



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIAGNOSTICO DE COLIBACILOSIS NEONATAL
PORCINA MEDIANTE LA PRUEBA DE
CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P O R
JOSE FERNANDO HUGO HERNANDEZ RODRIGUEZ

ASESORES: M.V.Z.M.Sc. FERNANDO OLGUIN ROMERO
M.V.Z. ANGEL RETANA REYES

MEXICO, D. F.

1982

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS	10
DISCUSION	14
LITERATURA CITADA	17
FIGURAS	20
CUADRO	30
GRAFICA	31

RESUMEN

HERNANDEZ RODRIGUEZ JOSE FERNANDO HUGO. Diagnóstico de colibacilosis neonatal porcina, mediante la prueba de contraímmunoelectroforesis. (Bajo la dirección de: los Mm. Vv. Zz. Fernando Olguín Romero y Angel Retana Reyes).

El sobrenadante que resultó después de la centrifugación de un cultivo de E. coli* se precipitó con sulfato de amonio y posteriormente las proteínas precipitadas se pasaron por columna cromatográfica de Sepharose 2B a una velocidad de 2.7 ml. por minuto. Se obtuvieron tres picos, los cuales según su peso molecular se consideraron como la enterotoxina LT al pico 1 (peso molecular mayor de 1×10^7) y como el antígeno K88 al pico 3. El pico 2 se descartó porque su peso molecular no correspondía a ninguna molécula de actividad biológica conocida. Las fracciones fueron inoculadas en conejos para producir sueros hiperinmunes. Los antisueros se sometieron a evaluación mediante pruebas de precipitación, inmunolectroforesis y contraímmunoelectroforesis, confrontándose con cepas conocidas de E. coli enteropatógenas y no enteropatógenas. Los resultados de las pruebas serológicas fueron confirmados con la prueba biológica de asa ligada y con la prueba fisicoquímica de electroforesis en gel de poliacrilamida.

En este estudio se purificó la toxina termolábil y se produjo un antisuero mono-específico contra esta fracción, mediante el cual se pueden identificar fácilmente las cepas enteropatógenas y establecer un diagnóstico rápido y específico de colibacilosis neonatal porcina, mediante la técnica de contraímmunoelectroforesis.

(*) Serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀

INTRODUCCION

Se denomina colibacilosis, a un grupo de enfermedades causadas por la infección con Escherichia coli; este es un término que designa - manifestaciones tanto entéricas como sistémicas en niños, lechones, becerros, corderos, aves, perros y animales silvestres (3,5,9). En los cerdos la colibacilosis se manifiesta principalmente por cuatro síndromes: Diarrea del recién nacido; Diarrea a las tres semanas de edad, Diarrea al destete y Enfermedad del edema (12, 14, 17).

La relevancia económica de la colibacilosis en los cerdos se ha puesto de manifiesto en varios estudios en diversos países incluyendo el nuestro (12, 17, 20, 21). Todos ellos coinciden en señalar -- que la colibacilosis del recién nacido es la presentación más frecuente y de mayor trascendencia económica, por las pérdidas que ocasiona.

El diagnóstico preciso de la colibacilosis requiere de por lo menos tres días para obtener resultados confiables y consiste en: 1) aislamiento de bacterias de contenido duodenal, cuando se sacrifican los animales o cuando no tengan más de dos horas de muertos; 2) la siembra en medio de cultivo para E. coli y 3) la prueba de toxigenidad en asa ligada de intestino de lechón o conejo y la realizada en ratón lactante (4). Todo lo anterior resulta costoso y tardado -- no sólo por los reactivos, sino por el uso de animales de laboratorio. Si se quiere hacer un tratamiento específico, se corre el riesgo de sufrir grandes pérdidas por la tardanza en los resultados. En nuestro medio no existe un diagnóstico que se ajuste a las condiciones y necesidades reales de campo, esto es, que sea confiable, rápido, económico y fácil de llevar a cabo.

E. coli cuenta con tres tipos de antígenos; O (somático), K (capsulares) y H (flagelares). El determinante antigénico O está localizado en la porción polisacárida de la membrana externa. Los antígenos K se encuentran rodeando a las células a manera de envoltura, o -- bien, como cápsula rudimentaria y son polisacáridos, existiendo una excepción: el antígeno K88 de naturaleza protéica que existe en forma de pelos o fimbria. Los antígenos H son moléculas de proteína --

que se encuentran en los flagelos (3, 6, 9, 12). Según Howard et. al. (9) y López Alvarez (12), existen 153 grupos de antígenos O de E. coli, 91 antígenos K y 51 grupos de antígenos H reconocidos internacionalmente. Se denomina "serotipo" cuando los tres grupos de antígenos están presentes en una cepa y "serogrupo" cuando no se expresan los antígenos K o H (12).

Mediante exámenes serológicos, se ha determinado que un número pequeño de serogrupos, se encuentran involucrados en las infecciones entéricas de los lechones (12, 16). Estos serogrupos poseen un tipo de antígeno K denominado K88, el cual es indicativo de la enteropatógenicidad (6, 8). Este antígeno, tiene propiedades adhesivas en el epitelio intestinal del lechón, que parecen ser esenciales para la virulencia de las cepas que lo poseen (6, 12, 17, 22). También la habilidad de producir enterotoxina por parte de la bacteria parece ser un requisito para la enteropatógenicidad de la misma (12). Las cepas enteropatógenas producen una toxina termoestable (ST) y otra termolábil (LT). La producción de ambos tipos de enterotoxina está controlada por plásmidos transmisibles (6, 9, 12). La enterotoxina termoestable es básicamente extracelular, tiene un peso molecular bajo de 5000 y no es antigénica; la enterotoxina termolábil es intracelular, posee un elevado peso molecular mayor de 1 000 000 y es antigénica. Ambas se obtienen del sobrenadante de cultivos en caldo de cepas enteropatógenas de E. coli (9, 12, 16, 19, 23). Según Gastra y de Graaf (6) las cepas enterotoxigénicas de E. coli del cerdo se han clasificado en dos categorías: a) las que producen sólo la toxina termoestable y b) las productoras de ambas toxinas. Guinée y Jansen (6), señalan que 37 de 52 cepas de E. coli K88 positivas, produjeron sólo la toxina termolábil y las otras 15 produjeron ambas. Igualmente Renault et. al. (16), confirmaron la asociación entre la presencia del antígeno K88 y la enterotoxina termolábil para la mayoría de las cepas enteropatógenas de E. coli de los cerdos.

Además del antígeno K88 adherente específico de cerdos, existen otros dos factores de adherencia para esta especie; son los antígenos 987P y el K99 (6). Ambos se presentan menos frecuentemente que-

el K88 en cepas enteropatógenas y son principalmente producidas por cepas productoras de la toxina termoestable (6, 8, 13).

La técnica de contrainmunolectroforesis permite identificar antígenos o anticuerpos específicos en muy corto tiempo, siempre y cuando se tengan en el laboratorio los reactivos conocidos. Consiste en -- aplicar la corriente eléctrica en un medio semisólido como el agar para que se separen los componentes de los reactivos (antígenos y anticuerpos) y estos reaccionen específicamente en un corto tiempo (10, 15). En esta técnica se coloca el antígeno en los pozos del lado izquierdo (cátodo) y el antisuero en los pozos del lado derecho (ánodo) en el agar. Los anticuerpos se desplazan hacia el cátodo, ya que el agar es recorrido por una corriente de amortiguador en dirección del cátodo.

Se pueden preparar sueros específicos contra un microorganismo determinado o contra partes de dicho microorganismo, y con él, identificarlo cuando se encuentren en un cultivo, en una suspensión tisular o en excretas como material fecal. Esta identificación puede -- ser realizada en aproximadamente dos a cuatro horas (10, 15).

HIPOTESIS

Mediante la producción de sueros hiperinmunes monoespecíficos contra el antígeno K88 y/o la toxina termolábil (LT) de E. coli, es posible diagnosticar la diarrea neonatal en cerdos, empleando la técnica de contraimmunoelectroforesis, dado que ambos antígenos se encuentran asociados en la mayoría de los casos a las cepas enteropatógenas de E. coli que afectan al lechón en esta etapa.

OBJETIVO

Elaboración de sueros hiperinmunes monoespecíficos, contra el antígeno K88 y la enterotoxina termolábil (LT) de E. coli, que serán utilizados para la identificación de cepas enteropatógenas, causantes de diarrea neonatal en cerdos, mediante la técnica de contraimmunoelectroforesis.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS: Para este trabajo se emplearon distintas cepas-- de E. coli enteropatógenas y no enteropatógenas.

Varias cepas de E. coli proporcionadas y clasificadas como enteropa-- tógenas y no enteropatógenas por el Departamento de Producción Ani-- mal: Cerdos de la F.M.V.Z. Estas sirvieron también para hacer ensa-- yos de evaluación, así como 6 cepas más aisladas de casos clínicos-- de diarrea neonatal en lechones.

CEPA PROTOTIPO: La cepa de E. coli (P155, serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈-H₁₀)* se usó como control positivo para las pruebas de diagnóstico-- así como para preparar un suero hiperinmune.

CONSERVACION Y CULTIVO: La E. coli, cepa P155, fue almacenada en re-- frigeración a 4°C en un medio de agar triptosa inclinada, y se re-- sembró cada 2 meses (3,**).

OBTENCION DE TOXINA Y FACTOR DE ADHERENCIA: Se usó la técnica de Sö-- derlind et. al. (19) que consiste en que una vez transcurrido 18 a-- 24 horas de incubación de la bacteria en caldo triptosa, el cultivo se centrifuga a 8000 g. durante 20 minutos. Recuperándose posterior-- mente el sobrenadante que contiene tanto el antígeno K88 como la to-- xina LT.

PRECIPITACION DE PROTEINA BACTERIANA: El sobrenadante se precipitó-- con sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ al 100% de saturación a volúmenes - iguales, durante 30 minutos en agitación constante y a 4°C. El pre-- cipitado fué centrifugado a 8000 g. durante 20'.

DIALISIS: El precipitado fue resuspendido en 5 ml. de solución sali-- na fisiológica estéril y se sometió a diálisis utilizando una mem-- brana de celofán*** con poro uniforme que permite el paso de molécu--

(*) Gentilmente donada por Laboratorios SERVA, S.A.

(**) Q.F.B. Beatriz B. de Unzueta, comunicación personal.

(***) Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Inc.

las menores de 10 a 12 mil Daltons de peso molecular. La diálisis-- se llevó a cabo contra solución salina fisiológica al 0.85% a pH -- 7.0 que se ajustó con HCl 1N o NaOH 1N. El líquido se cambió cada - 24 h, 6 veces y el proceso se mantuvo a 4°C. Una vez eliminado el - exceso de sulfato de amonio la muestra se sometió a cromatografía. CROMATOLOGRAFIA: Se utilizó una columna de Sepharose 2B* de 60 X 2.5- cm equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a - pH 7.2. La muestra se hizo correr por la columna a una velocidad de 2.7 ml por minuto (90 gotas por minuto) (19).

PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES CONTRA PROTEINAS DE E. coli (TOXI NA Y K88): Este paso se hizo nuevamente apoyándose en la técnica de Söderlind et. al. (19) con las siguientes modificaciones: se inocu- laron conejos con los dos picos de importancia de la fracción pro-- téica obtenidos por cromatografía.

Las fracciones se inocularon separadamente en conejos adultos sanos a la dosis de 1 ml de proteína mezclada con 1 ml de adyuvante com- pleteo de Freund. La inoculación se repitió por vía intramuscular ca da 3 días hasta completar 6 inoculaciones; pero en este caso el inó- culo no contenía adyuvante. Después de la 6a. aplicación se esperaron 14 días para hacer un sangrado de prueba, el cual se consideró- adecuado y se procedió a hacer el sangrado en blanco de los anima- les.

CALOSTRO DE CERDAS INMUNIZADAS DURANTE LA GESTACION: Se obtuvo ca- lostro de cerdas adultas inmunizadas con una bacterina comercial** de E. coli durante el último tercio de la gestación. Las muestras - de calostro se centrifugaron a 800 g durante 15' en centrifuga re- frigerada a fin de separar la grasa. Esta parte fue eliminada y el- resto fue tratado con renina; 1 gota de solución de renina al 10% - (0.3) por 1 ml de calostro desgrasado a 37°C durante 2 h. Una vez - formado el coágulo de caseína, fue centrifugado nuevamente a 800 g-

(*) Sepharose, Pharmacia, Uppsala, Suecia.
(**) Novi-vac It K88 (Laboratorios SERVA S.A.)

durante 15' para la obtención del suero que quedó como sobrenadante.

El suero de calostro se sometió a una evaluación mediante las mismas pruebas a que se sometieron los sueros preparados en conejo.

EVALUACION DE LOS ANTISUEROS: Para la evaluación de los sueros hiperinmunes, se hicieron los siguientes ensayos: Prueba de precipitación (de Ouchterlony o de doble difusión), prueba de inmunoelectroforesis y de contrainmunoelectroforesis. Las pruebas se basaron en las técnicas empleadas por Guinée y Jansen, Hudson et. al. y Poli et. al. (7, 10, 15) y con las cuales se confrontaron los sueros hiperinmunes frente a diferentes cepas de E. coli, tanto enteropatógenas y no enteropatógenas (las cepas usadas fueron mencionadas anteriormente). * Cada prueba se corrió por duplicado. Para la técnica de doble difusión se utilizaron Agar Noble 1%, Cloruro de Sodio 0.85%, Acido Bórico 0.90% e Hidróxido de Sodio 0.20%. La prueba se dejó incubar durante 24 h. Para la técnica de inmunoelectroforesis se empleó Agar Noble 1% en 100 ml de Buffer Tris-Barbital con pH 8.6. Este se usó como solución amortiguadora durante la prueba para el paso de corriente. El amperaje y el voltaje fueron constantes -- (5mA y 200 volts) durante dos horas, después de lo cual se dejaron las muestras en cámara húmeda durante 24 h.

Al terminar el paso de corriente la prueba fue leída e interpretada.

La incubación posterior sólo sirvió para una mejor coloración de los precipitados. En la prueba de contrainmunoelectroforesis se utilizaron los mismos reactivos que en la prueba de inmunoelectroforesis pero la toxina termolábil fue colocada en pozos cerca del cátodo y en la serie de pozos del ánodo se colocaron los sueros a probar, aplicándosele un paso de corriente de 10mA y 290 volts durante 1 hora y 30 minutos.

(*) Proporcionadas y clasificadas como enteropatógenas por el Departamento de Producción Animal: Cerdos de la F.M.V.Z.

El serotipo O149: K91: K88: H10: fungió como control positivo.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SODIO DUODECIL SULFATO - (EGPA-SDS): Esta prueba se llevó a cabo basándose en la técnica -- descrita por Dafni y Robbins, y aplicándose a la muestra ya dializada (2).

Los geles se prepararon por duplicado, teniendo como medidas aproximadamente 13X 0.8 cm. Fue empleado un patrón electroforético* para la determinación de proteínas de elevado y bajo peso molecular. La electroforesis se realizó usando una solución amortiguadora de Tris-Glicina, pH 8.3, bajo condiciones de amperaje y voltaje constante (40 mA X 150 volts). Una vez que el colorante azul de bromofenol indicó que la muestra estaba por salir del gel, se interrumpió el paso de corriente, para luego proceder a teñir el gel en -- azul de Comassie al 1% durante 24 h, después de lo cual se destiñó sumergiéndolo en una solución lavadora de Acido Acético al 10%, -- cambiándose esta cada 12 h, hasta que las distintas bandas fueron identificables en el gel.

PRUEBA DEL ASA LIGADA: Todas las cepas de E. coli aisladas de 6 casos clínicos** y las previamente clasificadas como enteropatógenas y no enteropatógenas, que se identificaron por medio de la contra-inmuno-electroforesis, fueron probadas para confirmación mediante la prueba del asa ligada en conejo (19).

(*) Patrón electroforesis (calibración KIT)
Pharmacia Fine Chemicals AB.

(**) Proporcionadas por el Departamento de Virología e Inmunología de la F.M.V.Z.

RESULTADOS

1.- OBTENCION DE TOXINA Y FACTOR DE ADHERENCIA:

La gráfica 1 muestra el registro de las diferentes fracciones que se obtuvieron después de pasar el dializado del cultivo de E. coli por la columna cromatográfica.

Se observaron tres picos que corresponden al paso de proteína de -- E. coli (cepa prototipo). Según Söderlind et. al. el primer pico corresponde a moléculas de 1×10^7 a 2×10^7 , el segundo corresponde a proteínas de menor peso molecular (mayor a 500 000) y el tercero a moléculas con peso molecular de 500 000 (19). Los pesos moleculares reportados para la toxina LT y el antígeno K88 corresponden a los de las sustancias recolectadas en los picos 1 y 3 respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Söderlind et. al. el primer pico recolectado de la columna, correspondió a la toxina termolábil (LT) de E. coli, por su elevado peso molecular (mayor a - - - 1 000 000). Los otros dos picos obtenidos en este trabajo corresponderían tanto a la toxina termoestable (ST, peso molecular 5000), como a otras proteínas de menor peso molecular, entre ellas, posiblemente el antígeno K88 de naturaleza protéica.

2.- EVALUACION DE ANTISUEROS Y ANTIGENOS:

a) Prueba de precipitación en agar: Los resultados se aprecian en las figuras 1, 2, y 3. En la primera de ellas se confrontan los picos 1 y 3 contra el antisuero específico producido en conejo. Se puede apreciar que hay una banda muy clara, contra el pico 1 y contra la cepa prototipo (bacteria completa). No hubo reacción ante el pico 3 ni contra el control de solución salina.

En la figura 2 se aprecian los resultados de la confrontación del antisuero específico, contra el pico 1 ante varios serogrupos de -- E. coli apatógenos, según la prueba del asa ligada, y un serogrupo enteropatógeno (O₂₀). No hubo precipitación en ningún caso.

La figura 3 señala la confrontación del antisuero antipico 1 frente a varias cepas consideradas como enteropatógenas y frente al pico -

3. Hubo precipitación únicamente con la cepa prototipo y con otra-- de las cepas, pero no con las otras dos ni con el pico 3. Estas cepas se habían considerado anteriormente como enteropatógenas en el Departamento de Producción Animal: Cerdos y en otro laboratorio. Con esta prueba también se ensayaron once muestras de calostro de - cerdas inmunizadas* contra colibacilosis neonatal porcina, durante la gestación. En este caso, se colocó el dializado del cultivo de - la bacteria prototipo (que contenía LT y K88) al centro, para que - actuara como antígeno, y en los pozos del rededor las muestras de - calostro. Los resultados se aprecian en la figura 4. En todos los - casos hubo una precipitación bien clara que se explica en la discu- sión. Las muestras de calostro se diluyeron a diluciones dobles con SSF y se confrontaron ante un cultivo de 18 a 24 h, de la bacteria- prototipo para obtener una titulación mediante aglutinación en tubo. Los títulos fueron los siguientes:

CALOSTRO	TITULO
Nº 1 -----	1/40
Nº 2 -----	1/80
Nº 3 -----	1/80
Nº 4 -----	1/160
Nº 5 -----	1/160
Nº 6 -----	1/160
Nº 7 -----	1/320
Nº 8 -----	1/320
Nº 9 -----	1/320
Nº 10 -----	1/640
Nº 11 -----	1/1280
Nº 12 -----	Control negativo

Se probó el antisuero obtenido en conejo después de la inoculación- con el pico 3 que supuestamente contenía el antígeno K88, confron- tándolo ante los mismos antígenos anteriores, y el pico 3 ante las- muestras de calostro. En ningún caso hubo precipitación.

(*) Vacunadas con novi-vac 1t K88 (Laboratorios SERVA, S.A.).

b) Inmunolectroforesis: En la figura 5 se muestran los resultados de esta prueba. La inmunolectroforesis evidenció la presencia de una banda, que corresponde a la confrontación del antisuero elaborado contra el pico 1 de la columna cromatográfica, frente a esta misma fracción. Con las fracciones 2 y 3 no hubo reacción.

c) Contraimunolectroforesis: La figura 6 muestra la lectura obtenida con esta prueba. Nuevamente las bandas muestran la positividad específica de la prueba entre la muestra y el antisuero.

Se probaron las mismas cepas de E. coli ya descritas anteriormente. Algunas eran enteropatógenas según la prueba del asa ligada y algunas otras apatógenas. Se puede observar que hubo reacción con la cepa prototipo (O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀), el pico 1 de la columna y sólo una de las cepas enteropatógenas consideradas así anteriormente en otro laboratorio. En el capítulo de discusión está la posible explicación del resultado.

3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SODIO DUODECIL SULFATO: Los resultados se observan en la figura 7. El patrón electrofórico empleado comprendió un rango de peso molecular entre 14 400 (lactoalbúmina) y 94 000 (Fosforilasa b). Los otros pesos moleculares de las proteínas del patrón electrofórico fueron en orden descendente:

- Seroalbúmina bovina -----	63 000
- Ovoalbúmina -----	43 000
- Anhidrasa carbónica -----	30 000
- Inhibidor de tripsina -----	20 000

Se observaron cuatro bandas en el caso del dializado de E. coli (cepa prototipo) que corresponden a cuatro tipos distintos de proteína bacteriana. Los pesos moleculares como evidencia la figura 7 fueron aproximadamente de 14 000, 30 000, 43 000 y uno mayor de 94 000.

4.- PRUEBA DEL ASA LIGADA:

Después de 24 horas de efectuada esta prueba, se le practicó la necropsia al conejo empleado, siendo sacrificado con una sobredosis de anestésico volátil*. Los resultados recabados a la lectura se --

(*) Halotane Mallinckrodt Chemical Works.

apreciar en el cuadro 1 y las figuras 8, 9 y 10. La dosis administrada en cada asa ligada fue de 1 ml de cada una de las muestras estudiadas. Cada ligadura fue realizada cuidadosamente para evitar el posible paso de muestras de un asa ligada a otra; además de que la disposición en la aplicación de cada dosis, comprendió la separación de muestras que pudieran dar resultados falsos positivos.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren de los de Söderlind et. al. (19). Estos autores emplearon Sepharose 2B y obtuvieron un solo pico en la columna cromatográfica, mientras que en este caso utilizando la misma resina se obtuvieron tres fracciones. Sin embargo, la purificación hecha dados los resultados obtenidos en pruebas de precipitación y sobre todo en inmunoelectroforesis -- fue confiable, ya que solamente se obtuvo una banda de precipitación para el pico 1. Es decir que sólo había un antígeno para dicha fracción, lo que demuestra que el antisuero era realmente monoespecífico.

Los mismos autores mencionados (19), empleando Bio-Gel A-0.5 registraron tres picos con el mismo cultivo. Posiblemente en este trabajo el registro de los tres picos se debió a que el sulfato de amonio es más eficiente que el cloruro de manganeso para la precipitación de proteína, aunque los dos picos secundarios no resultaran -- inmunogénicos.

En la inmunoelectroforesis se encontró la presencia de un solo antígeno para el pico 1. Esta prueba se empleó para probar hasta qué punto el contenido del pico 1 se encontraba realmente purificado, -- es decir, sin la presencia de dos o más antígenos. Se demostró que el antisuero era realmente monoespecífico. Las otras dos fracciones al no reaccionar se consideraron como no inmunogénicas.

Con la prueba de contrainmunoelectroforesis, se confirmaron los resultados de las pruebas de precipitación en agar, aglutinación, inmunoelectroforesis y asa ligada. Se ha dejado sin lugar a dudas que en la contrainmunoelectroforesis la reacción es específica y que se pueden detectar antígenos a pequeñas cantidades aun cuando estén -- mezclados con otras sustancias (10, 15). La detección se lleva a cabo en dos horas, lo cual le confiere a la prueba una gran ventaja -- sobre otras. Es muy fácil de llevar a cabo y sus principios son de gran sencillez, sin embargo se requiere el uso del equipo capaz de separar y hacer migrar las moléculas de antígeno y anticuerpo en el

campo eléctrico en medio de soporte.

En la prueba de precipitación, se pudo observar que el conejo inoculado con el pico 3 que supuestamente correspondía al antígeno K88 - de la bacteria, no reaccionó formando anticuerpos, lo cual indica - que esa fracción no es inmunogénica y que por tanto no correspondía al antígeno K88 sino a otra proteína de E. coli. Por el contrario - se observaron reacciones bien claras, cuando el suero del conejo -- inoculado con el pico 1 reaccionó específicamente con el antígeno - homólogo, con el cultivo completo de la cepa prototipo y con otros - serotipos reportados como enteropatógenos.

Los calostros mostraron títulos que variaron desde 1/40 a 1/1280 en aglutinación. El suero de conejo anti-pico 1 se comportó en forma - semejante mostrando títulos altos también (1/2560), lo que pudiera aprovecharse para detectar la presencia del antígeno, en una suspen- sión bacteriana, ya sea en cultivo o en una muestra fecal.

La prueba del asa ligada se llevó a cabo, con el objeto de corroborar la capacidad enteropatógena de algunos serotipos, y relacionarla con la posesión de la toxina LT. Dos cepas positivas al asa liga- da, mostraron mediante las pruebas de contrainmunolectroforesis y - precipitación en agar que poseían toxina LT, identificable con el - pico 1 de la columna cromatográfica. Los cultivos de E. coli que an- teriormente fueron considerados en otro laboratorio como enteropató- genos no provocaron cambios observables en el intestino de conejo - cuando se hizo la prueba del asa ligada, ni reaccionaron in vitro - con las pruebas de precipitación y contrainmunolectroforesis. El - pico 1 produjo en asa ligada una reacción inflamatoria con infiltra- ción moderada de linfocitos en mucosa y submucosa, con necrosis par- cial de las vellosidades; en la submucosa, presencia de microtrom- bos y congestión moderada difusa, lo cual es típico de la reacción - provocada por la presencia de la toxina LT de E. coli* (11).

Con lo anterior se puede concluir, que si se posee un antisuero es- pecífico contra LT, se puede detectar esta toxina característica de

(*) Diagnóstico histopatológico del Departamento de patología de la F.M.V.Z.

las cepas enteropatógenas de E. coli en las pruebas de contrainmuno electroforesis, precipitación en agar e inmuno electroforesis, sin necesidad del empleo de la prueba biológica del asa ligada.

Aunque las pruebas del asa ligada, la prueba del efecto esteroideogénico de células adrenales Y1 de origen de ratón, la prueba en células de ovario de Hamster chino (11, 16) y el aislamiento, son muy sensibles dado que utilizan indicadores biológicos, son costosas y complicadas, además que en el mejor de los casos requieren de 24 horas para tener resultados, y de toda una infraestructura muy costosa para la cría y manutención de los animales experimentales así como para el establecimiento del cultivo celular.

A todo lo mencionado hay que añadir, que el personal que efectúe estas pruebas debe ser altamente especializado. Para nuestro medio una o más pruebas realizadas in vitro con reactivos sencillos y menos delicados, como suero, muestras fecales que supuestamente contengan la bacteria a identificar, resulta mucho más conveniente. Ya se mencionó que la prueba de contrainmuno electroforesis que se basa en los mismos principios de la precipitación es la más sensible, y con la cual se pueden obtener resultados más rápidos y confiables, pero que requiere del equipo de electroforesis. Las otras pruebas podrían aplicarse con la desventaja de una menor sensibilidad. Con la electroforesis en poliacrilamida, no fue posible determinar el peso molecular de la sustancia contenida en el pico 1, aunque en las pruebas serológicas y biológicas se demostró una actividad biológica claramente identificable con dicha toxina.

Dado que se ha demostrado que la toxina y el factor de adherencia están regulados por plásmidos en E. coli, cabría la posibilidad de que un serogrupo que produzca problemas in vivo, al cultivarse in vitro perdiera la capacidad enteropatógena (9). En este trabajo, tres cepas que habían sido clasificadas como enteropatógenas, no demostraron esa capacidad tanto en las pruebas serológicas (ausencia de toxina LT), como en la prueba del asa ligada. Sería por lo tanto conveniente, aplicar estas pruebas en la suspensión bacteriana de muestras fecales o en su caso, de cultivos frescos.

LITERATURA CITADA

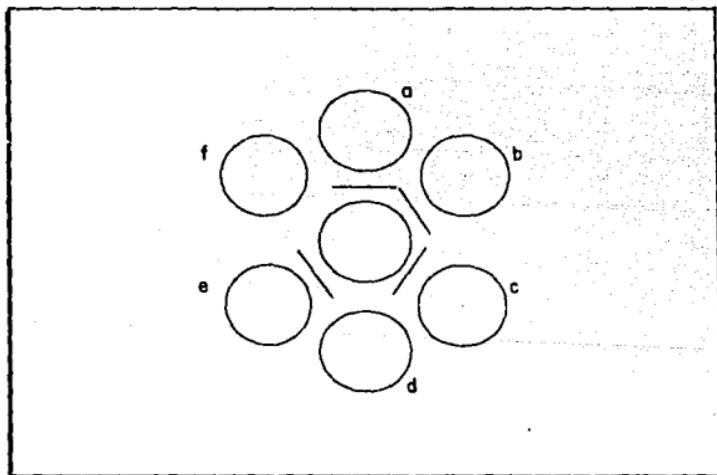
1. Cardella, M.A., Huhn, R.G. and Wilson, M.R.: Immunity to neonatal colibacillosis: Field studies. J.A.V.M.A., 164: 299-303 - - - (1974).
2. Dafni, Z., Robbins, J.B.: Purification of heat - labile enterotoxin from Escherichia coli 078: H11: by affinity chromatography - with antiserum to Vibrio cholerae toxin. J. Infect. Dis., 133: - 138-141 (1976).
3. Davis, B.D., Dulbeco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. y Wood, -- W.B.: Tratado de microbiología. 2a. ed. Salvat Editores, España, 1983.
4. Estrada Correa, A. y Enríquez Enríquez, C.: Diagnóstico simplificado de las diarreas infecciosas más comunes en lechones: Estudio recapitulativo. Veterinaria Mex., 14: 93-102 (1983)..
5. Frappe, M.R.C.: Manual de Infectología Veterinaria. 1a. ed. Méndez Oteo, México, 1981.
6. Gaastra, W. and Graaf, de, F.K.: Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. Microbiol., 46: 129-161 (1982).
7. Guinée, P.A.M. and Jansen, W.H.: Behavior of Escherichia coli K-antigens K88ab, K88ac and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and hemagglutination. Infect. Immun., 23: 700-705 ---- (1979).

8. Guinée, P.A.M. and Jansen, W.H.: Detection of enterogenicity -- and attachment factors in Escherichia coli strains of human, -- porcine and bovine origin: A comparative study. Zbl. Bakt. Kyg. I. Abt. Orig., A 243: 245-257 (1979).
9. Howard Gillespie, J. y Francis Timoney, J.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4a. ed. La prensa Médica Mexicana, México, 1983.
10. Hudson, L. y Hay, F.C.: Inmunología Práctica. 1a. ed. J.I.M.S., Barcelona, 1979.
11. Leman Allen, D.: Diseases of Swine. 5th. ed. Iowa State University, 1981.
12. López Alvarez, J.: Escherichia coli: Mecanismos de patogenicidad. Ciencia Veterinaria. Ricardo Moreno Chan. 1: 1-39. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1981.
13. Olsson, E., Smyth, C.J. and Söderlind, O.: Enterotoxigenicity - patterns of swedish porcine Escherichia coli: Relationship to O-groups and adhesians. I.P.V.S., Congress. Proc. 6th. ed. Copenhagen, (1980).
14. Penny, R.H.C. and Penny, J.C.: Priorities for pig research. - - Vet. Rec., 99: 451-453 (1976).
15. Poli, G., Pozza, O., Ponti, W., Balsari, A. and Vacirca, G.: -- Application of counterimmunoelectrophoresis for a rapid sero--- diagnosis of enzootic bovine leukosis. Br. Vet. J., 136, 3: --- 251-255 (1980).

16. Renault, L., Mathieu, D. and Bourhis, Le. E.: Detecting enteropathogenic Escherichia coli strains of porcine origin: Correlations between O and K antigens and the enterotoxin production - in strains isolated from the newborn piglet. Ann. Rech. Vet., - 8: 319-325 (1977).
17. Rutter, J.M.: Escherichia coli infections in piglets: Pathogenesis, virulence and vaccination. Vet. Rec., 96: 171-175 (1975).
18. Söderlind, O. and Mølby, R.: Studies on Escherichia coli in - - pigs. Zbl. Vet. Med. B., 25: 719-728 (1971).
19. Söderlind, O., Mølby, R. and Wadström, T.: Purification and some properties of a heat-labile enterotoxin from Escherichia - - coli. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig., A 229: 190-204 (1974).
20. Uruchurtu, A. y Doperto, J.M.: Mortalidad de lechones: Estudio-recapitulativo. Veterinaria Mex., 6: 96-106 (1975).
21. Uruchurtu, A., Méndez, D., Doperto, J.M., Romero, R.M., Alvarez J.L. y García, F.S.: Un estudio sobre la mortalidad de lechones en México. Veterinaria Mex., 7: 111-123 (1976).
22. Wilson, M.R. and Hohmann, A.W.: Immunity to Escherichia coli to isolated intestinal epithelial cells. Infect. Immun., 10: - - - 776-782 (1974).
23. Yolken, R.H., Greenberg, H.B., Merson, M.H., Sack, R.B. and Kapikian, A.Z.: Enzyme-Linked immunosorbent assay for detection - of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J. Clin. Micro-----biol., 6: 439-444 (1977).

FIGURA No. 1

Prueba de precipitación, donde se confronta el antisuero elaborado en conejo anti-pico 1 de columna cromatográfica. Se enfrentaron la cepa prototipo (a, c, e), el pico 1 (b), el pico 3 (d) y la solución salina fisiológica (f).

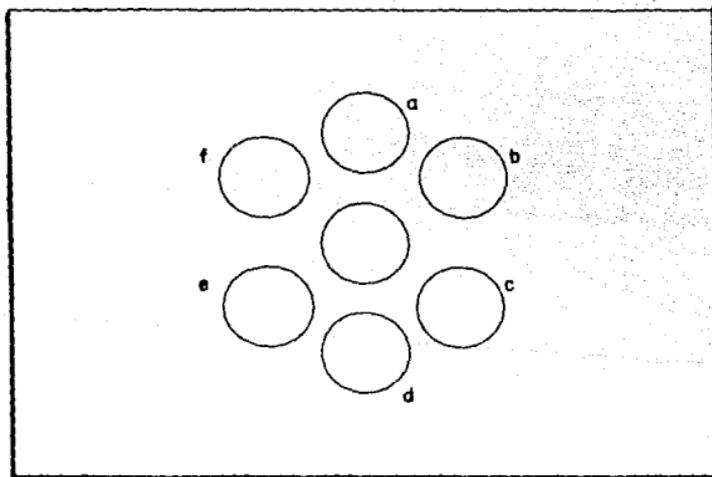


- a) E. coli serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀ (Prototipo)
- b) Pico 1
- c) E. coli serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀ (Prototipo)
- d) Pico 3
- e) E. coli serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀ (Prototipo)
- f) SSF (Control negativo)

En el pozo de enmedio se encuentra el antisuero elaborado contra el pico 1.

FIGURA No. 2

Prueba de precipitación, donde se confronta el antisuero elaborado en conejo anti-pico 1 de columna cromatográfica, frente a varias cepas apatógenas y una enteropatógena de E. coli (f).

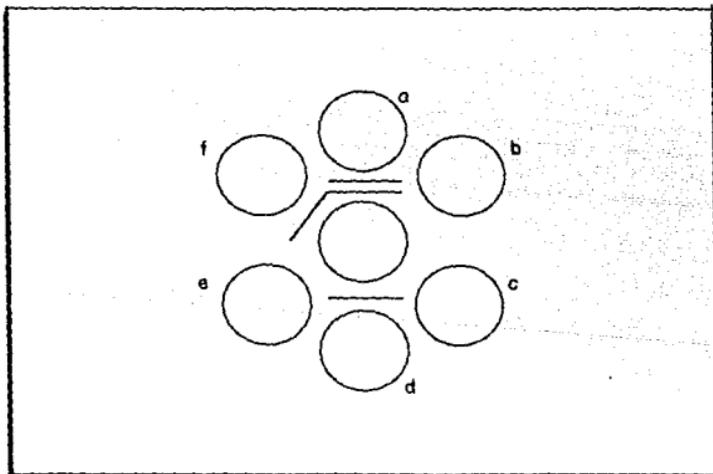


a)	E. coli	serogrupo	O _B
b)	"	"	O ₁₅
c)	"	"	O ₁₇
d)	"	"	O ₁₀₁
e)	"	"	O ₁₄₃
f)	"	"	O ₂₀

En el pozo de enmedio se encuentra el antisuero elaborado contra el pico 1.

FIGURA No. 3

Prueba de precipitación, donde se confronta el antisuero elaborado en conejo anti-pico 1 de columna cromatográfica, frente a 3 cepas enteropatógenas de E. coli (a, b, c), la prototipo (d, f) y el pico 3 (e).

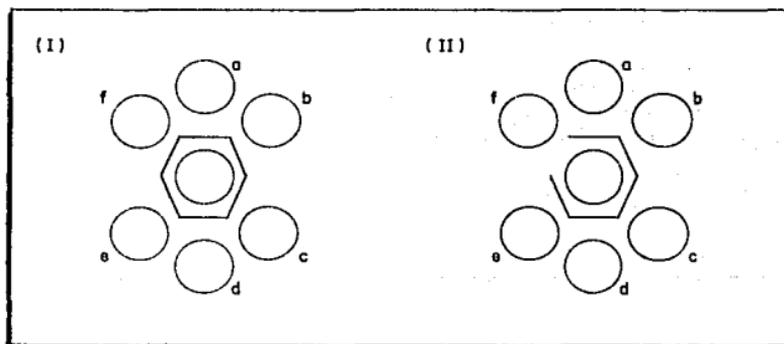


- a) E. coli serotipo O₁₄₇: K₉₉: K₈₈
- b) E. coli serogrupo O₂₁
- c) E. coli serogrupo O₃₄
- d) E. coli serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀ (Prototipo)
- e) Pico 3
- f) E. coli serotipo O₁₄₉: K₉₁: K₈₈: H₁₀ (Prototipo)

En el pozo de enmedio se encuentra el antisuero elaborado contra el pico 1.

FIGURA No. 4

La figura muestra la lectura de la prueba de precipitación, donde se confrontan los calostros de las cerdas inmunizadas contra colibaciosis neonatal porcina con bacterina comercial durante la gestación, ante el dializado del cultivo de la bacteria prototipo.

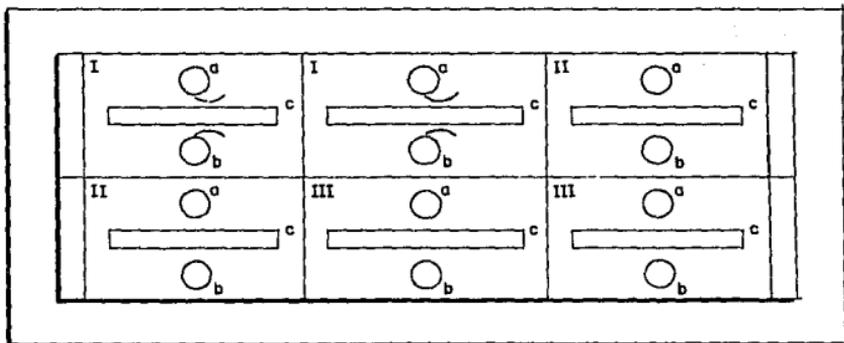


- (I) Pozo central : Dializado de *E. coli* .
 Pozos a) al f) : Muestras de calostros de cerdas.
- (II) Pozo central : Dializado de *E. coli* .
 Pozos a) al e) : Muestras de calostros de cerdas.
 Pozo f) : Calostro negativo (control negativo).
 Las muestras de calostro fueron las mismas que se titularon por aglutinación.

(*) Nobivac 11 K₈₈ (Laboratorios SERVA S. A.)

FIGURA No. 5

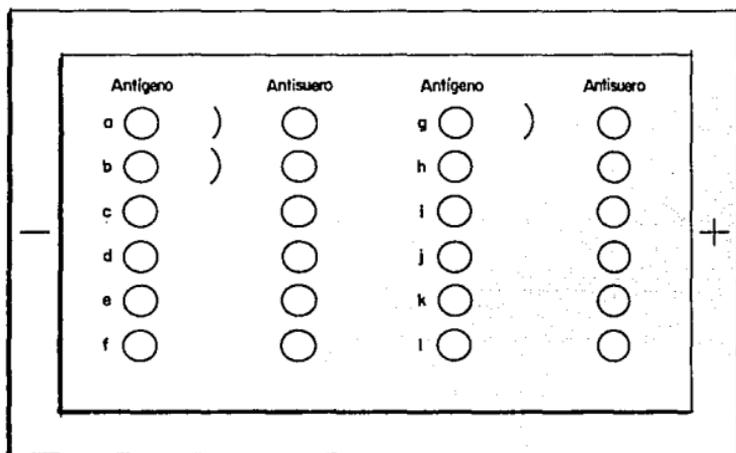
Prueba de inmunoelectroforesis, en la que se enfrentan las tres fracciones recolectadas de columna, frente al antisuero específico anti-pico I.



- I) a) Pico I de columna cromatográfica
 b) " " " " " "
 c) Antisuero específico anti-pico I de columna cromatográfica.
- II) a) Pico 2 de columna cromatográfica
 b) " " " " " "
 c) Antisuero específico anti-pico I de columna cromatográfica.
- III) a) Pico 3 de columna cromatográfica
 b) " " " " " "
 c) Antisuero específico anti-pico I de columna cromatográfica.

FIGURA No. 6

Contrainmunolectroforesis : Se esquematiza la lectura que diera la confrontación del antisuero contra el pico I, frente a los cultivos de diferentes cepas de E. coli incluidas en este trabajo.

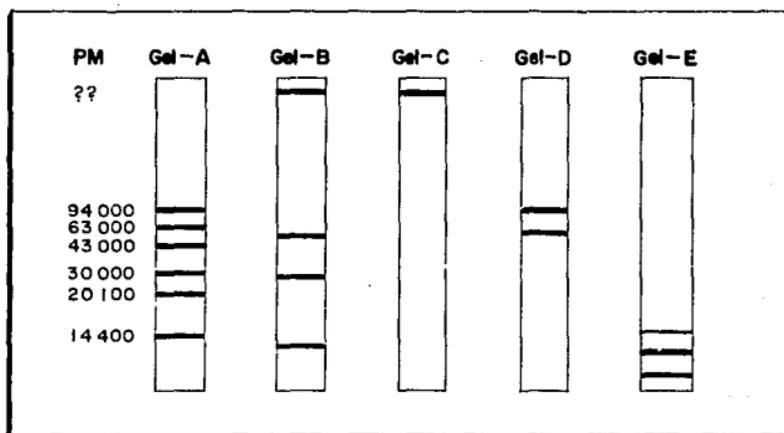


Para correr todas las muestras se empleó sólo el sobrenadante de las distintas bacterias.

- a) E. coli serotipo O₁₄₉ : K₉₁ : K₈₈ : H₁₀ (Prototipo)
- b) Pico I
- c) E. coli serogrupo O₂₁
- d) E. coli serogrupo O₃₄
- e) Pico 3
- f) E. coli serogrupo O₂₀
- g) E. coli serotipo O₁₄₇ : K₉₉ : K₈₈
- h) E. coli serogrupo O₈
- i) E. coli serogrupo O₁₅
- j) E. coli serogrupo O₇
- k) E. coli serogrupo O₁₀₁
- l) E. coli serogrupo O₁₄₃

FIGURA No. 7

Prueba de electroforesis en geles de poliacrilamida donde se muestran las distintas bandas de proteína del dializado formadas en este medio.



+

- Gel-A: Patrón electroforético
- Gel-B: Dializado de *E. coli* (Cepa prototipo)
- Gel-C: Pico 1
- Gel-D: Pico 2
- Gel-E: Pico 3

Los polos mostrados en esta figura indican el sentido en que emigra la proteína, es decir, del polo negativo al positivo. La proteína de menor peso molecular se desplaza más rápido que la de mayor peso molecular.

FIGURA No. 8



Prueba biológica del asa ligada en intestino delgado de conejo. Se aprecia en el segmento correspondiente a la inoculación con la cepa prototipo la presencia de líquido y dilatación característica de la actividad de la enterotoxina "LT" de E. coli. Los picos 2 y 3 no provocaron reacción, las otras cepas su--- puestamente enteropatógenas (E. coli O20 y -- O147: K89: K88) tampoco provocaron cambios.

FIGURA No. 9

Prueba biológica del asa ligada en la que se observa la presencia de hemorragia provocada por el pico 1 de columna cromatográfica; se aprecia la diferencia que existe con el intestino normal.

FIGURA No. 10



Prueba biológica del asa ligada en la que se observa la presencia de líquido y dilatación en el sitio de inoculación de la cepa P155 de E. coli (prototipo) así como hemorragia ligera.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO No. 1

En este cuadro se indica la lectura obtenida de la prueba del asa ligada en conejo, 24 horas despues de haber sido inoculado el animal.

MUESTRA Y ORDEN DE APLICACION	PRESENCIA DE LIQUIDO Y DILATACION	PRESENCIA DE HEMORRAGIA
1° <i>E. coli</i> serogrupo O ₂₀	No	No
2° Pico 2	No	No
3° <i>E. coli</i> serotipo O ₄₅ ·K ₉₁ ·K ₉₉ ·H ₁₀ (Prototipo)	Si	Moderada
4° Pico 3	No	No
5° <i>E. coli</i> serotipo O ₄₇ ·K ₅₂ ·K ₈₈	No	No
6° <i>E. coli</i> serogrupo O ₈	No	No
7° Pico 1	No	Si

GRAFICA No. 1

Registro de las fracciones obtenidas del dializado del cultivo de E. coli
en columna cromatográfica de Sepharose 2B .

