

Frecuencia de enterotoxinas termolábil (LTh) y termoestable (STa) en cepas *Escherichia coli* aisladas de lechones con diarrea

Mario Ramón Heredia Navarrete*
Javier Jesús Flores Abuxapqui*
Guadalupe de Jesús Suárez Hoil*
Miguel Angel Puc Franco*
José Franco Monsreal**

Resumen

Se realizó un estudio para conocer la frecuencia de enterotoxinas termolábil (LTh) y termoestable (STa) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces de 300 cerdos de 1 a 10 días de edad que cursaron con un cuadro diarreico. Se aisló *E. coli* en el 100% de los animales muestreados. Mediante la técnica de ELISA, se detectó la producción de enterotoxina termoestable (STa) en 35 animales (11.6%). No se encontraron cepas de *E. coli* productoras de enterotoxina termolábil (LTh). Se recomienda la utilización de antisuero homólogo al realizar la técnica de GM1-ELISA debido a que existen diferencias inmunológicas entre la LT humana (LTh) y la LT porcina (LTp).

Introducción

La industria porcina se ha visto afectada durante años por el problema de las diarreas neonatales del lechón y de los cerdos destetados precozmente.¹

Dentro de las numerosas causas de diarrea de los cerdos lactantes, las diagnosticadas con mayor frecuencia son las infecciosas, y de éstas, las más frecuentes son las bacterianas.^{10,17} Entre las causas de diarrea bacteriana, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp son las más comunes e importantes, aunque *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter* spp y *Yersinia enterocolitica* también han sido identificadas como causas de diarrea y de enfermedad entérica.⁷

La colibacilosis entérica se presenta típicamente en lechones no destetados desde las primeras 2 o 3 horas

hasta los 10 días de nacidos, aproximadamente.¹⁷

La diarrea colibacilar (colibacilosis) es una enfermedad causada por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Investigaciones realizadas en cepas de *E. coli* asociadas con casos individuales o brotes de diarrea en cerdos neonatos han permitido conocer ciertos factores específicos de virulencia, que son usados para distinguir entre cepas patógenas y comensales. Dos de los factores de virulencia más importantes identificados hasta ahora en cepas de *E. coli* enterotoxigénica son: 1) la expresión de antígenos fimbriales que permiten a la bacteria adherirse a las células de mamíferos, y 2) la elaboración de una o más enterotoxinas que inducen a la secreción de fluidos intestinales mediante el incremento del Adenosín Monofosfato cíclico (AMPC) o del Guanosín Monofosfato cíclico (GMPc).⁷

Para causar enfermedad, las cepas necesitan proliferar en la parte anterior del intestino delgado y producir enterotoxinas. Con la ayuda de los factores de adherencia F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) y F14 (adhesinas), las cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) se adhieren al epitelio intestinal y causan diarrea como resultado de la producción de enterotoxinas termolábiles, termoestables, o ambas.¹⁶

En los primeros estudios de cepas de *E. coli* en lechones con problemas entéricos se describió la frecuencia de los grupos y las cepas que producían enterotoxinas y factores de adherencia. Los serogrupos "O" de *E. coli* identificados con más frecuencia en diarrea neonatal del lechón son los siguientes: 8, 45, 138, 139, 141 y 149.^{15,16}

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la frecuencia de las enterotoxinas termolábil (LTh) y termoestable (STa) en cepas de *E. coli* aisladas de 300 lechones de 1 a 10 días de edad, con diarrea.

Material y métodos

Se estudiaron 300 cerdos de 1 a 10 días de edad, que cursaron con un cuadro diarreico, en granjas ubicadas en la zona henequenera del estado de Yucatán.

La muestra se tomó en forma directa (vía rectal) con la ayuda de hisopos estériles, y se conservó en tubos de ensayo con solución salina estéril como medio de trans-

Recibido para su publicación el 13 de octubre de 1993.

* Departamento de Microbiología, Unidad de Investigación de Enfermedades Tropicales. Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Universidad Autónoma de Yucatán. Apartado Postal 1232-2, Colonia Francisco I. Madero, 97240. Mérida, Yucatán.

** Unidad de Epidemiología y Estadística. Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Universidad Autónoma de Yucatán. Apartado Postal 1232-2, Colonia Francisco I. Madero, 97240. Mérida, Yucatán.

porte. El procesamiento se realizó dentro de las dos horas siguientes a partir de su recolección.

Aislamiento e identificación de *E. coli*

Las muestras se inocularon en cajas de Petri con agar MaConkey y con agar XLD (xilosa, lisina y desoxicolato), las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se realizaron pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares, utilización de aminoácidos, etc., en las colonias sugestivas, según lo recomendado por la American Society for Microbiology.⁹

Se utilizaron como cepas de referencia:

- 1) H-10407, productora de enterotoxina LT.
- 2) K-12, no productora de enterotoxinas LT y ST.
- 3) Q-20, productora de enterotoxinas LT/ST.

Detección de toxinas LTh y STa

a) *Producción de toxina LTh*. Se procesaron por separado 3 cepas de *E. coli* con pruebas bioquímicas diferentes por cada animal. Las cepas de *E. coli* problema y las de referencia se inocularon en 3 ml de caldo infusión de cerebro y corazón (BHI), y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Se tomaron 3 gotas del crecimiento, se inocularon en 3 ml de caldo Evans (medio CA-YE) adicionado con lincomicina a una concentración de 100 µg/ml de medio, y se incubaron a 37°C en agitación (mezcladora rotatoria) a 120 rpm durante 24 h. Se les añadió polimixina B a una concentración de 1,000 UI/ml de medio, y se incubaron a 37°C en agitación a 120 rpm durante una hora. Se centrifugaron a 3,000 x g durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron con filtros bacteriológicos de 0.45 micras de poro.^{2,11,20}

b) *Producción de toxina STa*. Por cada animal se tomaron 3 cepas de *E. coli* con bioquímicas diferentes y se preparó una mezcla. Las mezclas problema y las cepas de referencia se inocularon en 3 ml de caldo Evans y se incubaron a 37°C en agitación (mezcladora rotatoria) a 120 rpm durante 24 horas. Se centrifugaron a 3,000 x g durante 15 min y los sobrenadantes se filtraron con filtros bacteriológicos de 0.45 micras de poro.³

c) Se utilizó la técnica de GM1-ELISA para la detección de la toxina LT.^{5,8,13}

Se utilizaron placas de microtitulación con pozos de fondo plano; a cada pozo se le añadió 0.1 ml de monogangliósido GM1* para sensibilizarlos, y se incubaron durante 24 h. Los sitios de unión remanentes fueron bloqueados con 0.25 ml de albúmina sérica bovina* al 1% (peso-volumen), y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Después del lavado, a cada pozo se le añadió 0.1 ml de sobrenadante filtrado; la microplaca se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Para remover el material no fijado, se lavó 3 veces con solución

reguladora salina-fosfatos con 0.05% de Tween 20. Se incubó 1 hora con 0.1 ml de suero de conejo anti-LT 1:200 (IgG de conejo para la toxina termolábil de *E. coli* de origen humano**) y 0.1 ml de IgG de carnero anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano*. Por último, se añadió el sustrato enzimático (H₂O₂ + OPD) (Orto-fenilenediamina)* y se incubó a temperatura ambiente hasta que el color testigo positivo alcanzó una intensidad conveniente (de 10 a 20 minutos).

d) Para la detección de la toxina termoestable (STa) se utilizó un ELISA comercial.**¹⁴ Se desechó el contenido de la microplaca (los pozos vienen cubiertos con toxina STa), y ésta se lavó con la solución amortiguadora de lavado (PBS). Se añadieron 200 µl del extracto bacteriano de cada muestra problema a los pozos de la microplaca, dejando tres pozos vacíos: uno para poner 200 µl del testigo positivo, otro para poner 200 µl del testigo negativo y el otro para poner 200 µl de caldo Evans, al mismo tiempo se añadieron 10 µl del conjugado (anticuerpo monoclonal anti-STa marcado con peroxidasa de rábano). La microplaca se incubó 90 min a temperatura ambiente, al final de los cuales se lavó 4 veces (30 segundos cada vez con solución amortiguadora) y se le añadieron 100 µl de la solución de sustrato (OPD 1 mg/ml + H₂O₂ al 0.01%). Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 min, y por último se detuvo la reacción con H₂SO₄ 1.5 N. Lectura: El testigo positivo no desarrolla color, en tanto que el testigo negativo debe desarrollar un color amarillo.

Resultados

De los 300 animales muestreados, en todos (100%) se aisló *E. coli*. Treinta y cinco animales (11.6%) tuvieron cepas de *E. coli* productoras de toxina termoestable (STa). Sin embargo, no se encontraron cepas de *E. coli* productoras de toxina termolábil (LTh).

Discusión

Se ha demostrado que la *E. coli* enterotoxigénica es una causa importante de diarrea en cerdos neonatos. Estas cepas colonizan el intestino delgado por medio de uno o más antígenos fimbriales, y junto con la producción de enterotoxinas causan la enfermedad.

En Gran Bretaña, Woodward *et al.*,¹⁹ aislaron, de 686 cepas de *E. coli* provenientes de cerdos con diarrea, 245 (35.7%) cepas enterotoxigénicas, de las cuales 17 (6.9%) produjeron STa.¹⁹

En un estudio realizado en Polonia por Osek y Svennerholm,¹² de 103 cepas aisladas de lechones con diarrea, 71 (68.9%) fueron productoras de enterotoxina: 62 de estas cepas (87.3%) produjeron solamente LT, 7 cepas (9.8%) produjeron STa, y 2 cepas (2.8%) produjeron ambas toxinas.¹² Estos resultados concuerdan con los de este trabajo en la producción de STa.

Por otro lado, en un estudio realizado en España por González y Blanco,⁴ en el que encontraron un 30.8%

* Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.

** Swiss Serum and Vaccine Institute, Berna, Suiza.

***Denka Seiken Ltd., Japón, distribuido por Oxoid Ltd.

de cepas enterotoxigénicas aisladas de lechones con diarrea, todas produjeron STa solamente.

En Estados Unidos, Wilson y Francis¹⁸ aislaron 96% de cepas de *E. coli* enterotoxigénica en cerdos con colibacilosis, de las cuales el 47.5% produjo solamente STa. En Canadá, según el estudio de Harel *et al.*,¹⁶ de 211 cepas aisladas en cerdos con diarrea, 102 (48.3%) poseían los genes para una o más enterotoxinas. De estas 102 cepas, 44 (43.1%) produjeron toxina STa, y sólo 3 (2.9%) produjeron toxina LT. Puede observarse que en estos estudios hay un predominio de cepas de *E. coli* productoras de STa, con cifras tan altas como el 47.5%. Esto pudiera deberse a que todos ellos utilizaron sondas genéticas en sus estudios, las cuales son más específicas y sensibles que la técnica de ELISA.

En lo que respecta a la enterotoxina LT, en este estudio no se localizó ninguna cepa productora de esta enterotoxina. Esto concuerda con los resultados de González y Blanco,⁴ y de Wilson y Francis.¹⁸

Osek y Svennerholm¹² encontraron 62 cepas (87.3%) productoras de LT, en cepas de *E. coli* aisladas de lechones de cero a seis días de edad, con diarrea, utilizando la técnica de GM1-ELISA y una antitoxina LT porcina, a diferencia de este estudio en el que se utilizó una antitoxina LT de origen humano. Se ha observado que hay diferencias mínimas en uno o dos aminoácidos en la estructura primaria de las enterotoxinas de origen humano y porcino.⁵ Estas diferencias, aparentemente, son de poca importancia biológica en el efecto que causan en las células adrenales Y-1, no obstante, pueden causar un cambio conformacional en la estructura terciaria de la proteína, lo que da como resultado una diferencia observada inmunológicamente en la reacción con el GM1-ELISA y podría explicar los resultados negativos o falsos positivos que se han señalado en otros estudios cuando usan la técnica de GM1-ELISA con antisueros preparados con cepas de *E. coli* de origen humano para detectar enterotoxinas de origen porcino. Por lo tanto, lo más recomendable es usar antisueros homólogos y no heterólogos.

En conclusión, la frecuencia de enterotoxina termoestable (STa) en cerdos neonatos con diarrea fue de 11.6%, y no se encontró enterotoxina termolábil (LTh) con la prueba de GM1-ELISA. Se recomienda utilizar antisueros homólogos para detectar la producción de enterotoxina LT en cepas de *E. coli* de origen porcino.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración técnica de la QFB Patricia Madrigal Pachó.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), Convenio 1292-M9204.

Abstract

The aim of this study was to establish the frequency of heat-stable (STa) and/or heat-labile (LTh)-producing

E. coli in faeces from 300 diarrheic 1-10 day old piglets. *E. coli* was isolated in all piglets (100%) studied. STa producing *E. coli* was detected in 35 piglets (11.6%) using the ELISA test. LTh/producing *E. coli* was not detected. Due to immunological differences between human LT (LTh) and porcine LT (LTP), it is recommended to use homologous antiserum to perform GM1-ELISA.

Literatura citada

1. Bravo, F.O.: Diarreas por nutrición y mal manejo. En: Avances sobre Enfermedades del Cerdo, 1985. Editado por: Morilla, A., Correa, P., Stephano, A., 335-344. *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*, México, D.F., 1985.
2. Gillian, P.H. and Robertson, D.C.: Nutritional requirements for synthesis of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic strains of *E. coli*. *Infect. Immunol.*, 23: 99-107 (1970).
3. Gomez, J.A., Rodrigues, A.C., Simoes, M., Serafim, M.B. and Pestana-Castro de, A.F.: Simplification of methods for the production and storage of specimens to be tested for heat-stable enterotoxin of *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 786-790 (1979).
4. Gonzalez, E.A. and Blanco, J.: Colonization antigens, antibiotic resistance and plasmid content of enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets with diarrhea in Galicia (north-western Spain). *Vet. Microbiol.*, 11: 261-270 (1986).
5. Gustafsson, B. and Möllby, R.: GM-1 ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by human and porcine *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 298-301 (1982).
6. Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L.A., Bigras-Poulin, M., Lariviere, S. and Fairbrother, J.M.: Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 745-752 (1991).
7. Holland, R.E.: Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3: 345-375 (1990).
8. Honda, T., Sato, M. and Miwatani, T.: Differential detection of cholerae enterotoxin and *E. coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies specific to the two toxins. *J. Clin. Microbiol.*, 20: 664-667 (1984).
9. Kelly, M.T., Brenner, D.J. and Farmer, J.: *Enterobacteriaceae*. In: Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. Edited by: Tenenette, E.H., Balows, A., Hausler Jr., W.S., Shadomy, H.S., 263-277. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1985.
10. Martell, D.M.A. y Pérez, H.F.: Consideraciones sobre las diarreas de los lechones. En: Avances sobre Enfermedades del Cerdo, 1985. Editado por: Morilla, A., Correa, P., Stephano, A., 321-323. *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*, México, D.F., 1985.
11. Mundell, D.H., Anselmo, C.R. and Wishnow, R.M.: Factors influencing heat-labile *E. coli* enterotoxin activity. *Infect. Immunol.*, 14: 383-388 (1976).
12. Osek, J. and Svennerholm, A.M.: Determination of K88 antigens and enterotoxins of *E. coli* strains isolated from Polish piglets with diarrhea by the use of enzyme-linked immunosorbent assays. *Vet. Microbiol.*, 29: 299-307 (1991).
13. Sack, D.A., Huda, S., Neogi, P.B.K., Daniel, R.R. and Spira, W.M.: Microtitre ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *E. coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 35-40 (1980).
14. Scotland, S.M., Willshaw, G.A., Said, B., Smith, H.R. and Rowe, B.: Identification of *E. coli* that produces heat-stable

- enterotoxin STa by a commercially available enzyme-linked immunoassay and comparison of the assay with infant mouse and DNA probes test. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 1697-1699 (1989).
15. Söderlind, O. and Möllby, E.: Enterotoxins, o groups, and K88 antigen in *E. coli* from neonatal piglets with and without diarrhoea. *Infect. Immunol.*, 24: 611-616 (1989).
 16. Söderlind, O., Möllby, R. y Thafvelin, B.: Factores de virulencia en cepas porcinas de *E. coli* aisladas en Suecia de lechones con problemas diarreicos. En: Avances sobre Enfermedades del Cerdo, 1985. Editado por: Morilla, A., Correa, P., Stephano, A., 345-349. *Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*, México, D.F., 1985.
 17. Wilson, M.R.: Enteric colibacillosis. In: Diseases of Swine. 5th ed. Edited by: Leman, A.D., 471-491. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, 1981.
 18. Wilson, R.A. and Francis, D.H.: Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am. J. vet. Res.*, 47: 213-217 (1986).
 19. Woodward, M.J., Kearsley, R., Wray, C. and Roeder, P.L.: DNA probes for the detection of toxin genes in *E. coli* isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. *Vet. Microbiol.*, 22: 277-290 (1990).
 20. Yoh, M., Yamamoto, K., Honda, T., Takeda, Y. and Miwatani, T.: Effects of lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic *E. coli*. *Infect. Immunol.*, 42: 778-782 (1983).