



Colibacilosis en Lechones: Prueba de Eficacia de una Vacuna

M. E. CICUTA,* A. O. MIRANDA, W. R. ROIBÓN, M. C. BENITEZ, S. I. BOEHRINGER Y M. C. BARCELÓ

Cátedras de Microbiología e Inmunología General y Aplicada-Facultad de Ciencias Veterinarias,
UNNE. Sgto. Cabral 2.139-3400 Corrientes, Argentina. Tel/Fax: (0783) 22945/25753.

*Autor para correspondencia: E-mail cicuta@vet.unne.edu.ar

ABSTRACT. The damage caused in the economy and animal sanity by the porcine colibacilosis are significant and they deserve the investigation of preventive measures that give answers to the producers. Existing at the present time approximately 21,000 pigs in Corrientes and 110,000 in Chaco provinces of Argentina, the losses for diarrhea that exterminate whole litters, acquire relevance, specially if they can be prevented or cured. For that reason, having 21 strains of enteropathogenic and verocitotoxigenic *E. coli* (ETEC/VTEC) isolated from pigs of the North East of Argentine, that were recognized by PCR, two were selected, containing the genes for STIa, STIb, LTI, VT2e (SLT-IIv) and F4 (K88). They were spread on nutrient agar and Minca medium, to obtain the suspension in PBS, which was inactivated with formol. After the sterility and innocuity controls, it was diluted to a 12×10^8 concentration to make the mouse protection test in 20 mice, of 18–20 g, inoculating the vaccine the days 1, 4, 7 and 10, by the intraperitoneal route, doses of 0.25 ml each one. The day 21 after beginning the test the animals were challenged with 50 LD₅₀, and a protection of 85% was obtained. To determine the LD₅₀, we prepared a suspension in physiologic solution, corresponding to Mac Farland's tube N° 10, making dilutions from 10^{-1} to 10^{-5} and applying the statistical method of Reed and Muench. These first results encourage us to continue working after a prophylactic measure that were effective, potent and elaborated with strains of this area.

Key Words: Colibacilosis, Vaccine, Pigs.

RESUMEN. Los daños causados en la economía y sanidad animal por la colibacilosis porcina son significativos y merecen la investigación de medidas preventivas que den respuesta a los productores. Existiendo en la actualidad aproximadamente 21,000 porcinos en la provincia de Corrientes y 110,000 en la de Chaco, en Argentina. Las pérdidas por diarrea, que exterminan camadas enteras de lechones, adquiere relevancia, máxime si se pueden prevenir o, en su defecto, curar. Con tal motivo, contando con 21 cepas enteras y verocitotoxigénicas (ETEC/VTEC) aisladas de cerdos del Noreste de Argentina, que fueran reconocidas por técnicas de PCR, se seleccionaron dos, conteniendo los genes determinantes para STIa, STIb, LTI, VT2e (SLT-IIv) y F4 (K88). Se procedió a la siembra de ambas cepas en agar nutritivo y medio de Minca, para obtener la suspensión madre con su cosecha en PBS, la que fue inactivada con vapores de formol. Pasados los controles de esterilidad e inocuidad, se procedió a diluir a la concentración de inoculación (12×10^8) para efectuar la prueba de protección en 20 ratones, de 18-20 g, inoculando los días 1, 4, 7 y 10, vía intraperitoneal (IP), dosis de 0,25 ml a cada uno. Al día 21 del inicio de la prueba se los desafió con 50 DL₅₀, la que arrojó un 85% de cobertura. Para determinar la DL₅₀, se partió de una suspensión en solución fisiológica, correspondiente al tubo de Mac Farland N° 10, haciendo diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} y aplicando el método estadístico de Reed y Muench. Estos primeros resultados nos alientan a seguir trabajando en pos de una medida profiláctica que sea efectiva, potente y elaborada con cepas actuantes en la zona.

Palabras Clave: Colibacilosis, Vacuna, Cerdos.

INTRODUCCIÓN

La colibacilosis neonatal en cerdos continúa siendo un problema serio en los establecimientos de cría, en diversos lugares del mundo^{2,4,8} y en nuestro país.^{7,9,10} En los casos de diarrea, las cepas aisladas elaboran enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) o sólo esta última, denominándose las *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC), que colonizan el intestino de animales domésticos por medio de fimbrias huésped específicas.^{4,6} Por su parte, las cepas responsables de la enfermedad de los edemas sintetizan una verocitotoxina tipo 2 (VT2e), que es una variante de la

citotoxina SLTII (shiga like toxin) responsable de enteritis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico del hombre (SUH).¹³

La toxina VT2 daña los elementos de la pared vascular induciendo a cambios degenerativos irreversibles y necrosis celular.¹ Los cerdos infectados con *E. coli* productoras de toxinas LT y SLTIIv (VT2e) frecuentemente mueren de diarrea. Si las cepas infectantes son productoras de SLTIIv y alguna de las toxinas termoestables o ambas, el animal puede morir con signos de diarrea y/o edema.²

Siendo la colibacilosis de los lechones una de las cau-



sas de mortandad perinatal, la región nordeste argentina no escapa a este fenómeno que constituye una verdadera "infección endémica de las parideras". En un trabajo anterior,³ logramos aislar 21 cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) y verocitotoxigénicas (VTEC), identificadas por técnica de PCR, sobre un total de 178 muestras diarreicas y no diarreicas, provenientes de animales de 1 semana a 3 meses de edad, de 20 establecimientos de la región.

Los daños causados en la economía y sanidad animal por esta enfermedad son significativos y merecen la participación de grupos de investigación locales y nacionales que, en un esfuerzo concurrente, den respuesta a los productores. Existiendo en la actualidad aproximadamente 21,000 porcinos en la provincia de Corrientes y 110,000 en la del Chaco, en Argentina, las pérdidas por diarrea, que exterminan camadas enteras de lechones, adquiere relevancia, máxime si se pueden prevenir o, en su defecto curar.

La vacunación de las hembras madre y la inmunidad de la lactación sería el procedimiento profiláctico de elección ya que la cerda transfiere anticuerpos del calostro que previenen la adherencia de *E. coli* a la mucosa intestinal y, por consiguiente la invasión al torrente circulatorio de las cepas septicémicas.⁵

Supar, en 1992,¹² inoculando a cerdas preñadas a las 6 y 2 semanas, respectivamente, antes del parto, con una vacuna polivalente conteniendo cantidades equivalentes de los antígenos K88, K99, F41 y 987P de aislamientos de campo, producida a partir de los serogrupos O-9, 20, 64, 101, 108, 138 y 157 muertas con formol, utilizando hidróxido de aluminio como coadyuvante, con una concentración final del 25%, comprobó una mejor protección que una vacuna comercial, pero los resultados no fueron significativamente diferentes.

Zamora y col. (1996)¹⁴ sostienen que, para obtener una prevención eficaz en el control de la diarrea neonatal por *E. coli*, se deben conocer exactamente los tipos enteropato-

génicos (EPEC) y ETEC que existan, por lo que es imprescindible investigar constantemente cuáles son los factores de virulencia presentes en las cepas que infectan a los lechones lactantes en un determinado plantel y no sólo pesquisar los serogrupos y toxinas que produzcan.

Es nuestro propósito, elaborar con las cepas ETEC y VTEC obtenidas de la región, una vacuna o bacterina, que sea efectiva para este tipo de enfermedad, con tal fin se realizó la primer prueba de eficacia en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con tal fin se seleccionaron dos cepas ETEC/VTEC aisladas del NEA, que contienen los genes determinantes para ST1a, ST1b, LTI, VT2e (SLT-IIv) y K88 (F4). Se sembraron en agar nutritivo y medio Minca, para obtener la suspensión madre con su cosecha en PBS, la que fue inactivada con vapores de formol. Pasados los controles de esterilidad e inocuidad, se procedió a diluir a la concentración de inoculación (12×10^8) para efectuar la prueba de eficacia en 20 ratones, de raza CF1, de 18-20 g, inoculando los días 1, 4, 7 y 10, vía intraperitoneal (IP), dosis de 0.25 ml a cada uno. Al día 21 del inicio de la prueba se los desafió con 50 DL₅₀. Para determinar esta última, se partió de una suspensión bacteriana de ETEC/VTEC en solución fisiológica, correspondiente al tubo de Mac Farland N° 10 (3×10^9 bacilos/ml), haciendo 5 niveles de diluciones (10^{-1} a 10^{-5}) y aplicando el método estadístico de Reed y Muench.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Determinación de DL₅₀. Se inocularon a razón de 0.25 ml, por vía intraperitoneal, por cada ratón, mantenidos en condiciones estándar de alimentación y registros (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación de DL₅₀.

N° de ratones	Dosis	Muertos	Sanos	Σ Muertos	Σ Sanos	%Muertos
4	10^{-1}	4	0	9	0	100
4	10^{-2}	4	0	5	0	100
4	10^{-3}	1	3	1	3	25
4	10^{-4}	0	4	0	7	0
4	10^{-5}	0	4	0	11	0

$$\text{Distancia proporcional} = \frac{50\% - \% < 50\%}{\% > 50\% - \% < 50\%} \cdot \log \text{ factor dilución} = \frac{50 - 25}{100 - 25} \cdot -1 = -0.333$$

$$10^{-3(-0.333)} = 10^{-2.67} = 1 \text{ DL}_{50} - 2.67 + 1.69 (\text{Log } 50) = -0.98 (10^{-1})$$



Tabla 2. Prueba de protección en ratones.

Día	Fecha	Dosis (50 DL ₅₀) (ml)	Vía	Nº ratones
1	09/06/98	0.25	IP	20
4	12/06/98	0.25	IP	20
7	15/06/98	0.25	IP	20
10	18/06/98	0.25	IP	20
21	29/06/98	0.25	IP	20*

*Resultado del desafío: 3 ratones muertos / 17 vivos (85% de protección). Se utilizaron 4 testigos que resultaron todos muertos.

La prueba de protección en ratones se observa en la Tabla 2.

Estos primeros resultados son prometedores, considerando que el GELAB/SENASA (1995) exige una protección no inferior al 70%. Coincidimos con trabajos previamente publicados en la conveniencia de implementar una medida específica de protección, vacunando a las madres gestantes con los tipos de *E. coli* presentes en la explotación, siendo altamente conveniente elaborar vacunas con las cepas fimbrias completas o bien con los pilis purificados por su alto poder inmunógeno, con la consiguiente producción de anticuerpos que bloqueen la colonización bacteriana en el intestino.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pertenece al proyecto "Colibacilosis en lechones: Eficacia y potencia de una vacuna elaborada con cepas enterotoxigénicas regionales" (SEGICYT/UNNE, PI 393)

- Bertschinger, H. U., M. Stamm, y P. Vögeli. 1993. Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: Experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. *Vet. Microbiol* 35:79-89.
- Bertschinger, H. U. 1995. Pathogenesis of porcine post-weaning *Escherichia coli* diarrhoea and of oedema disease. *Pig news and Information* 16:85N-88N.
- Cicuta, M. E., A. E. Parma, M. R. Viñas, S. I. Boehringer, M. E. Sanz, W. R. Roibón, M. C. Benitez y M. C. Barceló. 1996. Aislamiento de *E. coli* SLT-II+ a partir de porcinos. *Memorias XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y VI Congreso Venezolano de Microbiología*, Caracas, Venezuela.
- Garabal, J. I., E. A. González, F. Vázquez, J. Blanco y M. Blanco. 1995. Toxigenic *Escherichia coli* in Spain from 1986 to 1991. *Vet. Microbiol* 47:1-2.
- Hunter, P. 1997. Vaccination for the control of animal diseases in Southern Africa. *Onderstepoort Veterinary Institute, Pretoria, South Africa.*
- Osek, J. y M. Truszczynski. 1992. Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15:285-292.
- Parma, A. E., M. R. Viñas y M. E. Sanz. 1996. Improvement of the polymerase chain reaction to detect *Escherichia coli* Shiga-like toxin II gene from clinical isolates. *J. Microbiol. Methods* 26:81-85.
- Rippinger, P., H. U. Bertschinger, H. Imberechts, B. Nagy, I. Sorg, M. Stamm, P. Wild y W. Wittig. 1995. Designations F 18ab and F 18ac for the related fimbrial types F 107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet. Microbiol.* 45:281-295.
- Sanz, M. E. y A. E. Parma. 1992. Desarrollo de un ensayo de dot blot para la detección de adhesina en *E. coli* enterotoxigénicas. *Acta Bioq. Clín. Latin.* 26:295-298.
- Sanz, M. E., A. E. Parma y H. Echevarría. 1993. Detección de antígenos de adhesión en *E. coli* enterotoxigénica. Estudio de la expresión en diferentes medios de cultivo. *Rev. Arg. Microb.* 25:1-6.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). 1995. Manual de métodos de control de vacunas bacterianas. 4ª Ed., Buenos Aires.
- Supar, H. R. G. 1990. Development of a whole cell vaccine from *E. coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens, vaccine field trials to control piglet neonatal colibacillosis. *Penyakit Hewan* 22:69-75.
- Wasteson, Y., A. Lund, A. y O. Olsvik. 1992. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *Vet. Microbiol.* 30:179-190.
- Zamora, J., G. Reinhardt, M. Polette, R. Aguilar y P. Macías. 1996. Cepas de *Escherichia coli* enteroadhesivas aisladas de cerdos. Propiedades hemolíticas y determinación serológica de fimbrias. *Arch. Med. Vet.* 28:35-39.