



13
2-21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILAN

FALLA DE ORIGEN

EFFECTO DEL VINAGRE EN LA INFECCION DE
LECHONES NO CALOSTRADOS CON Escherichia coli
ENTEROTOXIGENICA (O100;K88ab,ST+)

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N

LAURA PATRICIA GANDULFO RIVAS
MA. TERESA YU CARDENAS



DIRECTOR DE TESIS:
MVZ. MSC. Ph.D. ANTONIO MÉRILLA GONZALEZ

CUAUTILAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
Agentes Etiológicos	2
Diarrea Colibacilar de Cerdos	3
Aspectos Clínicos de la Colibacilosis	4
Generalidades de <u>Escherichia coli</u>	5
Mecanismos de Defensa contra <u>Escherichia coli</u> en el lechón	13
Tratamiento en el Campo del Síndrome Diarreico	18
Aspectos Clínicos del Vinagre	20
Planteamiento del problema	22
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y METODOS	24
RESULTADOS	30
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	47

R E S U M E N

La diarrea neonatal de los lechones causada principalmente por Escherichia coli constituye una de las enfermedades más frecuentes en granjas porcícolas que causa baja de peso e incremento de la mortalidad. Con objeto de determinar el efecto del vinagre diluido 1:5 en agua destilada sobre la colibacilosis experimental. Se utilizaron 20 lechones sanos sin calstrar, a los cuales se les inoculó con 5 ml de una cepa de Escherichia coli O100; K88ab, ST⁺ a dosis de 10^8 UFC/ml. Posteriormente 5 de éstos fueron tratados con vinagre comercial de alcohol de caña diluido 1:5 pH=3.04.

Por otra parte los 10 animales restantes fueron usados como testigos, administrándoles a 5 de ellos 5 ml de vinagre comercial de alcohol de caña 1:5 pH=3.04 y a los demás 5 ml de caldo lactosado. Durante el experimento se llevó un registro de los siguientes parámetros: temperatura rectal (°C), grado de diarrea y conteos bacterianos (mucosa estomacal, contenido estomacal y duodeno). Se observó que el vinagre disminuyó la intensidad de la diarrea, la hipotermia y el número de E. coli aislada a comparación de los animales inoculados sólo con ésta. Es probable que el efecto del vinagre sea el de favorecer la proliferación de la flora normal que baja el pH del estómago y duodeno y disminuye el grado de colonización por E. coli.

I N T R O D U C C I O N

El síndrome diarreico constituye una de las enfermedades más frecuentes en las granjas porcícolas. La magnitud del problema es variable ya que existen explotaciones en que las diarreas son constantes y graves y otras en que los lechones tienen diarrea leve entre la segunda y tercera semana de edad. En la mayoría de los casos se tratan, pero causan baja de peso e incrementan la mortalidad (Maqueda, 1988).

Agentes Etiológicos.

Existen una gran variedad de agentes causales del síndrome diarreico entre los que se encuentran: Escherichia coli, Klebsiella spp, Salmonella spp, virus como el de la gastroenteritis de los cerdos (GTC), rotavirus (RV), pararotavirus (PRV), adenovirus, astrovirus, calicivirus y parásitos como Giardia lamblia, Isospora suis, Balantidium coli, Cryptosporidium, Ascaris, Oesophagostomun y Trichuris suis (Davis, et al., 1978; Eliassen, 1984).

En Estados Unidos, Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es responsable del 50-80% de los casos de diarrea aguda; se considera como un agente primario productor de este síndrome al igual que el virus de GTC (Giannella y Ralph, 1981; Mizrahi y Muñoz, 1984).

Los datos recopilados de la epidemiología de Escherichia coli se refieren al papel común especialmente como patógeno entérico en Estados Unidos indicando una relación sinérgica de este patógeno que se desarrolla en animales y humanos

(Gangarosa, 1978).

Diarrea colibacilar de cerdos.

La diarrea colibacilar o colibacilosis de los recién nacidos, es una de las enfermedades más importantes en los lechones causada por Escherichia coli (Pijoán y Necoechea, 1982). Por lo que constituye una enfermedad que afecta en mayor grado a la porcicultura en el aspecto económico ya que las pérdidas sobrevienen por concepto de mortalidad (Dunne, 1970).

La colibacilosis es una enfermedad que se clasifica en (Nielsen, et al., 1969; Linton y Hinton, 1988):

Colibacilosis sistémica: Cepas invasivas de E. coli causan colibacilosis sistémica principalmente en vacas, corderos, aves de corral y cada vez es menos frecuente en cerdos. Las cepas de E. coli pasan a mucosa del tracto intestinal y entran a corriente sanguínea causando infección aguda generalizada.

Colibacilosis enterica: Se presenta generalmente en lechones no destetados desde las 2 ó 3 horas hasta aproximadamente los 10 días de edad; también se presentan al destete o en la forma de enfermedad del edema. La colibacilosis entérica involucra la secuencia de los siguientes eventos: (1) la infección de ceoas ETEC, (2) la proliferación del organismo en el intestino delgado, (3) formación y liberación de entérotoxinas y (4) desarrollo de lesiones.

Aspectos clínicos de la colibacilosis.

Patologicamente la colibacilosis es una enfermedad que se caracteriza por la producción de diarrea que es uno de los problemas más comunes en granjas porcícolas.

Los signos clínicos más característicos en los lechones son: Cierta lentitud en sus movimientos; marcada depresión, costración y pelo hirsuto; se observa diarrea acuosa profusa blanca amarillenta que poco antes de la muerte se hace viscosa provocando una severa deshidratación, el vómito es raro; la temperatura corporal se ve disminuida.

Las lesiones encontradas a la necropsia son: Congestión múltiple en la mucosa estomacal e intestinal, el estómago usualmente contiene cantidades variadas de leche coagulada, el intestino delgado se encuentra flácido, distendido, con las paredes transparentes y el contenido acuoso de color amarillento con leche sin digerir. Los ganglios linfáticos mesentéricos presentan aumento de tamaño y edema. Hígado y bazo es tán aumentados de tamaño (Kohler y Bohl, 1964; Hornich, et al ., 1973; Martínez, 1986).

Generalidades de Escherichia coli.

E. coli pertenece a la familia de las Enterobacteriaceas, es el único miembro del género Escherichia (Sussman, 1985).

Es un bacilo Gram negativo, grueso, corto, de 0.4 a 0.7 micras de grosor y de 1 a 4 micras de longitud, no esporulado, anaerobio facultativo, presenta fimbrias, flagelos peritricos y a menudo presentan cápsula (Smith, et al., 1968; Sussman, 1985).

La pared celular de E. coli contiene una capa predominante que es la membrana externa la cual es típica de bacterias gram negativas. Contiene proteínas, lípido y lipopolisacárido. Todos estos componentes están expuestos en la superficie celular y así interactúan con células o sustancias en el medio ambiente. Algunas proteínas forman poros e intercambian sustancias o atraviezan la pared celular. Otras toman parte en procesos como la depuración de hierro o adhesión celular. Con respecto a la virulencia y patogenicidad de E. coli muestra constituyentes en la membrana externa como lipopolisacáridos (LPS) en la pared celular, el cual no sólo tiene antígenos dominantes sino también grandes mediadores con muchas actividades biológicas (Riestchel, et al., 1982) (Fig.1).

Se conocen 3 tipos de antígenos, los antígenos O que no juegan un papel importante en la E. coli; los antígenos H que son los flagelares; y los antígenos K, que pueden ser de naturaleza proteica o polisacárida; los de naturaleza proteica presentan una estructura filamentosa denominada fimbria o

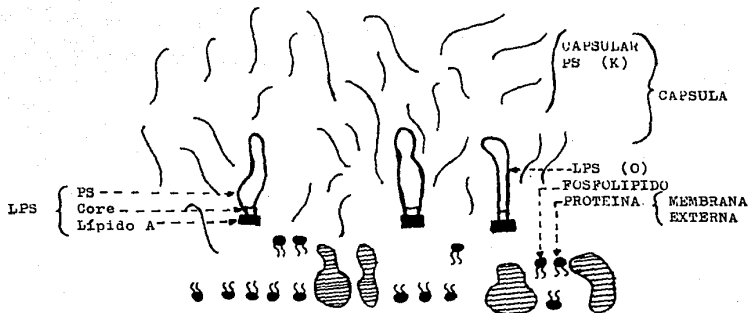


Figura 1. Diagrama de las capas exteriores de Escherichia coli.

LPS = Lipopolisacárido

PS = Polisacárido

Core = centro

pili, mientras que los de naturaleza polisacárida son poco inmunogénicos (Smith, et al., 1968; Cravioto, et al., 1982; Linton y Hinton, 1988).

Una de las propiedades de los antígenos O y K es el efecto protector de la pared celular. Ambos protegen a la bacteria E. coli contra la acción bactericida de fagocitos y complemento aunque los antígenos K son mucho más efectivos que los antígenos O (Jann y Jann, 1982; Robbins, et al., 1980).

Se conocen varios tipos de E. coli que tienen la habilidad de reconocer distintos receptores de membrana:

E. coli enteropatógena (EPEC), la cual no es toxigénica y no es invasiva pero coloniza el intestino de los comensales y causa enfermedad esporádica extraintestinal. La dosis infectante es de 10^5 a 10^{10} UFC/ml.

E. coli enterotoxigénica (ETEC), que causa diarrea no invasiva, coloniza el intestino delgado y produce enterotoxinas. La dosis infectante es de 10^8 a 10^{10} UFC/ml.

E. coli enteroinvasiva (EIEC), la cual causa un síndrome semejante a la disenteria o enterocolitis. La dosis infectante suele ser baja (Parry y Rooke, 1985; Smith, et al., 1985; Sussman, 1985).

Las cepas de E. coli capaces de inducir diarrea en recién nacidos; se asocian a factores de patogenicidad codificados por plásmidos como son:

a) Estructuras superficiales que permiten la citoadherencia como son los antígenos K88, K99, 987P y 41P.

EL antígeno K88 es mediado por plásmidos, no flagelar, se encuentra en la superficie de la bacteria y está compuesto de proteína (Moon, et al., 1977). Fue identificado como un factor de adhesión por Ørskov y Ørskov (1966). Juegan un papel importante en la determinación de enteropatogenicidad confiriendo propiedades hemaglutinantes y adhesivas sobre las células epiteliales del intestino, por lo cual la bacteria que lo posee es más difícil de eliminar por el peristaltismo intestinal y por lo tanto, tiene más oportunidades de colonizar y crecer en gran número en el intestino delgado causando enfermedad (Escamilla, et al., 1977; Holmgreen, et al., 1981; Parry y Rooke, 1985).

Cepas aisladas de lechones en diferentes países indican que el antígeno K88 está compuesto por componentes antigénicos en distintas combinaciones (Ørskov, et al., 1964). Otros estudios indican que existe como mínimo dos formas, cada una con un determinante común y uno distinto simbolizado como K88ab y K88ac, además de la variante K88ad (Guinné y Jansen, 1979).

Bijlsman, et al (1981-1982), reportan que el modo de acción de éstas variantes difiere de la especificidad de especie sugiriendo cambios en los receptores celulares en el epitelio intestinal.

Por medio de electroforesis se ha demostrado la presencia de un material homogéneo con peso molecular de 26 000 daltons para K88ad, 23 500 para K88ab y 25 000 para K88ac. Con esto se concluye que el antígeno K88 es una proteína pura, y

tiene variantes serológicas que difieren en la composición de aminoácidos (Jann y Jann, 1985).

b) La producción de enterotoxinas, que son sustancias de naturaleza proteica liberadas por algunas bacterias que producen alteraciones en el transporte de líquidos y electrólitos en el intestino o bien provocan daño a la estructura de la mu cosa intestinal (Sussman, 1985).

Ahora está bien establecido que E. coli puede causar enfermedad diarreica en humanos y animales por la producción de una o más enterotoxinas.

Existen tres tipos de toxinas:

La toxina termo-lábil (LT) que posee un peso molecular elevado, aproximadamente de 36 500 daltons, es una proteína con bajo contenido en lípidos y carbohidratos; es antigénica, no dializable, sensible al calor, a la tripsina y al ácido (Zepeda, 1981; Sussman, 1985). Se relaciona con la toxina de Vibrio cholerae pues posee receptores similares, estructura, actividad inmunológica y mecanismo de acción semejante (Raskova y Raska, 1980; Holmgren, 1985; Sussman, 1985; Scotland, 1938). La toxina LT de E. coli posee dos subunidades, una A o activa y 5 unidades B, que se unen al gangliósido GM₁ de la membrana celular (Fig. 2), penetra la subunidad A que activa el adenilato ciclasa, y esto trae como consecuencia un incremento del adenosil monofosfato cíclico (AMPc), que es respon-

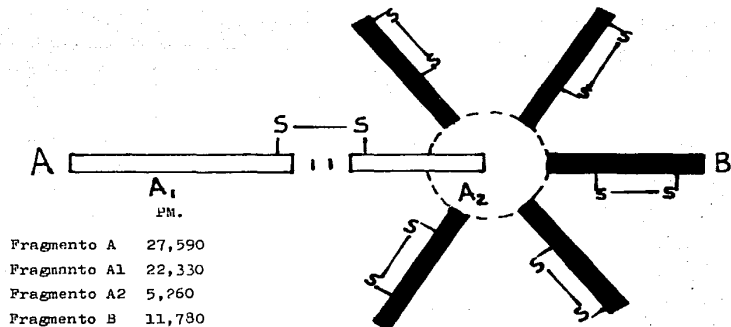


Figura 2. Estructura propuesta para el modelo de la enterotoxi
na LT de Escherichia coli.

sable de la salida de líquido de la célula (Raskova y Raska, 1980; Giannella y Ralph, 1981; Holmgreen, 1985; Sussman, 1985; Scotland, 1988).

La toxina termo-estable (ST) tiene un peso molecular bajo, aproximadamente de 1 000 a 10 000 daltons, no es antigénica, con poco contenido de proteínas, alto contenido en lípidos y dializable. Su presencia se puede demostrar por la acción que produce en asa ligada de conejo, en un período de 6 horas, o por vía intragástrica en ratón lactante. La producción de esta toxina está determinada por plásmidos. Su mecanismo de acción aparentemente se debe a que aumenta la concentración en la célula de la guanidil monofosfato cíclico (GMPc) hasta 10 veces su valor normal y consecuentemente se produce un incremento de la secreción de líquido (Guerrant, et al., 1980; Raskova y Raska, 1980; Giannella y Ralph, 1981; Suesman, 1985; Scotland, 1988). Existen 2 clases de ST: STa que es específica para lechón y ratón lactante, es soluble en metanol, tiene baja estabilidad térmica y tiene diferente espectro de actividad biológica; y STb específica sólo para cerdos e insoluble en metanol (Burges, et al., 1978; Donald, et al., 1984; Scotland, 1988).

c) Existen algunas cepas de E. coli que no son invasivas, toxigénicas ni enteropatógenas y sin embargo provocan diarrea. Konowalchuk (1977) las relacionó con la presencia de una cito toxina que produce lisis en células Vero (VT). Sin embargo,

otros autores relacionan estas cepas de E. coli simplemente con la producción de otra toxina.

Para que la diarrea se presente en los lechones, estos deben ingerir una dosis infectante de 10^8 a 10^{10} organismos de ETEC; deben adherirse y colonizar el epitelio intestinal y producir enterotoxinas LT ó ST (Bullen, et al., 1978; Gorbach , 1978; Levine, et al., 1980; Morris, et al., 1982; Maqueda , 1985).

Mecanismos de defensa contra Escherichia coli en el lechón.

La defensa natural y específica presente en los animales está basada fundamentalmente en mantenerse libres de microorganismos y para esto depende de diversos mecanismos (Wiesmann, 1982; Ondarza, 1984):

a) Mecanismos inespecíficos:

El lechón al momento de nacer se ve expuesto súbitamente a problemas de sobrevivencia por lo que tiene que haber una a adaptación fisiológica al nuevo medio ambiente y tiene que evitar ser invadido por los microorganismos patógenos que pueden llegar a provocar enfermedad y muerte (Morilla, 1983).

Existen diversos factores por los que los lechones son protegidos de ser invadidos por E. coli uno de estos es :

Influencia del pH.

El estómago del lechón tiene un pH de 5.5 a 6.0 al nacimiento, baja a 4.0 en pocas horas y a 3.0 en pocos días, nivel en que permanece hasta los 2 meses de edad cuando alcanza un pH de 2.0. Los altos valores de pH que se observan en lechones de corta edad se debe a la escasa capacidad secretora de HCL en el estómago, la que a su vez no se ve ciertamente estimulada por la leche de la cerda debido a su fuerte capacidad

tampón (Puchal, 1984).

Es probable que la acidificación temprana de los lechones ayude a establecer rápidamente la flora normal (lactobacilos) que es lo que hace disminuir el pH estomacal y esto a la vez inhiba la multiplicación de bacterias potencialmente patógenas como E. coli (Davis, et al., 1978; Mendoza, et al., 1987; Morilla, 1988).

Flora normal.

El tracto gastrointestinal (TGI) de los animales recién nacidos es estéril y desde las primeras horas empieza a colonizarse con una gran cantidad de microorganismos provenientes de la madre y del medio ambiente, estos microorganismos constituyen la flora normal.

La flora normal es de suma importancia para los animales pues es necesaria para:

1. Proveer energía a partir de los alimentos.
2. Competir con microorganismos patógenos capaces de producir infecciones en los lechones.
3. Favorecer el ambiente del TGI por la producción de sustancias bactericidas ayudando a que se incremente su eficiencia.

La flora normal esta constituida por bacterias, levaduras y en algunos casos protozoarios. Se estima que existe gran cantidad de microorganismos en el TGI (Vázquez, et al., 1988); siendo las más importantes las bacterias acidificantes

(lactobacilos) que utilizan la lactosa y un factor de crecimiento que contiene nitrógeno y polisacárido que favorecen su implantación (Goldman y Smith, 1973; Sandine, 1979).

Tienen otras características como el de sobrevivir a los procesos digestivos y ser capaces de competir por nutrientes y espacio, pues algunas bacterias consumen lo que otras necesitan; generalmente la competencia es por fuente de carbono fermentable en condiciones de anaerobiosis, producen metabolitos que influyen en el medio ambiente inmediato y/o agentes antimicrobianos de amplio espectro denominados lactosidinas, producen peróxido de hidrógeno, ácido acético, láctico y fórmico que son bactericidas para varios microorganismos, disminuyen el pH impidiendo que E. coli se fije y reproduzca (Rubin y Vaughan, 1979; Gulliland, et al., 1980; Miller y Watkins, 1980; Vázquez, et al., 1988).

Otro mecanismo contra la colonización por bacterias potencialmente patógenas es el peristaltismo normal del intestino delgado. La peristalsis normal barre con las bacterias ingeridas llevándolas fuera del intestino delgado y depositándolas en el colón. Este proceso se ayuda por la acción de moco secretado, el cual remueve partículas de la superficie de la mucosa por tanto cuando la función motora del intestino delgado se inhibe proliferan las bacterias (Giannella y Ralph, 1981; Mizrahi y Muñoz, 1984; Vázquez, et al., 1988).

Table 1. Origen de las inmunoglobulinas en el calostro y leche de la cerda (%).

	CALOSTRO			LECHE		
	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
Inmunoglobulinas derivadas del suero	85	40	100	10	10	30
Inmunoglobulinas formadas en la glándula mamaria	15	60	0	90	90	70

Tomado por Bourne y Curtis (1973).

Este tipo de inmunidad se denomina lactogénica y está basada en la presencia constante de IgAS en la luz intestinal durante todo el período de lactancia y que protege al lechón de contraer infecciones entéricas. De esta manera es evidente que la inmunidad pasiva sólo protege durante varios días y contra antígenos específicos; lo que aparentemente trae como consecuencia que durante este período, el sistema inmunológico del recién nacido alcance una madurez para poder responder por si mismo a los estímulos antigénicos, es decir, que sea reemplazada gradualmente por la inmunidad activa (Sherman, et al., 1972; Goldman, et al., 1973; Welliver y Ogra, 1978; Weaver, et al., 1981; Pijoán y Necoechea, 1982; Kolsto, et al., 1983; Vázquez, et al., 1988).

Tratamiento en el campo del síndrome diarreico.

Para prevenir las diarreas se han utilizado varios métodos, algunos dirigidos contra los microorganismos y otros encaminados a incrementar la resistencia del lechón; dentro de estos métodos está el uso de antibióticos y quimioterapéuticos, así como la administración de sustancias y bacterias acidificantes que disminuyen el pH del tracto gastrointestinal del recién nacido (Rosales, et al., 1983; Mendoza, et al., 1987).

Debido a que la protección del lechón contra la enfermedad proviene del calostro y leche por lo general se inmuniza a la cerda gestante para que ella proteja a los lechones. Para la inmunización se han utilizado intestinos de lechones infectados con E. coli patógena que se mezclan con el alimento, o se aíslan bacterias de los cerdos enfermos de la granja y se preparan autobacterinas para ser administradas por vía oral o intramuscular a la cerda gestante antes del parto (Kohler, et al., 1975; Childow y Porter, 1978; Klipstein, et al., 1982).

Otra forma de crear inmunidad en los lechones es por medio de anticuerpos monoclonales dirigidos en forma específica contra los factores de adherencia, que se administran por vía oral a los cerdos neonatos (Sherman, et al., 1982; Morris, et al., 1985).

Por otra parte, se ha hecho investigación en granjas utilizando vinagre comercial de manzana o de alcohol y jugo de limón en lechones y se encontró que disminuyó la frecuencia de lechones diarreicos. Según algunos clínicos, el vinagre pue

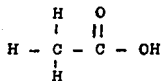
de ser usado como profiláctico y como tratamiento en forma in directa, ya que a través de estos factores se permite la colo nización del TGI con bacterias acidificantes. Estos constituyen la flora normal del lechón e inhiben el crecimiento de otras bacterias que pueden ser potencialmente patógenas (Sandine, 1979; Mendoza, et al., 1987).

Aspectos clínicos del vinagre.

El vinagre comercial se obtiene por fermentación aeróbica de soluciones alcohólicas mediante bacterias del género Aceto bacter; contiene ácidos orgánicos, derivados del material de origen y usualmente de un 5 a 6% de ácido acético (Russel , et al., 1982; Chabert, et al., 1987).

Este ácido en concentraciones de 5% es bactericida para muchos tipos de microorganismos y bacteriostático en concen--traciones menores. Ocasionalmente se usa en soluciones al 1% en la piel para apósitos quirúrgicos. La Pseudomona aeruginosa es particularmente susceptible al ácido acético que también pue de emplearse en el cuidado de las quemaduras. Se usa en duchas vaginales para suprimir infecciones por Trichomona vaginalis, Candida albicans y Haemophilus ducreyi (Goodman, et al., 1981).

Los ácidos grasos volátiles de cadena corta no disociados (acético, propiónico y butírico), son bacteriostáticos y ligeramente bacterisidas para gérmenes entéricos como Escherichia coli, Salmonella spp y Shigella spp. Como estos ácidos son pro ductos principales de la fermentación bacteriana en el intes--tino grueso de animales monogástricos, pueden desempeñar cier to papel regulando el crecimiento de las bacterias entéricas en el tubo digestivo (Freeman, 1984).

Características fisicoquímicas del ácido acético:

FORMULA CONDENSADA: CH_3COOH

PESO MOLECULAR: 60 g/mol

PUNTO DE FUSION: 16°C

PUNTO DE EBULLICION: 118°C

LIQUIDO INCOLORO DE OLOR IRRITANTE
Y TOTALMENTE MISCIBLE EN AGUA.

Planteamiento del problema.

El síndrome diarreico de los lechones constituye uno de los problemas más comunes en las explotaciones porcícolas. Tiene gran número de causas entre las que se encuentran: las ingtalaciones y el manejo deficiente, la mala alimentación de la cerda y factores del medio ambiente que provocan en el lechón alteraciones de la flora normal, menor absorción de calostro e infecciones por gérmenes patógenos (Morilla, 1986).

Por lo que se ha visto la necesidad de utilizar métodos más baratos y eficaces para su control. Dentro de estos métodos se encuentra la acidificación temprana del tracto gastro-intestinal de los lechones el cual ha dado buenos resultados en el campo (Morilla, 1988).

El siguiente paso de estas investigaciones es demostrar el efecto del vinagre en infecciones controladas de Escherichia coli por lo que se plantea el motivo de este trabajo.

O B J E T I V O S

Determinar la dosis de Escherichia coli en lechones no calostrados que induzca la colibacilosis experimental.

Conocer el efecto que produce la administración de vina gre diluido 1:5 sobre la reducción de signos clínicos y la concentración de Escherichia coli en estómago y duodeno de lechones inoculados experimentalmente.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Cepa de Escherichia coli:

Se usó la cepa O100; K88ab, ST⁺ serotificada en Inglaterra y donada amablemente por la M en C. Clara Inés Alvarez de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Depto. de Microbiología Sección Posgrado.

Posteriormente para reactivar la cepa y comprobar su toxigenicidad se realizó la prueba de asa ligada en conejo.

Vinagre:

Se utilizó vinagre comercial de alcohol de caña (Herdez) diluido 1:5 en agua destilada con pH=3.04.

Animales:

Se utilizaron 32 lechones sanos de 1 día de edad sin calostroar.

Selección de la dosis de Escherichia coli:

Se usaron 12 lechones sin calostroar para elegir la concentración infectante más adecuada, para lo cual se formaron 4 grupos de 3 lechones cada uno; un grupo se utilizó como testigo administrándole por vía oral 5 ml de caldo lactosado y los restantes fueron inoculados con 5 ml de un cultivo bacteriano de 2 a 5 horas de incubación a 37°C y concentración de

10^3 , 10^5 y 10^8 UFC/ml según el nefelómetro estándar de Mc. Farland.

Desarrollo del modelo de colibacilosis experimental:

Se formaron 4 grupos experimentales y se realizaron 5 réplicas. En cada una de éstas se utilizaron 4 animales que fueron distribuidos como sigue:

Grupo I: Grupo de animales testigo que se les administró 5 ml de caldo lactosado por vía oral.

Grupo II: Grupo de animales inoculados por vía oral con 5 ml de un cultivo bacteriano de E. coli de 2 a 5 horas de incubación a 37°C con una concentración de 10^8 UFC/ml según la escala de Mc. Farland.

Grupo III: Grupo de animales testigo para el vinagre, que fueron inoculados con 5 ml de vinagre comercial con una dilución 1:5 en agua destilada con $\text{pH}=3.04$.

Grupo IV: Grupo de animales inoculados con 5 ml de E. coli de 2 a 5 horas de incubación a 37°C con una concentración de 10^8 UFC/ml según la escala de Mc. Farland y tratados a los 30 minutos con 5 ml de vinagre diluido 1:5 en agua destilada.

Parámetros clínicos:

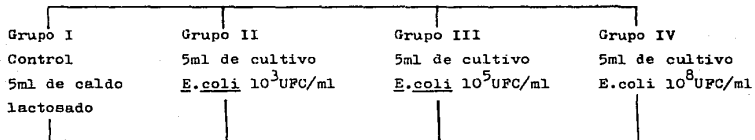
Los lechones se observaron cada 2 horas y se determinó la temperatura rectal y el grado de diarrea; para esto se midió la intensidad de ésta como leve (+), moderada (++) y fuerte (+++ ó ++++).

Los lechones se sacrificaron a las 22.00 horas, se reasoló la bacteria del contenido estomacal, mucosa estomacal y duodeno en agar MacConkey incubándose a 37°C por 24 horas, realizándose después la tinción de Gram e IMVIC para la identificación de la bacteria.

Así mismo se tomó un gramo de contenido estomacal, mucosa estomacal y duodeno para llevar acabo las diluciones seriadas de cada muestra en caldo lactosado incubándose a 37°C durante 24 horas y realizando por duplicado el conteo en placa.

Selección de la dosis infectante de Escherichia coli

12 lechones sin calostro



Observación de signos clínicos y aislamiento de la bacteria

Tinción de Gram

Pruebas bioquímicas

Desarrollo del modelo de colibacilosis experimental

Grupo I
4 animales
5ml caldo
lactosado
vía oral

Grupo II
4 animales
5ml cultivo
E.coli 10⁸ UFC/ml

Grupo III
4 animales
5ml vinagre
1:5 pH=3.04

Grupo IV
4 animales
5ml cultivo
E.coli 10⁸UFC/ml

30 min. adm.
5ml vinagre
1:5 pH=3.04

Observación de signos clínicos y temperatura cada 2 hrs.

Sacrificio de animales

Aislamiento de C.E., M.E. y D.
en A. MacConkey

37°C/24hrs

Tinción de Gram

IMVIC

1 g de C.E., M.E. y D.
diluciones seriadas en
caldo lactosado

37°C/24hrs.

Selección de dilución óptima

Alicuotas 1ml + 20ml A.
MacConkey por duplicado.

Conteo del no. de colonias

R E S U L T A D O S

Los resultados para seleccionar la dosis de E. coli se muestran en la tabla 2. Se puede apreciar que la dosis fué 10^3 UFC/ml siendo la que desarrollo los signos clínicos en forma consistente concordando con lo reportado en la bibliografía.

En la tabla y figura 3 se presenta la temperatura rectal en ($^{\circ}$ C) promedio, de los diferentes grupos de animales. Se observa que los lechones tratados con vinagre 1:5 presentaron hipotermia pero no fué tan marcada como en los inoculados sólo con la bacteria durante las últimas horas de experimentación. La hipotermia se debe a la hipoglucemia presente en lechones menores de 6 días de edad, ya que la glucosa desciende de sus valores normales como resultado de agaláctea.

La tabla 4 muestra la sumatoria total del grado de diarrea al cual se le dan signos positivos para asignarle un valor de leve (+), moderado (++) y fuerte (+++ ó ++++), en lechones inoculados con E. coli (10^8 UFC/ml = 5ml) y tratados con vinagre 1:5. Los inoculados con E. coli presentan una mayor intensidad en comparación con los tratados con vinagre.

Así mismo en la figura 4 se muestra la intensidad de diarreas en los lechones inoculados con E. coli y tratados con vinagre, mostrándose una disminución en estos últimos, ya que la acidificación es un factor importante para aumentar el número de lactobacilos presentes en la flora normal que son productores de sustancias bactericidas como son las lactocidinas, ácidos orgánicos, H_2O_2 , etc. que favorecen la eliminación de microorganismos patógenos.

Con respecto al IMVIC resultó ser el característico para

la identificación de Escherichia coli.

En la tabla y figura 5 se muestran los resultados en relación logarítmica de concentración de los conteos bacterianos de mucosa estomacal, contenido estomacal y duodeno de cada grupo, tomándose como dosis que puede llegar a causar infección una concentración de $\geq 10^8$ UFC/ml utilizando el método en placa. Se observó que en el grupo de inoculados con E. coli se encuentran valores por arriba de la dosis que causa infección en comparación con el grupo de inoculados con E. coli y tratados con vinagre que muestra una ligera reducción en cuanto al número de bacterias. Con respecto a los testigos se encontró en su mayoría valores menores, aunque también hubo algunos que fueron $\geq 10^8$ UFC/ml, esto se debe tal vez a las condiciones de manejo durante el nacimiento, además de considerar el número de E. coli saprófitas con el que cuentan.

En la tabla 6 se muestra el número total de lechones por grupo que presentaron un conteo $\geq 10^8$ UFC/ml, describiendo con más claridad que los lechones inoculados con E. coli muestran en un 100% el desarrollo de la infección, un 40% para el grupo de E. coli-vinagre, mientras que los controles muestran una disminución respectivamente.

Tabla 2. Selección de la dosis infectante más adecuada

Animal No.	Dosis <u>E.coli</u> UFC/ml	Signos clínicos				
		Vómito	Diarrea	Deshidratación	Pelo hirsuto	Postración
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	10^3	-	-	+/-	-	-
5	10^3	-	-	-	-	-
6	10^3	-	-	+/-	-	-
7	10^5	-	+/-	+	+	+
8	10^5	-	-	+	+/-	+
9	10^5	-	+	+	+/-	+
10	10^8	-	+++	+++	++	+++
11	10^8	+/-	++++	+++	++	+++
12	10^8	-	+++	+++	++	+++

Tabla 3. Temperatura rectal en ($^{\circ}\text{C}$) promedio (\pm error estándar) correspondientes a cada uno de los grupos experimentales en que fueron distribuidos los 20 animales.

Horas	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Posinoculación	Testigo	<u>E. coli</u>	Vinagre	<u>E.coli</u> - vinagre
0				
4	38.1 \pm 0.137	37.7 \pm 0.369	38.4 \pm 0.342	37.7 \pm 0.246
6	38.0 \pm 0.234	37.9 \pm 0.466	38.7 \pm 0.506	38.4 \pm 0.095
8	38.0 \pm 0.248	38.3 \pm 0.217	38.6 \pm 0.363	38.2 \pm 0.249
10	38.4 \pm 0.295	37.9 \pm 0.278	38.5 \pm 0.118	38.2 \pm 0.325
12	38.4 \pm 0.144	37.8 \pm 0.396	38.4 \pm 0.050	38.2 \pm 0.347
14	38.3 \pm 0.155	37.8 \pm 0.379	38.4 \pm 0.047	38.1 \pm 0.487
16	38.1 \pm 0.075	37.4 \pm 0.025	38.4 \pm 0.119	37.9 \pm 0.319
18	38.1 \pm 0.095	37.3 \pm 0.285	38.6 \pm 0.175	37.5 \pm 0.190
20	38.3 \pm 0.119	37.0 \pm 0.163	38.5 \pm 0.040	37.5 \pm 0.108
22	38.4 \pm 0.108	36.7 \pm 0.119	38.5 \pm 0.085	37.3 \pm 0.155

Tabla 4. (Σ) del grado de diarrea que presentaron los lechones inoculados con Escherichia coli (10^8 UFC/ml = 5ml) y tratados con vinagre diluido en agua 1:5.

Horas	Grupo II	Grupo IV
Posinoculación	E. coli	E. coli-vinagre
0	-	-
2	-	-
4	-	-
6	-	-
8	-	-
10	1(a)	1
12	7	8
14	11	8
16	15	11
18	13	8
20	11	4

(a) El número representa la suma total que se da por signos positivos para asignar un valor de leve (+), moderado (++) y fuerte (+++ ó ++++) presentes en todos los lechones de cada grupo por períodos de 2 horas.

Tabla 5. Promedio de los conteos bacterianos hechos en el estómago y duodeno en los 4 grupos de animales.

Organo	Testigo	E. coli	Vinagre	E. coli-vinagre
M.E.	4.0×10^8	7.6×10^{14}	--	--
C.E.	--	1.4×10^{19}	--	--
D.	2.1×10^9	1.8×10^{18}	--	1.6×10^{18}
M.E.	--	4.0×10^{14}	--	--
C.E.	--	9.5×10^{13}	--	--
D.	--	5.3×10^{14}	--	--
M.E.	--	1.4×10^{19}	--	7.2×10^{20}
C.E.	3.2×10^9	1.1×10^{21}	--	8.5×10^{19}
D.	--	6.8×10^{18}	--	--
M.E.	--	6.6×10^{17}	--	5.6×10^{20}
C.E.	--	3.0×10^{20}	--	3.5×10^{19}
D.	--	6.7×10^{17}	--	2.6×10^{16}
M.E.		7.3×10^{18}	--	--
C.E.		9.0×10^{19}	--	--
D.		6.5×10^{21}	--	--

M.E. = mucosa estomacal

C.E. = contenido estomacal

D. = duodeno

Tabla 6. Resultados del conteo bacteriano en diferentes órganos de lechones inoculados con Escherichia coli y tratados con vinagre 1:5 (a).

Organo	Testigo	Aislamientos		
		<u>E.coli</u>	Vinagre	<u>E.coli-vinagre</u>
Mucosa				
estomacal	1/5(b)	5/5	0/5	2/5
Contenido				
estomacal	1/5	5/5	0/5	2/5
Duodeno	1/5	5/5	0/5	2/5

- (a) Se consideró como positivo cuando se aisló E. coli a una concentración bacteriana de 10^8 UFC/ml o más.
- (b) Positivo/Número de lechones.

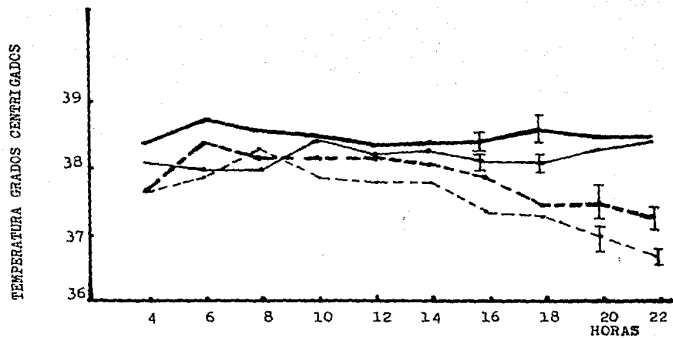


Figura 3. Temperatura rectal de lechones inoculados con Escherichia coli.

Tratamientos: ——— Testigo
 - - - - Escherichia coli
 ——— Testigo vinagre
 - - - - Escherichia coli-vinagre

GRADO DE DIARREA

El número representa la suma total que se da por signos positivos para asignar un valor de leve (+), moderado (++) y fuerte (+++ ó ++++) presentes en todos los lechones de cada grupo por períodos de 2 horas.

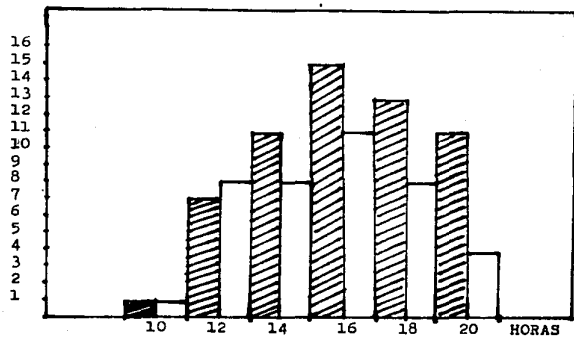




Figura 4. Intensidad de la diarrea en lechones inoculados con Escherichia coli y tratados con vinagre (1:5) pH=3.04

Tratamiento:  Escherichia coli
 Escherichia coli-vinagre

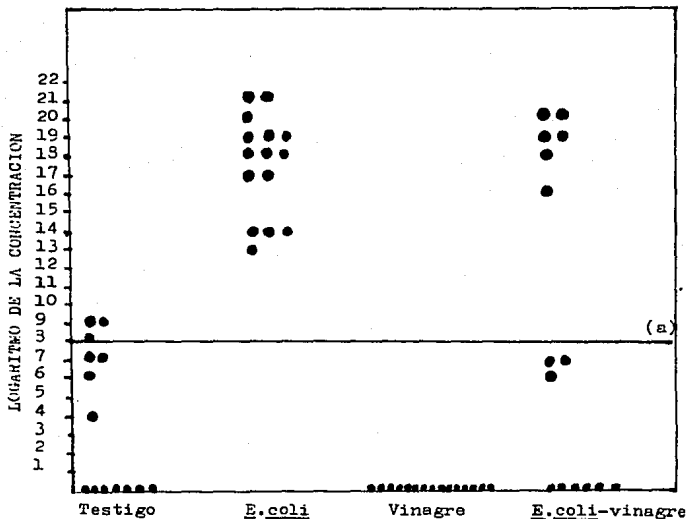


Figura 5. Resultados del conteo bacteriano de mucosa estomacal, contenido estomacal y duodeno de cada grupo estudiado.

- (a) Una concentración bacteriana de 10^8 más se considera como índice de enterotoxigenicidad (Parry y Rooke, 1985; Smith, *et al.*, 1985; Sussman, 1985).

D I S C U S I O N

En algunas granjas el vinagre diluido 1:5 se ha utilizado empíricamente para controlar la diarrea de los cerdos con buenos resultados pues disminuye en aproximadamente de las veces la incidencia de diarrea en los lechones (Morilla, 1988).

Para tratar de determinar a que nivel el vinagre controla la diarrea se estableció un modelo de colibacilosis experimental y se determinó el efecto del vinagre diluido 1:5 pH= 3.04.

La infección por E. coli K88 enterotóxica provocó un cuadro clínico de colibacilosis que se presenta con decaimiento, pelo hirsuto, un chillido agudo, falta de apetito, deshidratación, postración, diarrea a partir de las 6 horas después de la dosis infectante e hipotermia (Kohler y Bohl, 1964; Arbuckle, 1970; Hornich, et al., 1973; Martínez, 1986).

El efecto del vinagre administrado 30 minutos después de la infección con E. coli probablemente ayuda a que se establezca en mejores condiciones la flora normal y ésta es la que va a impedir la colonización por gérmenes patógenos (Mendoza, et al., 1987).

La flora normal compete por nutrientes y espacio produce antibióticos y baja el pH del estómago e intestino, por lo que algunos microorganismos patógenos como E. coli no pueden multiplicarse (Rubin y Vaughan, 1979; Gulliland, et al., 1980; Miller y Watkins, 1980; Vázquez, et al., 1983), es por esto que se muestra una disminución de los signos clínicos. Esto se manifiesta en la temperatura rectal y el grado de diarrea de los lechones inoculados con E. coli y tratados con vinagre,

Pues aunque presentaron los mismos signos clínicos e hipotermia que los inoculados sólo con E. coli a partir de las 16 horas se empezaron a recuperar.

Los aislamientos bacterianos reafirman que el vinagre ayudó a reducir la concentración bacteriana en los animales tratados a comparación con los no tratados. Pues cuando se tomó como parámetro de aislamiento la concentración de 10^8 UFC/ml que se considera como índice de enterotoxigenicidad para E. coli los lechones tratados con vinagre tuvieron menor cuenta bacteriana (Farry y Rooke, 1985; Smith, et al., 1985; Sussman, 1995).

En cuanto al método en placa utilizado para realizar las cuentas bacterianas resulta ser sensible, ampliamente usado y permite trabajar tanto con muestras pequeñas como grandes, además de que es más exacto que el método de número más probable (NMP) debido a que las colonias son visibles (Freeman, 1934).

Se seleccionó el uso de lechones no calostrados para eliminar el efecto del calostro ya que estudios previos muestran que lechones calostrados responden de diferente manera a la infección experimental con E. coli incluso algunos no enfermaban. Además de que el efecto observado fué sólo al vinagre y es de esperarse que en el campo tenga un efecto aditivo junto con el calostro ya que este proporciona protección de tipo sistémica y además de tipo local ya que tiene un pH de 5.5 a 6.0 y posee factores estimulantes de la proliferación de las bacterias acidificantes (lactobacilos) que ayudan a estable-

cer la flora normal (Davis, et al., 1978; Puchal, 1984; Mendoza, et al., 1987).

De este estudio de laboratorio se concluye que el uso del vinagre diluido administrado en el lechón recién nacido ayuda a controlar la infección por E. coli y como se ha observado en el campo, ayuda a disminuir la diarrea en los cerdos durante la lactancia.

C O N C L U S I O N E S

Tomandose como base los objetivos planteados, y una vez que se ha hecho el respectivo análisis de resultados obtenidos en este experimento podemos concluir lo siguiente:

- Se comprobó que la dosis infectante fué 10^8 UFC/ml considerando la óptima para desarrollar la colibacilosis en lechones sin calostrear.
- El vinagre inhibe la proliferación de gérmenes patógenos debido a que disminuye el pH ayudando a la implantación y desarrollo de lactobacilos, acidifica el tracto digestivo de los lechones no calostrados impidiendo la colonización de Escherichia coli enterotoxigénica sensible al pH bajo y además estimulan la multiplicación de la flora normal.
- El vinagre no solamente puede ser usado como preventivo sino también para disminuir la frecuencia de los lechones diarreico.
- Económicamente el tratamiento con vinagre es de un costo muy bajo comparado con los antibióticos, bacterinas, lactobacilos o yogurt.

B I B L I O G R A F I A

1. Arbuckle, R.B., 1970, The localization of E. coli in the pig intestine. J. Med Microbiol., 3:333-40.
2. Bijlsman, I.G.W., de Nijs, A., and Frik, J.F., 1981, Adherence of E. coli to porcine intestinal brush borders by means of serological variants of the K88 antigen. Antonie Van Leeuwenhoek., 47:467-68.
3. Bijlsman, I.G.W., de Nijs, A., Vander Keer and Frik, J.F., 1982, Different pig phenotype affect adherence of E. coli to jejunal brush borders by K88ab, K88ac or K88ad antigen. Infec. Immun., 37:891-94.
4. Bourne, P.J., and Curtis, J., 1973, The transfer of Immuno globin IgA, IgG and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. Immunol., 24:119-27.
5. Bullen, J.J., Rogers, J.H., and Griffiths, E., 1978, Role in iron in bacterial infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 30:1-35.
6. Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullen, N.A., and Newsome, P.M., 1978, Biological evaluation of a methanol-soluble heat-stable E. coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbit and calves. Infect. Immun., 21:526-31.
7. Charbert, D., Giorgio, B., 1987, Study of organic acids in vinegar by ion exclusion liquid chromatography. Annales des falsifications dél expertise chimique et toxicologique. 80:259-67.
8. Chidlow, J.M. and Porter, P., 1979, Intestinal defence of the neonatal pig: Interrelationship of gut and mammary function providing surface immunity against colibacillosis.

- Vet. Rec., 104:496-500.
9. Cravioto, A., Scotland, M., and Rowe, B., 1982, Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. Infect. Immun., 36:189-97.
 10. Davis, D.B., Dulbeco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H. y Wood, B.W., 1973, Tratado de Microbiología. 2a. ed., Edit. Salvat, S.A. p. 778-826.
 11. Donald, J.K., Greenberg, N.R., Dunn, A.J., Albernathy, R., Ryerse, S.J., and Guerrant, I.R., 1984, Effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxigenic STb on intestines of mice, rats, rabbits and piglets. Infect. Immun., 46:639-47.
 12. Dunne, W.H., 1970, Diseases of swine. Edited by Howard. W. Dunne. University Press. Ames, Iowa, U.S.A. Third edition, p. 177-239.
 13. Eliassen, A., 1984, Aplicación de la ingeniería genética en la prevención de la colibacilosis entérica. Porcicultura, 106:5-10.
 14. Escamilla, F., Soto, F. y Giono, S., 1977, Colibacilosis en cerdos, aislamientos de cepas de Escherichia coli dentro del área del Valle de México, serotipificación, pruebas de virulencia y sensibilidad a antibióticos y agentes quimioterapéuticos. XIV Reunión Anual INIP, SARH.
 15. Freeman, A.B., 1984, Desarrollo de la bacteria. Tratado de Microbiología de Burrows. 21a. ed., Edit. Interamericana, p. 121-155.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

16. Gangarosa, J.E., 1978, Epidemiology of Escherichia coli in the USA. J. Infect. Dis., 137:634-38.
17. Giannella, M.D., and Ralph, A. 1981, Patogenesis of acute diarrheal disorders. Ann. Rev. Med., 32:341-57.
18. Goldman, S.A. and Smith, W.C., 1973, Host resistance factors in human milk. J. Pediatrics., 82:1082-90.
19. Goodman, G.A., Goodman, S.L. y Gilman, A., 1981, Antisépticos, desinfectantes, fungicidas y ectoparásitos. Basas Farmacológicas de la Terapéutica. 6a. ed., Edit. Panamericana, p. 719-24.
20. Gorbach, L.S., 1978, Recombinant DNA; and infectious disease perspective. J. Infect. Dis., 137:615-23.
21. Guerrant, L., Hughes, M., Chang, B., Robertson, C., and Murad, F., 1980, Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: studies of tissue specificity potential receptors. J. Infect. Dis., 42:220-28.
22. Guinné, P.A.M., Jansen, W.H., 1979, Behaviour of Escherichia coli K antigens, K88ab, K88ac and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and hemagglutination. Infect. Immun., 23:700-05.
23. Gulliland, S.E., Bruce, B.B., Brush, L.J. and Staley, T.E., 1980, Comparison of strains of lactobacillus acidophilus as dietary adjuncts for young calves. J. Dairy Sci., 63: 364-72.
24. Holmgren, J., Suennerholm, M., and Ahren, C., 1981, Non immunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial

- adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of Escherichia coli and V. cholerae. Infect. Immun., 33:136-41.
25. Holmgreen, J., 1985, Toxins affecting intestinal transport processes, The virulence of Escherichia coli. 1a. ed., Edit. by Sussman, M., p. 177-91.
26. Hornich, M., Salajka, E., Ulmann, L., Sarmanova, Z., and Sedalecék, M., 1973, Enteric Escherichia coli infections. Vet. Path., 10:484-500.
27. Jann, K., and Jann, B., 1982, The K antigens of Escherichia coli. Progress in Allergy., 33:53-79.
28. Jann, K., and Jann, B., 1985, Cell surface components and virulence and pathogenicity. The virulence of Escherichia coli C and K antigens in relation to virulence and pathogenicity. The virulence of Escherichia coli. 1a. ed., Edit. by Sussman, M., p. 157-76.
29. Klipstein, A.F., Engert, F.R., and Clements, D.J., 1982, Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against Escherichia coli producing either enterotoxin. Infect. Immun., 36: 550-57.
30. Kohler, M.E., Bohl, H.E., 1964, Prophylaxis of diarrhea in newborn pigs. JAVMA., 144:1294-1297.
31. Kohler, E.M., Cross, R.F., and Bohl, E.H., 1975, Protection against neonatal enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinates sow. Am. J. Vet. Res., 36:757-62.
32. Kolsto, A., Laegreid, A., and Erthesvag, K., 1983, Inhibition of enterotoxin from Escherichia coli and V. cholerae

- by gangliosides from human milk. Am. Society for Microbiol. 40:563-69.
33. Koneman, W.E., Allen, D.S., Dowell, R.V., and Sommers, M.H. 1985, Enterobacterias. Diagnóstico Microbiológico. 1a. ed. Edit., Medica Panamericana S.A., p. 152-185.
34. Konowalchuk, J., Speirs, J., and Stavrie, S., 1977, Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun., 18:775-779.
35. Levine, M.M., Rennels, B., and Daya, V., 1980, Hemagglutination and colonization factors in Enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli cause diarrhea. J. Infect. Dis., 141:733-37.
36. Linton, H.A., and Hinton, H.M., 1988, Enterobacteriaceae associated whit animals in health and disease. J. Applied Bacteriology. Symposium Suppl., 71S-85S.
37. Maqueda, J.J., 1988, Sistemas de control de colibacilosis neonatal. Tecnología Agropecuaria., 5:27-30.
38. Martínez, R., 1986, Diarrea en cerdos lactantes. Síntesis porcina., 1:8-20.
39. Mc Faddin, J.F., 1976, Biochemical test for identification of medical bacteria. Baltimore, Edit., Williams &Wilkins.
40. Mendoza, A., Vega, M.C. y Norilla, A., 1987, Uso de acidificantes en la prevención del síndrome diarreico en lechones. Veterinaria (Mex.), 18:65-68.
41. Willer, B., and Watkins, B., 1980, Gut ecology and health implications. Dairy Council Digest., 50:13-17.
42. Mizrahi, L.M. y Muñoz, H.O., 1984, Infecciones entéricas:

- fisiopatología y tratamiento de sus complicaciones. 2a. ed., Edit. Manual Moderno, p. 3-23.
43. Moon, H.W., Naggy, B., Isaacson, R.E. and Ørskov, I., 1977, Occurrence of K99 antigen on Escherichia coli isolated from pigs and colonization of ileum by K99⁺ enterotoxigenic Escherichia coli from calves and pigs. Infect. Immun., 15: 614-20.
 44. Morilla, A., 1983, Mecanismo de resistencia del lechón. Porciram, 95:58-64.
 45. Morilla, A., 1986, El síndrome diarreico de los lechones. Porciram, 116:16-25.
 46. Morilla, A., 1988, Vinagre diluido y el síndrome diarreico en lechones. Técnica pecuaria, 1:22-27.
 47. Morris, A.J., Thorns, C.J., and Boarer, C., 1985, Evaluation of a monoclonal antibody to the K99 fimbrial adhesion producer by Escherichia coli enterotoxigenic for calves, lambs and piglets. Res. Vet. Sci., 39:75-80.
 48. Morris, A.J., Thorns, C.J., Scott, C.A., Sojka, J.W. and Well, A.C., 1982, Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain Escherichia coli B41. Infect. Immun., 36:146-53.
 49. Nielsen, N.C., Moon, H.W. and Rowe, W.E., 1968, Colibacillosis enteric in swine. JAVMA, 153:1590-1606.
 50. Ondarza, N.R., 1984, Anticuerpos: la inmunología y la enfermedad. Biología Moderna. 8a. ed., Edit. Trillas. p. 91-100.

51. Ørskov, I., Ørskov, F., Sojka, W.J. and Witting, W., 1964, antigens K83ab (L) and antigens K88ac (L) in Escherichia coli a new O antigen Cl47 and a new K antigen: K99(B) . Acta pathologic et Microbiologica Scandinava, 62:439-47.
52. Ørskov, I. and Ørskov, F., 1966, Episome carried surface antigen K88 of Escherichia coli transmission of the determinant of the K88 antigen and its influence on the transfer of chromosomal markers. J. of Bacteriol., 91:69-75.
53. Parry, H.S., and Rooke, M.D., 1985, Adhesins and colonization factors of Escherichia coli. The virulence of Escherichia coli. 1a. ed., Edit. by Sussman, M., p. 79-155.
54. Pijoán, A.C. y Necoechea, R.R., 1982, Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Publicado por Pijoán, A.C. y Necoechea, R.R., p. 110-117 y 485-90.
55. Puchal, N.F., 1984, Estado actual de los acidificantes en nutrición porcina. Porcitrama, 101:31-50.
56. Raskova, H. and Raska, K., 1980, Enterotoxins from gram-negative bacteria relevant for veterinary medicine. Vet. Res. Comm., 4:195-224.
57. Riestschel, E.T., Schade, U., Jensen, N., Wollen, Weber, H.W., Lüderitz, C. and Greisman, S.G., 1982, Bacterial endotoxin: chemical structure biological activity and role in septicemia. Scandinavian J. Infect. Dis. Supp., 31:8-21.
58. Robbins, J.b., Schneerson, E., Egan, W., Wann, W. and Liu, D.T., 1980, Virulence properties of bacterial capsular polysaccharides unanswered question. In the Molecular Bases of Microbiol Pathogenicity. Edit. by Smith, H., Skene,

- J.J. and Turner, M.J. p. 115-32.
59. Rosales, C.C., Correa, E.A., Morilla, A., Nieto, C.E., Muñoz, R.A. y Aceves, A., 1983, Efecto del yogurt y un preparado de bacterias acidificantes sobre las diarreas de los lechones. Tec. Pec. Mex., 45:80-86.
 60. Rubin, E.H. and Vaughan, F., 1979, Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against Salmonella typhimurium, J. Dairy Sci., 62:1973-79.
 61. Russel, A.D., Hugo, W.B. and G.A.J., 1982, Types of antimicrobial agents. Principles and practice on disinfection preservation and sterilization. Blacwel scientific publication. London Edinburg Boston Melbourne. p. 8-106.
 62. Sandine, W.E., 1979, Role of Lactobacillus in the intestinal tract. J. Food. Prot., 42:259-63.
 63. Scotland, M.S., 1988, Toxins. J. App. Bact. Supp., 109S-129S.
 64. Sherman, C.J., Parkin, M.D., Mc. Clelland?L.B.D., 1972, The demonstration and function of antibodies in the gastro intestinal tract., Gut., 13:483-99.
 65. Sherman, D.M., Acres, S.D., Sadowsk, P.L. and Muscoplat, C.C., 1982, Protection of calves against enteropathogenic colibacillosis by oral administered K99 specific monoclonal antibody. In Abstracts of the 63rd Annual Meetig of the Conference of Research Works in animal Diseases, Chicago. p.44.
 66. Smith, T., Conant, D., Norman, F. and Willeh, P.H., 1968, Microbiología de Zinsser. 14a. ed. p. 764-83.

67. Smith, R.H., Scotland, N.S. and Rowe, B., 1935, Genetics of Escherichia coli virulence. The virulence of Escherichia coli . 1a. ed., Edit. by Sussman, M. p. 227-43.
68. Stuart, J.S., Greenwood, T.K., and Luke, J.K.R., 1982, Iron supresible production of hidroxomate by Escherichia coli isolates. Infect. Immun., 36:870-75.
69. Sussman, M., 1985 Escherichia coli in human and animal di seases. The virulence of Escherichia coli. 1a. ed., Edit by Sussman, M. p. 7-45.
70. Uruchurtu, M.A. and Doporto, M.J., 1975, Mortalidad de los lechones. Vet. Mex., 6:96-106.
71. Vázquez, M.R., Vázouez, R.F. y Padilla, P.M., 1938, Ecolo gía del tracto gastrointestinal. AMVEC, p. 236-40.
72. Weaver, A.E., Goldblum, M.R., Davis, P.C. and Goldman, S.A., 1981. Enhanced immunoglobulin A release from human colostral cells during phagocytosis, Infect. Immun., 34: 493-502.
73. Welliver, C.R., Percy, M.D. and Ogra, L.M., 1978, Impor tance of immunity in enteric infection. JAVMA, 173:560-64.
74. Wiesman, E., 1982, Microbiología Médica. 2a ed., Edit. Salvat, p. 24-25.
75. Zepeda, L.H., 1931, Determinación de enterotoxina LT y citotoxina VT en cepas de Escherichia coli en células Vero. Tesis de licenciatura de la ENCB.