cultivo que se utiliza para aislar y diferenciar enterobacterias como *E. coli* un gram negativo fermentador de lactosa.

3.3.1 ENRIQUECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE ADN

Transcurrido el tiempo de cultivo en el agar MacConkey se procede con el enriquecimiento de *E. coli* con el caldo Luria-Bertani (caldo LB), con un asa bacteriológica se tomó un par de colonias aisladas y se inoculo en viales de 2ml con 1.5ml de caldo LB, incubándose a 37°C durante 24h. Estos viales enriquecidos son usados para la extracción de ADN, el cual se realizó con el kit comercial de purificación de ADN: "GeneJET™ Genomic DNA Purification, de la empresa Thermo Scientific", siguiendo las instrucciones indicadas en el **Anexo 3**.

El caldo LB es un medio de cultivo rico en nutrientes que se utiliza principalmente para el crecimiento de bacterias, como cepas de *E. coli*.

El kit GeneJET^{TM} Genomic DNA purification permite la extracción de ADN genómico de alta calidad de bacterias, su principio se basa en la lisis celular (Proteinasa K), eliminación de proteínas e impurezas (ARNasa, Buffer de lisis y Etanol) y posterior purificación mediante el método de columnas de membrana de sílice y lavados con Buffer de lavado I y II, al finalizar se centrifuga el producto, se desecha el tubo de recolección y se transfiere la columna a un tubo estéril de 1.5ml y se añade 200 µL de Buffer de elución, se centrifuga a 8000 x g por 1 min; una vez finalizado se desecha la columna de purificación y se almacena en una congeladora a -20°C.

La concentración final de ADN obtenido con el kit GeneJET^{TM} Genomic DNA purification fue entre 18-28 ng/µL, medido por el Spectrophotometer/Fluorometer DeNovix DS-11 FX.

3.3.2 DETECCIÓN DE LOS GENES *stx2e* Y *fedA* MEDIANTE PCR

El ADN extraído de las muestras de *E. coli* se utilizará para la amplificación de los genes *stx$_{2e}$* y *fedA*. La detección de los genes *stx2e* y *fedA* se llevó a cabo utilizando la prueba molecular PCR convencional, realizándose análisis independientes para cada gen a partir del ADN extraído previamente. Para el proceso se utilizaron primers específicos sintetizados por Macrogen para cada uno de los genes mencionados, cuyas secuencias están indicadas en el **Cuadro 1.**

El protocolo establecido para la amplificación de ADN mediante PCR fue estandarizado mediante temperatura de hibridación en gradiente (55°C – 57°C – 59°C) en el termociclador en base al protocolo diseñado por Casey y Bosworth (2009) en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, teniendo como temperatura optima 55°C de hibridación.

Cuadro 1. Secuencia de ADN de *primers* para los genes *Stx2e* y *fedA*

Primer		Secuencia 5'→3'	Producto	Referencia
stx2e **(stx2e)**	**forward**	AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT	733 pb	Casey y Boswort, (2009)
	reverse	TCT GAC ATT CTG GTT GAC GC		
fedA **(F18)**	**forward**	TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA	313 pb	
	reverse	ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG		

El protocolo para ambos genes (*stx2e* y *fedA*) se estandarizo con 20µl de volumen final, en el cual 19µl era el preparado Master Mix (componentes de la marca ThermoScientific) y 1µl de ADN (**Cuadro 2)**.

Cuadro 2. Componentes del PCR para el gen *stx2e* y *fedA* – ThermoScientific: DreamTaq™

Componentes	Cantidad	Concentraciones
Buffer + Cloruro de Magnesio	2 µL	Buffer 1X + $MgCl_2$ 5mmol
Deoxinucleótido trifosfato (DNTP)	0.4 µL	0.2 mmol
Taq polimerasa	0.2 µL	2.5 U
Primer *stx2e* o *fedA*	0.3 µL	0.5 µmol
Agua ultrapura	16.1 µL	--
ADN (Muestra bacteriana)	1 µL	18-28 ng/µL
Volumen final (Master Mix + AND)	20 µL	--

Las condiciones del ciclo de termociclador para cada gen, empezó con la desnaturalización a una temperatura de 95°C por 15 minutos, continuando el proceso por 35 ciclos, empezando cada ciclo con la desnaturalización a 95°C por 1 minuto, la alineación a 55°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 1 minuto; al finalizar los ciclos este terminara con la extensión final a 72°C durante 10 minutos.

3.3.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Una vez finalizado el proceso de amplificación se tomó 5 µL del volumen final (20µL) de cada muestra, la cual será utilizada para la elaboración de la electroforesis y la lectura del PCR.

Para la elaboración de la electroforesis, se procedió primero con la elaboración del gel de agarosa al 1.5%, preparado en 50ml de buffer TBE 0.5X para 15 muestras y 75ml TBE 0.5X para 36 muestras.

Los amplicones obtenidos por PCR (para ambos genes) fueron procesados junto al buffer de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega) usando 1µL del producto por cada 5µL del producto amplificado y finalmente colocados en el gel de agarosa con el ADN marcador de 100pb (Promega) para corroborar el peso molecular de los pares de bases. La muestra son procesadas mediante la electroforesis a 90V, 90 minutos y 90A en un Nano PAC – 300p. Una vez finalizado el proceso, el gel fue puesto en reposo oscilante por 20 minutos con un colorante fluorescente Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) en una dilución de 1:10,000 en TBE para teñir y visualizar la lectura del PCR en el Safe VIEW – $MINI_2$ (transiluminador de luz azul).

IV. RESULTADOS

4.1DETECCIÓN DE LOS GENES *stx2e* Y *fedA* – PCR

De las 119 muestras analizadas de *E. coli* de cerdos con diarrea, mediante PCR convencional y electroforesis **(Figura 10)**, se identificaron 6 muestras positivas para el gen *stx2e*. De estas, 3 presentaron simultáneamente los genes *stx2e* y *fedA*, todas procedentes del distrito de Tarapoto (San Martín). Las otras 3 fueron positivas únicamente para *stx2e*, provenientes de Huaral (2) y Pachacamac (1) de la región de Lima, sin la presencia del gen asociado a la adhesina fimbrial F18. Además, se detectaron tres muestras positivas para el gen *fedA* de manera independiente, sin asociación con el gen *stx2e* **(Anexo 4).**

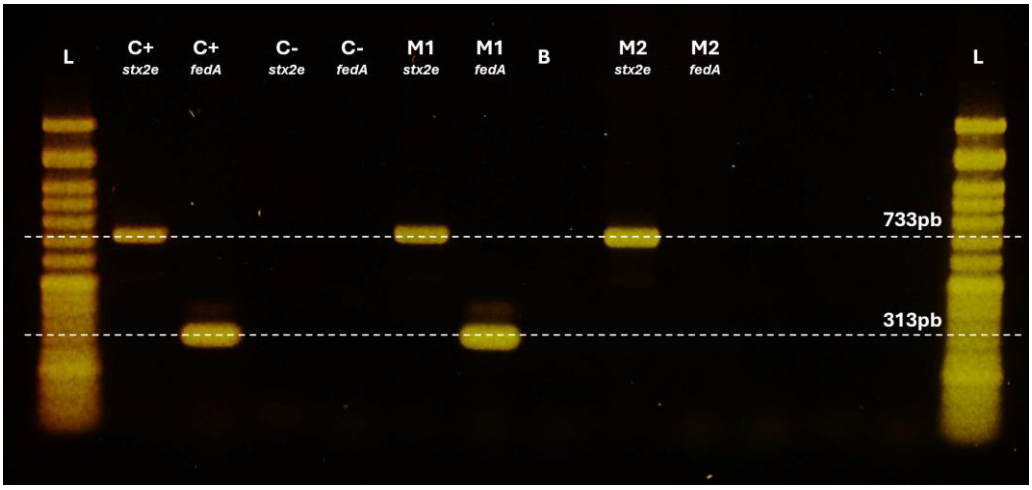

Figura 10. Amplificación del gen *stx2e* y *fedA,* control positivo (P5A – P2A) y negativo (ATCC 25922): **L:** Marcador de 100pb; **C+*stx2e*:** Control positivo P5A; **C+*fedA*:** Control positivo P2A; **C-*stx2e* y *fedA*:** Control negativo ATCC 25922; **M1:** muestra positiva a *stx2e* y *fedA* (EC-167k); **B:** Control blanco; **M2:** muestra positiva a *stx2e* y negativa a *fedA* (EC-242).

4.2FRECUENCIA DE LOS GENES *stx2e* Y *fedA*

Se analizaron un total de 119 muestras de cerdos con diarrea mediante PCR convencional, para determinar la presencia de los genes *stx2e* y *fedA*. Mediante la prueba de proporciones se puedo evaluar la frecuencia de los genes evaluados en el estudio. Los resultados obtenidos se distribuyen de la siguiente manera (**Figura 10**):

- **Positivos para Stx2e**: Se identificaron 6 muestras positivas, representando el 5.04% del total analizado.
- **Positivos para F18**: Se encontraron 6 muestras positivas, lo que equivale al 5.04% del total.

Dentro de las muestras positivas a Stx2e (**Figura 11**):

- **Positivas también a F18 (STEC típicos)**: 3 muestras, lo que representa el 2.52% del total analizado y el 50% de las muestras positivas a Stx2e. Este porcentaje coincide con los STEC típicos, definidos por la presencia simultánea de ambos genes (Stx2e y F18). Comparativamente, el valor estimado hipotético para los STEC típicos era del 2%, y los resultados obtenidos están ligeramente por encima de esta estimación (Moredo *et al*., 2012).
- **Negativas para F18 (STEC atípicos)**: 3 muestras, lo que representa el 50% de las muestras positivas a Stx2e. Estas corresponden a cepas en las que se detecta el gen Stx2e, pero no el gen F18, lo que sugiere la posible presencia de otras adhesinas diferentes a F18.

Adicionalmente:

- **Positivas solo para F18**: Se detectaron 3 muestras positivas, pero negativas para Stx2e. Estas muestras no cumplen con la definición de STEC, pero indican la posible existencia de cepas que portan adhesinas sin el gen productor de toxina Shiga.

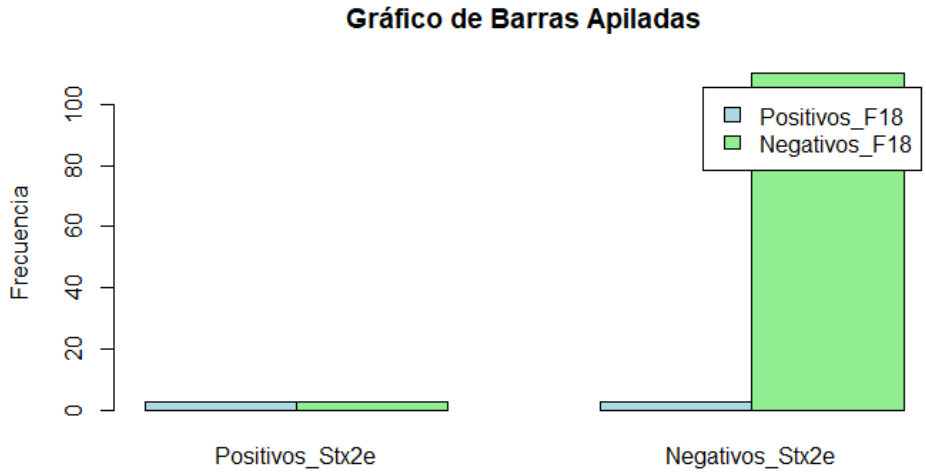

Figura 11. Gráfico de barras apiladas de las frecuencias absolutas de la toxina Stx2e y la fimbria F18

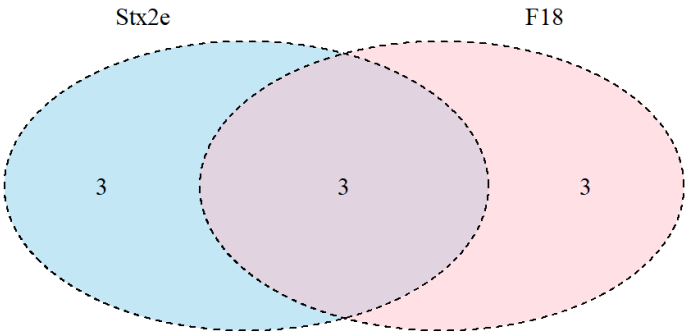

Figura 12. Diagrama de Venn representando la distribución de muestras positivas

4.3 ASOCIACIÓN ENTRE LOS GENES *stx2e* Y *fedA*

La asociación entre los genes *stx2e y fedA* (F18) fue evaluada utilizando la prueba exacta de Fisher debido a las bajas frecuencias observadas en las categorías estudiadas. Este análisis tiene como objetivo determinar si la presencia de ambos genes en las

muestras porcinas está estadísticamente relacionada, lo cual es relevante para entender su papel en la enfermedad del edema.

De las 119 muestras analizadas, se realiza una matriz de contingencia con la siguiente distribución en el cuadro 3.

Cuadro 3: Matriz de contingencia para la asociación entre Stx2e y F18.

	F18 positivo	*F18 negativo*
Stx2e positivo	3	3
Stx2e negativo	3	110

La prueba exacta de Fisher arrojó un valor p = 0.001377, lo que indica una asociación estadísticamente significativa entre los genes *stx2e* y *fedA* (F18).

Por lo cual hay evidencia de que la presencia de un gen puede estar asociada con la presencia del otro gen.

V. DISCUSIÓN

Este estudio constituye la primera investigación llevada a cabo en Perú, con el objetivo principal de evaluar la presencia de los genes (*stx2e* y *fedA*) asociados con la enfermedad del edema (EE) en aislados de *Escherichia coli* provenientes de cerdos con diarrea, de muestras de hisopados rectales procedentes de las regiones de Lima, Ica y San Martín y conservadas en el banco del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM. La relevancia de este estudio se fundamenta en que, en diversos países, se ha logrado identificar estos genes (*stx2e* y *fedA*) característicos de las cepas Stx2e-STEC, hallándose en cerdos destetados con signos clínicos asociados a la enfermedad de los edemas (EE) como en aquellos que, a pesar de estar aparentemente sanos, son portadores de las cepas patógenas (Macêdo *et al.*, Moredo, 2012, Meng *et al.*, 2014 Koláčková *et.al*, 2021, Berger *et al.*, 2023). Estos hallazgos subrayan la importancia epidemiológica de la enfermedad y la necesidad de fortalecer los programas de monitoreo en el sector porcino para poder detectar y prevenir su propagación de manera efectiva, dada su capacidad para inducir altas tasas de mortalidad en los animales afectados (Fairbrother, 2023).

Los resultados obtenidos en este estudio, productos del PCR confirman la presencia de genes *stx2e* y *fedA* en cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con diarrea de hisopados rectales. En el cual se identificaron 6 muestras positivas para el gen *stx2e* mediante PCR convencional. De estas, 3 presentaron de forma simultánea los genes *stx2e* y *fedA*, mientras que las otras 3 muestras fueron positivas solo para *stx2e*, sin el gen asociado a la adhesina F18. Además, se detectaron tres muestras adicionales que fueron positivas únicamente para el gen *fedA*, sin la presencia del gen *stx2e*. En un estudio

realizado en Alemania por Berger *et al.* (2023), también se reporta la detección de los genes *stx2e* y *fedA*, mediante PCR dúplex, hallando la expresión de ambos genes (24.9%) en corrales muestreados, e independientemente de la presencia del gen *fedA*, también reportaron la presencia positiva solo para el gen que codifica Stx2e (35.1%%), dando entender que la presencia del gen *fedA* (F18) es variable, lo que sugiere que otras adhesinas podrían estar presentes en las cepas negativas a F18, pero positivas a Stx2e.

El porcentaje de muestras positivas a Stx2e fue del 5.04% (6/119), mientras que solo el 2.52% de las muestras fueron positivas a ambos genes, lo que indicaría la proporción de cepas STEC con potencial de causar EE es baja según el estudio. Estas cifras son consistentes con un estudio previo en Sudamérica en donde reportaron resultados similares en cepas de *E. coli* asociadas a la enfermedad del edema en cerdos, esta investigación fue realizada en Argentina por Moredo *et al.* (2012) obteniendo frecuencias de STEC típicos del 2% y una prevalencia del 4.5% (2/44) de Stx2e. En Italia la presencia de aislados STEC cerdos está ampliamente documentada, en el estudio de Baldo *et al.,* (2020) registró una prevalencia del 11.6% (230/2060) más alta en comparación a estudios realizados por Chen et al. (2007) en china, donde reporta que los aislados STEC representaron el 6,1% de los 250 aislados de *E. coli* obtenidos de cerdos con diarrea. De manera similar, Brand et al., (2017) en Suiza reporto una prevalencia del 3,36% de productores de Stx2e en aislados de *E. coli* de 115 cerdos con diarrea.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una frecuencia de Stx2e-STEC del 5.04% en cerdos con diarrea en Perú, una cifra considerablemente menor como Argentina (4.5%) en comparación a otros estudios realizados en otros países, como Alemania con un 24.9%, China 21.54% (Moredo *et al*., 2012, Yang *et al.*, 2019*;* Berger *et al.*, 2023). Estas diferencias en la detección de *E. coli* productora de Stx2e pueden atribuirse a múltiples factores, incluyendo el sistema de producción, las condiciones ambientales, la genética de los cerdos y las estrategias de manejo sanitario implementadas en cada región. El tipo de sistema de producción porcina en países como Alemania y China es predominantemente intensiva, caracterizada por una alta densidad de animales en confinamiento, este tipo de manejo puede facilitar la transmisión de *E. coli* Stx2e debido al estrecho contacto entre los lechones y estrés asociado a la crianza en sistemas cerrados; por el contrario en países como Perú y Argentina, aunque también se

implementan sistemas intensivos, también es predominante la crianza de traspatio y sistemas semi-intensivos, lo que podría reducir la diseminación del patógeno (Berger *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024). Las condiciones ambientales también pueden influir significativamente en la persistencia y transmisión de *E. coli*; Alemania y China presentan climas más húmedos en sus principales regiones productoras, lo que favorece la supervivencia de bacterias en el ambiente; en cambio Perú presenta una diversidad climática, con regiones cálidas y húmedas en la costa y selva, y frías en la sierra, en zonas de producción tecnificada como Lima, el clima es templado y seco, lo que podría limitar la propagación de *E. coli* en el entorno de las granjas (SENAMHI, 2020; Braun, 2023; Campetella, 2024) . Otro aspecto que considerar es la genética de los cerdos y su susceptibilidad a la infección, la diferencia entre razas en cada país puede influir en la expresión de receptores específicos. Las estrategias de bioseguridad y control sanitario varían entre países, en algunas regiones se utilizan medidas preventivas como vacunas, dietas especializadas y monitoreo microbiológico, lo que podría disminuir la persistencia del patógeno en la población porcina.

La detección del gen *stx2e* en aislamientos de *E. coli* obtenidos de cerdos con diarrea, resalta la importancia de reconocer la posible coexistencia de stx2e-STEC con otros patógenos, debido a que la diarrea no es un signo patognomónico de la enfermedad del edema, lo que sugiere que otros agentes etiológicos podrían estar involucrados. Entre los diagnósticos diferenciales, destacan otras cepas de *E. coli* patógenas, como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), causante de diarrea neonatal y posdestete en lechones debido a la producción de enterotoxinas y su adhesión al epitelio intestinal mediante fimbrias F4, F5 y F18; además virus entéricos como el coronavirus porcino de la diarrea epidémica y el rotavirus porcino pueden inducir diarrea severa en cerdos jóvenes comprometiendo la integridad de la mucosa intestinal y predisponiendo a infecciones bacterianas secundarias (McOrist, 2016; Puente, 2024). No obstante, la ausencia de información sobre el historial clínico de los animales estudiados y las muestras obtenidas de cerdos con diarrea, limitan la interpretación de los resultados, dejando abierta la posibilidad de que algunas detecciones correspondan a cepas portadoras sin manifestación clínica de EE.

Los estudios sobre la detección de Stx2e-STEC en cerdos a nivel mundial revelan que esta patología se presenta en diversas regiones, como Alemania, Italia, China, Suiza, EEUU, Argentina, Brasil y Perú, aunque la prevalencia varía entre los países. En Alemania, se reportó la detección de *stx2e* y *fedA* en cerdos destetados mediante PCR dúplex (Berger et al., 2023). En Italia, se observó que *E. coli* productora de Stx2e se asocia principalmente con formas clínicas de la enfermedad, siendo la adhesina F18 la más común (Baldo et al., 2020). En China, estudios sobre cerdos sanos y humanos identificaron cepas de Stx2e-STEC, lo que sugiere que los cerdos son reservorios importantes de estas cepas, además de mostrar resistencia a antibióticos (Meng *et al.*, 2014; Yang et al., 2021). En Argentina, se documentó la presencia de genes *stx2e y fedA* en cerdos con diarrea post-destete y enfermedad de los edemas (Moredo, 2012). Por otro lado, en Brasil, un estudio de *E. coli* en cerdos con diarrea destacó la identificación de los genes de virulencia Stx2e y F18 mediante PCR multiplex (Macêdo et al., 2007). En el Perú, un estudio reciente realizado en Lima evaluó la presencia de los genes *stx2e* y *fedA* en *E. coli* aislados de cerdos sanos de granjas tecnificadas, sin obtener resultados positivos para dichos genes (Flores, 2023; Flores et al., 2024). En nuestro estudio si se logró detectar la presencia de los genes *stx2e* y *fedA* en muestras aisladas de *E. coli* de cerdos con diarrea. Esto resalta la importancia de seguir investigando la prevalencia y distribución de estas cepas en el contexto peruano, especialmente considerando la relevancia epidemiológica de las *E. coli* productoras de Stx2e en la enfermedad de los edemas (EE), ya que en nuestro país no hay suficientes estudios específicos sobre la detección de *E. coli* productora de toxina Shiga 2e, resultando una limitante por la falta de información, restringiendo la comparación y comprensión de los resultados.

De las muestras analizadas en el presente estudio, se detectó la presencia de la toxina Stx2e en un 5.04% (6/119), lo cual evidencia la circulación de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga tipo 2e en cerdos con diarrea en Perú. Sin embargo, una limitación importante es que las muestras provienen exclusivamente de animales con diarrea, un signo que no es patognomónico de la enfermedad del edema, la falta de antecedentes clínicos de los cerdos analizados impide determinar si desarrollaron la enfermedad del edema o que los animales actúan como portadores asintomáticos. A pesar de esta limitación, la detección de Stx2e-STEC en cerdos con diarrea es relevante desde el punto de vista epidemiológico, ya que sugiere que la bacteria podría estar implicada en

procesos entéricos o como portadores, siendo crucial este punto ya que los portadores son una fuente de diseminación en las granjas. Es posible que los aislados de *E. coli* obtenidos de cerdos con diarrea incluyan otras cepas patógenas que no necesariamente estén relacionadas con la enfermedad del edema, además existe la posibilidad que las muestras positivas para el gen *stx2e* sean cepas hibridas, es decir, que además de portar el gen *stx2e*, posean otros factores de virulencia asociados a diferentes patotipos de *E. coli,* esto sugiere la importancia de estudios complementarios para caracterizar mejor las cepas involucradas en la patogenicidad. Estudios previos en otros países como China, Corea e Italia se han identificado cepas hibridas porcinas STEC/ETEC de cerdos con enfermedad diarreica y edematosa, además de confirmar que las cepas hibridas podría causar diarrea acuosa en cerdos posdestete sin signos de enfermedad de edema (Cheng *et al.*, 2006; Byun *et al.*, 2013; Baldo *et al.*, 2020; Nammuang *et al.*, 2024). Teniendo en cuenta estos puntos, los resultados obtenidos son relevantes porque confirman la presencia de Stx2e-STEC en el país y establece una base para futuras investigaciones, además de sugerir estudios complementarios que incluyan animales con signo clínicos de la enfermedad del edema, así como análisis de cerdos sanos, para un mejor enfoque en la caracterización de la prevalencia y el papel de la Stx2e-STEC en la producción porcina en Perú.

VI. CONCLUSIONES

Este estudio confirmo la detección de los genes *stx2e* y *fedA* mediante la prueba molecular PCR convencional, a partir de muestras aisladas de hisopados rectales de cerdos con diarrea.

La frecuencia del gen *stx2e* en las muestras porcinas fue del 5.04% (6/119), con un 2.52% (3/119) de coincidencia entre ambos genes.

VII. RECOMENDACIONES

Recomendamos realizar estudios adicionales para investigar la presencia de otras adhesinas distintas al gen *fedA*, así como otros factores de virulencia en cepas Stx2e-STEC, como la detección de cepas hibridas, con el objetivo de comprender mejor su papel en la patogénesis de la enfermedad del edema. Asimismo, es importante implementar programas de monitoreo genético en granjas porcinas para identificar la prevalencia y distribución de estas cepas, lo que facilitará la toma de decisiones en el manejo sanitario de los animales. Finalmente, se sugiere ampliar este tipo de investigaciones a otras regiones geográficas para determinar si los patrones observados en este estudio se replican en otras poblaciones porcinas, contribuyendo así al control epidemiológico de la enfermedad.

VIII. LITERATURA CITADA

1. ***Amasino C. 2017. Enfermedades*** infecciosas de los animales y zoonosis. 1ªed. La Plata: Universidad de la plata, 2017. ISBN 978-950-34-1563-4.

2. ***Báez F. 2009.*** Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar factores de virulencia de *Escherichia coli* toxigénica de lechones. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

3. ***Báez, 2013.*** Detección de factores de virulencia de *Escherichia coli* por medio de la técnica de PCR y determinación de variantes por RFLP'S. Tesis de Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

4. ***Baldo V, Salogni C, Giovannini S, D'Incau M, Boniotti M, Birbes L, Perozzi A, Formenti N, Grassi A, Pasquali P, Alborali G. 2020.*** Pathogenicity of Shiga toxin type 2e *Escherichia Coli* in pig colibacillosis. Frontiers in Veterinary Science. Vol 7: 2p

5. ***Bergan J, Dyve a, Simm R, Skotland. 2012.*** Shiga toxins. Toxicon. 60(6):1085-1107

6. ***Berger P, Doherr M, Hermanns, Bauerfeind R. 2020.*** Oedema disease – correct sampling is crucial. Pig Progess – CEVA. [Internet]. Disponible en:

https://www.pigprogress.net/health-nutrition/oedema-disease-correct-sampling-is-crucial/

7. ***Berger P, Hermanns S, Kerner K, Schueler V, Schmelz F, Ewers C, Bauerfeind R, Doherr M. 2021.*** Prevalence of edema disease *Escherichia coli* (EDEC) in weaned piglets in Germany. En: 12th edition of ESPHM. Bern: European Symposium of Porcine Health Management.

8. ***Berger P, Hermans S, Kerner K, Schmelz F,Schüler V, Ewers C, Bauerfeind, Doherr. 2023.*** Cross-sectional study: prevalenve of oedema disease *Escherichia coli* (EDEC) in weaned piglets in Germany at pen and farm levels. Porcine Health Management. 2023, 9(49)

9. ***Bishop R. 2020.*** How lipopolysaccharide strikes a balance. Nature; London. 584(7821):348-349.

10. ***Bonanno L, Loukiadis E, Mariani P, Oswald E, Garnier L, Michel V, Auvray F. 2015.*** Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11: characterization of *stx* subtypes and insertion sites of Stx and EspK bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology. 2015;81(11):3712-3721. doi: 10.1128/AEM.00077-15

11. ***Brand P, Gobeli S, Perreten V. 2017.*** Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014 – 2015). Schweiz Arch Tierheilkd. 159(7):373-380

12. ***Braun V. 2023.*** Mehr Infektionskrankheiten durch Klimawandel. Tagesschau. [Internet]. Disponible en: https://www.tagesschau.de/wissen/gesundheit/klimawandel-gesundheit-104.html

13. ***Bruyand M, Kurkdjian M, Gouali M, Valk H, King L, Hello S, Bonacorsi S, Loirat C. 2018.*** Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Médicine et Maladies Infectieuses. 48(3):167-174.

14. ***Byun J, Yeal B, Kim H, Fairbrother J, Lee M, Lee W. 2013.*** Real-time PCR for differentiation of F18 variants among enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from piglets with diarrhoea and oedema disease. Vet J. Vol 198(2):538-540p.

15. Calle S, Pinto C, Morales S, Siuce J, Savatierra G, Sedano A, Monterroso M. 2018. Manual de bacteriología y micología. FMV-UNMSM.

16. Campetella E. 2024. Crece la resistencia a los antibióticos y el cambio climático la está empeorando. Meteored. [Internet]. Disponible en: https://www.meteored.com.ar/noticias/ciencia/crece-la-resistencia-a-los-antibioticos-y-el-cambio-climatico-la-esta-empeorando.html

17. *Cappuccino J, Welsh C. 2020.* Microbiology A Laboratory Manual. 12 Edition. Pearson Education.

18. *Casanova N, Redondo L, Dailoff G, Arenas D, Fernández M. 2018.* Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease phatogenesis. Toxicon. Vol148:149-154.

19. *Casanovas C. 2015.* Enfermedad de los edemas – Actualización. PorciNews: 103-110.

20. *Casey TA, Bosworth BT. 2009.* Design and Evaluation of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Identification of Genes for Nine Different Virulence Factors Associated with Escherichia Coli that Cause Diarrhea and Edema Disease in Swine. J Vet Diagn Invest. 2009, 21:25–30. doi: 10.1177/104063870902100104

21. *CEVA. 2020.* La enfermedad de los edemas. PorciPlanet. [Internet]. Disponible en: https://porciplanet.com/biologicos/bio-digestivo/la-enfermedad-de-los-edemas/

22. ***CEVA. 2024.*** Como saber si estoy ante un caso de Enfermedad de los Edemas en Cerdos. Swine healt CEVA. [Internet]. Disponible en: https://swinehealth.ceva.com/es/blog/enfermedad-edemas-cerdos

23. Chen X. 2007. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. Vet Microbiol. 103(1-2):13-20

24. Cheng D, Huaichang S, Xu J, Gao C. 2006. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. Vet Microbiol. Vol 115(4):320p

25. ***Coddens A, Verdonck F, Tiels P, Rasschaert K, Goddeeris B, Cox E. 2007.*** The age-dependent expression of the F18+ *E. coli* receptor on porcine gut epithelial cells is positively correlated with the presence of histo-blood group antigens. Veterinary Microbiology. 2007, 122 (3-4): 332-341.

26. ***Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino J, Qin X, Muzny D, Ayele M, Gibbs R, Csorgo B, Posfai G, Weinstock G, Blattner. 2008.*** The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. Journal of Bacteriology. 190(7):2597-2606.

27. ***EFSA. 2024.*** Story map on Shiga toxin-producing *Escherichia coli.* European Food Safety Authority. [Internet]. Disponible en: https://storymaps.arcgis.com/stories/ff3eb57b8d40474485d533b3cd2cfa63

28. ***Ekhlas D, García E, Ortiz J. 2021.*** Eliminación de antibióticos y óxido de zinc del pienso (1/2): cómo, cuándo y porqué. 3tres3 [Internet]. Disponible en: https://www.3tres3.com/latam/articulos/eliminacion-de-antibioticos-y-oxido-dezinc-del-pienso_12562/

29. ***Escamilla I. 2022.*** Microbiología: Diagrama de trabajo (metodología) – Conservación de cepas microbianas. Studocu.

30. Fairbrother J. 2015. *E. coli* asociada a diarrea post-destete. Etiología, signos clínicos y factores de riesgo. 3tres3. [Internet] Disponible en: https://www.3tres3.com/latam/print/11689

31. *Fairbrother J. 2023.* Edema Disease in Pigs (*Escherichia coli* Enterotoxemia). MSD Veterinary Manual. [Internet]. Disponible en: https://www.msdvetmanual.com/generalized-conditions/edema-disease/edema-disease-in-pigs

32. *FAO. 2010.* Principales Enfermedades de los Cerdos: Dirigido a Técnicos y Equipo de Promotoría del Bono Productivo Alimentario. 36p

33. *Flores A, Alvarez L, Palomino J, Siuce J Calle S. 2024.* Existencia/ausencia de los genes stx2e y f18 en aislados de *Escherichia coli* de cerdos libres de diarrea. RIVET. 2024, 35(5).

34. *Flores A. 2023.* Evaluación de la presencia/ausencia de los genes stx2e y f18 en *Escherichia coli* aisladps de cerdos sin diarrea. Tesis de Médico Veterinario. Lima: UNMSM.

35. *Fraser M, Fujinaga M, Cherney M, Melton A, Twiddy E, O'Brien A, James M. 2004.* Structure of siga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Biological Chemistry. 279(26):27511-27517.

36. *García R. 2013.* Caso clínico de enfermedad de los edemas. [Internet]. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ganad %2F Ganad_2005_33_22_24.pdf

37. *Gotter V. 2014.* Implicaciones nutricionales en el control de *E coli*. NutriNews [Internet]. Disponible en: https://nutrinews.com/download/Implicaciones-nutricionales-control-ecoli-IDT-nutrinews-revista-noviembre-2014.pdf

38. ***Gutiérrez J, Luna L, Mendoza M, Díaz G, Burguete J, Feliciano J. 2015.*** Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2015, 35(2):95-102.

39. ***Hostetter S, Helgerson A, Paton J, Paton A, Cornick N. 2014.*** Therapeutic use of a receptor mimic probiotic reduces intestinal Shiga toxin levels in a piglet model of hemolytic uremic syndrome. BMC Res Notes. Vol 7:331

40. ***Hu J, Hang B, Xu Y, Sun Y. 2020.*** Animal Microbiology. Science Pass and Alpha Science International Ltd.

41. ***ISS. 2023.*** STEC. Istituto Superiore di Sanità. [Internet]. Disponible en: https://www.iss.it/en/vtec-stec

42. ***Jackson P, Cockcroft P, 2009.*** Manual de medicina porcina. Intermédica S.A

43. ***Khalil RKS, Skinner C, Patfield S, He X. 2016.*** Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxigenic Enterobacter and *Escherichia coli* Strains. Pathog Dis. 2016;74(5):1–11. doi: 10.1093/femspd/ftw037.

44. ***Koláčková I, Vackova Z, Strakova N, Jorena K, Karpiskoba R, Vanhara J, Sperling D. 2021***. Atypical *Escherichia coli* strains producing Shiga toxin 2 subtype e and their ability to cause edema disease. CEVA.12: 89p

45. ***Lazo L, Dahbi G, Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Llorens F. 2009.*** Aplicación de técnicas moleculares en la caracterización de aislados de *Escherichia Coli* procedentes de cerdos con síndrome diarreico en la provincia de Villa Clara. Rev. Salud Anim. Vol. 31 No. 2 (2009): 93-104.

46. ***Lee K, Jeong Y, Lee M. 2021.*** *Escherichia coli* Shiga Toxins and Gut Microbiota Interactions. MDPI. 13(6):416

47. ***Leon J. 2024.*** Consumo per cápita de carne de cerdo en Perú alcanzo los 10.5 kilos en 2023, mostrando un aumento de1.9%. Agraria. [Internet]. Disponible en: https://agraria.pe/noticias/consumo-per-capita-de-carne-de-cerdo-en-peru-alcanzo-los-10--37387#:~:text=Consumo%20per%20c%C3%A1pita%20de%20carne,mostrando%20un%20aumento%20de%201.9%25

48. ***Li S, Wang L, Zhou Y, Miao Z. 2019.*** Prevalence and characterization of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets suffering post-weaning diarrhoea in Shandong Provice, China. Vet Med Sci. 2019, 6(1):69-75.

49. ***Lundstedt E, Kahne D, Ruiz N. 2021.*** Assembly and Maintenance of Lipids at the Bacterial Outer Membrane. Chem Rev. 121(9):5098-5123.

50. ***Macêdo N, Menezes C, Lage A, Ristow L, Reis A, Guedes R. 2007.*** Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59(5), 1117–1123

51. ***Martineau G, Amenna N, Waret A. 2018.*** Enfermedad de los edemas. Cuadro clínico y lesional y fisiopatología. IDT [Internet]. Disponible en: https://www.shigatoxin.com/assets/res/downloads/Monografico_STEC_SUIS_2018.pdf

52. ***McOrist S. 2016.*** Diarrea, vacunación y estrategias de prevención asociadas a *Escherichia coli* en los cerdos. Rev Suis. n°120

53. ***McVey D, Kennedy M, Chengappa M, Wilkes R. 2022.*** Veterinary Microbiology. 4ta Edition. Wiley Blackell. 56-87pp.

54. ***Melton. 2014.*** Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. Microbiology Spectrum. 2(4).

55. ***Meng Q, Bai X, Zhao A, Lan R, Du H, Wang T, Shi C, Yuan X, Bai X, Ji S, Jin D, Yu B, Wang Y, Sun H, Liu, Xu J, Xiong Y. 2014.*** Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in china. BMC Microbiology. 2014, Vol 14:5.

56. ***MINAGRI. 2020.*** Panorama y perspectivas de la producción de carne de cerdo en el Perú. Ministerio de Agricultura y Riego. 14p

57. ***Moonens K, Kerpel M, Coddens A, Cox E, Pardon E, Remaut H, Greve H. 2014.*** Nanobody Mediated Inhibition of Attachment of F18 Fimbrae Expressing *Escherichia coli*. PloS ONE. 9(12)

58. ***Moredo F, Cappuccio J, Insarralde L, Perfumo C, Quiroga M, Lotta G. 2012.*** Caracterización genotípica de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea post destete y enfermedad de los edemas. Revista Argentina de Microbiología. 44: 85-88 pp

59. ***Moredo F, Sanz M, Etcheverria A, Padola N, Quiroga M, Perfumo C, Leotta G. 2012.*** *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga en cerdos con manifestación clínica de diarrea. Engormix. [Internet]. Disponible en: https://www.engormix.com/porcicultura/escherichia-coli-cerdos/escherichia-coli-productor-toxina_a30132/

60. ***Moredo F. 2012.*** Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires. Tesis de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Plata: Univ. Nac. La Plata. 246 p.

61. ***Moser G, Spiteril K, Canning P, Schuler V, Sperling D. 2021.*** Shiga toxin *escherichia coli* (STEC) prevalence study on Ontario farms (Canada). CEVA. 12: 85p

62. ***Moxley RA. 2000.*** Edema Disease. Vet Clin North America: Food Animal Practice. 16: 175-185.

63. ***Nammuang D, Shen y, Ke C, Kuan N, Lin C, Yeh K, Chang Y, Chang C, Chang H. 2024.*** Isolation and evaluation of the pathogenicity of a hybrid shiga toxin-producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. BMC Veterinary Research. Vol 20(480).

64. ***Navarro F. 2014.*** *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. Microbiology Spectrum

65. ***Nicholas F, Tammen I, Sydney Informatics Hub. 2024.*** OMIA:000862-9823: Oedema disease, *Escherichia coli* F18, resistance/susceptibility to in Sus scrofa (pig). OMIA. [Internet]. Disponible en: https://omia.org/OMIA000862/9823/

66. ***OIE. 2023.*** Manual de las pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los animales terrestres, duodecima edición: Capitulo 3.10.9: *Escherichia coli* Verocitotoxigénica. [Internet]. Disponible en: https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/

67. ***OMS. 2018.*** *E. coli*. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli

68. ***Pinto G, Sampaio M, Dias O, Almeida C, Azeredo J, Oliveira H. 2021.*** Insights into the genoma architecture and evolution of Shiga toxin encoding bacteriophages of *Escherichia coli*. BMC Genommics. 19(22):366

69. ***Puente H. 2024.*** Colibacilosis neonatal y postdestete. Aquilon

70. ***Meng Q, Bai X, Zhao A, Lan R, Du H, Wang T, Shi C, Yuan X, Bai X, Ji S, Jin D, Yu B, Wang Y, Sun H, Liu K, Xu J, Xiong Y. 2016.*** Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. BMC Microbiology. 14,5

71. ***Quyen TM. 2023.*** Edema disease in pigs. Vemedim. [Internet]. Disponible en: https://vemedim.com/en/1/specialized-in-livestock-andpoultry/technical/1234/edema-disease-in-pigs#_ftn1

72. ***Raetz C, Whitfield C. (2002).*** Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry, 71:635 700p.

73. ***Rivera A, Chávez E, Rendón G, Giono S. 2006.*** Viabilidad de *Escherichia coli*en presencia de diferentes contaminantes. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 2006, 23(2):110-113

74. ***Rodriguez G. 2002.*** Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 44(5)

75. ***Rojas E, Billings G, Odermatt P, Auer G, Zhu L, Miguel A, Chang F, Weibel D, Theriot J, Huang K. 2018.*** The outer membrane is an essential load-bearning element in Gram-negative bacteria. Nature. 559(7715).

76. ***Salas D. 2023.*** Crianza de cerdos. Proyectos Peruanos. [Internet]. Disponible en: https://proyectosperuanos.com/crianza_de_chancho/#:~:text=La%20poblaci%C3%B3n%20nacional%20de%20cerdos,la%20poblaci%C3%B3n%20del%20a%C3%B1o%202020.&text=La%20saca%20o%20beneficio%20de,hechos%20conocidos%20del%20a%C3%B1o%202020.

77. ***Salas D. 2025.*** Cerdos estadísticas 2023. Proyectos Peruanos. [Internet]. Disponible en: https://proyectosperuanos.com/cerdos-estadisticas-2023/

78. ***Scheutz, F., Strockbine G, Brenner D, Krieg N, Staley J, 2005.*** Escherichia Bergey´s manual of systematic bacteriology. 2 edition. Springer. 607-624p.

79. ***SENAMHI. 2020.*** Mapa Climático del Perú. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. [Internet]. Disponible en: https://www.senamhi.gob.pe/?p=mapa-climatico-del-peru#:~:text=Entre%20los%20climas%20de%20mayor,y%20c%C3%A1lido%2

0en%20la%20selva.&text=Seleccione%20la%20zona%20o%20el,la%20descripci%C3%B3n%20del%20clima%20correspondiente.

80. ***SENASA. 2020.*** Guía para la implementación de Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) – Producción de porcinos. Servicio Nacional de Sanidad Agraria.

81. ***Shu S, Tsutsui Y, Nathawat R, Mi W. 2024.*** Dual function of LapB (YciM) in regulating *Escherichia coli* lipopolysaccharide synthesis. Proc Natl Acad Sci. 121(17).

82. ***SIEA. 2024.*** Boletín estadístico mensual – diciembre 2023. Sistema Integrado de Estadística Agraria. 11p

83. ***SIEA. 2025.*** Boletín estadístico mensual – noviembre 2024. Sistema Integrado de Estadística Agraria. 11p

84. ***Skinner C, Patfield S, Hernlem B, He X. 2015.*** New Stx2e Monoclonal Antibodies for Inmunological Detection and Distinction of Stx2e Subtypes. PLoS ONE. 10(7).

85. Smeds A, Pertovaara M, Timonen T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, Palva. 2003. Mapping the Binding Domain of the F18 Fimbrial Adhesin. Infection and Immunity. 71(4):2163-2172.

86. ***Sperling D, Vanhara J, Vinduska J, Kolackova I, 2021.*** Effect of the vaccination against Shiga toxin 2e in a piglet producing farm with history of edema disease: case study. CEVA. 12: 88

87. ***Sperling D, Vanhara J, Vinduska J, Kolackova I, 2021.*** Shiga toxin 2e-producing *E. coli* in swine: prevalence and risk factors evaluation on Czech pig farms. CEVA. 12: 86

88. ***Steil D, Bonse R, Meisen I, Pohlentz G, Vallejo G, Karch H, Müthing J. 2016.*** A Topographical Atlas of Shiga Toxin 2e Receptor Distribution in the Tissues of Weaned Piglets. MDPI. 2016, 8(12): 357p.

89. ***Tseng M, Fratamico P, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning S, Funk J. 2014.*** Diverse Virulence Gene Content of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Finishing Swine. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80(20):6395. DOI: 10.1128/AEM.01761-14.

90. ***UniProt. 2024.*** Taxonomy – *Escherichia coli* (species). [Internet]. Disponible en: https://www.uniprot.org/taxonomy/562

91. ***Vélez M, Colello R, Etcheverría A, Padola N. 2022.*** *Escherichia coli* productora de toxina Shiga: el desafío de adherirse para sobrevivir. Revista Argentina de Microbiología. 2023, 55:100-107

92. ***White M. 2017.*** Caso clínico: Enfermedad de los edemas. 3tres3. [Internet]. Disponible en: https://www.3tres3.com/latam/articulos/enfermedad-de-los-edemas_11887/

93. ***Won G, Lee J. 2016.*** Effectiveness of F18+ Fimbrial Antigens Released by a Novel Autolyzed *Salmonella* Expression System as a Vaccine Candidate against Lethal F18+ STEC Infection. Frontiers in Microbiology. Vol 7:1835.

94. ***Yang G, Guo L, Su J, Zhu Y, Jiao L, Wang J. 2019.*** Frequency of Diarrheagenic Virulence Genes and Characteristics in *Escherichia coli* Isolates from Pigs with Diarrhea in China. MDPI. 2019, 7(9):308.

95. ***Yang X, Wu Y, Liu Q, Sun H, Luo M, Xiong Y, Mastussek A, Hu B, Bai X. 2021.*** Genomic Characteristics of Stx2e-Producing *Escherichia coli* Strains Derived from Humans, Animals, and Meats. MDPI. 2021, 10(12):1551

96. ***Yoshimura M, Honda Y, Yonemitsu E, Takahashi R, Suenaga K, Waki T. 2023.*** Induction of antitoxic antibody and preventive effect against porcine edema

disease by the pentameric Stx2eB subunit vaccine. Veterinary Research. 2023, 54(29).

97. ***Yu D, Banting G, Neuman N. 2021.*** A review of the taxonomy, genetics, and biologu of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology. Vol 67:553-571.

98. ***Zhang L, Mao Y, Chen Z, Hu X, Wang C, Lu C, Wang L. 2024.*** A systematic review of life-cycle GHG emissions from intensive pig farming: Accounting and mitigation. Science of The Total Environment. Vol 907

99. ***Zhang W. 2014***. Progress and challenges in vaccine development against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)-associated porcine post-weaning diarrhoea (PWD). J Vet Med Res. 1(2):1006.

100. ***Zhitnitskiy P. 2021***. Edema disease – F18 *Escherichia coli*. [Internet]. Disponible en: https://open.lib.umn.edu/swinedisease/chapter/edema-disease/

101. ***Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Steveson G, Zhang J. 2019.*** Diseases of Swine, 11 edition. Wiley Blackwell. 807-834p.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Lista de número de muestras de *E. coli* según su distrito y región de procedencia

REGIÓN	DISTRITOS	NÚMERO DE MUESTRAS
LIMA	Huaral	56
	Huacho	26
	Lurín	7
	Pachacamac	6
	San Borja	4
	Chancay	3
	Ate	3

	San Juan de Lurigancho	2
	Puente Piedra	2
ICA	Ica	7
SAN MARTIN	Tarapoto	3

ANEXO 2. Lista de cada aislado de *E. coli* del banco del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNMSM-FMV con edad del animal y región de procedencia

CODIGO	EDAD	LIMA	SAN MARTIN	ICA
EC 5k	24	X		
EC 6k	24	X		
EC 7K	24	X		
EC 8K	24	X		
EC 9K	10	X		
EC 11K	35	X		
EC 12K	35	X		
EC 13K	22	X		
EC 14K	22	X		
EC 15K	22	X		
EC 16K	22	X		
EC17K	22	X		
EC 18K	21	X		
EC 19K	21	X		
EC 20K	21	X		
EC 23K	15	X		

EC 46K	15	X		
EC 57K	15	X		
EC 117	15	X		
EC 118	15	X		
EC 119	15	X		
EC 120	15	X		
EC 122	18	X		
EC 123	18	X		
EC 124	18	X		
EC 125	18	X		
EC 126	18	X		
EC 137	18			X
EC 138	12			X
EC 139	12			X
EC 140	47			X
EC 141	47			X
EC 142	47			X
EC 143	5			X
EC 155	17	X		
EC 157	17	X		
EC 159	17	X		
EC 166	28		X	
EC 167	28		X	
EC 168	28		X	
EC 171	22	X		
EC 172	22	X		
EC 173	22	X		
EC 178	22	X		

EC 179	21	X		
EC 181	21	X		
EC 182	18	X		
EC-184K	12	X		
EC-189	12	X		
EC-190	17	X		
EC-200K	17	X		
EC-201K	17	X		
EC-202K	22	X		
EC-203K	22	X		
EC-204K	14	X		
EC-206K	14	X		
EC-207K	11	X		
EC-213K	11	X		
EC-215K	11	X		
EC-218K	16	X		
EC-219K	16	X		
EC-220K	16	X		
EC-221K	50	X		
EC-225K	50	X		
EC-226K	50	X		
EC-227K	42	X		
EC-228K	42	X		
EC-230K	16	X		
EC-231K	16	X		
EC-232K	16	X		
EC-233K	29	X		
EC-234K	29	X		

EC-235K	29	X		
EC-236K	32	X		
EC-237K	32	X		
EC-238K	32	X		
EC-239K	32	X		
EC-240K	16	X		
EC-241K	16	X		
EC-242K	16	X		
EC-243K	16	X		
EC-244K	22	X		
EC-245K	22	X		
EC-246K	22	X		
EC-247K	11	X		
EC-248K	33	X		
EC-249K	41	X		
EC-250K	41	X		
EC-251K	41	X		
EC-253K	30	X		
EC-254K	30	X		
EC-255K	28	X		
EC - 256K	28	X		
EC-258K	25	X		
EC-260K	25	X		
EC-261K	25	X		
EC-262K	25	X		
EC-263K	19	X		
EC-264K	19	X		
EC-265K	42	X		

EC-266K	42	X		
EC-267K	42	X		
EC-268K	8	X		
EC-269K	8	X		
EC-270K	8	X		
EC-273K	8	X		
EC-274K	13	X		
EC-275K	21	X		
EC-276K	21	X		
EC-277K	21	X		
EC-278K	26	X		
EC-280K	26	X		
EC-281K	26	X		
EC-283K	10	X		
EC-284K	17	X		
EC-285K	17	X		
EC-286K	17	X		
EC-288K	17	X		
EC-289K	17	X		

ANEXO 3. Protocolo de purificación del ADN genómico de bacterias gramnegativas – GeneJET Genomic DNA purificarion kit

1. Centrifugar el tubo de microcentrífuga con 1.5 o 2 mL del cultivo bacteriano ($2x10^9$) a 5000 x g durante 10 minutos para obtener el pellet de células. Descartar al sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 µL de Digestion Solution (solución de digestión). Agregar 20 µL de Proteinase K y asegurarse de homogeneizar bien las células, mediante agitación en vórtex o pipeteo.
3. Incubar la mezcla a 56 °C durante 30 minutos. Agitar en vórtex de vez en cuando o utilizar un baño de agua con agitación, una plataforma oscilante o un termomezclador hasta que las células estén completamente lisadas.
4. Agregar 20 µL de ARNasa A la mezcla, mezclar con vortex y dejar incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para eliminar el ARN.
5. Agregar 200 µL de Lysis Solution (solución de lisis). Mezclar mediante agitación en vórtex durante unos 15 segundos hasta obtener una mezcla homogénea.
6. Agregar 400 µL de etanol al 50 % y luego mezcle con una pipeta o agitando con un vórtex.
7. Transferir el lisado preparado a una columna de purificación de ADN genómico GeneJET™ insertada en un tubo de recolección.
8. Centrifugar la columna a 6000 × g durante 1 minuto. Deseche el tubo de recolección que contiene la solución de flujo continuo. Colocar la columna de purificación de ADN genómico GeneJET™ en un nuevo tubo de recolección de 2 ml.

9. Agregar 500 µL de Tampón de Lavado I (con etanol agregado). Centrifugar a 8000 × g durante 1 minuto. Desechar el flujo continuo y luego colocar la Columna de Purificación nuevamente en el tubo de recolección.
10. Agregar 500 µL de Tampón de Lavado II (con etanol agregado) a la columna de purificación de ADN genómico GeneJET™. Centrifugue a ≥12 000 × g durante 3 minutos.
11. (Opcional) Si se observa solución residual en la Columna de Purificación, vaciar el tubo de recolección y luego centrifugar la columna nuevamente a ≥12 000 × g durante 1 minuto.
12. Desechar el tubo de recolección que contiene la solución de flujo continuo y luego transferir la Columna de Purificación de ADN genómico GeneJET™ a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL.
13. Agregar 200 µL de Tampón de Elución al centro de la membrana de la Columna de Purificación de ADN genómico GeneJET™ para eluir el ADN genómico. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego centrifugue a 8000 × g durante 1 minuto.
14. Desechar la columna de purificación.

    Nota: Usar el ADN purificado inmediatamente en aplicaciones posteriores o consérvelo a -20 °C.

ANEXO 4. Lista de cada aislado de *E. coli* positivo o negativo a los genes *stx2e* y *fedA* mediante PCR convencional

CODIGO	STX2e	F18
EC 5k	0	0
EC 6k	**1**	**0**
EC 7K	0	0
EC 8K	0	1
EC 9K	0	0
EC 11K	0	0
EC 12K	0	0
EC 13K	0	0
EC 14K	0	0
EC 15K	0	0
EC 16K	0	0
EC17K	0	0
EC 18K	0	0
EC 19K	0	0
EC 20K	0	0
EC 23K	0	0
EC 46K	0	0
EC 57K	0	0
EC 117	0	0
EC 118	0	0

EC 119	0	0
EC 120	0	0
EC 122	0	0
EC 123	0	1
EC 124	0	0
EC 125	0	0
EC 126	0	0
EC 137	0	0
EC 138	0	0
EC 139	0	0
EC 140	0	0
EC 141	0	0
EC 142	0	0
EC 143	0	0
EC 155	0	0
EC 157	0	0
EC 159	0	0
EC 166	**1**	**1**
EC 167	**1**	**1**
EC 168	**1**	**1**
EC 171	0	0
EC 172	0	0
EC 173	0	0
EC 178	0	0
EC 179	0	0
EC 181	0	0
EC 182	0	0
EC-184K	0	0
EC-189	0	0
EC-190	0	0
EC-200K	0	0
EC-201K	0	1
EC-202K	0	0

EC-203K	0	0
EC-204K	0	0
EC-206K	0	0
EC-207K	0	0
EC-213K	0	0
EC-215K	0	0
EC-218K	0	0
EC-219K	0	0
EC-220K	0	0
EC-221K	0	0
EC-225K	0	0
EC-226K	0	0
EC-227K	0	0
EC-228K	0	0
EC-230K	0	0
EC-231K	0	0
EC-232K	0	0
EC-233K	0	0
EC-234K	0	0
EC-235K	0	0
EC-236K	0	0
EC-237K	0	0
EC-238K	0	0
EC-239K	0	0
EC-240K	0	0
EC-241K	0	0
EC-242K	**1**	**0**
EC-243K	0	0
EC-244K	0	0
EC-245K	0	0
EC-246K	0	0
EC-247K	0	0
EC-248K	0	0

EC-249K	0	0
EC-250K	0	0
EC-251K	0	0
EC-253K	0	0
EC-254K	0	0
EC-255K	0	0
EC - 256K	0	0
EC-258K	**1**	0
EC-260K	0	0
EC-261K	0	0
EC-262K	0	0
EC-263K	0	0
EC-264K	0	0
EC-265K	0	0
EC-266K	0	0
EC-267K	0	0
EC-268K	0	0
EC-269K	0	0
EC-270K	0	0
EC-273K	0	0
EC-274K	0	0
EC-275K	0	0
EC-276K	0	0
EC-277K	0	0
EC-278K	0	0
EC-280K	0	0
EC-281K	0	0
EC-283K	0	0
EC-284K	0	0
EC-285K	0	0
EC-286K	0	0
EC-288K	0	0

EC-289K	0	0

POSITIVO: 1

NEGATIVO: 0