

TIPIFICACION SEROLOGICA, SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS Y PATOGENICIDAD PARA EL RATON DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE CERDOS

Por M. Fernández Díez
J. A. Ordás Alvarez
P. Cármenes Díez
P. Rubio Nistal

INTRODUCCION

En las explotaciones ganaderas de tipo industrial, los animales jóvenes desprovistos de un sistema inmune plenamente funcional suelen tener unas tasas muy elevadas de morbilidad y mortalidad, a consecuencia de diversas infecciones. En tales explotaciones porcinas, las infecciones colibacilares de lechones y cerdos jóvenes adquieren una especial importancia por su frecuencia y trascendencia económica, tanto por las muertes ocurridas, sobre todo dentro de las primeras semanas de vida, como por los retrasos del crecimiento y mermas en la ganancia de peso.

Las infecciones colibacilares son debidas principalmente a unos serotipos específicos y bien definidos^{3, 14}, por lo que puede ser de especial interés llegar al conocimiento de aquéllos que predominan actualmente en nuestro país. No obstante, hay que tener en cuenta que la frecuencia de los distintos serotipos tiende a cambiar con el tiempo, habiéndose señalado como más frecuente en otros lugares durante los últimos años a los siguientes: 0149 (considerado durante mucho tiempo como el más común), 0157, 0101 (cuya frecuencia va en aumento), 064 y 020¹⁶.

La utilización incorrecta de diversos antimicrobianos en el tratamiento de estas infecciones y para estimular el desarrollo de los animales jóvenes, ha venido determinando una constante modificación de la sensibilidad de las cepas de *E. coli*, las cuales han llegado incluso a hacerse resistentes a algunos para los que tenían la consideración de naturalmente sensibles⁶. Por lo tanto, parece imprescindible mantener una vigilancia continua respecto a su sensibilidad y procurar el cambio frecuente de los utilizados de forma rutinaria, para reducir a un mínimo las presiones selectivas que dan lugar a la aparición de cepas resistentes^{1, 8}.

Hasta hace algún tiempo, la prueba de la virulencia en ratón fue frecuentemente utilizada para estimar el carácter patógeno de *E. coli*^{10, 13, 15, 17}. Se ha informado que

An. Fac. Vet. León, 1984, 30, 209-216.

las cepas de fuente sistémica mostraban una mayor virulencia que las de procedencia intestinal⁷, lo que nos llevó a considerar si dentro de estas últimas se pondrían también de manifiesto diferencias según que se hubiesen aislado de animales enfermos o de sanos. De todos modos, su validez actual es muy dudosa, puesto que los antígenos de fijación y la enterotoxina LT representan los factores responsables de la patogenicidad de las cepas intervinientes en la diarrea colibacilar, así como el «principio de la enfermedad de los edemas» en el proceso enterotoxémico^{11, 16}.

MATERIAL Y METODOS

Para el estudio de la identificación serológica se utilizaron 67 cepas de *E. coli*, 43 de las cuales se aislaron de heces, hisopos rectales y mucosa duodenal de lechones enfermos, y las 24 restantes de hisopos rectales de cerdas madres y lechones sanos. Las muestras procedieron de diversos lugares del país y el aislamiento se verificó en agar McConkey y agar sangre, haciéndose la identificación bacteriana por las pruebas de Eijkman e IMViC.

La serotipificación se hizo mediante la prueba de aglutinación en porta, utilizándose los siguientes antisueros del Instituto de Salud Pública de Holanda: 08:K87, 0138:K81, 0139:K82, 0141:K85ab, 0141:K85ac, 0147:K89, 0149:K91 y K88. Mediante el cultivo de las cepas en agar sangre se obtuvieron las adecuadas suspensiones bacterianas, que se utilizaron sin calentar y calentadas a 100° C durante una hora para demostrar los antígenos K y O, respectivamente.

Para el estudio de la sensibilidad a los agentes antimicrobianos se utilizaron 50 de dichas cepas (29 de la primera procedencia y 21 de la segunda). La sensibilidad in vitro se comprobó por el método de difusión en agar Mueller-Hinton, con tabletas Neo-sensitabs, haciéndose la lectura de los halos de inhibición de acuerdo con las cifras dadas por el sistema correspondiente, para inóculos preparados en caldo triptosa fosfato y ajustados al patrón 0,5 de McFarland ($3,75 \times 10^8$ gérmenes), según la técnica de KIRBY-BAUER².

La inoculación de las placas se realizó mediante hisopos y la lectura de los halos de inhibición se hizo transcurridas 16 a 18 horas. Los antimicrobianos ensayados y las dosis probadas figuran en la tabla 1.

Para la prueba de patogenicidad en ratón se utilizaron 43 de las cepas (19 de la primera procedencia y 24 de la segunda). Se realizó en ratones blancos NMRI (Naval Medical Research Institute), cuyo peso osciló entre 18 y 26 g, utilizándose 40 animales por cepa distribuidos en ocho lotes iguales, que se inocularon con las diluciones 10^{-1} a 10^{-8} .

Los inóculos se prepararon con mucina gástrica de cerdo en una concentración final del 1,8%. Después del cultivo de las cepas en caldo tripticosa soja, durante 14 horas a 37° C, la concentración bacteriana se determinó por recuento en cámara de Petroff-Hausser, a partir de una dilución 10^{-2} en suero fisiológico. Los ratones inoculados por la vía intraperitoneal se mantuvieron en observación durante tres días y la DL_{50} fue calculada por el método de Kärber.

TABLA I
Antimicrobianos ensayados y su cantidad difusible

A. <i>Penicilinas</i>	Ampicilina	33 μ g
	Carbenicilina	115 "
B. <i>Cefalosporinas</i>	Cefalotina	66 "
	Cefamandol	60 "
C. <i>Aminoglucósidos</i>	Estreptomicina	100 "
	Kanamicina	100 "
	Neomicina	120 "
	Amikacina	40 "
	Gentamicina	40 "
	Espectinomicina	200 "
D. <i>Tetraciclinas</i>	Tetraciclina (oxi)	80 "
E. <i>Cloranfenicol</i>	Cloranfenicol	60 "
F. <i>Macrólidos</i>	Virginiamicina	30 "
G. <i>Polipéptidos</i>	Colistina	150 "
	Vancomicina	70 "
H. <i>Sulfonamidas y combinaciones</i>	Sulfonamidas	240 "
	Trimetoprim-sulfa	5,2 + 240 "
I. <i>Nitrofuranos y derivados quinólicos</i>	Nitrofurantoina	260 "
	Flumequina	30 "
	Acido nalidíxico	130 "
J. <i>Otros</i>	Fosfomicina	70 "

RESULTADOS Y DISCUSION

Serotipificación

Tres cepas de *E. coli* aisladas de tres lechones con enfermedad de los edemas procedentes de la provincia de Segovia resultaron 0149:K91. Dos cepas aisladas de un lechón con diarrea (a su vez con infección septicémica de mal rojo) y de uno sano procedentes de la provincia de La Coruña resultaron 0149:K91, K88. Cuatro cepas aisladas de igual número de lechones con diarrea procedentes de la provincia de Burgos y una cepa aislada de un lechón sano de la provincia de León resultaron 0141:K85ab, K88.

Además de las siete cepas K88 positivas referidas anteriormente, dicho antígeno fue demostrado también en otras seis cepas aisladas de tres lechones sanos y una cerda sana de la provincia de León, y de dos lechones con diarrea de la de Zaragoza.

Por otra parte, tres cepas dieron aglutinación positiva frente a los antisueros K89 (esta cepa a su vez con K88), K81 y K85ab, las que fueron aisladas de un lechón sano de la provincia de León, de uno con diarrea de la de Zaragoza y de otro con diarrea de la de Burgos, respectivamente.

Vemos pues que con los antisueros utilizados solamente ha podido determinarse

el serogrupo en 10 cepas (14,9%); en otras tres cepas se ha demostrado un antígeno K polisacárido; y en 13 cepas se ha demostrado el antígeno K88.

Cabe señalar que dos de las cinco cepas del serogrupo 0149:K91 tenían a su vez el antígeno K88, precisamente las aisladas de lechones procedentes de una granja donde se estaban presentando casos de diarrea, mientras que dicho antígeno no fue detectado en las otras tres cepas aisladas de lechones recientemente destetados, procedentes de una granja en la que se estaban presentando casos de enfermedad de los edemas.

Estos dos serogrupos, 0149:K91 y 0141:K85ab, parece que por el momento tienen una importante prevalencia en nuestro país. Recientemente han sido señalados también por otros investigadores, quienes obtuvieron la más alta frecuencia para el primero de ellos^{9, 12}.

Respecto al antígeno K88, dado su papel esencial como factor de patogenicidad, hemos de reseñar su presencia en trece cepas (19,4%), siete aisladas de lechones enfermos y seis de animales sanos.

Sensibilidad a los agentes antimicrobianos

En la tabla 2 pueden verse los porcentajes de sensibilidad-resistencia obtenidos con 50 cepas de *E. coli* frente a los 21 agentes antimicrobianos ensayados. Es destacable el elevado porcentaje de cepas que manifestaron sensibilidad (sensibles +

TABLA 2
Porcentajes de sensibilidad-resistencia a 21 agentes antimicrobianos de 50 cepas de *Escherichia coli*

Antimicrobianos	Porcentajes de sensibilidad-resistencia de las cepas		
	Sensibles	Intermedias	Resistentes
Colistina	98	—	2
Flumequina	94	4	2
Cefamandol	92	6	2
Fosfomicina	88	10	2
Acido nalidíxico	72	26	2
Amikacina	70	24	6
Gentamicina	60	26	14
Neomicina	38	40	22
Ampicilina	62	14	24
Cloranfenicol	66	8	26
Espectinomicina	48	26	26
Carbenicilina	68	4	28
Trimetoprim-sulfa	26	44	30
Nitrofurantoína	26	36	38
Kanamicina	38	22	40
Cefalotina	14	42	44
Tetraciclina	10	10	80
Estreptomycin	10	2	88
Sulfonamidas	—	4	96
Vancomicina	—	—	100
Virginiamicina	—	—	100

intermedias) a la colistina, flumequina, cefamandol, fosfomicina y ácido nalidíxico (98 % de cepas sensibles para todos ellos). También tuvieron una marcada actividad la amikacina (94 %) y la gentamicina (86 %).

Para una mejor interpretación de conjunto de la sensibilidad de las cepas frente a los diversos agentes antimicrobianos, hemos establecido arbitrariamente cinco grupos. a) Con más del 90 % de cepas sensibles: colistina, flumequina, cefamandol, fosfomicina y ácido nalidíxico; b) entre el 70 y 90 %: gentamicina, neomicina, ampicilina, cloranfenicol, espectinomicina, carbenicilina y trimetoprim-sulfa; c) entre el 50 % y 70 %: nitrofurantoína, kanamicina y cefalotina; d) con menos del 25 %: tetraciclina, estreptomycinina y sulfonamidas; e) sin ninguna cepa sensible: vancomicina y virginiamicina.

El criterio utilizado en la selección de los agentes antimicrobianos ha sido aleatorio, de modo que junto a los tradicionalmente empleados en el tratamiento de las infecciones colibacilares se incluyen otros sin un interés práctico inmediato, así como algunos que no estando indicados entre este tipo de infecciones son ampliamente utilizados en la práctica diaria ante cualquier caso de diarrea infecciosa, con independencia de su etiología.

En términos generales, la pauta de sensibilidad-resistencia ha sido bastante similar a la dada por diferentes informes durante los últimos años. En un trabajo previo realizado hace algún tiempo en la cátedra⁴, la furazolidona, neomicina, kanamicina y cloranfenicol, manifestaron buena actividad, mientras que la estreptomycinina y tetraciclina no tuvieron la que normalmente se les venía confirmando por entonces, lo que causó cierta alarma entre los sanitarios asistentes al V Congreso Nacional de Microbiología, al que presentamos la correspondiente comunicación. Si comparamos los datos de entonces con los de ahora, puede apreciarse que el cloranfenicol y la neomicina mantienen aproximadamente la misma actividad mientras que el furano y la kanamicina la han reducido sensiblemente (95 y 90 % de cepas sensibles frente al 62 y 60 %, respectivamente). Hemos de hacer la salvedad que en aquella ocasión no se empleó el sistema Neo-sensitabs.

Para finalizar este apartado, diremos que los porcentajes de sensibilidad para las cepas procedentes de animales sanos fueron ligeramente superiores a los obtenidos para las cepas de los animales enfermos, respecto a la mayoría de los antimicrobianos.

Patogenicidad

En la tabla 3 puede verse que 37 de las cepas de *E. coli* (86,04 %) fueron letales para el ratón por la vía intraperitoneal, oscilando la DL_{50} entre $10^{2,55}$ y $10^{7,88}$. Si 18 de las cepas (94,7 %) aisladas de lechones enfermos resultaron letales, con dosis comprendidas entre $10^{2,55}$ y $10^{7,7}$, también lo fueron 19 (79,16 %) de las aisladas de animales sanos, con dosis comprendidas entre $10^{2,55}$ y $10^{7,88}$.

En una experiencia previa realizada con inóculos sin mucina, se obtuvieron unas DL_{50} muy elevadas⁵, ocurriendo además la muerte de una parte considerable de los ratones inoculados con el cultivo total en las dos primeras horas, presuntivamente de

TABLA 3
DL₅₀ para ratón de 43 cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones enfermos y animales sanos (cerdas madres y lechones)

Lechones enfermos		Cerdas madres y lechones sanos (cepas 20-29 y 30-43, respectivamente)	
N.º cepa	DL ₅₀	N.º cepa	DL ₅₀
1	10 ^{6,0}	20	10 ^{4,7}
2	10 ^{2,61}	21	10 ^{7,54}
3	10 ^{5,65}	22	10 ^{5,42}
4	10 ^{7,0}	23	10 ^{6,32}
5	10 ^{2,55}	24	10 ^{7,88}
6	10 ^{5,44}	25	10 ^{7,7}
7	10 ^{5,95}	26	10 ^{7,3}
8	10 ^{6,53}	27	10 ^{7,38}
9	10 ^{6,78}	28	10 ^{7,72}
10	>10 ^{8,12}	29	10 ^{6,74}
11	10 ^{7,23}	30	>10 ^{7,97}
12	10 ^{6,61}	31	10 ^{7,71}
13	10 ^{4,5}	32	10 ^{5,55}
14	10 ^{3,04}	33	10 ^{6,70}
15	10 ^{7,06}	34	10 ^{7,21}
16	10 ^{4,83}	35	>10 ^{7,56}
17	10 ^{7,3}	36	10 ^{4,6}
18	10 ^{7,7}	37	10 ^{3,76}
19	10 ^{6,62}	38	>10 ^{7,72}
		39	10 ^{4,42}
		40	>10 ^{7,48}
		41	>10 ^{7,80}
		42	10 ^{6,79}
		43	10 ^{6,58}

toxemia. En esta ocasión, utilizando inóculos con mucina, y partiendo de una primera concentración a la dilución 10⁻¹, se obtuvieron unas DL₅₀ más bajas, que han permitido discernir mucho mejor respecto a la distinta virulencia de las cepas, al reducir sensiblemente el número de bacterias requerido para producir una DL₅₀.

El mayor número de muertes tuvo lugar dentro de las primeras doce horas, aconteciendo las restantes casi en su totalidad dentro de las 24 horas siguientes; en ambos casos, después de establecerse una infección septicémica, observándose la bacteria en muy diversos órganos, con una presencia numérica más importante en los pulmones y riñones.

De acuerdo con el criterio de virulencia tenido en cuenta por otros autores⁷, solamente tres cepas, dos de ellas aisladas de dos lechones enfermos y una de un lechón sano, con unas DL₅₀ inferiores a 10³, tendrían un grado medio de virulencia; asimismo, otras siete cepas, tres de ellas aisladas de tres lechones enfermos y cuatro de una cerda madre sana y tres lechones sanos, con unas DL₅₀ entre 10³ y 10⁵, tendrían una virulencia ligera. Por lo tanto, no se ha observado una diferencia sustancial entre las cepas de una y otra procedencia, predominando las de baja virulencia.

El hecho de que seis de las ocho cepas no letales sin mucina resultaran

igualmente apatógenas con mucina, parece reafirmar dicho carácter. Cinco de dichas seis cepas apatógenas fueron aisladas de animales sanos, por lo que en este aspecto sí se ha observado una clara diferencia, pudiendo ser la prueba de la virulencia en ratón de alguna ayuda, con vistas a una primera valoración de los aislamientos efectuados a partir de muestras fecales.

RESUMEN

Mediante siete antisueros OK y uno K88, se ha determinado el serogrupo en diez de sesenta y siete cepas de *E. coli* aisladas de cerdos enfermos y sanos: tres cepas fueron 0149:K91, dos 0149:K91, K88 y cinco 0141:K85ab, K88. El antígeno K88 se demostró en trece de las cepas.

De veintiún antimicrobianos ensayados con cincuenta cepas, el porcentaje más alto de cepas sensibles (98%) se obtuvo con la colistina, flumequina, cefamandol, fosfomicina y ácido nalidíxico. La amikacina (94%) y gentamicina (86%) tuvieron también una importante actividad.

De cuarenta y tres cepas, treinta y siete resultaron letales para el ratón, por vía intraperitoneal, oscilando la DL_{50} entre $10^{2,55}$ y $10^{7,88}$. Solamente diez de estas cepas mostraron un grado medio o ligero de virulencia, habiendo sido aisladas tanto de los animales enfermos como de los sanos. Por otro lado, cinco de las seis cepas apatógenas fueron aisladas de los animales sanos.

SEROTYPING, SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS AND MOUSE PATHOGENICITY OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM PIGS

SUMMARY

The serogroup has been determined in ten of sixty-seven *E. coli* strains isolated from diseased and healthy pigs, by means of seven OK and one K88 antisera. Three of the strains were 0149:K91, two were 0149:K91, K88 and five were 0141:K85ab, K88. Thirteen of the strains showed the K88 antigen.

Of the twenty-one antimicrobial agents assayed with fifty strains, 98% of these strains were sensible to colistin, flumequine, cefamandole, fosfomicin and nalidixan. Amikacin (94%) and gentamicin (86%) also showed a marked activity.

Thirty-seven of forty-three strains were lethal for mouse via the intraperitoneal route, having the DL_{50} between $10^{2,55}$ and $10^{7,88}$. Only ten of these strains which were indistinctly isolated from diseased and healthy animals, showed some degree of virulence. On the other hand, five of the six non-pathogenic strains were isolated from healthy animals.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDERSON, E. S. (1968).—The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**, 131.
- 2) BAUER, A. W.; KIRBY, M. M.; SHERRIS, J. C., y TURCK, M. (1966).—Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Path.*, **45**, 493-496.
- 3) EWING, W. H.; DAVIS, B. R., y MONTAGUE, T. S. (1963).—Studies on the occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease. C.D.C. Monograph, Communicable Disease Center, Atlanta, Ga., 1-38.
- 4) FERNÁNDEZ DÍEZ, M., y ALLER, B. (1976).—Sensibilidad y polirresistencia a distintos agentes quimioterápicos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de procesos clínicos de terneros, lechones y pollos. *Bol. Inf. Consejo Gen. Col. Vet. Esp.*, **204-205**, 121-127.
- 5) FERNÁNDEZ DÍEZ, M.; ORDAS ALVAREZ, J. A., y CÁRMENES DÍEZ, P. (1982).—Patogenicidad para el ratón de cepas de *Escherichia coli* de origen porcino. *Comunicaciones del VII Symposium Internacional de la A.M.V.M.I.*, Barcelona, 38.
- 6) GUINEE, P.A.M. (1963).—*Experimental studies on the origin and significance of antibiotic-resistant Escherichia coli in animals and man*. Thesis, Utrech.
- 7) JACKS, T. M., y GLANTZ, P. J. (1967).—Virulence of *Escherichia coli* serotypes for mice. *J. Bacteriol.*, **93**, 991-995.
- 8) MITSUHASHI, S. (1969).—The R factors. *J. Infect. Dis.*, **119**, 89.
- 9) MUÑOZ BENITO, L. (1982).—Estudio y caracterización de cepas de *E. coli* porcino. *Comunicaciones del VII Symposium Internacional de la A.M.V.M.I.*, Barcelona, 40.
- 10) NAMIOKA, S.; MURATA, M., y SAKAYAKI, R. (1961).—Studies on the pathogenicity of *Escherichia coli*: an observation on virulence of *Escherichia coli* for mice with wetting agent. *Japan J. Med. Sc. Biol.*, **14**, 11-20.
- 11) NIELSEN, N. O. (1981).—Edema disease. En LEMAN, A. D. y col., ed.: *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Ames, 478-490.
- 12) NOGAREDA, J.; RIERA, P., y COSTA, LL. (1982).—Estudio serológico de los *E. coli* aislados en procesos patológicos que afectan a la cabaña porcina española. *Anaporc*, **7**, 18.
- 13) ROWLEY, D. (1954).—The virulence of strains of *Bacterium coli* for mice. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **35**, 528-538.
- 14) SOJKA, W. J.; LLOYD, M. K., y SWEENEY, E. J. (1960).—*Escherichia coli* serotypes associated with certain pig diseases. *Res. Vet. Sci.*, **1**, 17-27.
- 15) TURGEON, F.; BORDUAS, A. G., y FRAPPIER, A. (1960).—Pathogénicité pour l'embryon de poulet et la souris, de quelques souches d'*Escherichia coli* entero-pathogènes. *Rev. Can. Biol.*, **19**, 417-424.
- 16) WILSON, M. R. (1981).—Enteric colibacillosis. En LEMAN, A. D. y col., ed.: *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Ames, 471-490.
- 17) WOLBERG, G., y DEWITT, C. W. (1969).—Mouse virulence of K(L) antigen containing strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **100**, 730-737.