



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

MAESTRÍA SALUD ANIMAL AVANZADA

*Prevalencia de Antígenos Fimbriales F4
y F18 en cerditos lactantes y destetados
en la Provincia de Villa Clara, Cuba.*

Autor: Dr. M.V. Julio César Castillo Cuenca.

Tutor: Dr. M.V. Pedro Y. de la Fe Rodríguez MsC.

Dr. M.V. Eduardo Cruz Muñoz.

AÑO 2010

CON SU ENTRAÑABLE TRANSPARENCIA



EXERGO



La casualidad solo favorece a las mentes más preparadas.

Louis Pasteur.

AGRADECIMIENTOS

Considero prudente y atinado agradecer la responsabilidad y entusiasmo con que asumió el tutor de la Tesis: Pedro Y. De La Fe Rodríguez el diseño y ejecución de la misma. Asimismo, quisiera transmitir mis más sinceros agradecimientos a los compañeros Leonel Lazo Pérez, Omelio Cepero Rodríguez, Leonardo Ruiz Pozo, por comportarse no solo como compañeros de trabajo, sino como verdaderos amigos, pues sin la ayuda y cooperación de ellos me hubiera sido prácticamente imposible escribir este documento para optar por el grado académico de Máster.

DEDICATORIA

A mi esposa Melba Roig Martínez por su entrega, lealtad y comprensión. A mis suegros Juan Pablo Roig Rodríguez y Melba Martínez Alba, por su ayuda y colaboración incondicional. A mis padres Julio Castillo García y Xiomara Cuenca Carbó, porque siempre han sido el móvil para alcanzar cualquier objetivo o meta importante que me he propuesto en la vida. Además de estas hermosas personas, dedico esta tesis a un niño que es fuente de alegría, entusiasmo y porque no, de admiración en nuestra familia; a un niño que contagia con su sonrisa, con su buen sentido del humor, con su suspicacia. Hablo precisamente de mi hijo César Alejandro Castillo Roig.

RESUMEN.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar la prevalencia de antígenos fimbriales F4 y F18 en cerditos lactantes y destetados diarreicos de la Provincia de Villa Clara. La n fue de 90 cerditos, 41 lactantes (0-26 días de Edad) y 49 destetados (hasta 50 días de edad), pertenecientes a 6 unidades estatales de producción de la Provincia de Villa Clara. Para el aislamiento de la *E. coli* enteropatógena, los animales muestreados se sacrificaron y se tomó muestra del contenido intestinal del íleo, el cual se transportó y conservó en Medio Stuart. Subsecuentemente y de forma paralela se procedió a la siembra por agotamiento en Agar Sangre y Mac Conkey. Como controles positivos se emplearon las cepas de *E. coli* enterotoxigénica de referencia GIS 26, serotipo O149:K91:F4ac LT⁺ STa⁺ STb⁺ y 2134, serotipo O157:H19 F18ac⁺ STIa STII. La detección de los antígenos fimbriales se realizó a través del método fenotípico MAb Dot Blot Assay. La prevalencia de Unidades Positivas a Antígenos Fimbriales F4 en cerditos lactantes diarreicos y a Antígenos Fimbriales F18 en cerditos destetados diarreicos fue del 67% y 83% respectivamente. La prevalencia de antígenos fimbriales F4 y F18 en cerditos lactantes diarreicos fue del 20% y 7% respectivamente. Sin embargo, la prevalencia de ambos antígenos fimbriales en cerdos destetados diarreicos fue de igual magnitud (12%). Se concluye que existe una alta prevalencia de Unidades Positivas a antígenos fimbriales F4 y F18 en aislados de *E. coli* enteropatógena procedentes de cerdos lactantes y destetados diarreicos de la Provincia de Villa Clara.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.....	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
E. COLI ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC).....	6
EPIDEMIOLOGÍA.....	7
FACTORES DE VIRULENCIA.....	16
FIMBRIAS.....	16
FIMBRIA F4.....	18
FIMBRIA F18.....	19
FIMBRIA F5 (K99).....	19
FIMBRIA F6 (987P).....	19
FIMBRIA F41.....	20
AIDA.....	20
ENTEROTOXINAS.....	20
ENTEROTOXINAS STa.....	21
ENTEROTOXINAS STb.....	21
ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL (LT).....	22
PATOGENIA.....	23
PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD EDEMÁTICA EN LOS CERDOS.....	24
LA ENFERMEDAD EN LOS CERDOS	27
DIAGNÓSTICO.....	29
CONTROL.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Diseño Experimental:.....	43
Aislamiento de E. coli.....	43
Cepas Bacterianas De Referencia.....	43
Actividad Hemolítica.....	44
Mab Dot Blot Assay Para La Detección De Antígenos Fimbriales F4 Y F18.....	44
Obtención De Monoclonales A- F4 Y A- F18 Con Hibridomas:.....	45
Análisis Estadístico.....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

INTRODUCCIÓN.

La diarrea post-destete (*PWD*, por sus siglas en Inglés) es el principal problema infeccioso de granjas a gran escala y es responsable de pérdidas significativas a nivel mundial (**Hampson, 1994**). La enfermedad es causada principalmente por *E. coli* enterotoxigénica (*ETEC*, por sus siglas en Inglés), y *E. coli* productora de Toxina Shiga (*STEC*, por sus siglas en Inglés), también llamadas *E. coli* productoras de verotoxinas (*VTEC*, por sus siglas en Inglés) (**Frydendahl, 2002**). La *E. coli* patogénica porcina involucrada en la diarrea post-destete típicamente pertenecen a los serogrupos O8, O138, O139, O141, 147, O149 y O157, de las cuales O149 se ha visto que es el serogrupo predominante en la mayoría de los países (**Noamani et al., 2003**). Las cepas de *E. coli* aisladas de cerditos con diarrea neonatal son mucoides, a menudo no hemolíticas, y usualmente confinadas a los serogrupos O8, O9, O20, O64 y O101 (**Fairbrother et al., 1999**). ETEC puede causar diarrea severa en cerditos recién nacidos y destetados por la producción de enterotoxinas termolábiles (*LT*, por sus siglas en Inglés) y/o enterotoxinas termoestables (*STa*, *STb*, por sus siglas en inglés). Estas enterotoxinas son péptidos o proteínas extracelulares que son capaces de causar diarrea por cambios en el balance de agua y electrolitos del intestino delgado (**Bianco et al., 1997**). La *E. coli* porcina productora de toxina Shiga produce la verotoxina edemática (*VTe*, por sus siglas en Inglés), también llamada toxina Shiga 2e (*Stx2e*, por sus siglas en inglés), que daña el endotelio vascular del intestino delgado, subcutis y cerebro y finalmente conduce al edema subcutáneo y desordenes neurológicos (**MacLeod et al., 1991**). Las ETEC y STEC implicadas en la diarrea post-destete en cerdos producen frecuentemente adhesinas fimbriales F4 o F18 (**Nagy et al., 1997**). Existen dos variantes de la fimbria F18: F18ab (F107) y F18ac (2134P) (**Nagy et al., 1999**). F18ac está asociada con diarrea mientras F18ab está involucrada en la enfermedad edemática (**Nagy et al., 1997**). Hay tres variantes de F4 a saber: ab, ac y ad. La variante más comúnmente encontrada es ac. Cuando las tres variantes de F4 (F4 ab, F4 ac, F4 ad) son consideradas, seis fenotipos porcinos pueden ser distinguidos con respecto a la adhesividad en el borde en cepillo: fenotipo A une las tres variantes, es decir, todas, Fenotipo B une F4 ab y F4 ac, Fenotipo C une F4 ab y F4 ad, Fenotipo D une F4 ad, Fenotipo E no une ninguna de las variantes y el Fenotipo F une a F4 ab

(Van den Broeck et al., 2000). En adición a F4 (K88) y F18, otros antígenos de colonización fimbriales tales como F5 (K99), F6 (987P), y F41 también han sido asociados con diarrea post-destete, pero menos frecuentemente **(Garabal et al., 1997).** La identificación de ETEC en muestras clínicas a nivel mundial provee una información importante para el desarrollo de vacunas eficientes contra la ETEC, tales como la identificación de los factores de virulencia más comunes que son capaces de inducir inmunidad protectora para el patógeno e identificación de las combinaciones más comunes de toxinas de ETEC y factores de colonización en diferentes localizaciones geográficas **(Sjöling et al., 2007).**

La detección y caracterización de aislados de ETEC clínicos se ha logrado gracias a una variedad de métodos fenotípicos y genotípicos. Estos incluyen ensayos fenotípicos para toxinas y factores de colonización basados en el reconocimiento por anticuerpos monoclonales (*MAB, por sus siglas en inglés*) **(Qadri et al., 2000)** y métodos genotípicos basados en la Hibridación DNA/DNA **(Steinsland et al., 2003)**, Reacción en cadena de la Polimerasa (*PCR, por sus siglas en Inglés*), o Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (*Real-Time PCR, por sus siglas en Inglés*) **(Reischl et al., 2004; Vidal et al., 2004).**

Constituyen antecedentes de la problemática científica en nuestro país, los importantes aportes realizados por **Talavera (1981); Talavera (1983)**, que estudió la enteropatogenicidad en cepas aisladas de cerdos diarreicos, basados en el estudio de antígenos somáticos y capsulares, el comportamiento frente a determinadas pruebas bioquímicas y el empleo de la prueba de inmunofluorescencia directa para la detección de cepas de *E. coli* K88 y K99.

También fue desarrollada una tecnología de producción de sueros policlonales para el diagnóstico serológico de *E. coli*, a partir de cepas que expresaban fimbrias K88, K99, F41 y 987P **(Talavera, 1983; Talavera y Montes de Oca, 1987)** y de antisueros marcados contra cepas de *E. coli* para inmunofluorescencia directa **(Pedroso y Talavera, 1983).** Se han efectuado estudios de la presencia de plásmidos de virulencia y de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas en cerdos diarreicos de diferentes unidades porcinas de la Provincia de Villa Clara **(Pernas, 1980; Pernas et al., 1989; Pernas y Roja, 1985; Pernas y Bravo, 1986)** así como, el empleo de pruebas de

intestino ligado (**Pernas et al., 1986**) y del ratón lactante (**Gebremariam et al., 1985**) para la detección del poder patógeno en cepas de *E. coli* aisladas en cerdos con diarrea.

Pérez y Talavera (1984) evaluaron el efecto de la enterotoxina TL de *E. coli* en la línea celular CRT-2 y demostraron que este es similar al producido por la enterotoxina en las células VERO. **Barreto y Karadjov (1985)** realizaron un estudio ecológico sobre cepas de *E. coli* aisladas en cerdos diarreicos de tres unidades porcinas de la Provincia de Camagüey, para lo cual emplearon estudios bioquímicos y serológicos, determinaron la producción de colicinas y la sensibilidad frente a un grupo de antibióticos. **Basulto et al. (1997; 1999)** utilizaron sondas de ADN específicas en la identificación de los genes que codifican los antígenos fimbriales K88, K99, F41 y 987P en aislamientos de *E. coli* de cerdos con diarrea. **Castro et al. (2002)** emplearon un ELISA para determinar la presencia de factores de colonización K88, K99, 987P y F41 en muestras fecales de cerdos con diarrea. Más recientemente **Lazo (2007)** a través del diseño de un estudio integral realizó investigaciones en la Provincia de Villa Clara con aislados de *E. coli* procedentes de cerdos con síndrome diarreico aplicando métodos moleculares de avanzada (Reacción en Cadena de la Polimerasa y Electroforesis en Campos Pulsantes), que permitieron determinar los factores moleculares de virulencia, relacionados con la patogenicidad, como las adhesinas, toxinas, capacidad de resistencia a antibióticos; elementos importantes para precisar la patogenicidad de los aislados de *E. coli* productores de diarrea en cerdos.

A pesar de los ingentes esfuerzos que se han dedicado al estudio de la problemática planteada en Cuba y en nuestra provincia, y los aportes de la ciencia en este campo de trabajo, es imprescindible continuar realizando estudios epidemiológicos, con métodos moleculares de avanzada, que nos permitan determinar la prevalencia de los antígenos fimbriales más prevalentes y difundidos a nivel mundial, como paso previo a la instauración de un programa de control a través de la inmunoprophilaxis contra la *E. coli* enterotoxigénica en nuestro país. Asimismo elevar el arsenal diagnóstico para tan importante entidad patológica en la industria porcina moderna.

De acuerdo a lo planteado con anterioridad, hemos concentrado nuestros esfuerzos en determinar la prevalencia de los antígenos fimbriales F4 y F18 de *E. coli* enterotoxigénica en cerdos lactantes y destetados con síndrome diarreico de la Provincia de Villa Clara, aplicando para ello un método fenotípico (**MAb Dot Blot Assay, nombre en Inglés**), no empleado hasta el momento en nuestro país.

Este empeño constituye no solo una continuidad de investigaciones realizadas en nuestro país, en las temáticas: diagnóstico y epidemiología de la colibacilosis porcina; sino también, la inclusión de una moderna herramienta de diagnóstico molecular, que a su vez permite conocer el comportamiento epidemiológico de los principales antígenos fimbriales de la *E. coli* enterotoxigénica que se encuentran circulando en las diferentes granjas porcinas de nuestro territorio.

Como vía para valorar el problema científico se formula la siguiente **Hipótesis**:

La identificación de antígenos fimbriales F4 y F18 en las heces de cerditos lactantes y destetados diarreicos permite determinar la prevalencia de tan importantes factores de virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica.

Para dar respuesta a la anterior hipótesis, nos planteamos el siguiente **Objetivo General**:

Determinar la prevalencia de antígenos fimbriales F4 y F18 en cerditos lactantes y destetados diarreicos de la Provincia de Villa Clara.

Objetivos Específicos:

Determinar la prevalencia de antígenos fimbriales F4 en cerdos lactantes y destetados diarreicos en la Provincia de Villa Clara.

Determinar la prevalencia de antígenos fimbriales F18 en cerdos lactantes y destetados en la Provincia de Villa Clara.

Identificar si existe asociación entre la actividad hemolítica y la expresión de antígenos fimbriales.

Identificar algunas ventajas operacionales del método fenotípico empleado en la investigación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

E. COLI ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC).

Las enfermedades diarreicas de los animales de granja y/o hombre son frecuentemente debido a la infección por uno u otro patotipo de *Escherichia coli*: enterotoxigénica (ETEC), productoras de toxinas Shiga o Vero (VTEC o STEC), necrotoxigénica (NTEC, por sus siglas en Inglés), enteropatogénica (EPEC, por sus siglas en Inglés), enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en Inglés), enteroagregativa (EAaggEC, por sus siglas en Inglés), y enteroinvasiva (EIEC, por sus siglas en Inglés). De estos patotipos, ETEC es una importante causa global de diarrea acuosa severa en la descendencia de algunas especies de animales tales como terneros recién nacidos (lactantes) y cerdos lactantes y destetados. Interesantemente, es muy rara o no existe en algunas importantes especies de animales de granja como conejos, caballos y aves de corral, para lo cual no hay una explicación en el presente, como estos animales parecen tener receptores y ser receptivos a enterotoxinas y adhesinas de algunas ETEC (**Bouckenooghe et al., 2002**).

Es conocido que ETEC se adhiere al epitelio del intestino delgado sin inducir cambios morfológicos significativos, y para secretar proteínas (enterotoxinas) que alteran la función de los enterocitos incrementando la secreción y reduciendo la absorción. De esa manera los atributos de virulencia principales de ETEC son adhesinas (primeramente apéndices en formas de pelos, llamados fimbrias o pili) y enterotoxinas (proteínas o péptidos). En adición a factores de virulencia adhesivos y enterotóxicos, la patogénesis también involucra factores del hospedero, los más importantes de los cuales son los receptores para las adhesinas y para enterotoxinas. La especificidad de especie, que es una característica general de las infecciones por ETEC, es ampliamente debida a la presencia de receptores específicos en solamente uno o en un limitado espectro de especies animales. Debido a las especificidades de receptor de adhesinas, las cepas de ETEC parecen ser totalmente específicas de hospedero (**Nagy y Fakete, 2005**).

Diversos factores de virulencia enterotóxicos y adhesivos de ETEC y sus receptores en animales ya son conocidos pero otros son parcialmente entendidos o completamente

desconocidos. En la década pasada nuevos rasgos de potenciales de virulencia de algunas ETEC han sido descritas, nuevas enterotoxinas (EAST1, por sus siglas en Inglés) (Savarino et al., 1993), nueva fimbria (tipo IV; Pichel et al., 2002), y proteínas de invasión celular para ETEC (Elsinghorst and Weitz, 1994), proteína autotransportadora (Moormann et al., 2002), y citolisina (Ludwig et al., 2004). Además, hay un interesante vehículo genético transportador de genes de virulencia de ETEC originalmente derivado de otras especies de bacterias: aislados de alta patogenicidad de *Yersinia* patogénica en ETEC (Wang et al., 2002, 2003), o los nuevos aislados de patogenicidad asociados a plásmidos (Fakete et al., 2003), el significado patogenético y los arreglos moleculares específicos, los cuales aún no han sido determinados. Además hay mucho que aprender, acerca de los mecanismos moleculares, biogénesis y perspectivas de evolución de los nuevos atributos de virulencia y acerca de las nuevas oportunidades para aplicar nuestro conocimiento en el diagnóstico y prevención ETEC en los animales (Nagy y Fakete, 2005).

La *ETEC* es la causa más común de diarrea en los animales de granja. Estas cepas producen una o más adhesinas fimbriales y enterotoxinas. Las adhesinas fimbriales más frecuentemente encontradas de *ETEC* en cerdos son F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 y F18. Los aislados productores de adhesinas F4 o F18 y ciertos aislados F6 son hemolíticos. Las enterotoxinas producidas por la *ETEC* pueden ser termoestables (St_a, ST_b o Enterotoxina 1 termoestable de *E. coli enteroagregativa* (EAST 1) o termolábil (LT) (Fairbrother et al., 2005).

EPIDEMIOLOGÍA.

En cerdos, las infecciones más comunes y severas de *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) son causadas por cepas que expresan fimbrias F4⁺, enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina termoestable b (ST_b) (Erume et al., 2008). La diarrea postdestete y la mortalidad causada por *Escherichia coli* F4 es un importante problema de enfermedad en Ontario. En estudio transversal que incluyó 70 granjas en Ontario, encontraron que un 30% de las granjas fueron positivas al aislamiento de *E. coli* O149: K91: F4 (Amezcuca et al. 2008). La bacteria ETEC O149: K 91: F4 ha sido el serogrupo predominante en la diarrea post-destete a nivel mundial (Fairbrother et al., 2005; Fontaine et al., 2002; Frydendahl, 2002). En un estudio caso-control realizado al sur

de Ontario, este serogrupo fue el más común de las *E. coli* aislado en cultivos puros de cerdos con diarrea post-destete por *E. coli*. Además los serotipos O139: K82 y O138: K81 fueron también demostrados en algunos casos de diarreas post-destete por *E. coli* (**Amezcuca et al., 2002**). Las *E. coli* patogénicas porcinas involucradas en la diarrea post-destete típicamente pertenecen a los serogrupos O8, O138, O139, O141, O147, O149 y O157, de los cuales el serogrupo O149 es el más prevalente en la mayoría de los países (**Noamani et al., 2003**). **Khac et al. (2006)** encontraron que el serotipo más comúnmente detectado en cerdos con diarrea post-destete en Eslovaquia fue O149:H10 LT/STb/ESACI/F4. Interesantemente, este estudio demostró que dos nuevos serotipos (O163:H⁻ y ONT:H4) han emergido como patógenos en cerdos en Eslovaquia. Además sus resultados muestran una alta diversidad genética principalmente entre las ETEC del serotipo O149:H10.

Blanco et al. (2006) afirman que la distribución y frecuencia de serogrupos puede variar considerablemente de región a región y sobre el tiempo en una región dada. **Lazo (2007)** plantea que los principales resultados obtenidos en su investigación muestran que en los procesos diarreicos por *Escherichia coli* que afectan al cerdo durante la etapa neonatal y post-destete en diferentes granjas porcinas de la provincia de Villa Clara, Cuba, predominan los patotipos O141:H⁻ TSa TSb VT2 y O157: H19 VT2. Además encontraron los serogrupos O7:H15 (1), O15:H45 (2), O15:H⁻ (1), O20:H⁻ (1), O35:H6 (2), O45:H9 (1), O64:H⁻ (2), O84:H⁻ (1), O149:H23 (1), O169:H38 (1), ONT:H19 (3), ONT: H⁻ (2). Adicionalmente, este autor concluye que los aislados de *E. coli* a partir de muestras provenientes de cerdos con diarrea en la población estudiada, muestran una gran diversidad genética. Este autor encontró genes de virulencia para F18 y 987P (F6), no encontrando genes que codificaran para los antígenos de adhesión F4, F5, F17 y F41. **Blanco et al. (1997)** en un total de 74 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos con diarrea o enfermedad edemática en España, encontraron una mayor prevalencia de genes que codifican para TSb (58 cepas), seguido por los que codifican para TSa (46 cepas), TL (19 cepas), VT2 (11 cepas) y VT1 (1 cepa). Estos autores concluyen que aparentemente en España hay tres seropatotipos predominantes, O149: K91: H10 K88⁺ TL-I⁺ TSb, O141: K 85ab: H⁻ 987 P⁻ TSaP⁺ y O138: K81: H14 o H⁻ TSa⁺ VT2e. **Thomas et al. (1998)**, plantean que la enterotoxina que se identifica con mayor

prevalencia en las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas en porcinos es la TSb, sin embargo las cepas TSb⁺ frecuentemente expresan además otras enterotoxinas como TL o TSa por lo que se ha sugerido que las cepas de *E. coli* que contienen solo TSb y no otra enterotoxina, son menos patógenas, lo cual fue demostrado experimentalmente por este autor en cerditos neonatos.

Parma et al. (2000) encontraron en un estudio realizado en Argentina en 223 cerdos de 28 granjas porcinas, que el gen enterotoxigénico TSla fue el más comúnmente encontrado en las cepas de ECET aisladas de cerdos con diarrea (27/127, 21.2 %), en comparación con TLI (4/127, 3.1 %) y 8 serogrupos O diferentes fueron encontrados, O8, O9, O64, O101, O138, O139, O149, y O162, siendo el más común el O164. **Souza et al. (2001)** demostraron por métodos de PCR, que el 70% de *E. coli* aisladas de cerdos con ED en Brasil portan los genes de Stx2e (*por sus siglas en Inglés*), y que el 83% de las cepas Vt2e⁺ resultaron positivas a los genes que codifican para la fimbria F18ab. **Lazo (2007)** el 100% de las cepas Stx2e aisladas resultaron positivas a los genes que codifican para las fimbrias F18 ab. En estudios realizados en Cuba por **Talavera (1981)** en 145 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos lactantes con diarrea de dos unidades porcinas, halló como serogrupos más relevantes O141, O26, O157, O17, O137 y O126, siendo el serogrupo O141 y el O17 los que mostraron mayor frecuencia de aislamiento. **Barreto y Karadjov (1985)** quienes hallaron como serovariantes dominantes los serogrupos O139 y O149 en un estudio realizado en 127 cepas de *E. coli* aisladas en tres unidades porcinas afectadas por diarrea, en la Provincia de Camagüey. **Harel et al. (1991)** hallaron los serogrupos O149 y O157 entre los más comunes en Norte América, todos productores de TL y TSb. **Woodward et al. (1993)** encontraron que los grupos más comunes hallados en Australia son O9, O20 y O101. **Alexander (1994)** demostró que los serogrupos más comunes asociados a la diarrea en cerdos en el Reino Unido son O8, O138, O147, O149 y O157. **Garabal et al. (1996)** en un estudio de cinco años, realizado en España, hallaron los serogrupos O5, O7, O45, O141, O149 y O157 en cerdos con diarrea. Además, el 91,2 % (249 de 273) de ECET (TL y/o TSa). **Parma et al. (2000)** encontraron mayor prevalencia del serogrupo O64 en cepas ECET y O138 en ECET/VT en cerdos con diarrea en Argentina, y reportaron la baja incidencia de la toxina TL (3.1%) y un 21.2 % de TSa.

Los cerdos predestetados más viejos, así como también los animales postdestetados hasta 12 semanas de edad, son afectados por ETEC hemolítica (**Fahy et al., 1987**). Estas cepas son frecuentemente representadas por serogrupos clásicos, incluyendo O8, O138, O139, O141, O145, O149, O157 y son consideradas ETEC típicas “Clase 1” (**Fahy et al., 1987**). Ellas expresan adhesinas fimbriales F4 en asociación con enterotoxina termolábil solamente o en combinación con la enterotoxina termoestable a y/o b (**Smith y Gyles, 1970**).

Las cepas de *E. coli* aisladas de cerditos con diarrea neonatal son mucoides, a menudo no hemolíticas, y usualmente confinadas a los serogrupos O8, O9, O20, O64 y O101 (**Fairbrother et al., 1999**). Estas cepas han sido clasificadas como ETEC atípicas “Clase 2”, como ellas poseen adhesinas fimbriales pertenecientes a F4, F5, F6, o F41 y son generalmente toxina termolabil negativa (LT⁻, por sus siglas en inglés) y toxina termoestable positiva (ST⁺) (**Harel et al., 1991**).

Históricamente, el antígeno de colonización F4 (K88) ha sido incriminado como el tipo de fimbria predominantemente asociado a la diarrea neonatal y postdestete en cerdos. Sin embargo, ha sido detectada una más alta prevalencia de cepas F18 comparada con F4 en diarrea postdestete y enfermedad edemática (**Frydendahl 2002; Cheng et al. 2004**) en la República Checa, detectaron 312 cepas positivas (40%) para F18 de 772 aislados de *E. coli* de cerdos destetados con diarrea, y **VuKhac et al. (2006)** detectaron un 35% de F18 de 101 aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea postdestete en este mismo país. **Hide et al. (1995)** en Australia observaron que *E. coli* que expresaban F18, aislados de cerdos destetados pertenecían a los serogrupos O8, O45, O138, O141, y O157. También **Alexa et al. (1995)** y **Nagy et al. (1999)** mostraron que muchas cepas de ETEC y STEC halladas en la República Checa y Hungría, aisladas de cerdos destetados, expresaban F18 y eran predominantemente de los serogrupos O138, O139, O141, y O157. **Lazo (2007)** identificó el gen F18 en cepas de los serogrupos O35, O141 y O157. Como hallazgo en este estudio, fue observado asociación de F18 con toxinas, ya que los aislados de *E. coli* positivos para el gen F18, portan también TSa, además de toxinas TSb y Stx2e, Stx2e solo, o TSb solo.

Rippinger et al. (1995) afirman que la adhesina fimbrial F18 está asociada a cepas aisladas de cerdos con diarrea postdestete y enfermedad edemática. **Ojeniyi et al.**

(1994) y Frydendahl (2002) reportaron respectivamente, la detección de F18 en 34% y 39% de *E. coli* aislada de diarrea postdestete en Dinamarca. Un pesquisaje realizado por Hide et al. (1995) demostraron que de 480 aislados de *E. coli* hemolíticas de cerdos destetados con diarrea, un porcentaje significativo (62%) portaban el gen F18. También Wittig et al. (1995) mostraron la presencia de F18 en 75% de 380 *E. coli* aisladas del contenido intestinal de cerdos destetados con diarrea. Sin embargo, en algunos países ha sido encontrada una baja prevalencia de F18. En este sentido, Osek et al. (1999) en Polonia detectaron solo 10 (3%) cepas F18⁺ de 372 aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea postdestete. Kwon et al. (2002) hallaron solo 19% de positividad para el gen F18 en 230 cepas de *E. coli* aisladas de diarrea postdestete en Corea. Blanco et al. (1997) plantea, que *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC) y *Escherichia coli* verotoxigénico (STEC) son las principales categorías de bacterias que causan infecciones entéricas en cerdos. Numerosos estudios en otros países han mostrado, que del 63-75 % de cepas de *E. coli* aisladas de cerdos con enfermedad edemática producen Stx2e (Wasteson et al., 1992).

Las fimbrias F4 (K88) y F18 han sido implicadas como factores de colonización en la Diarrea Postdestete (Frydendahl, 2002; Cheng et al., 2004). Mientras la fimbria F18 ha sido asociada además exclusivamente con la Diarrea Postdestete, la fimbria F4 (K88) ha sido también el principal factor de colonización implicado en la Diarrea Neonatal (Noamani et al., 2003). Lazo (2007) no detectó ningún aislado F4 (K88)-positivo, a pesar de ser uno de los factores de colonización más frecuentes en las cepas de ETEC causantes de diarrea neonatal y postdestete en todo el mundo. Contrariamente, en estudios realizados en Cuba, por Felix et al. (1981) empleando aglutinación rápida en placa, hallaron un 34% y 14,8% de *E. coli* K88⁺ y K99⁺ respectivamente, en 156 muestras de intestino delgado de cerdos con diarrea neonatal. En estudios realizados por Talavera (1981) empleando el método de aglutinación, encontró un 54.2% de cepas K88⁺ y 67,08% de cepas K99⁺ en 250 colonias aisladas de 25 cerdos lactantes que presentaban diarrea. Talavera (1983) halló alta prevalencia de aislados positivos, con el empleo de la prueba de inmunofluorescencia directa para la detección de *E. coli* K88 y K99. En otras unidades porcinas del país, Talavera (1982) aisló *E. coli* en cerdos sanos y diarreicos que expresaban antígenos fimbriales

K88 y K99, encontrando mayor prevalencia de aislados positivos en cerdos con diarrea. Por otra parte **Barreto y Karadjov (1985)** en un estudio realizado en 127 aislados de *E. coli* de cerdos diarreicos con uno a tres semanas de nacidos, en tres unidades porcinas de la provincia de Camagüey, hallaron solo cuatro aislados (3,1%) que presentaban el antígeno K88 y uno (0,7%) los antígenos K88 y K99. **Talavera y Montes de Oca (1987)** al emplear la aglutinación rápida en placa, informaron de la detección de un 24,7% y 43,9% de positividad a fimbrias K88 y K99 en 105 muestras de copro y 41 de yeyuno respectivamente, procedentes de cerdos diarreicos al diagnosticar diarrea enterotóxica en tres laboratorios del país. **Yanes et al. (1983)** empleando esta misma técnica de diagnóstico, hallaron 14,8% y 9,2% de *E. coli* K88⁺ y K99⁺ respectivamente, en 54 aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea neonatal. **Pedroso y Talavera (1983)** con el empleo de la inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *E. coli* K88 y K99 en cerdos diarreicos y no diarreicos, hallaron un 50 y 48% de antígenos enteropatógenos K88 y K99 respectivamente en *E. coli* aisladas de 50 cerdos diarreicos, y concluye que esta prueba tiene mayor poder de detectabilidad que la aglutinación rápida en placa y tiene un valor diagnóstico presuntivo. Por otra parte, **Pernas y Roja (1985)**, hallaron 16 (14,1%) y 9 (7,9%) de *E. coli* K88⁺ y K99⁺ respectivamente, de un total de 113 cepas de *E. coli* aisladas del intestino delgado en cerdos diarreicos de dos unidades de la Provincia de Villa Clara, al realizar un diagnóstico serológico con la prueba de aglutinación rápida en placa. En esta misma Provincia, **Pernas y Bravo (1986)** hallaron 50(28,9%) y 24(13,8%) cepas de *E. coli* K88 y K99 respectivamente de un total de 173 aislamientos en muestras de intestino delgado de cerdos que presentaban diarrea, mediante la prueba serológica de aglutinación en placa. **Pernas et al. (1986)** en 54 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos con diarrea, encontraron solo 8 (14,81%) de K88⁺ y 5 (9,25%) de K99⁺. **Lazo et al. (1988)** en una granja porcina de la Provincia de Villa Clara, en 74 aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea neonatal, hallaron 27 (36,4%) de K88⁺ y 2 (15,3%) de K99⁺ en cerdos con diarrea post-destete. Por otra parte **Benitez et al. (1989)** de un total de 83 *E. coli* aisladas en cerdos diarreicos de la misma unidad, encontraron 17 (20,4%) de K88⁺ y 19 (22,8%) de 987P. En un estudio realizado por **Basulto et al. (1997)** en granjas porcinas de la Provincia de Camagüey, emplearon un sistema

inmunoenzimático ELISA y sondas de ADN específicas en la identificación de los genes que codifican los antígenos fimbriales K88, K99, F41 y 987P en 117 aislamientos de *E. coli* de cerdos con diarrea. Diez aislamientos resultaron positivos con las sondas utilizadas 5 (K88⁺), 4 (987P⁺) y 1 (K99⁺). En este estudio, hallaron que 4 (5,2%) de los 77 cerdos neonatos investigados, estaban infectados con *E. coli* portadoras del gen para la fimbria 987P y el 13 % de los cerdos neonatos analizados resultaron ser portador de *E. coli* K88⁺. **Castro et al. (2002)** en un total de 109 aislados de cepas de ETEC 54 (49,54%) fueron identificados como K88, K99, 987P o F41 empleando un ensayo inmunoenzimático ELISA. En este estudio el antígeno de colonización más común encontrado fue el F4 (K88) el cual fue hallado en el 70,32% de los cerdos, seguido por F6 (987P) 33,33%, F5 (K99) 25,92% y F41 24,07%. Otros autores **Vu Khac et al. (2006)** encontraron que ECET positiva para fimbria F4 (K88) fueron las más prevalentes aisladas de cerdos neonatos (detectada en 38%) y DPD (detectada en 19%) en Slovakia. **Ojeniyi et al., (1994); Alexa et al., (2002); Wittig et al., (1995); y Osek, (1999a)** reportaron una prevalencia de aislados F4 (K88) originando diarrea postdestete en Dinamarca, República Checa, Alemania y Polonia de 26%, 19%, 14% y 19% respectivamente. Similarmente, **Nagy et al. (1990)** reportaron un 61% de aislados positivos con fimbria F4 (K88) de un total de 205 aislados de *E. coli* derivados de casos fatales de diarrea postdestete o enfermedad edemática en Hungría. Sin embargo, al igual que en este estudio, **Pernas et al. (1980)** hallaron un bajo porcentaje (0-16%) de los plásmidos de virulencia K88, K99 además del Ent en 192 cepas de *E. coli* aisladas del intestino delgado de 146 cerdos lactantes y 46 postdestetados con diarrea en esta misma provincia. En la Provincia de Camagüey, otros autores, **Pernas et al. (1989)** hallaron una baja incidencia de K88⁺ y K99⁺ (9,7 y 6,3% respectivamente) en aislados de copro y 28,5 y 11% de K88⁺ y K99⁺ respectivamente, en aislados de órganos de cerdos diarreicos con diarrea neonatal y diarrea post-destete, pero con el empleo de la prueba de aglutinación rápida en placa. En otras latitudes geográficas como Japón y Corea, también ha sido reportado una baja prevalencia de F4 (K88) aisladas de cerdos con diarrea post-destete (**Kwon et al. 2002**). Númerosos estudios demostraron que serogrupos O asociados con la fimbria F4 (K88) fueron principalmente: O8, O149, y

O157 (**Frydendahl, 2002**). En España, O149:H10: TL/TSb y O157: H-: TL/TSb son los seropatótipos más prevalentes detectados en cepas ETEC F4 (**Blanco et al., 1997**).

La ETEC F4⁺ está ampliamente expandida y es altamente prevalente en granjas de cerdos no vacunados. **Van den Broeck et al. (1999)** encontraron que el 65% de las granjas no vacunadas destinadas a la producción de cerdos en cuatro provincias de Bélgica fueron seroposivas a IgG contra F4, aunque la mayoría solo fue débilmente positiva. En ausencia de vacunación, la IgG sérica específica para F4 es inducida por infección con ETEC F4⁺. **Hampson et al. (1987)** observaron que ETEC hemolíticas pueden estar como residentes del tracto intestinal de cerdos lactantes saludables jóvenes que pueden excretar y expandir la bacteria. Por tanto, ETEC F4⁺ puede circular sobre granjas incluso sin brotes clínicos de colibacilosis entérica. Sobre una escala regional, la prevalencia de ETEC F4⁺ en granjas no vacunadas es incluso más alta en West-Vlaanderen, Oost-Vlaanderen, y Antwerpen con 79, 71 y 68% respectivamente. El incremento de la seropositividad F4, con incrementadas densidades de granjas criadoras de cerdos, indica la importancia de la densidad de la población porcina sobre la prevalencia de infecciones en una región. Una vez que las infecciones por ETEC son transmitidas por contacto directo con las heces o materiales contaminados con heces, estos datos prueban el alto estándar de higiene que se necesita en las granjas especialmente en áreas con altas densidades poblacionales (**Van den Broeck et al., 1999**). La colibacilosis entérica porcina es una enfermedad de importancia en la provincia de Villa Clara, Cuba, con mayor ocurrencia en los meses de abril, junio, septiembre y diciembre y una estacionalidad manifiesta en el último cuatrimestre del año; con una prevalencia focal de periodo de 25,17% en la colibacilosis y de 58,74% en la colienterotoxemia, con una morbilidad de 50,92%, una mortalidad de 14,77% y una letalidad de 29,02% (**Lazo, 2007**). **Wong et al. (1996)** en la provincia de Camagüey, Cuba, al evaluar los parámetros de morbilidad y mortalidad por *E. coli* en crías y precebas, tomando como referencia los datos registrados en 1991, 1992 y 1993, anteriores a la aplicación de un programa de vacunación, encontraron valores de morbilidad de un 13% en ambas categorías; y una mortalidad de un 7% en las crías. Estudios a cerca de la diarrea post-destete por *E. coli* F4⁺ se han focalizado mayormente sobre los síntomas clínicos de los cerdos (**Madec et al. 2000**), y no en la

transmisión de la *E. coli* F4⁺. Sin embargo, para entender la epidemiología de la diarrea post-destete y para el desarrollo de medidas de control, información sobre infecciosidad y susceptibilidad de los individuos a *E. coli* F4⁺ dentro de una población es también necesaria. La excreción de *E. coli* F4⁺ en las heces puede reflejar diferencias en colonización y replicación entre cerdos, y por ende, diferencias en infecciosidad (**Engel et al., 2003**). Además de los niveles de bacteria excretada, otros aspectos como tolerancia al ácido (**Merrell y Camilli 2002**), supervivencia de *E. coli* F4⁺ en heces (**Kudva et al., 1998**) y comportamiento de la enfermedad en cerdos son probablemente los que afectan la infecciosidad. La intensidad de la diarrea puede ser también un vector para la expansión de *E. coli* F4⁺, una vez que las heces diarreicas pueden formar aerosoles, aunque la toma oral pueda ser menor. Uno de los factores que causa alta variabilidad en la colonización y replicación y de esa manera en la excreción y diarrea, es la presencia o ausencia de receptores F4. La presencia de receptores F4 estuvo significativamente asociada con alta excreción de *E. coli* F4⁺ a gran escala. Esto indica que las poblaciones de cerdos Receptores F4⁺ y F4⁻ no pueden ser consideradas homogéneas con respecto a la excreción de *E. coli* F4⁺. Por tanto, el estatus Receptores F4 de los cerdos y su efecto en las poblaciones serán tomados en cuenta en la evaluación de los modelos de infección de *E. coli* F4⁺ o cuando se van a probar medidas de intervención sobre *E. coli* F4⁺ (**Geenen et al., 2006**).

González y Garabal (1998) señalan que la causa principal de la aparición de la colibacilosis en cerdos, está estrechamente asociada, a diferentes factores predisponentes; como destetes bruscos, cambios cualitativos y cuantitativos en la dieta, así como un manejo zootécnico inadecuado. Las dietas influyen sobre la capacidad de absorción del intestino y hacen al mismo más propenso a la colonización y subsecuente diarrea (**Thomson, 2001**). **Lazo (2007)** la mayor mortalidad aparente, pudieran atribuirse fundamentalmente a causas predisponentes relacionadas con la cantidad y calidad del alimento consumido en la etapa, la cual se caracterizó, por inestabilidad en el suministro de alimentos concentrados y mala calidad de las materias primas. La contaminación del agua de bebida juega un papel importante como fuente y vía de transmisión de la enfermedad (**Lazo, 2007**). Otro factor importante que incidió negativamente en el incremento de la tasa de morbilidad y mortalidad en las granjas

afectadas, lo constituyó, la deficiente existencia de fármacos y productos desinfectantes, unido a la carencia de rodenticidas e insecticidas que limitaron la efectividad en las medidas contraepizoóticas relacionadas con los tratamientos curativos y el saneamiento ambiental.

FACTORES DE VIRULENCIA.

FIMBRIAS.

Cerca de 23 años después de la descripción de *E. coli*, Guyot encontró en 1908 que algunas cepas de *E. coli* son capaces de aglutinar eritrocitos de animales y humanos. En 1955, **Collier and De Miranda (1955)** demostró que está aglutinación puede ser inhibida específicamente por la manosa, y Duguid y colaboradores demostraron las propiedades aglutinantes de la *E. coli* debido a la presencia de apéndices filamentosos largos no flagelares sobre la superficie de la bacteria. Ellos llamaron a estos apéndices fimbrias (**Duguid et al., 1955**), mientras **Brinton (1959)** usó el nombre de pili. Desde entonces estos dos términos han sido usados como sinónimos. Basados en sus propiedades hemoaglutinantes, las fimbrias son generalmente clasificadas como: fimbrias sensibles a la manosa (MS, por sus siglas en inglés), y fimbrias resistentes a la manosa (MR, por sus siglas en inglés). Las fimbrias sensibles a la manosa son también llamadas comúnmente fimbria tipo 1 (**Brinton, 1959; Ofek and Beachey, 1980**). Ellas están a menudo presente sobre comensales y cepas enterotoxigénicas y tienen glicoproteínas ricas en manosa como receptores. Ellas aglutinan una amplia variedad de células de levadura y animales y son expresadas en un amplio rango de temperatura $18 \pm 37,8$ grados Celsius. Las fimbrias MR, sin embargo, generalmente no son expresadas a temperaturas inferiores a $18,8$ grados Celsius. Ellas son estimadas como específicas de hospederos y aglutinarán y se unirán solamente a una variedad restringida de células eucariotas. Hoy, diversas fimbrias MR procedentes de *E. coli* patogénica para los intestinos han sido caracterizadas, tales como los antígenos factores de colonización (CFA, por sus siglas en inglés) CFA/I y CFA/II de cepas patogénicas humanas (**Evans and Evans, 1978**), el antígeno K88 que ocurren en diversas variantes serológicas de cepas patogénicas porcinas (**Moon et al., 1980**), el antígeno K99 encontrado sobre varias cepas de *E. coli* enterotoxigénica de origen bovino, porcino y ovino (**Isaacson, 1977**), el antígeno F41 que usualmente ocurre junto

con K99 (**de Graaf and Roorda, 1982**) y está principalmente asociado con cepas enterotoxigénicas de terneros, ovejas y ocasionalmente cerdos, y a la fimbria 987P específica para cepas porcinas (**Isaacson and Richter, 1981**). En 1983, un nuevo y simplificado sistema de nomenclatura fue introducido por Ørskov y Ørskov en el que las fimbrias son denominadas antígenos F y solamente la designación de la F (fimbrial) debe ser usada (**Ørskov y Ørskov, 1983**). De acuerdo a este sistema, la fimbria tipo I, CFA/I y CFA/II, K88, K99, 987P, y F107 fueron cambiadas dentro de F1-F3, F4, F5, F6 y F18 respectivamente (**Smyth et al., 1994**).

Las fimbrias son largos apéndices proteicos que irradian desde la superficie de la bacteria a una longitud de $0,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$. Ellas están peritricamente distribuidas en números de 100 ± 300 por bacteria o incluso hasta 1000 por bacteria (**Klemm, 1981**).

A grandes rasgos, dos grupos diferentes morfológicamente de fimbrias sobre la superficie de cepas de *E. coli* patógenas han sido descritas (**Mooi and de Graaf, 1985**) a saber pili y fibrilla (**Simons et al., 1994**). Aunque los términos pili y fimbria fueron usados al inicio como sinónimos, el término fimbria es usado para indicar los grupos de apéndices proteicos de superficies mientras que la designación pili refiere a un rasgo morfológico específico de la fimbria. Pili son estructuras rígidas con diámetro de $7 \pm 8 \text{ nm}$ y una abertura axial, mientras que las fibrillas son más bien delgadas y flexibles con un diámetro pobremente definido de $2 \pm 4 \text{ nm}$. Por lo visto, las fimbrias F1 y F6 pertenecen al primer grupo (estructuras en forma de pili) mientras que las Fimbrias F4 y F5 pertenecen al segundo grupo (estructura en forma de fibrilla). Sin embargo, **Simons et al. (1994)** encontraron que la apariencia de la fimbria F4 varía desde una estructura delgada, flexible y extendida a una forma más ancha, rígida y condensada. Esta variación depende grandemente del medio de cultivo en el que ellas están suspendidas y por consiguiente la morfología de la Fimbria F4 *in vivo* no está clara del todo. Consecuentemente, la distinción preliminar entre pili y fibrilla como estructuras gruesas y rígidas contra estructuras flexibles y delgadas, respectivamente, es artificial.

Las fimbrias o pili son apéndices superficiales filamentosos o en forma de bastón sobre la bacteria que media la unión a tejidos del hospedero. Cada unidad fimbrial consiste en cientos de copia de una sub-unidad mayor que provee de estructura y confiere la especificidad de antigénica de la fimbria. Las fimbrias pueden también contener

diversas copias de sub-unidades menores, una de las cuales es una adhesina con propiedades de unión específica.

FIMBRIA F4.

Las adhesinas F4, inicialmente se pensó que era un antígeno capsular K (K88), subsiguientemente se encontró de ser una estructura fibrilar fina. Las Fimbrias F4 son codificadas por el locus *fae* sobre un plásmido que a menudo también transporta genes que codifican para la fermentación de rafinosa. Las fimbrias F4 median la adherencia bacteriana al epitelio intestinal en la mayor parte del intestino delgado de los cerdos de todas las edades. Por tanto, la colonización de la mucosa intestinal, por *E. coli* enterotoxigénica F4 positivo ocurre tanto en cerdos neonatales como destetados y pueden ser observadas en cerdos en ceba. La adherencia debido a F4 es especie específica, ocurriendo mayormente en cerdos. Hay tres variantes de F4 a saber: ab, ac y ad. La variante más comúnmente encontrada es ac. Cuando las tres variantes de F4 (F4 ab, F4 ac, F4 ad) son consideradas, seis fenotipos porcinos pueden ser distinguidos con respecto a la adhesividad en el borde en cepillo: fenotipo A une las tres variantes, es decir, todas, Fenotipo B une F4 ab y F4 ac, Fenotipo C une F4 ab y F4 ad, Fenotipo D une F4 ad, Fenotipo E no une ninguna de las variantes y el Fenotipo F une a F4 ab (**Van den Broeck et al., 2000**).

Hasta un 50% de los cerdos no presentan receptores para adhesinas F4. El alelo (S) para el receptor es dominante y la resistencia genética es heredada por un modelo de herencia Mendeliana. Por tanto tres genotipos existen: ss (resistente), SS y Ss (sensibles). Si la cerda es el progenitor resistente, hay anticuerpos anti-F4 no específicos en el calostro en ausencia de inmunización parenteral, resultando en cerdos altamente resistentes. Un reporte de **Francis et al. (1998)** indica que una glicoproteína tipo mucina del borde en cepillo intestinal puede ser biológicamente más relevante como receptor para F4 que la glicoproteína localizada sobre el borde en cepillo epitelial, posiblemente explicando la ausencia a menudo observada de correlación de adherencias de variantes de F4 al borde en cepillo del intestino delgado *in vitro* con susceptibilidad en cerdos.

FIMBRIA F18.

Las Fimbrias F18 son filamentos grandes flexibles con un modelo de zigzag característico (**Nagy y Fekete, 1999**). Ellos son codificados por el locus *fed*, que es usualmente encontrado sobre un plásmido. Dos variantes de F18, ab y ac han sido descritas, basándose en diferencias de secuencias nucleotídicas y serológicas. Estas variantes son biológicamente distintas, la F18 ab siendo pobremente expresada *in vitro* e *in vivo* y asociadas mayormente con cepas productoras de Stx2e y la F18 ac siendo más eficientemente expresada *in vitro* e *in vivo* y más comúnmente asociada con cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica. Los receptores F18 están ausentes en cerdos recién nacidos y se incrementa su producción en la edad de destete. Los genotipos susceptibles y resistentes a la adherencia por F18 han sido diferenciados y los cerdos con al menos una copia del alelo dominante para el receptor son susceptibles de la adherencia epitelial *in vitro* y por tanto la colonización intestinal. El gen del receptor ha sido localizado sobre porcinos en el cromosoma 6, estrechamente vinculado al gen que codifica la sensibilidad al Halotan (**Gyles y Fairbrother, 2006**).

FIMBRIA F5 (K99).

Inicialmente se pensó que la fimbria F5 (K99) era capsular, pero subsecuentemente se encontró que era un apéndice fibrilar similar a la fimbria F4 (K88). Ellas están codificadas por el locus *fan*, que es también encontrado en el plásmido. Las fimbrias F5 son también producidas por aislados de *E. coli* enterotoxigénica procedentes de cerdos, ganado y ovejas. La fimbria F5 media la unión de la *E. coli* enterotoxigénica a la parte posterior de la mucosa del intestino delgado en animales jóvenes y en ocasiones de animales adultos. Por lo tanto, la diarrea debido a *E. coli* enterotoxigénica positiva a F5 es observada mayormente en animales neonatales, pero recientemente se ha visto ocasionalmente en los cerdos post-destete (**Gyles y Fairbrother, 2006**).

FIMBRIA F6 (987P).

La fimbria F6 (987P) es larga y en forma de bastón codificada por el locus *fas* encontrado tanto en el cromosoma como en el plásmido. La fimbria F6 (987P) media la colonización bacteriana principalmente en el intestino delgado posterior en cerdos neonatales. La fimbria F6 que media la colonización intestinal en cerdos adultos es raramente observada y se pensó que es inhibida por la unión preferencial de la bacteria

a receptores F6 presentes en el mucus más que en aquellos que están sobre el epitelio intestinal. Por tanto, la diarrea debido a *E. coli* enterotoxigénica positivas a F6 es observada al menos exclusivamente en cerdos neonatales (**Dean-Nystrom and Samuel, 1994**).

FIMBRIA F41.

F41 es un apéndice fibrilar codificadas por genes presentes en los cromosomas y son encontradas en cepas de *E. coli* enterotoxigénica porcinas y bovinas. Ellas son mayormente expresadas juntas con las fimbrias F5 (K99), aunque algunas cepas pueden producir F41 solamente. La colonización mediada por F41 es observada principalmente en el intestino delgado posterior de cerdos neonatales, terneros y corderos, y puede resultar en diarrea estando F5 presente o no (**Gyles y Fairbrother, 2006**).

AIDA.

La adhesina involucrada en la adherencia difusa (AIDA) es una proteína madura auto transportada, que media la unión bacteriana a las células del epitelio intestinal (**Benz and Schmidt, 1992**). AIDA fue originalmente detectada en aislados de *E. coli* procedentes de humanos con diarreas, ya ha sido detectada recientemente en cepas de *E. coli* de cerdos con enfermedad edemática o diarrea post-destete, particularmente en cepas que pertenecen a los virotipos Stx:F18 y F18 solamente (**Mainil et al., 2002**). AIDA es codificada por genes presentes en un plásmido, posiblemente contienen los genes *fed* que codifican para la fimbria F18. Los aislados de *E. coli* enterotoxigénica de los virotipos STb o STb: EAST-1 (*por sus siglas en Inglés*) procedentes de cerdos neonatales o destetados pueden ser también positivos a AIDA e inducir diarrea en cerdos neonatos (**Ngeleka et al., 2003**).

ENTEROTOXINAS.

Las dos principales clases de enterotoxinas que son producidas por ETEC: Toxina termoestable (ST, por sus siglas en Inglés), que es resistente al tratamiento a 100 grados Celsius por 15 minutos, y una toxina termolábil (LT, por sus siglas en Inglés), que es inactivada a 60 grados Celsius por 15 minutos. Las Toxinas termoestables han sido además caracterizadas como STa (o STI) y STb (o STII) basados en la talla,

estructura molecular y actividad biológica. Las enterotoxinas son codificadas por plásmidos. Las enterotoxinas LT son altamente antigénica, mientras que las enterotoxinas ST tiende a ser pobremente antigénica. Las enterotoxinas no producen lesiones patológicas o cambios morfológicos en la mucosa intestinal (**Gyles, 1994**).

ENTEROTOXINAS STa.

Las enterotoxinas STa es un péptido de 18 ó 19 aminoácidos de 2 000 Da. Las enterotoxinas STa se unen a un receptor guanilil ciclase del epitelio intestinal y activo la guanilato ciclase que estimula la producción del GMP cíclico (**De-Sauvage et al. 1991**). Altos niveles de GMP cíclico en la célula inhibe el sistema de co-transporte Na/Cl y reduce la absorción de electrolitos y agua del intestino por las vellosidades y resultan de una secreción elevada de Cloro y Agua en las células de la Cripta (**Forte et al., 1992**). Los efectos de la STa son reversibles. La enterotoxina STa es activa en cerdos jóvenes pero es menos activa en cerdos más viejos, posiblemente debido a la concentración disminuida de receptores con la edad (**Cohen et al., 1988**).

ENTEROTOXINAS STb.

Las enterotoxinas STb es un péptido de 48 aminoácidos de 5000 Da, en su forma madura, no está relacionada a la enterotoxina STa en composición y actividad biológica (**Dubreuil, 1997**). Las ETEC productoras de enterotoxinas STb están mayormente asociadas con cerdos pero han sido aislada esporádicamente de casos de diarrea en humanos, terneros y pollos. El receptor de la célula del epitelio intestinal que une STb no ha sido completamente elucidado. Una proteína de 25 kDa en membrana celular intestinal de ratón que une STb ha sido identificada (**Hitotsubashi et al. 1994**).

Las enterotoxinas STb no alteran los niveles de cGMP y cAMP en las células de la mucosa intestinal, de esa manera difieren en mecanismo de acción de STa y LT. Por otro lado, las enterotoxinas STb estimulan un incremento de los niveles de prostaglandinas E₂, probablemente induciendo la secreción yeyunal y duodenal de agua y electrolitos por un mecanismo aún no conocido. Las enterotoxinas STb también estimula la liberación de otras secretagogas, 5-hidroxitriptamina, dentro del fluido intestinal (**Harville y Dreyfus 1995**).

ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL (LT).

Dos subgrupos de Toxinas Termolábiles han sido descritos, solamente LTI ha sido neutralizada por toxina anticólera. La LTI puede ser dividida dentro de LTh-I producida por ETEC de humanos y ETEC y LTp-I, producida por ETEC porcina, que poseen grandes diferencias en composición. Las LTII consisten en dos variantes antigénicas, LTIIa y LTIIb, que están relacionadas con LTI su sub-unidad A pero difieren en sus sub-unidades B. La LTI es una toxina de alto peso molecular compleja (aproximadamente de 88 000 Daltons) que consisten en 5 subunidades de unirse a receptores gangliosidos GM1 sobre la superficie celular epitelio intestinal y una subunidad A activa biológicamente (**Gill et al., 1981**). Otros receptores los cuales unen LT son GD1b, un sialo GM1 y GM2 y un número de galactoproteínas y glicolípidos conteniendo galactosa. La subunidad A (30 000 Daltons) consisten en un fragmento A1 (21 000 Daltons) conteniendo un sitio activo y el fragmento A2 que se vincula al fragmento A1 de las sub-unidades B. El fragmento A1 parece jugar un rol importante en la estabilidad de Holotoxina y las diferencias en este fragmento han sido reportadas menor toxicidad de LT comparada con CT. LTI es muy similar a la toxina colérica estructuralmente y funcionalmente (**Tauschek et al. 2002**).

Después de la unión de las subunidades B a sus receptores específicos de la superficie de las células, el fragmento A₁ es transportado dentro de la célula, donde este activa el sistema de la adenilciclase, estimulando la producción de AMP cíclico (cAMP por sus siglas en inglés). El fragmento A₁ posee actividad ADP-ribosil transferasa, por lo que este transfiere ADP-Ribosa desde NAD al regulador Gs-alpha de la Adenilciclase. Esta acción permite la síntesis de cAMP por la Adenilciclase bloqueada en esta posición. La ADP-Ribosilación es incrementada por los factores de ADP-Ribosilación, que son GTPasas reguladoras que activan la unidad catalítica LT A₁. Los altos niveles de cAMP en la célula resulta en secreción incrementada y decrecimiento de la absorción de iones Cl⁻ y Na⁺ y agua dentro del lumen intestinal. El efecto de LT es irreversible, y los enterocitos afectados permanecen en un estado hipersecretor de cAMP hasta que este es suprimido. La secreción excesiva de electrolitos y agua conduce a la deshidratación, acidosis metabólica y posiblemente la muerte. LT puede inducir secreción a través de mecanismos alternativos tales como estimulación de prostaglandinas, el sistema

nervioso entérico y la activación de citoquinas **(Nataro y Kaper, 1998)**. LT tiene un fuerte efecto inmuno modulador, y derivados de LT han sido empleados como adyuvantes tanto en sistema inmune sistémico como mucosal **(Fraser et al., 2003)**.

PATOGENIA.

Los cerdos recién nacidos ingieren la *E. coli* enterotoxigénica encontradas en su ambiente, especialmente de las glándulas mamarias de la madre y en el cubículo de parto. Estas *E. coli* enterotoxigénica provienen de las heces de cerditos con diarrea, y cerdas y cerditos transportadores asintomáticos **(Fairbrother, 1999)**. Los factores que promueven el desarrollo de la diarrea incluyen pobre higiene, inadecuada desinfección, un sistema de partos continuos, temperatura menor de 25 grados, o excesiva corriente de aire. Estos factores al aumento de la *E. coli* patogénica en el ambiente, o reducen la actividad peristáltica y un retraso en el pasaje de la bacteria y anticuerpos protectores a través del intestino **(Gyles y Fairbrother, 2006)**.

En los cerdos recién nacidos, el pH. del estómago y el duodeno es menos ácido y la producción de enzimas digestivas es más lenta, proveyendo un ambiente favorable para la rápida multiplicación de la bacteria tales como *E. coli*, incluyendo *E. coli* enterotoxigénica que puede estar presente en el ambiente de los cerditos. La diarrea es observada principalmente en los primeros días después del nacimiento. Uno o más animales de un grupo son afectados. Una diarrea menos acuosa puede también ser observada en las dos primeras semanas de edad, o tan temprano como dos días post-destete, con baja mortalidad y a menudo decrecimiento en la ganancia de peso. En cerditos de este grupo de edad con diarrea, una coinfección con otros patógenos tales como virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus o coccidia es a menudo observada. Los aislados productores de F4 ocasionalmente proliferan rápidamente en el intestino delgado de los cerdos jóvenes e inducen síntomas de shock y muerte rápida. La colibacilosis entérica complicada por shock ocurre en cerdos recién destetados y no destetados y se manifiesta con muerte rápida y con algunas cianosis cutáneas de las extremidades, o menos aguda con hipertemia, diarrea y anorexia **(Gyles y Fairbrother, 2006)**.

La diarrea post-destete es fluida, grisácea o amarillenta, y comúnmente comienza de 3 a 5 días después del destete, durando hasta una semana y causando emaciación.

Pasado varios días, la mayoría de los cerdos en un grupo pueden estar afectados y una mortalidad de hasta el 25% puede ser observada en ausencia de terapia antibiotica. En las granjas donde las medidas de crianza en el destete tales como proteína de fuente animal, plasma, agentes acidificantes y óxido de zinc están siendo usadas, los picos de diarrea y colibacilosis entérica complicada por shock pueden ser observadas a menudo a las tres semanas después del destete, o incluso a las seis u ocho semanas después del destete, en el tiempo en que los cerdos entran en los cubículos de crecimiento **(Bertschinger, 1999)**.

PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD EDEMÁTICA EN LOS CERDOS.

La enfermedad edemática (*ED*, por sus siglas en inglés) es una toxemia por toxina Stx 2e (*Stx2e*, por sus siglas en inglés) que resulta en un edema severo en sitios específicos de los cerdos que han absorbido Stx2e desde el intestino siguiendo la colonización por una *E. coli* Stx2e positiva. La inyección intravenosa de cerdos con Stx2e a bajas dosis (3 nanogramos por kilogramos de peso) resulta en los signos característicos, síntomas y lesiones de la Enfermedad Edemática **(MacLeod et al., 1991)**.

Las cepas de *E. coli* responsables de la enfermedad edemática son ingeridas desde un ambiente contaminado por cerdas que transportan la bacteria o cerdos que están infectados. La colonización se desarrolla sobre los tres a seis días y es dependiente de la adherencia no íntima de la bacteria a las células epiteliales de las partes superior y laterales de las vellosidades del intestino delgado por medio de la fimbria F18 ab codificada por un plásmido **(Bertschinger y Gyles, 1994)**. Los cerdos que carecen de receptor intestinal para la fimbria F18 son resistentes a la enfermedad edemática y pueden ser identificados por ensayos de PCR que detecta una mutación específica en el gen para α 1, 2 fucosiltransferasa (FUT 1), que puede ser requerido para la síntesis de un receptor glucoconjugado para la fimbria F18. La resistencia está presente en solo un bajo porcentaje de la mayoría de las razas de cerdos. La *E. coli* responsable de la enfermedad edemática usualmente produce una α -hemolisina *in vitro* y durante el curso de la enfermedad. Esta citolisina no es esencial para la enfermedad edemática **(Smith y Linggood, 1971)**, pero esta puede contribuir a la colonización intestinal, ya que esta *E. coli* que produce la α -hemolisina parece tener una ventaja selectiva comparadas con

unas no hemolíticas en el intestino de cerdos recién destetados (**Deprez et al., 1986**). La colonización intestinal por *E. coli* responsables de la enfermedad edemática puede ser ayudada por factores de manejo. En el tiempo del destete, las células del epitelio intestinal de los cerdos experimentan cambios que conducen a un período de mala absorción temporal. Las dietas altas en proteínas contribuyen a la presencia en el intestino de un abundante y rico sustrato para la rápida proliferación de *E. coli* responsables de la enfermedad edemática (**Bertschinger and Gyles, 1994**). Se ha observado que los cerdos de crecimiento más rápido de una camada son los más susceptibles y pueden representar los cerdos que están consumiendo la mayor parte del alimento y/o son los que más eficientemente absorben el alimento en el intestino. La transportación de los cerdos y el mezclado de los cerdos de diferentes fuentes también predisponen al desarrollo de la enfermedad edemática, posiblemente por la oportunidad incrementada del estrés sobre los cerdos y la oportunidad de contaminación con cepas de *E. coli* responsables de la enfermedad edemática (**Gyles et al., 2004**).

La enfermedad es dependiente de la absorción de Stx2e dentro del torrente sanguíneo, pero hay poco entendimiento de cómo esto ocurre. La toxina Stx2e no parece ser absorbida por el intestino en condiciones normales, pero la adición de deoxicolato al intestino permite que tenga lugar la absorción de la toxina (**Waddell y Gyles, 1995**), y es posible que la bilis pueda influir en la absorción. Los receptores que unen la Stx2e están presentes en los enterocitos de la cripta del intestino delgado de los cerdos, pero su rol en la absorción de Stx2e no es conocido. La Stx2e se une preferencialmente a sus receptores específicos, globotetraosilceramida (Gb4), en células del endotelio vascular o intestinal, pero pueden también unirse a Gb3. En cerdos que mueren de enfermedad edemática, la Stx2e puede ser recuperada del contenido intestinal (**Sojka, 1965**), y el daño mediado por la toxina al endotelio vascular puede ser identificado en tejidos dianas.

Hay cambios mínimos en el epitelio intestinal de los cerdos afectados, y es probable que muchas de las toxinas que entran a las células epiteliales son degradadas en el compartimento endocítico y un porcentaje menor de la toxina intacta pasa a través del epitelio intestinal (**Acheson et al., 1996**). Las toxinas absorbidas, unidas y dañando las células del endotelio vascular en tejidos dianas, resultan en edema y hemorragia. La

presencia o ausencia de receptores en el endotelio vascular para Stx2e en los vasos sanguíneos es el determinante principal en la distribución de lesiones en el tejido. Sin embargo, factores adicionales determinan si la toxina es tomada por una ruta que conduce a la intoxicación **(Paton y Paton, 1998)**. Los receptores para Stx2e están presentes en el músculo liso vascular, que experimentan necrosis en los órganos dianas en cerdos con enfermedad edemática, pero no es conocida si la necrosis es un resultado directo del daño por la toxina o un efecto secundario del daño de la célula del endotelio vascular.

Los casos de enfermedad edemática pueden ser esporádicos o pueden afectar muchas camadas o un rebaño entero y pueden ser reconocidas como muertes repentinas sin signos de la enfermedad. Algunos cerdos afectados suelen estar inapetentes, desarrollan edemas en los párpados y en la frente, dan un chillido peculiar y muestran incoordinación y debilidad respiratoria. No hay diarrea o fiebre **(Bertschinger and Gyles, 1994)**.

Los cerdos que mueren de enfermedad edemática muestran típicamente lesiones groseras de edema y hemorragia en algunos o todos de los siguientes sitios: tejido subcutáneo de los párpados y la frente, la curvatura mayor del estómago, los nódulos linfáticos mesentéricos, el mesenteterio colónico, y el cerebro, especialmente el cerebelo. Una microscopia electrónica identifica cambios degenerativos en las células del endotelio vascular, trombosis en los vasos sanguíneos, edema perivascular, y necrosis del músculo liso vascular **(Bertschinger and Gyles, 1994)**. Las *E. coli* responsables de la enfermedad edemática recuperadas de cerdos afectados pertenecen la mayoría comúnmente a los serogrupos O139, y menos frecuentemente a los serogrupos O138, o 141, aunque la pérdida de los antígenos O no parecen dañar la capacidad del organismo para causar enfermedad **(Aarestrup et al., 1997)**. Otros grupos O han sido asociados con enfermedad edemática o poseen los genes Stx2e incluidos los grupos 2, 9, 101, 107, 120, 121, 125, 149, 154 y 157 **(Gannon et al., 1988)**.

Las *E. coli* responsables de la Enfermedad Edemática pueden o no ser enterotoxigénica. Aquellas cepas que son enterotoxigénica funcionan como ambas *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* responsable de enfermedad edemática **(Nagy y Fekete, 1999)**.

LA ENFERMEDAD EN LOS CERDOS

Pocos días después del nacimiento, los cerdos infectados con cepas patógenas de *E. coli* se atontan y maman sin vigor o rehúsan mamar. Por lo general, presentan diarrea acuosa, amarillenta o de color grisáceo, aunque a veces se encuentran estreñidos, se desmedran y se debilitan con rapidez, no se mueven con facilidad en la nidada y no viven por mucho tiempo. A veces, los rabos se recubren con heces que al secarse, si los cerdos sobreviven, el período agudo de la infección obstaculizan la circulación produciendo el desprendimiento del rabo. En los cerdos en la edad de destete el desarrollo de los signos es más rápido en la infección de *E. coli* y la coloración de la piel menos pronunciada. La elevación de la temperatura alcanza cifras de 40 a 41,1° C. La diarrea es un signo precoz, pero no se observa hasta después de tres a cuatro días de la enfermedad, y el consumo de alimentos está marcadamente disminuida (**Bouguenec y Bertin, 1999**).

En la enfermedad edemática las muertes súbitas de cerdos en crecimiento y en buen estado de carne, pueden ser el primer signo; y los cerdos son frecuentemente encontrados muertos sin síntomas previos de la enfermedad (**Hampson, 1994**). Los cerdos se mueven con una marcha tambaleante hacia el alimento, pudiendo comer escasamente o solo hociquean el alimento, seguidamente pierden el control de las extremidades posteriores o anteriores, y en pocas horas la parálisis es completa y los cerdos no pueden levantarse, en otros casos se observan ataques de convulsiones y movimientos de corrida (**Bertschinger y Gyles, 1994**).

Los signos neurológicos característicos comprenden ceguera aparente, ataxia y marcha en círculos, que progresan a decúbito lateral con opistótonos y movimientos de nadar con las patas. Puede haber evidencia de edema de los párpados o de la frente y el edema de la laringe puede causar un rugido con un timbre característico. La muerte generalmente ocurre varias horas o dos días después, y algunos animales que se recuperan presentan signos neurológicos persistentes de severidad variable. La morbilidad en un grupo afectado es de alrededor de un 5% (**Hampson, 1994**).

La inflamación alrededor de los ojos frecuentemente combinada con enrojecimiento de la piel, puede deberse a una forma benigna de presentación de la enfermedad, de la

cual los cerdos se recuperan; la temperatura rectal es normal salvo algunas excepciones, puede observarse constipación marcada, pero en brotes debido a cepas de *E. coli* que producen una o más enterotóxicas, la diarrea puede preceder a los síntomas de la enfermedad edemática (**Bertschinger and Gyles, 1994**). En ciertos brotes los cerdos pueden sobrevivir y desarrollar la enfermedad crónica caracterizada por un crecimiento más lento con o sin signos de una encefalopatía local (**Kausche et al., 1992**).

Las alteraciones que se encuentran en los cerdos con enteritis producidas por *E. coli* son: enteritis catarral, que puede ser moderado o grave y que se caracteriza por congestión de los vasos mesentéricos anteriores y posteriores. El estómago puede contener cantidades variables de la leche coagulada, pero por lo general no presenta alteraciones hemorrágicas notables. El intestino contiene a menudo una sustancia acuosa amarillenta y gaseosa. Los ganglios linfáticos mesentéricos pueden estar aumentados de tamaño y edematosos. Los casos de enteritis hemorrágicas son poco frecuentes. En los cerdos de más edad con enteritis necrótica se ha aislado serotipos patógenos de *E. coli*. Es de presumir que tales organismos contribuyan al desarrollo de dicho estado. En cualquier edad se puede encontrar como complicaciones neumonías, peritonitis y pleuritis (**Frasser, 1993**). En los casos de septicemia, la piel puede presentar cierta coloración, que casi siempre es moderada, los abscesos de las articulaciones se presentan a veces después de que la septicemia ha declinado (**Wenneras et al., 1990**).

En la enfermedad edemática aunque algunos cerdos pueden no presentar lesiones visibles, otros, particularmente que han muerto recientemente, presentan edema evidente del subcutis, notablemente en la región craneal, en los párpados, sobre el hueso nasal, en la región inguinal y sobre el vientre (**Bertschinger and Gyles, 1994**). La submucosa de la curvatura mayor del estómago y el mesenterio del colon en espiral pueden mostrar un edema gelatinoso; y las cavidades serosas pueden contener una cantidad excesiva de líquido ámbar claro (**Hampson, 1994**).

Las lesiones pueden presentarse en varias combinaciones y la severidad de los cambios muestran enormes variaciones; los nódulos linfáticos subcutáneos están

edematosos con un moteado rojizo en la superficie, en el corazón pueden aparecer petequias ocasionalmente, en los pulmones y en la pared de la vejiga biliar se presenta edema variable, el estómago está frecuentemente lleno de un contenido seco y fresco parecido a migajas de alimentos, la mucosa está pálida y en la región del cardias puede presentarse un edema de variado espesor, a nivel de la submucosa (**Bertschinger and Gyles, 1994**).

DIAGNÓSTICO.

La identificación de ETEC en muestras clínicas a nivel mundial proveerá de una información importante para el desarrollo de vacunas efectivas contra ETEC, tales como la identificación de factores de virulencia más comunes que son capaces de inducir inmunidad protectora al hospedero e identificación de las combinaciones más comunes de toxinas de ETEC y factores de colonización en diferentes áreas geográfica y en el tiempo (**Sjöling et al., 2007**).

Blanco et al. (2002) señalan, que las diarreas en cerdos a la edad de amamantamiento y dentro de las dos primeras semanas postdestete, están casi siempre acompañadas por algún tipo de infección por *E. coli* no-comensal. El diagnóstico de la infección por ETEC se hace en la detección de factores de virulencia conocidos y del serogrupo de ETEC sospechoso. Esto puede no requerir necesariamente del cultivo de la bacteria. Pero la necesidad de determinar la resistencia antibiótica simultáneamente, hace que el cultivo y pruebas de características culturales "in vitro" sea parte del diagnóstico de rutina para los laboratorios. Para el cultivo usualmente se usa intestino de cerdo o heces, de las cuales es aconsejable inocular medios específicos requeridos para el crecimiento potencial de algunas adhesinas (MINCA, para F4 o Difco Blood Agar base con sangre de cabra para 987P).

Los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de *E. coli* son Agar Mac-Conkey con lactosa y el medio de eosina con azul de metileno (EMB o LEVINE). Se trata de medios selectivos que diferencian las colonias en positivas y negativas con respecto a la lactosa. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son lactosa positiva no se deben descartar el estudio de las colonias lactosa negativas, ya que en el 5% de *E. coli* que no fermenta la lactosa se pueden encontrar cepas patógenas. La biotipificación

se puede realizar con una serie corta de pruebas bioquímicas: indol (+), rojo de metilo (+), Voges Proskauer (-), citrato (-), SH2 (-) y ureasa (-). No obstante, hay que tener en cuenta que hay cepas atípicas: indol (-), citrato (+), SH2 (+) o ureasa (+) (**Blanco et al., 2005**).

Para probar si los aislamientos son ETEC, los antígenos fimbriales F4, F5, F6 (987P), F41, y F18 pueden detectarse por aglutinación de latex para lo cual hay disponibles kits basados en anticuerpos monoclonales. Las fimbrias adhesivas producidas "in vivo" pueden ser mas eficientemente detectados por pruebas de cuadros diarreicos usando ensayo de anticuerpos fluorescentes. Como puede ser que la cepa de EETC no sea conocida (o detectable), es aconsejable preparar ensayos para comprobar enterotoxinas de igual manera. Las toxinas TL y TSa pueden ser identificados por ELISA o por aglutinación del latex, desafortunadamente estas pruebas no son factibles para TSb. Pruebas de ADN (hibridación y PCR) son usadas para la detección "in vitro" de casi todos los genes virulentos conocidos de ETEC porcino (**Osek, 1999a, 1999b**). Su uso sin embargo, parece ser muy costoso y consume mucho tiempo bajo condiciones de diagnóstico de rutina en laboratorio. Por eso posteriores investigaciones han sido y aún son llevados a cabo en técnicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (*PCR, por sus siglas en Inglés*) que podría facilitar su uso para diagnóstico de laboratorio (**Nielsen y Andersen, 2003**).

La detección y caracterización de aislados de ETEC ha sido alcanzado por una variedad de métodos fenotípicos y genotípicos. Estos incluyen ensayos fenotípicos para toxinas y factores de colonización basados en el reconocimiento de anticuerpos monoclonales (MAbs, por sus siglas en inglés) (**Qadri et al., 2000**) y métodos genotípicos basados en la hibridación DNA/DNA (**Steinsland et al., 2003**), Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR, por sus siglas en Inglés*), o Técnicas de PCR a tiempo Real (**Reischl et al., 2004; Vidal et al., 2004**).

Sjöling et al. (2007) en investigación realizada en la que llevaron acabo un análisis comparativo de los métodos fenotípicos y genotípicos mencionados con anterioridad, encontraron una muy buena concordancia general en los resultados derivados de dichos métodos. Adicionalmente observaron que en unas pocas cepas, las toxinas termolábiles y Factores de Colonización fueron identificadas genotípicamente y no

fenotípicamente. De acuerdo a los resultados obtenidos estos investigadores recomiendan iniciar el screening para ETEC en muestras clínicas por PCR múltiple para detectar genes de la toxina LT. Las cepas positivas a las toxinas pueden entonces ser analizadas por Dot Blot para la detección de factores de colonización expresados sobre la superficie de la bacteria y por PCR para la determinación adicional de Factores de Colonización para los cuales los MAbs (Anticuerpos monoclonales, por sus siglas en Inglés) están actualmente ausentes así como también para cepas que hospedan genes de factores de colonización silente.

Han et al. (2007) desarrollaron un Microarray DNA para la identificación de serogrupos y modelos de genes de virulencia de aislados de *Escherichia coli* asociados con diarrea post destete porcina y enfermedad edemática. Estos investigadores paltean que el Microarray demostró ser altamente específico y con resultados reproducibles. Los autores concluyen que el microarray puede ser una técnica fácil de hacer para diagnosticar la presencia de cepas *E. coli* asociadas con diarrea post destete y enfermedad edemática.

El diagnóstico de la diarrea postdestete (*PWD*, por sus siglas en Inglés) requiere de cuidadosa consideración de los factores predisponentes y resultados bacteriológicos. Esto es casi siempre una necesidad para la investigación en el diagnóstico diferencial tales como detección de virus. Por ello en caso de PWD, es muy aconsejable no ser absoluto con un posible resultado bacteriológico donde se detecten varios tipos de ETEC, pero es también necesario considerar otros factores fisiológicos, ambientales, dietéticos y virales que pueden a veces ser tan importantes como las mínimas bacterias ETEC. Cultivo y/o identificación inmunofluorescente “in vivo” de cepas de ECET del íleo de cerdos diarreicos es la vía más simple y eficiente para el diagnóstico bacteriológico (como se describe para la diarrea en recién nacido). El análisis bacteriológico de muestras fecales para ETEC es más difícil porque la bacteria presente en las heces puede no reflejar el status microbiológico del intestino delgado. Hay una variedad de técnicas “in vitro” que detectan los factores de virulencia (adhesinas y toxinas) de ETEC incluyendo ensayos inmunológicos y biológicos, pruebas moleculares (hibridación del ADN y PCR), como se mencionó antes para la diarrea en recién nacidos (**Blanco et al., 2005**).

La diferenciación de cepas expresando F18 ab de cepas que expresan F18 ac puede ser importante en el desarrollo de vacunas efectivas para infecciones por ETEC y *Escherichia coli* productoras de Toxinas Shiga en cerdos destetados. La diferenciación de cepas productoras de F18 ab y F18 ac es también importante por la correlación que existe entre los tipos de toxinas producidas y la secuela clínica en los cerdos infectados. Las cepas F18 ab⁺ son generalmente cepas STEC y están asociadas con enfermedad edemática, mientras que las cepas F18 ac⁺ son generalmente ETEC, y están asociadas con diarrea (**Nagy et al., 1997; Wittig et al., 1995**). Los antisueros policlonales monoespecíficos y los anticuerpos monoclonales 6C7/C1, que es específico para cepas F18 ac⁺, puede diferenciar entre estas dos variantes antigénicas (**Nagy et al., 1997; Rippinger et al., 1995**). Sin embargo, la diferenciación serológica no siempre es posible porque muchas cepas no expresan F18 cuando son cultivadas in vitro bajo condiciones de cultivo estándares (**Rippinger et al., 1995**). El gen codificante para la Subunidad Fimbrial mayor de F18 (*fedA*) en cepas F18 ab⁺ y F18 ac⁺ ha sido secuenciado y se han encontrado diferencias (**Imberechts et al., 1994**). Una prueba de Polimorfismo de Fragmento Largo de PCR de Restricción (*RFLP, por sus siglas en Inglés*) consistió en la amplificación del gen *fedA* seguido de la digestión con la enzima de restricción *NgoMI*, esta prueba ha sido usada para diferenciar cepas F18 ab⁺ de cepas F18 ac⁺ (**Nagy et al., 1997**).

Brad et al., (1998) aplicando la técnica de Análisis de Polimorfismo Conformacional de una sola Cadena (*SSCP, por sus siglas en Inglés*) aplicado al gen *fedA* logró diferenciar cepas F18 ab⁺ de cepas F18 ac⁺. Además encontraron que muchas cepas clasificadas como F18 ab⁺ por SSCP contenían genes para la Stx2e y enterotoxinas, mientras que las cepas clasificadas como F18 ac⁺ solo contenían genes para las enterotoxinas. Los autores concluyen que el análisis SSCP es un método útil para predecir la antigenicidad de F18⁺ y pudiera ser usado para el análisis de otros genes de virulencia de *E. coli*.

La presencia de uno o más tipos de ETEC puede ser a menudo acompañada por *rotavirus*, *calicivirus*, *coccidia* o por *coronavirus* de la diarrea epidémica porcina en ambos grupos de edad, neonatos y destetados, pero sobre todo en cerdos destetados (**Imberechts et al., 1997**). El diagnóstico diferencial puede incluir frecuentemente la

detección de *rotavirus* y *coronavirus* así como *espiroquetas* y *salmonellas* (**Franck et al., 1998**).

Al respecto **Monseratt (2004)**, señala que los agentes que provocan diarrea en lechones son numerosos, pudiendo ser de carácter infeccioso o no. Entre los agentes infecciosos se encuentran diversos virus (virus de la Gastroenteritis transmisible, Rotavirus, etc) y bacterias (*Clostridium perfringens*, etc). Algunos parásitos también aparecen relacionados (coccidias).

Con relación a la colienterotoxemia, los cerdos normalmente están en buenas condiciones y los signos clínicos o hallazgos de la necropsia en animales de muerte reciente son distintivos. La enfermedad de los edemas afecta fundamentalmente a lechones destetados, tiene una elevada mortalidad y está causada por cepas que además de producir enterotoxinas sintetizan la verotoxina VT2e (también conocida toxina edematosa), responsable de las alteraciones neuronales (**Blanco et al., 2002**).

La confirmación se basa en la demostración histológica de malacia focal en el tallo cerebral o de lesiones vasculares degenerantes típicas en varios lugares (**Hampson, 1994**). Son importantes las lesiones microscópicas en el cerebro, y las lesiones en pequeñas arterias y arteriolas, consistentes en pignosis y cariorrexis del núcleo en la túnica media del endotelio, necrosis de las células de la muscular de la mucosa, en el intestino. Glóbulos de material eosinofílico se observan alrededor de los vasos afectados en el cerebro (**Erickson et al., 1992**). El diagnóstico diferencial incluye la meningitis por *Streptococcus suis*, Pseudo rabia, septicemia por *Salmonella* e intoxicación con cloruro de sodio y compuestos arsenicales orgánicos (**Hampson, 1994**).

Al respecto (**Bertschinger y Gyles, 1994**) refieren que esta enfermedad es fácilmente diagnosticada cuando ocurren brotes típicos, sin embargo, los casos esporádicos especialmente aquellos que afectan grupos de edades atípicas y requieren diferenciación con otras enfermedades caracterizadas por un curso corto y por signos neurológicos como la Pseudo rabia, Poliencfalomielitis enteroviral, Fiebre porcina, Meningoencefalitis bacteriana causada por *Streptococcus suis* o *Haemophilus parasuis*, otitis media, y privación de agua.

En estudios comparativos de infecciones intestinales, mediante el empleo de métodos histopatológicos, se ha demostrado, que las infecciones por rotavirus se caracterizan por la destrucción de las vellosidades de las células epiteliales, las infecciones por parvovirus se caracterizan por la destrucción de las criptas de las células epiteliales. Las infecciones por organismos intracelulares parecidos a *Campylobacter* se caracterizan por hiperplasia de las células epiteliales. Mientras que las infecciones por *E. coli* enterotoxigénicos se caracterizan por la adherencia de *E. coli* a las vellosidades del epitelio, con daño escaso o inaparente en la estructura de la mucosa y por el ataque a la superficie de la membrana de las células epiteliales, sobre todo en las microvellosidades (**Moxley y Duhamel, 1999**).

En algunos casos convendría determinar su fagotipo y patrón de electroforesis en campos pulsantes (PFGE por sus siglas en Inglés). Solamente en determinados laboratorios de investigación de referencia se realiza el serotipado completo, el fagotipado y la técnica de PFGE (**Blanco et al., 2005**).

La técnica de electroforesis en gel de campos pulsantes (*PFGE*) es la técnica de epidemiología molecular que ha dado mejores resultados para detectar las conexiones clonales entre cepas relacionadas epidemiológicamente. En esta técnica se usan enzimas de restricción que cortan de manera infrecuente el ADN cromosómico para generar fragmentos muy grandes que son separados por electroforesis. Los fragmentos de ADN generados son mayores de 40 kb y se pueden separar si se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis (**Blanco et al., 2005**). Sin embargo, **Nemoy et al., (2005)**, señalan que aunque la PFGE es el método actual más usado para el tipado molecular de las bacterias, el tipado de la secuencia del multilocus (*MLST, por sus siglas en Inglés*) ofrece ventajas sobre la PFGE ya que tiene mayor capacidad discriminatoria para definir la relaciones genéticas entre cepas.

Mora et al. (2000), han empleado la fagotipificación como un método de caracterización y clasificación de *E. coli* verotoxigénicos aisladas en España. Otro método que no es común utilizarlo en el diagnóstico de rutina es la inmunoelectromicroscopia, lo cual permite identificar las bacterias con fimbrias F107, las cuales se adhieren fuertemente al borde de las vellosidades de los enterocitos de fragmentos de intestino delgado, y con la preparación de antisueros contra estas fimbrias se pueden visualizar la unión de

anticuerpos fimbriales anti F107 unido a las bacterias que colonizan el intestino (**Blanco et al., 2002**).

La detección de las enterotoxinas puede realizarse por métodos fenotípicos (TL en células Vero, TSa en el ensayo del ratón lactante y TSb en asas intestinales ligadas de cerdo) o genotípicos (hibridación DNA/DNA y PCR). También se pueden identificar los serotipos de ETEC detectando sus antígenos de colonización con pruebas de aglutinación (**Blanco et al., 2002**).

CONTROL

La diarrea post-destete (PWD) es una seria amenaza a la prosperidad económica de la industria porcina debido a las pérdidas como resultado de las mortalidades y debido a la reducción del crecimiento en los cerdos supervivientes. Se estima que el 50% de la mortalidad en cerdo debido a la diarrea es atribuible al agente causal de la diarrea postdestete (PWD), *E. coli enterotoxigénica* (**Gyles, 1994**). Las cepas de *E. coli* más comúnmente asociadas con la PWD poseen fimbrias F4 y F18 (**Fairbrother et al., 2005; Zhang et al., 2007**). Como resultado del impacto significativo que la *E. coli* enterotoxigénica positiva a F18 y otras infecciones bacterianas pueden tener sobre la producción porcina, antibióticos profilácticos son frecuentemente incluidos en la dieta de cerdos jóvenes en un intento de prevenir la colonización por ETEC y por ende la diarrea postdestete. El 78% de las granjas porcinas grandes de EE.UU. incluyen concentraciones subterapéuticas de antibióticos en la dieta de cerdos jóvenes (**USDA, 2001**). A pesar del uso de profilaxis antibiótica, el 40,7% de estas granjas reportaron la ocurrencia de diarrea causada por las infecciones de *E. coli* (**USDA, 2001**). La ausencia de prevención efectiva de PWD no es sorprendente por la frecuencia y espectro de la resistencia antibiótica vistas en las cepas de ETEC (**Lanz et al., 2003**). Se espera que la resistencia antibiótica se incremente más entre estas cepas, basados en el incremento general en la resistencia a los antibióticos por cepas de ETEC en los últimos 20 años (**Maynard et al., 2004**).

Dada la preocupación a nivel mundial sobre el uso de antibióticos profilácticos en la agricultura y su contribución a la expansión de resistencia antibiótica (**Stein, 2002**), el

desarrollo de alternativas a antibióticos convencionales es necesidad urgente para proteger al cerdo de estas infecciones de *E. coli* **(Hayes et al., 1999)**.

Una alternativa potencial a los antibióticos convencionales que sostienen mucho que ofrecer son las colicinas. Las colicinas son una clase de bacteriocinas producidas por una *E. coli* y efectiva contra la misma y estrechamente relacionada con la bacteria **(Fredericq, 1957)**. Las colicinas formadoras de poros, tales como Colicina E1, se une a su bacteria diana y las destrulle por disrupción del gradiente ionico de la célula **(Fredericq, 1957)**. Estas proteínas son particularmente atractivas para su uso como una alternativa a antibióticos convencionales para el control de la diarrea post-destete causadas por *E. coli*. La inclusión en la dieta de Colicina E1 disminuyó la incidencia y severidad de la diarrea post-destete causada por *E. coli* enterotoxigénica F18 positiva y mejoró la ganancia de peso de los cerditos **(Cutler et al., 2007)**.

Los probióticos ofrecen otra alternativa no antibiótica a la prevención de diarrea por ETEC. Diversos productos bacterianos en el mercado con mayor o menor eficacia sobre las infecciones entericas bacterianas están siendo demandados. Sin embargo, en la mayoría de los casos hay solo pocos datos exactos y convincentes de la eficacia de tales productos contra la ETEC. Como el uso preventivo de antibióticos en Medicina Veterinaria se prohibió en la Unión Europea, hay una necesidad de incrementar rápidamente el reemplazo de los antibióticos que se utilizaban para prevenir las infecciones ETEC. Sin embargo, estos productos deben ser cuidadosamente probados, y su modo de acción más precisamente explicados **(Jin et al., 2000; Kiers et al., 2002)**.

Una de las nuevas esperanzas está siendo dada por el Tratamiento de Exclusión Competitiva para cerdos neonatales **(Genovese et al., 2000)** dando un cultivo de microflora cecal de cerdos jóvenes saludables. Tal tratamiento es conocido también como concepto Nurmi **(Nurmi and Rantala, 1973)**. La necesidad de tales productos más eficientes y bien fundamentados científicamente es más evidente en el caso de la diarrea post-destete **(Nagy and Fekete, 1999)**.

La dieta es uno de los factores más importantes que influyen en el curso de la enfermedad en estos animales. Una dieta rica en productos lácteos y energía reduce la duración del periodo de toma de alimentos disminuida, la mortalidad asociada y retrasa la aparición de los signos clínicos. El palsa desecado adicionado al alimento también

también tiene un efecto protector en reducir la incidencia y severidad de la diarrea. En contraste, otros ingredientes, tales como soja, favorecen la ocurrencia de diarrea post-destete. Esto pudiera deberse a la presencia de inhibidores de la tripsina o antígenos que inducen una respuesta inmune localizada. Polvo de Plasma Desechado Spray (*SDPP, por sus siglas en inglés*) es una fuente de proteína común en dietas de inicio para cerdos destetados en muchos países. Está descrito que mejora el crecimiento y la salud durante los primeros días después del destete, en particular bajo altas presiones de infección (**Coffey y Cromwell, 1995; Bergstrom et al., 1997**). **Niewold et al. (2007)** demostraron que tanto el Polvo de Plasma Desechado Spray (SDPP) como el Polvo de Plasma Inmune Desechado Spray (*SDIPP, por sus siglas en inglés*) mejoran la salud y el crecimiento de manera similar al que ha sido mostrado en la diarrea neonatal usando anticuerpos derivados de yema de huevo o SDPP (**Yokoyama et al., 1992; Owusu-Asiedu et al., 2002**). **Niewold et al. (2007)** confirman que SDIPP protegen contra la diarrea post-destete, y esto puede ser atribuido a la presencia de anticuerpos α -LT y α -F4. SDPP solo protege significativamente contra la diarrea, que es consistente a la presencia de anticuerpos α -LT solamente. Comparando SDPP y SDIPP es evidente que este último, no solamente protege contra la diarrea, sino también reduce la excreción de ETEC, que reducirá la transmisión dentro del rebaño (**Geenen et al., 2005**).

La presencia de acidificantes orgánicos puede promover una mayor ganancia de peso diaria, conversión alimenticia y decrecimiento de la incidencia de la diarrea post-destete. La adición de niveles de óxido de zinc a niveles superiores a 2 400 ppm en el alimento redujo la severidad de la diarrea post-destete. **Højberg et al. (2005)** en investigación realizada sobre la influencia del óxido de zinc y el sulfato de cobre en la dieta sobre el ecosistema gastrointestinal en cerdos recién destetados, encontraron que el mecanismo de acción del óxido de zinc sobre la microbiota gastrointestinal es semejante al mecanismo de trabajo de algunos antibióticos promotores del crecimiento, a saber, la supresión de comensales grampositivos más que organismos gramnegativos potencialmente patógenos. La reducida fermentación de nutrientes digeribles en la parte proximal del tracto gastrointestinal puede suministrar más energía disponible para el animal y contribuir al efecto de promover el crecimiento en dietas con altas dosis de zinc. La dieta con sulfato de cobre inhibió los coliformes y de esa manera los patógenos

potenciales, pero de manera general el efecto fue limitado cuando se comparó con el óxido de zinc.

La utilización de nuestro conocimiento sobre los factores de virulencia de ETEC ha sido bien documentada en el uso eficiente de vacunas maternas para el ganado y el cerdo. Hoy las infecciones por ETEC de cerdos lactantes puede ser mejor prevenida por inmunización materna y por suplemento temprano de calostro inmune. Diversas vacunas maternas están disponibles en el mercado, principalmente por aplicación parenteral, en cerdas preñadas. Estas vacunas contienen bacterias inactivadas con antígenos protectores (Adhesinas Fimbriales con o sin Enterotoxinas LT), o antígenos purificados, y son aplicadas en la última etapa de la preñez. Como resultado, los anticuerpos calostrales específicos pueden ser suplementados a las crías recién nacidas tan temprano como las primeras pocas horas de vida. Por consecuencia bloquea los factores de virulencia y la propagación de la bacteria ETEC en el intestino **(Moon and Bunn, 1993)**. El calostro inmune o anticuerpos específicos pueden ser aplicados metafilacticamente (en el momento en que la infección está incrementada), sin embargo, con mucho menos éxito **(Nagy y Fakete, 2005)**.

Los primeros experimentos de inmunización en que las fimbrias fueron utilizadas como antígenos, fueron realizados con fimbrias F4: en 1973, Rutter y Jones tuvieron éxito al proteger cerditos contra colibacilosis entérica neonatal inmunizando parenteralmente cerdas con antígenos F4 purificados **(Rutter and Jones, 1973)**. Esta protección pasiva de animales recién nacidos por anticuerpos específicos de fimbria en sus cisternas de calostro y leche han sido usado con respecto a la fimbria F5 y F6 **(Morgan et al., 1978; Sojka et al., 1978; Acres et al., 1979)** las vacunas parenterales basada sobre la fimbria han sido producida comercialmente y están disponibles para la protección de neonatos contra colibacilosis entérica durante el periodo de lactancia. Sin embargo en el momento del destete, esta inmunidad lactogénica deja de existir propiciando que los animales se tornen susceptibles contra las infecciones por *E. coli* enterotoxigénica. Una respuesta inmune mucosal intestinal activa es requerida para la protección. Una vez que las vacunas parenterales disponibles tienden a estimular la respuesta sistémica más que el sistema inmune mucosal **(Moon and Bunn, 1993)**, la administración oral de antígenos es una alternativa. Sin embargo, los antígenos administrados oralmente no

siempre despiertan una respuesta inmune mucosal (**Swarbrick et al., 1979**). Sobre lo contrario, el resultado más frecuente de un encuentro oral con antígenos solubles es la inducción hipo o incluso no respuesta sistémica, llamada tolerancia oral (**Strobel and Mowat, 1998**). Si la tolerancia es inducida, puede ser influenciada por ciertas propiedades de antígenos. Ciertamente, ha sido demostrado antes, que la administración oral de fimbrias F5 y F6, ambas poseen actividades de unión al receptor, evocando respuestas de anticuerpo sérico en ratones (**De Aizpurua and Russell-Jones, 1988**). Estos investigadores hipotetizaron que los antígenos se unen al epitelio intestinal y son subsecuentemente transportados a través de la barrera epitelial para entrar en la circulación y despertar una respuesta inmune sistémica. Sin embargo, como un control no de unión, ellos usaron antígenos de diferentes naturaleza y consecuentemente la implicación de receptores específicos de fimbria en la inducción de una respuesta inmune mucosal intestinal pudo no ser determinada exactamente. Más recientemente, la capacidad de la fimbria F4 purificada con actividad de unión al receptor (**Van den Broeck et al., 1999a**) para inducir una respuesta inmune mucosal intestinal en cerdos en el momento de la administración oral ha sido demostrada (**Van den Broeck et al., 1999b**). Adicionalmente, para la inmunización de cerdos receptores F4 positivos y receptores F4 negativos, los mismos investigadores demostraron que la presencia de estos receptores específicos de antígenos sobre el borde en cepillo de los enterocitos de las vellosidades es un prerrequisito para la inducción de una respuesta inmune (**Van den Broeck et al., 1999c**).

La inmunización oral de cerditos receptor F4 positivos induce protección contra un desafío con *E. coli* enterotoxigénica virulenta F4 positiva (**Van den Broeck et al., 1999c**). Como las infecciones con *E. coli* enterotoxigénica F4 positivas son la principal causa de diarrea y mortalidad de los cerdos recién destetados y con pérdidas económicas significativas como consecuencia y como no hay vacunas eficientes disponibles aún para proteger estos cerdos recién destetados, estos hallazgos pueden tener importantes implicaciones clínicas abriendo nuevas perspectivas (**Van den Broeck et al., 2000**).

Además debe ser examinado si las fimbrias F4 pueden ser usadas en cerdos receptores F4 positivos como transportadores de otros antígenos para inducir la

inmunidad por vía oral, al igual que la toxina del cólera (**Stok et al., 1994**). Como no todos los cerdos expresan el receptor F4, el uso de otros antígenos fimbriales con actividades de unión al receptor debe ser evaluado.

Las medidas inmunoterapéuticas incluyendo la aplicación de anticuerpos monoclonales (**Sun et al., 2000**), o yema de huevo o plasma animal conteniendo anticuerpos (**Bosi et al., 2004; Owusu-Asiedu et al., 2002**) protege cerdos jóvenes contra la adhesión y colonización por ETEC. Los productos de Yema de Huevo antiadhesivos específicos se ha visto que dan cierto grado de protección contra la diarrea post-destete (PWD) de cerdos en caso de infección por ETEC F18⁺ y/o F4⁺ (**Marquardt et al., 1999**).

La inmunización activa contra PWD en los cerdos es mucho más difícil. Las razones principales de estas dificultades son: (1) la bacteria ETEC es solo uno de los componentes esenciales de la etiología de la diarrea post-destete. (2) La efectividad de la inmunización es dependiente de la respuesta al antígeno, que se ha visto que depende de la presencia de receptores intestinales a las adhesinas F4 y F18 específicas de ETEC (**Van den Broeck et al., 1999a, b**), siendo ambas consideradas las más importantes en la PWD. (3) El sistema inmune mucosal del intestino delgado puede reaccionar con tolerancia o hipersensibilidad para antígenos iguales dependiendo de la dosis y forma del antígeno inmunizante (**Cox et al., 2002**). (4) Las cinéticas de la inmunidad mucosal específica puede ser diferente en los casos de F4 y F18 (**Verdonck et al., 2002**). Además diversas estrategias de inmunización existen para evitar estos problemas, algunas de las cuales son las siguientes: Adopción de la inmunización pasiva por alimentación con yema de huevo o plasma animal conteniendo anticuerpos específicos. Hasta el presente los experimentos más promisorios están en el área de las vacunas orales vivas aplicadas antes del destete (**Nagy y Fakete, 2005**). **Bertschinger et al. (1979)** demostró la eficacia de tales vacunas cuando dietas bajas en energías fueron también dadas. Experimentos adicionales de este grupo proveyó evidencia a cerca de la protección de cerdos contra diarrea postdestete y enfermedad edemática por una vacuna viva oral conteniendo fimbria F18 (**Bertschinger et al., 2000**). La protección contra la enfermedad ha sido obtenida por vacunación de cerdos con Stx2e purificada e inactivada por glutaraldehido. La protección fue demostrada en un modelo de enfermedad edemática experimental (**Macleod y Gyles, 1991**) y

experimentos de campo en dos rebaños de producción con enfermedad edemática post-destete (**Johansen et al., 1997**). La vacunación con un toxoide Stx2e genéticamente modificado también ha demostrado ser efectivo en proteger cerdos contra la enfermedad edemática usando un modelo de infección experimental (**Bosworth et al., 1996**). La vacunación probablemente requiere dos inyecciones con un intervalo de 14 días, para proveer inmunidad protectora una semana después de la segunda inyección (**Johansen et al., 1997**). En contraste, un antisuero específico puede proveer inmediatamente inmunidad protectora adquirida pasivamente en cerdos. **Alexa et al. (1998)** ha demostrado protección adecuada en condiciones de campo tratando cerdos destetados con un antisuero, que fue producido por inyección del sobrenadante de un cultivo de una cepa de *E. coli* verotoxigénica en cerdos destinados al sacrificio. Resultados promisorios similares fueron obtenidos por la aplicación oral de fimbria F4 purificada (**Van den Broeck et al., 1999a, b**). Sin embargo, la aplicación de Fimbria F4 y F18 en microesferas no ha probado ser útil (**Felder et al., 2000; Snoeck et al., 2004**). **Verdonck et al. (2007)** demostraron que la inmunización oral de cerdos destetados con fimbria F18 purificada no produjo protección contra la infección por *E. coli* F18⁺. Una vacuna combinada (oral viva y parenteral muerta) contra la PWD también se ha visto de ser efectiva previniendo las pérdidas (**Alexa et al., 1995**). Recientemente, las vacunas DNA (usando todos los genes de virulencia contenidos en el plasmido de la ETEC responsable de la PWD) (**Verfaillie et al., 2004**), y cepas vacunales de *E. coli* y *Salmonella* recombinantes vivas y oral (**Lee et al., 2001; Xu and Wei, 2002**) están dando algunas esperanza pero el efecto protector en cerdos están aún por ser vistos (**Nagy y Fakete, 2005**). **Melbeke et al., (2007)** demostraron que la optimización de la expresión construida y la coadministración de vectores LT, incrementaron fuertemente la inmunogenicidad de la Vacuna DNA FaeG. Sin embargo, la inmunización de la vacuna DNA FaeG vía oral indujo una respuesta IgG mayormente sistémica, fallando en prevenir la excreción de *E. coli* en el momento del desafío.

En general la efectividad de la vacunación contra la PWD depende ampliamente del correcto vínculo que debe existir entre los antígenos protectores utilizados con el tipo de factor de virulencia de ETEC presente en la población animal, y aplicando esta de la forma más eficiente y en el tiempo óptimo. Nuestro conocimiento a cerca de la etiología

y patogénesis de la diarrea post-destete, a cerca de la posibilidad de factores de virulencia existentes y a cerca la inmunidad celular y secreción intestinal (**Bozic et al., 2002**) y la biología de los receptores de los cerdos destetados es aún limitada y además los avances en está área están por ser esperados. Adicionalmente, nuestro progreso debe ser grandemente aumentado por modelos in vivos fiables. Entre otros, un modelo de desafío reproducible para la diarrea post-destete es aún muy necesario (**Frydendahl et al., 2003; Madec et al., 2000**).

MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo se realizó en la Provincia de Villa Clara, Cuba. En los laboratorios de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en el Laboratorio de proteínas del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Diseño Experimental:

El método de muestreo utilizado fue en Etapas Múltiples o Multinivel. Primeramente se seleccionaron a través del método aleatorio simple las seis unidades porcinas a muestrear. En cada Unidad se procedió a la selección de una muestra de 15 animales diarreicos de las categorías crías y precebas. Esta selección se realizó alternando el tamaño de la muestra por categoría en cada Unidad Porcina, garantizando al final del muestreo 45 crías y 45 precebas, para un tamaño de muestra de 90 animales. El tamaño de la muestra se calculó según **Pfeiffer (2002)** para poblaciones infinitas y con un nivel de precisión de 99%.

Aislamiento de E. coli.

Para el aislamiento de la *E. coli* enterotoxigénica, los animales muestreados se sacrificaron y se tomó muestra del contenido intestinal del íleo, el cual se inoculó en el Medio Stuart - un medio de conservación y transportación – (Producido por la Merck Germany, Lot: 1/876017). Subsiguientemente y de forma paralela se procedió a la siembra por agotamiento en Agar Sangre (Producido por Merck, Lot: V171086) y Mac Conkey (UNI-Chem ® Chemical Reagent, Lot: GD 7051179). Las colonias hemolíticas se volvieron a sembrar por agotamiento y de forma paralela en Agar Sangre y Mac Conkey.

Cepas Bacterianas De Referencia.

Como controles positivos se emplearon las cepas de *E. coli* enterotoxigénica de referencia GIS 26, serotipo O149:K91:F4ac LT⁺ STa⁺ STb⁺ [**Ver Figura 1 del acápite anexos**] y 2134, serotipo O157:H19 F18ac⁺ STIa STII [**Ver Figura 2 del acápite anexos**] respectivamente, provenientes del Laboratorio de Microbiología, Universidad de Ghent, Ghent, Bélgica.

Actividad Hemolítica.

Los aislados en Agar Sangre Base suplementado con el 5% de sangre de oveja e incubado a 37 °C por 24 horas. La β-hemolisis fue evidente como una zona de lisis alrededor del crecimiento bacteriano [Ver Figura 3 del acápite anexos].

MAb Dot Blot Assay Para La Detección De Antígenos Fimbriales F4 Y F18.

1. Se aplicó el papel de nitrocelulosa (Bio-Rad laboratorios 0,45µm Lot: 1020115) – previamente cortado en forma de media placa de petri – sobre las colonias obtenidas por agotamiento en Agar Sangre por espacio de dos horas.
2. Se distribuyó la solución de bloqueo en placas de Petri a un volumen de 10 – 12 mL
3. Los papeles de nitrocelulosa previamente aplicados sobre las colonias bacterianas se retiraron y se lavaron con PBS, hasta retirar las colonias que se adhirieron al papel.
4. Luego los papeles de nitrocelulosa se sumergieron en la solución de bloqueo y se incubaron a 4 grados Celsius por una noche.
5. Subsiguientemente se lavaron los papeles de nitrocelulosa 3 veces por cinco minutos cada vez con solución de lavado (PBS y Tween 20); la agitación del lavado se obtuvo en el equipo ORBIT 300 (Labnet International) a 20 rpm y 5 minutos cada vez.
6. Luego se procedió a añadir una solución de $\frac{1}{10}$ del anticuerpo monoclonal contra antígeno fimbrial F4 en solución de bloqueo, y se puso en agitación por espacio de 1 hora y a 20 rpm en el mismo equipo citado con anterioridad.
7. Después de cumplimentado este tiempo se lavó tres veces con solución de lavado.
8. Se añadió una solución $\frac{1}{1000}$ del anticuerpo policlonal (Policlonal de Conejo Antiinmunoglobulina de Ratón *HRP* por sus siglas en inglés, a razón de 1,3 g/L, Lot: 00036043) contra el anticuerpo monoclonal anti F4, en solución de bloqueo y

se puso en agitación por espacio de 1 hora y a 20 rpm en el mismo equipo citado con anterioridad.

9. Posteriormente se lava tres veces con solución de lavado.
10. Subsecuentemente se añade el cromógeno 3-amino – 9 – ethylcarbazole (Producido por ALFA Aeser ® A Johnson Matthey Company, Lot: H3804A) y dimetilforfamida (Producido por J.T. Baker, Lot: 0601902019) a 2X y se adiciona el peróxido de hidrógeno 10 µL/10mL del total.
11. La descripción se ha restringido a la detección de antígenos fimbriales F4 para hacerla más comprensible. En la detección de antígenos fimbriales F18 se siguen las mismas pautas que para detectar antígenos F4, solo varía que se utilizan anticuerpos monoclonales anti F18 y anticuerpos policlonales contra los monoclonales anti F18.
12. En ambas detecciones se estableció un control positivo y un control negativo, ilustrando con un 4 y un 18 los controles positivos de antígenos Fimbriales F4 y F18 respectivamente [**Ver Figuras 4 y 5 del acápite anexos**]. Los antígenos fimbriales F4 y F18 fueron obtenidos de cepas de E. coli enterotoxigénica de referencia GIS 26, serotipo O149:K91:F4ac LT⁺ STa⁺ STb⁺ y 2134, serotipo O157:H19 F18ac⁺ STIa STII respectivamente provenientes del Laboratorio de Microbiología, Universidad de Ghent, Ghent, Bélgica.

Obtención De Monoclonales α-F4 Y α-F18 Con Hibridomas:

Se colocan primero todos los reactivos y se añade RPMI hasta el volumen deseado y calculado.

Se conserva a 4 grados Celsius.

Cuando los hibridomas se extraen de la crioconservación en nitrógeno líquido (2 ml), se hacen dos lavados con RPMI – Completo con 4 grados Celsius para eliminar el DMSO (Dimetilsulfoxido) que es tóxico a las células a temperatura ambiente (10 min. / 900 rpm).

Primero se ponen 8 ml del medio en pequeños frascos de cultivos celulares y antes de incubar se chequea bajo microscopio óptico.

F4 2D8F564 (IMMαF4) son los hibridomas.

Para cambiar de frasco pequeño a grande primero se cuantifica para eliminar todos los detritus y metabolitos viejos, se decanta el Sobrenadante (10 min / 900 rpm) y se resuspende en frascos medianos 15 ml.

En Frasco Mediano – Frasco grande se centrifuga 10 minutos a 1000 rpm. Se colecta el sobrenadante (Debe ser amarilloso) a 4 grados Celsius, el Pellet se resuspende en 1ml de medio y se añaden 250 µl a 40 ml de medio.

Se revisan los frascos.

Purificación de IgG en sobrenadantes de hibridomas: Cromatografía de Columna de Proteína G.

- HiTrap Protein HP Column 1 mL.
- Pharmacia LKB pump P1: peristaltic pump.
- Buffers:
 - ✓ 0,5 M Na-phosphate buffer: 40,875g Na₂HPO₄ in 500 mL UPW.
 - ✓ 200 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0.
 - ✓ Binding Buffer: 100 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0.
 - ✓ Wash Buffer: 10 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0.
 - ✓ Elution Buffer: 100 mM glycine – HCL pH. 2.7.
 - ✓ Neutralisation Buffer: 1M Tris-HCL pH. 8.

1. Eliminar algunas burbujas en las bombas peristálticas con una **syringe**.
2. Lavar la bomba peristáltica con 10 mL de 100mM Na-phosphate buffer pH. 7.0. *Tasa de flujo = 1mL / min(1x;10x)*
3. Lavar la Columna de Proteína G con 10 volúmenes de Columnas 100mM Na-phosphate buffer pH. 7.0. *Tasa de flujo = 1mL / min(1x;10x)*
 - ✓ Filtrar el SN.
 - ✓ Adicionar 1 mL 200 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0. a 6.25 mL de sobrenadante.
 - ✓ Adicionar un 10% de azida sódica a un cociente final de 0.05%.
1. **Echar** el sobrenadante sobre la columna. *Tasa de flujo = 0.5mL / min(1x;5x)*
2. Lavar la columna con 15 volúmenes de columna 10 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0. *Tasa de flujo = 0.5mL / min(1x;5x)*

3. Lavar el sistema cromatográfico por espacio de 15 min con 10 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0.
4. Correr el programa MHCII: C.
 - a) Lavar la Columna con 5 volúmenes de columna 10 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0. *Tasadeflujo = 1mL/ min*
 - b) Eluir La IgG de la Columna con 10 volúmenes de columna 100 mM glycine – HCL pH. 2.7. *Tasadeflujo = 0.5mL/ min* Fracciones iguales a 500 μ L. Inmediatamente adicionar 75 μ L de 1M Tris-HCL pH. 8. para eluir fracciones.
 - c) Lavar la Columna con 15 volúmenes de 100 mM Na-phosphate buffer pH. 7.0. *Tasadeflujo = 1mL/ min*
5. Lavar la columna por 15 minutos con AD + 0.05% Acida Sódica.
Tasadeflujo = 1mL/ min

Remarks

IgG will elute after appr. 2-3 mL de Buffer de Elusión.

Analisis Estadístico.

Los resultados fueron procesados con el empleo del Módulo de Proporciones Binomial, a través de una comparación de proporciones, utilizando como base la prueba de Chi-Cuadrado en el Software Profesional SAS, versión 9.1. Asimismo la asociación entre la actividad hemolítica y la expresión de fimbrias se valoró con el empleo del Software Profesional EPIDAT versión 3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 1. Prevalencia de Unidades Positivas Antígenos Fimbriales F4 y F18 en cerdos lactantes de la Provincia de Villa Clara.

Total de Unidades Encuestadas	Unidades Positivas a antígenos F4	Unidades Positivas a antígenos F18	Prevalencia de Unidades positivas a Antígeno F4 (%)	Prevalencia de Unidades Positivas a Antígeno F18 (%)
6	4	2	66,66	33,33

En la tabla 1. se puede apreciar que la prevalencia de unidades positivas a antígenos fimbriales F4 y F18 en cerditos lactantes diarreicos de la Provincia de Villa Clara fue del 66,66% y del 33,33% respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por **Erume et al. (2008)** quienes plantean que en cerdos, las infecciones más comunes y severas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) son causadas por cepas F4⁺. Nuestros resultados concuerdan además con los obtenidos por **Talavera (1981)** quien empleando el método de aglutinación, encontró un 54,2% de cepas K88⁺ (F4⁺) en 250 colonias aisladas de 25 cerdos lactantes que presentaban diarrea.

El hecho de que aparezca un elevado porcentaje de unidades positivas a fimbrias F18 se debe a cerditos lactantes que están próximos a la edad del destete. Pues, los receptores F18 están ausentes en cerdos recién nacidos y se incrementa su producción en la edad de destete (**Gyles y Fairbrother, 2006**).

Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por **Lazo (2007)** quien plantea que los principales resultados obtenidos en su investigación muestran que en los procesos diarreicos por *Escherichia coli* que afectan al cerdo durante la etapa neonatal y post-destete en diferentes granjas porcinas de la provincia de Villa Clara, Cuba, predominan genes de virulencia para F18 y 987P (F6), no encontrando genes que codifican para los antígenos de adhesión F4, F5, F17 y F41.

Tabla 2. Prevalencia de Unidades Positivas Antígenos Fimbriales F4 y F18 en cerditos destetados diarreicos de la Provincia de Villa Clara.

Total de Unidades Encuestadas	Unidades Positivas a antígenos F4	Unidades Positivas a antígenos F18	Prevalencia de Unidades positivas a Antígeno F4 (%)	Prevalencia de Unidades Positivas a Antígeno F18 (%)
6	4	5	66,66	83,33

La tabla 2 expresa una mayor prevalencia de unidades positivas a la circulación de antígenos fimbriales F18, aunque la prevalencia de unidades positivas a antígenos F4 es también elevada. Las fimbrias F4 (K88) y F18 han sido implicadas como los principales factores de colonización en la Diarrea Postdestete (**Nagy et al., 1997; Nagy et al., 1999; Frydendahl, 2002; Cheng et al., 2004**). **Rippinger et al. (1995)** afirman que la adhesina fimbrial F18 está asociada a cepas aisladas de cerdos con diarrea postdestete y enfermedad edemática. **Ojeniyi et al. (1994) y Frydendahl (2002)** reportaron respectivamente, la detección de F18 en 34% y 39% de *E. coli* aislada de diarrea postdestete en Dinamarca. **Frydendahl (2002)** encontró que los genes fimbriales F4 y F18 fueron los dominantes en la diarrea post-destete y fueron detectados en el 44,7% y el 39,3% respectivamente. Este autor concluye que todos los aislados patogénicos transportaban genes fimbriales F4 y F18. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por **Lazo (2007)** quien no detectó ningún aislado F4 (K88)-positivo, a pesar de ser uno de los factores de colonización más frecuentes en las cepas de ECET causantes de diarrea neonatal y postdestete en todo el mundo. **Wittig et al. (1995)** mostraron la presencia de F18 en 75% de 380 *E. coli* aisladas del contenido intestinal de cerdos destetados con diarrea.

Tabla 3. Prevalencia de antígenos Fimbriales F4 y F18 en cerdos lactantes diarreicos de la Provincia de Villa Clara

Unidades	Crías			Prevalencia	
	n	F4+	F18+	F4	F18
A	9	2	-	0,22 ^b	0,00 ^a
B	6	-	-	0,00 ^b	0,00 ^a
C	5	-	-	0,00 ^b	0,00 ^a
D	7	1	1	0,14 ^b	0,14 ^a
E	7	1	-	0,14 ^b	0,00 ^a
F	7	4	2	0,57 ^a	0,29 ^a
Total	41	8	3	0,20	0,07

Leyenda: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas Chi-cuadrado ($p < 0,05$).

La tabla 3. refleja que la prevalencia de antígenos fimbriales F4 en cerditos lactantes diarreicos fue de un 20%. Asimismo la prevalencia de antígenos fimbriales F18 fue de un 7%. No detectándose la circulación de ambos antígenos fimbriales en las Unidades B y C. Es importante destacar que la Unidad F presentó una prevalencia de 57%, constituyendo éste, el valor de prevalencia más alto. Solo se evidenció diferencias significativas entre la prevalencia de antígenos F4 de la Unidad F con el resto de las unidades. Esto último pudo deberse a ciertas insuficiencias en las buenas prácticas de manejo e higiene en la Unidad.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por **Felix et al. (1981)** quienes empleando aglutinación rápida en placa, hallaron un 34% de *E. coli* K88+ en 156 muestras de intestino delgado de cerdos con diarrea neonatal. En estudios realizados por **Talavera (1981)** empleando el método de aglutinación, encontró un 54.2% de cepas K88+ en 250 colonias aisladas de 25 cerdos lactantes que presentaban diarrea. **Talavera (1983)** halló alta prevalencia de aislados positivos, con el empleo de la prueba de inmunofluorescencia directa para la detección de *E. coli* K88. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por **Barreto y Karadjov (1985)** quienes en un estudio realizado en 127 aislados de *E. coli* de cerdos diarreicos con uno a tres semanas de nacidos, en tres unidades porcinas de la provincia de Camagüey, hallaron solo cuatro aislados (3,1%) que presentaban el antígeno K88. Por otra parte **Talavera y Montes de Oca (1987)** al emplear la aglutinación rápida en placa, informaron de la detección de un 24,7% de positividad a fimbrias K88 en 105 muestras

de copro, procedentes de cerdos diarreicos al diagnosticar diarrea enterotóxica en tres laboratorios del país. **Yanes et al. (1983)** empleando esta misma técnica de diagnóstico, hallaron 14.8% de *E. coli* K88+, en 54 aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea neonatal. **Pedroso y Talavera (1983)** con el empleo de la inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *E. coli* K88 en cerdos diarreicos y no diarreicos, hallaron un 50% de antígenos enteropatógenos K88 en *E. coli* aisladas de 50 cerdos diarreicos. Por otro lado, **Pernas y Roja (1985)**, hallaron 16 (14,1%) de *E. coli* K88+, de un total de 113 cepas de *E. coli* aisladas del intestino delgado en cerdos diarreicos de dos unidades de la provincia de Villa Clara, al realizar un diagnóstico serológico con la prueba de aglutinación rápida en placa. En esta misma provincia, **Pernas y Bravo (1986)** hallaron 50(28,9%) cepas de *E. coli* K88 de un total de 173 aislamientos en muestras de intestino delgado de cerdos que presentaban diarrea, mediante la prueba serológica de aglutinación rápida en placa. **Pernas et al. (1986)** en 54 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos con diarrea, encontraron solo 8 (14,81%) de K88+. **Lazo et al. (1988)** en una granja porcina de la provincia de Villa Clara, en 74 aislados de *E. coli* de cerdos con diarrea neonatal, hallaron 27 (36,4%) de K88+ en cerdos con diarrea post-destete.

Tabla 4. Prevalencia de antígenos Fimbriales F4 y F18 en cerdos destetados diarreicos de la Provincia de Villa Clara

Unidades	preceba			Prevalencia	
	n	F4+	F18+	F4	F18
A	6	-	-	0,00 ^a	0,00 ^a
B	9	2	2	0,22 ^a	0,22 ^a
C	10	-	1	0,00 ^a	0,10 ^a
D	8	2	1	0,25 ^a	0,125 ^a
E	8	1	1	0,125 ^a	0,125 ^a
F	8	1	1	0,125 ^a	0,125 ^a
Total	49	6	6	0,122	0,122

Leyenda: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas Chi-cuadrado ($p < 0,05$).

La tabla 4. expresa que la prevalencia de ambos antígenos fimbriales F4 y F18 en cerdos destetados diarreicos fue de 12,2%, no registrándose diferencias significativas en la prevalencia de ambos antígenos fimbriales entre las distintas unidades. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos por **Nagy et al. (1997)**; **Nagy et al. (1999)**; **Frydendahl, (2002)**; **Cheng et al., (2004)** quienes plantean que las fimbrias F4 (K88) y F18 han sido implicadas como los principales factores de colonización en la Diarrea Postdestete. Adicionalmente **Frydendahl (2002)** encontró que los genes fimbriales F4 y F18 fueron los dominantes en la diarrea post-destete y fueron detectados en el 44,7% y el 39,3% respectivamente. Este autor concluye que todos los aislados patogénicos transportaban genes fimbriales F4 y F18. Estos resultados son opuestos a los obtenidos por **Wilson et al. (1984)**, quienes examinaron la presencia de fimbria entre 223 cepas de *E. coli* procedentes de cerdos con diarrea y detectaron el 72% de ellos positivos a F4. También **Nagy et al. (1990)** investigó 205 aislados de *E. coli* y demostró que el 61% fueron positivas a F4. Por otro lado, **Osek (1994)** demostró que la prevalencia de fimbria F4 es incluso un porcentaje más bajo (19,1%).

Tabla 5. Relación entre la presencia de Fimbria F4 y actividad hemolítica.

Factor de Virulencia	Actividad Hemolítica		Total
	Positiva	Negativa	
F4 ⁺	3	11	14
F4 ⁻	8	68	76
Total	11	79	90

Tabla 6. Relación entre la presencia de Fimbria F18 y actividad hemolítica.

Factor de Virulencia	Actividad Hemolítica		Total
	Positiva	Negativa	
F18 ⁺	4	5	9
F18 ⁻	7	74	81
Total	11	79	90

La relación entre el potencial patogénico representado por la presencia de fimbrias F4 y/o F18 y la actividad hemolítica se presentan en las tablas de contingencias (Tablas 5 y 6). Los resultados de nuestro trabajo muestran que a pesar de que la presencia de Fimbria F4 es un factor atribuible la fuerza de asociación entre ambas variables (presencia de fimbria y actividad hemolítica) no es significativa ($P > 0,05$) [ver anexos tablas de contingencias 1]. En cuanto al análisis realizado para la fimbria F18, se demostró que la presencia de la misma no solo es un factor atribuible sino también que

la fuerza de asociación es estadísticamente significativa ($P < 0,05$) [**ver anexos, tablas de contingencia 2**]. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por **Frydendahl (2002)** quien a través de sus resultados demostró que tanto los serogrupos como la actividad hemolítica están estadísticamente asociados con los factores de virulencia (genes codificantes para toxinas y adhesinas). Este autor plantea que el uso de cualquiera de estos elementos por separado, es decir, serotipado o la actividad hemolítica conducirán no solamente a la aparición de resultados falsos, sino también fallará en detectar la aparición de cepas patogénicas ya sea porque pertenezcan a otros serogrupos o no presenten actividad hemolítica. Dicho autor continua planteando que una mejor aproximación sería caracterizar los aislados de *E. coli* para la presencia de todos los genes de factores de virulencia como los mejores marcadores de patogenicidad. Sin embargo, esta es una opción cara para el diagnóstico de rutina diario. De acuerdo al conocimiento actual, las adhesinas que median la unión al epitelio intestinal, se cree que es un paso esencial en las infecciones entéricas (**Nagy y Fakete, 1999**), haciendo que la patogenicidad de cepas negativas al factor de adhesión sea altamente cuestionable. De esa manera, una alternativa económica pudiera ser detectar solamente genes de factores de adhesión. **Frydendahl (2002)** plantea que su estudio demostró que los genes de factores dianas F4, F18 e Intimina pudieron detectar todas las cepas presentes causantes de diarrea post-destete y enfermedad edemática. Nuestros resultados coinciden también parcialmente con los obtenidos por **Vu Khac et al. (2006)**; **Fairbrother et al. (2005)** quienes plantean que todos los aislados F4⁺ y F18⁺ detectados en cerdos diarreicos destetados fueron hemolíticos.

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO UTILIZADA:

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar la prevalencia de antígenos fimbriales F4 y F18 en cerditos lactantes y destetados de la Provincia de Villa Clara. Para lo cual se empleó como técnica de diagnóstico la **MAB Dot Blot Assay, por su nombre en Inglés**. El método fenotípico empleado permitió diagnosticar como positivo los papeles de nitrocelulosa que presentaban una o varias manchas esféricas de color marrón [**Ver Figura 6 del acápite anexos**].

El método fenotípico utilizado posee ciertas ventajas: permite conducir estudios epidemiológicos, no necesita la existencia de laboratorios de alto estándar de bioseguridad, se puede ejecutar con un mínimo de entrenamiento en biología molecular. Dentro de las principales desventajas se encuentra que se tarda como mínimo tres días para dar el resultado, requiere una alta laboriosidad y no se pueden trabajar un alto número de muestras. Como aspectos relevantes durante su ejecución se pudo apreciar que dos aislados (77 y 81) fueron positivas tanto al antígenos fimbrial F4 como al F18. Esto puede deberse a aislados de *E. coli* enteropatógena que coexpresan genes para antígenos fimbriales F4 y F18. Estos resultados coinciden con los obtenidos por **Vu Khac et al. (2006)** quienes en investigación realizada en Eslovaquia con el objetivo de conocer los principales serogrupos, serotipos, genes de virulencia y perfiles electroforéticos de aislados de *E. coli* procedentes de cerdos diarreicos destetados, encontraron que un aislado perteneciente al serotipo O149:H10 expresaba genes para los antígenos fimbriales F4 y F18.

CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos y la literatura consultada inferimos las siguientes conclusiones:

1. Existe una baja prevalencia de antígenos fimbriales F4 y F18 en aislados de *E. coli* enteropatógena procedentes de cerdos lactantes y destetados diarreicos de la Provincia de Villa Clara, con una distribución epizootica difusa en la región.
2. Se evidenció asociación entre la actividad hemolítica y la presencia de antígenos fimbriales F18.
3. El método fenotípico empleado posee las siguientes ventajas: permite conducir estudios epidemiológicos, no necesita la existencia de laboratorios de alto estándar de bioseguridad, se puede ejecutar con un mínimo de entrenamiento en técnicas biología molecular.

RECOMENDACIONES.

De acuerdo a los resultados y conclusiones arribados en nuestra investigación y la bibliografía consultada sugerimos las siguientes recomendaciones:

1. Realizar estudios de Epidemiología Diagnóstica que permitan validar el método diagnóstico empleado en esta investigación.
2. Realizar estudios epidemiológicos que permitan asociar la prevalencia de antígenos fimbriales de *E. coli* enteropatógenicas con los indicadores de bioseguridad de las distintas unidades en cuestión.
3. Hacer un análisis de factibilidad económica que permita evaluar la posibilidad de una transferencia tecnológica hacia nuestro país de esta importante herramienta diagnóstica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aarestrup, F. M., Jorsal, S. E., Ahrens, P., Jensen, N. E., Meyling, A. (1997).** Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. J. Clin. Microbiol. 35: 20-24.
- Acheson, D. W., Moore, R., De Breucker, S., Lincicome, L., Jacewicz, E., Skutelsky, E., Keusch, G. T. (1996).** Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cell in tissue culture. Infect. Immun. 64: 3294-3300.
- Acres, S.D., Isaacson, R.E., Babiuk, L.A., Kapitany, R.A., (1979).** Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. Infect. Immun. 25, 121±126.
- Alexa, P., Hamøik, J., Salajka, E. (1998).** Prevention of oedema disease of weaners by administration of immune serum to verotoxin VT2. Proc 15th IPVS Cong, Birmingham, UK, 3:105.
- Alexa, P., Salajka, E., Salajkova, Z., Machova, A., (1995).** Combined parenteral and oral immunization against enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in weaned piglets. Vet. Med. (Praha) 12, 365–370.
- Alexa, P.K., Stouračová, J., Hamřík and Salajka E. (2002).** Gene typing of the colonisation factors F18 of *Escherichia coli* isolated from piglets suffering from post-weaning oedema disease. Vet. Med.–Czech. 47:132-136.
- Alexander, T.J.L. (1994).** Neonatal diarrhea in pigs. En: Gyles CL, ed. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford, United Kingdom: CAB International pp. 153-155.
- Amezcuca, Rocio., Friendship, R. M., Dewey, Catherine (2008).** An investigation of the presence of *Escherichia coli* O149:K91:F4 on pig farms in southern Ontario and the use of antimicrobials and risk factors associated with the presence of this serogroup. Can Vet J; 49:39–45.
- Amezcuca, Rocio., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Gyles, C.L., Fairbrother, J.M. (2002).** Presentation of post- weaning *Escherichia coli* diarrhea in Southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. Can J Vet Res;66:73–78.

- Barreto, A.G., Karadjov, J. (1985).** Estudio ecológico sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas en cerdos diarreicos de tres unidades porcina en la provincia de Camaguey. *Revista de Producción Animal.* 1(3):63-70.
- Basulto, R., Calzada Aguilera Lesvia, Olivera Tania, De la Fuentes, J. (1997).** Detection of genes for fimbrial antigens in *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Camagüey *Biotecnología Aplicada.* 14(4):237-241.
- Basulto, R., Calzada, Aguilera Lesvia, Junco, J., Olivera Gutiérrez Tania. (1999).** Caracterización fenotípica de cepas autóctonas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas 987P. *Rev. Prod. Anim.* 12 sept. 1999/jul. 2000 1-4.
- Benítez M Ramona, Pernas, L.L.E., Quiñones, R.R., Sánchez, S.E., González G Oraida, Gutiérrez, F.G., Delgado L Marelys. (1989).** Evaluación de una vacuna oral para la prevención de la colibacilosis en cerdos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de Las Villas. Cuba. Facultad de Ciencia Animal. Cuba.
- Benz, I. y Schmidt, M. A. (1992).** Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect. Immun.* 60: 13-18.
- Bergstrom, J.R., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Goodband, R.D., Dritz, S.S., Owen, K.Q., Nessmith, W.B., (1997).** Evaluation of spray-dried animal plasma and select enhanced fish meal in transition diets of pigs weaned at 12 to 14 days of age and reared in different production systems. *J. Anim. Sci.* 75, 3004–3009.
- Bertschinger, H. U. (1999).** Postweaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. In *Diseases of Swine.* B. E. Straw, S. D’Allaire, W.L. Mengeling, And D. J. Taylor. Ames: Iowa States University Press, pp. 441-454.
- Bertschinger, H. U., Gyles, C. L. (1994).** Oedema Disease of pigs. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles. Oxon, UK: CAB International, pp. 193-219.
- Bertschinger, H.U., Nief, V., Tschape, H., (2000).** Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Vet. Microbiol.* 71, 255–267.

- Bertschinger, H.U., Tucker, H., Pfirter, H.P., (1979).** Control of *Escherichia coli* in weaned pigs by use of oral immunization combined with a diet low in nutrients. *Fortschr. Veterinärmedizin*. 29, 73–81.
- Blanco, A.M., Lazo, P.L., Blanco, A.J.E., Dhahi Gizlane, Mora Azucena, López Cecilia, González, E.A., Blanco, A.J. (2006).** Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol* Vol. 9 (1):53-60.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M. P., González, E. A., Bernárdez, M. I. (2002).** Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: *Manual de Microbiología Veterinaria*. Vadillo S., Píriz S & Mateos E. Eds McGraw-Hill Interamericana, Madrid. pp. 301-325.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora Azucena, Alonso María Pilar, González E.A. y Bernárdez, María Isabel. (2005).** *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. [en línea]. [Fecha de consulta: 21/1/09]. Disponible en: [http://secuslugo.usc.es/ecoli/index.html/E.coliPATHOGENIC FOR POULTRY AN EUROPEAN PROJECT.htm](http://secuslugo.usc.es/ecoli/index.html/E.coliPATHOGENIC_FOR_POULTRY_AN_EUROPEAN_PROJECT.htm).
- Blanco, M., Blanco, J. E., González, E. A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T.A.T., Zerbini, L.F., Yano, T., Castro, A.F., Blanco, J. (1997).** Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes. Relation with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol* 35 (11):2958-2963.
- Bosi, P., Casini, L., Finamore, A., Cremokolini, C., Merialdi, G., Trevisi, P., Nobili, F., Mengheri, E., (2004).** spraydried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 82, 1764–1772.
- Bosworth, B.T., Samuel, J.E., Moon, H.W., O'Brien, A.D., Gordon, V.M., Whipp, S.C. (1996).** Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin II prevents edema disease in swine. *Infect Immun*;64:55-60.
- Bouckenoghe, A.R., Jiang, Z.D., De La Cabada, F.J., Ericsson, C.D., DuPont, H.L., (2002).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico. *J. Travel. Med.* 9, 137–140.

- Bouguenec, C.L., Bertin, Y. (1999).** AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* 30 (2-3):317-342.
- Bozic, F., Lackovic, G., Stokes, C.R., Valpotic, I., (2002).** Recruitment of intestinal CD45RA⁺ and CD45RC⁺ cells induced by a candidate oral vaccine against porcine postweaning colibacillosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 137–146.
- Brad, T. B., Evelyn, A., Dean-Nystrom, T.A.C., Holly, L. N. (1998).** Differentiation of F18ab⁺ from F18ac⁺ *Escherichia coli* by Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis of the Major Fimbrial Subunit Gene (*fedA*). *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 5 (3): 299–302.
- Brinton, C.C., (1959).** Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature* 183, 782±786.
- Castro, M.D., Campal, A., Arteaga, N., Miranda, A., Junco, J., León, L., Casas, S., Álvarez, T., Fuentes, F. (2002).** Immunodetection of colonizing antigens in enterotoxigenic *Escherichia coli* cells isolated from piglets with diarrhoea in Cuba. 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er Congreso Cubano de Inmunología. La Habana. Cuba. Diciembre 9-13.
- Cheng, X., Gao, S., Jiao, X., Liu, X. F. (2004).** Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhea in eastern China. *Vet Microbiol.* 103 (1-2):13-20.
- Coffey, R.D., Cromwell, G.L., (1995).** The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma. *J. Anim. Sci.* 73, 2532–2539.
- Cohen, M.B., Guarino, A., Shukla, R., Giannella, R. A. (1988).** Aged-related differences in receptors for *Escherichia coli heat-stable* enterotoxins in the small and large intestine of Children. *Gastroenterology* 94: 367-373.
- Collier, W.A., De Miranda, J.C., 1955. Microbial serology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 21, 133±140.
- Cox, E., Van der Stede, Y., Verdonck, F., Snoeck, V., Van den Broeck, W., Goddeeris, B., (2002).** Oral immunisation of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 287–290.

- Cutler, S. A., Lonergan, S. M., Cornick, N., Johnson, A. K., Stahl, C. H. (2007).** Dietary Inclusion of Colicin E1 Is Effective in Preventing Postweaning Diarrhea Caused by F18-Positive *Escherichia coli* in Pigs. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51 (11): 3830–3835.
- De Aizpurua, H.J., Russell-Jones, G.J., (1988).** Oral vaccination. *J. Exp. Med.* 167, 440±451.
- Dean-Nystrom, E. A. y Samuel, J. E. (1994).** Age-related resistance to 987P fimbriae-mediated colonization correlates with specific glycolipid receptors in intestinal mucus in swine. *Infect. Immun.* 62: 4789-4794.
- Deprez, P. Van den Hendle, C. Muylle, E., Oyaert, W. (1986).** The influence of the administration of sow's milk of the postweaning excretion of hemolytic *E. coli* in the pig. *Vet. Res. Commun.* 10: 469-478.
- De-Sauvage, F. J., Camerato, T. R., Goeddel, D. V. (1991).** Primary Structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 266: 17912-17918.
- Dubbreuil, J. D. (1997).** *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* 143 (Pt .6): 1783-1795.
- Duguid, J.P., Smith, I.W., Edmunds, P.N., (1955).** Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and hemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 70, 335±348.
- Elsinghorst, E.A., Weitz, J.A., (1994).** Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect. Immun.* 62, 3463–3471.
- Engel, B., van Reenen, C.G., Buist, W.G. (2003).** Analysis of correlated series of repeated measurements: application to challenge data. *Biometrical Journal*; 45: 866–886.
- Erickson, A.K., Willgohs, J.A., McFarland, S.Y., Benfield, D.A., Francis, D.H. (1992).** Identification of two porcine brush border glycoproteins that bind the K88ac adhesin of *Escherichia coli* and correlation of these glycoproteins with the adhesive phenotype. *Infect Immun* 60 (3):983-988.
- Erume, J., Berberov, E. M., Kachman, S. D., Scott, M. A., Zhou, Y., Francis, D., Moxley, R. A. (2008).** Comparison of the Contributions of Heat-Labile Enterotoxin and Heat-

Stable Enterotoxin b to the Virulence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in F4ac Receptor-Positive Young Pigs. *Infection and Immunity*, 76 (7): 3141–3149.

Evans, D.G., Evans Jr., D.J., (1978). New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.* 21, 638±647.

Fahy, V. A., Connaughton, I. D., Driesen, S. J., Spicer, E. M. (1987). Postweaning colibacillosis, 189–201. *In* J. L. Barnett, E. S. Batterham, G. M. Cronin, C., Hansen, P. H. Hemsworth, D. P. Hennessy, P. E. Hughes, N. E. Johnston, and R. H. King (ed.), *Manipulating pig production*. Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia.

Fairbrother, J. M. (1999). Neonatal *Escherichia coli* Diarrhea. *In* *Diseases of Swine*. B. E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, And D. J. Taylor. Ames: Iowa States University Press, pp. 221-236.

Fairbrother, J. M., Nadeau, E. and Gyles, C. L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6:17–39.

Fekete, P.Z., Schneider, G., Olasz, F., Blum-Oehler, G., Hacker, J.H., Nagy, B., (2003). Detection of a plasmidencoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 287–298.

Felder, C.B., Vorlaender, N., Gander, B., Merkle, H.P., Bertschinger, H.U., (2000). Microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* and detached fimbriae for peroral vaccination of pigs. *Vaccine* 19, 706–715.

Felix, M.J., Pernas, L.L.E., Castro, L., Reinoso, J., González, J., Rojas Delfa (1981). Determinación de la presencia de plásmidos Ent+ en cepas de *E. coli* aisladas de cerdos recién nacidos mediante la prueba de ligadura intestinal. Trabajo de Diploma. Universidad Central de Las Villas. Facultad de Ciencia Animal. Villa Clara. Cuba.

Fontaine, F., Peres, S., Gyles, C.L., Fairbrother, J.M. (2002). Trends in O149:K91 enterotoxigenic *Escherichia coli* from pigs in Quebec (Abstract). *Proc 17th Int Pig Vet Soc (IPVS) Congr Ames:70.*

Forte, L. R., Thorne, P. K., EberL, S. L., Krause, J. W., Freeman, R. H., Francis, S. H., Corbin, J. D. (1992). Stimulation of intestinal Cl-Transport by heat-stable enterotoxins:

activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* 263 (3 Pt 1): C 607-615.

Francis D. H., Grange, P.A., Zeman, D. H., Baker, D. R., Sun, R. and Erickson, A. K. (1998). Expression of mucin-type glycoprotein K88 receptors strongly correlates with piglet susceptibility to K88 (+) enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. *Infect. Immun.* 66: 4050-4055.

Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W., (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1795–1797.

Fraser, S. A., de Haan, L., Hearn, A. R., Bone, H. K., Salmond, R. J., Rivett, A. J., Williams, N. A., Hirts, T. R. (2003). Mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin b subunit that separates toxoid-mediated signalling and immunomodulatory action from trafficking and delivery functions. *Infect. Immun.* 71: 1527-1537.

Frasser, C.M., Bengeron, J.A., Mays, A., Aiello, Susan E. (1993). El Manual Merck de Veterinaria (4ta edición). Merck and Co. Inc. EUA. Oceano/Centrum. España. pp. 222

Fredericq, P. (1957). Colicins. *Annu. Rev. Microbiol.* 11:7–22.

Frydendahl, K. (2002). Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol*; 85:169–182.

Frydendahl, K., Kare Jensen, T., Strodl Andersen, J., Fredholm, M., Evans, G., (2003). Association between the porcine *Escherichia coli* F18 receptor genotype and phenotype and susceptibility to colonisation and postweaning diarrhoea caused by *E. coli* O138:F18. *Vet. Microbiol.* 93, 39–51.

Gannon, V. P., Gyles, C. L., Friendship, R. W. (1988). Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Can. J. Vet. Res.* 52: 331-337.

Garabal, J.I., González, E. A., Vázquez, F., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E. (1996). Serogroup of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol* (48):113-123.

Garabal, J.I., Vázquez, F., Blanco, J., Blanco, M., Gonzalez, E.A. (1997). Colonization antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol*, 54:321-328.

- Gebremariam, B.T., Pernas, L.L.E., Castro, B.L., Bravo, A.R., Gutiérrez, F.G. (1985).** Valoración de la Prueba del Ratón Lactante para la determinación del poder patógeno de las *Escherichia coli*. Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencia Animal. Universidad Central de Las Villas. Cuba.
- Geenen, P. L., Van Der Meulen, J., Bruma, A., Engel, B., Heesterbeek, J. A. P. And De Jong, M. C. M. (2006).** Classification of temporal profiles of F4+ *E. coli* shedding and faecal dry matter in experimental post-weaning diarrhoea of pigs. *Epidemiol. Infect.*: 1-9.
- Geenen, P.L., Döpfer, D., Van der Meulen, J., De Jong, M.C.M., (2005).** Transmission of F4+ *E. coli* in groups of early weaned piglets. *Epidem. Infect.* 133, 459–468.
- Genovese, K.J., Anderson, R.C., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., (2000).** Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Can. J. Vet. Res.* 64, 204–207.
- Gill, D. M., Clements, J. D., Robertson, D. C., Finkelstein, R. A. (1981).** Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 33: 677-682.
- Glunder, G. (2002).** Influence of the diet on the occurrence of some bacteria in the intestinal flora of wild and pet birds. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 109: 206-270.
- González, E.A., Garabal, J.I. (1998).** Colibacilosis entérica porcina. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Veterinaria. LUGO. Universidad de Santiago de Compostela. España. pp. 67-88.
- Gyles, C. L. (1994).** *Escherichia coli* enterotoxins. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans Gyles, C. L. (ed.). Oxon, U.K.: CAB International, pp. 337-364.
- Gyles, C. L. y Fairbrother, J. M. (2006).** Pathogenesis of bacterial infections in animals. *Escherichia coli*. Blackwell Publishing, Tercera Edición, Iowa, USA, pp. 193-223.
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, J. G., Thoen, C. O. (2004).** Pathogenesis of bacterial infections in animals. Third Edition. Blackwell Publishing 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA, pp. 3-456.
- Hampson, D.J. (1994).** Postweaning *E. coli* diarrhoea in pigs. En : (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford, pp. 171 – 192.
- Hampson, D.J., Fu, Z.F., Robertson, I.D., (1987).** Investigation of the source of haemolytic *Escherichia coli* infecting weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* 99, 149±153.

- Han, W., Liu, B., Cao, B., Beutin, L., Krüger, U., Liu, H., Li, Y., Liu, Y., Feng, Lu., Wang, L. (2007).** DNA Microarray-Based Identification of Serogroups and Virulence Gene Patterns of *Escherichia coli* Isolates Associated with Porcine Postweaning Diarrhea and Edema Disease. *Applied And Environmental Microbiology*, 73 (12): 4082–4088.
- Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L. A., Bigras-Poulin, M., Larivie`re, S., Fairbrother, J. M. (1991).** Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29:745–752.
- Harville, B. A., Dreyfus, L.A. (1995).** Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E₂ in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect. Immun.* 63: 745-750.
- Hayes, D. J., Jensen, H. H., Backstrom, L., Fabiosa, J. (1999).** Economic impact of a ban on the use of over-the-counter antibiotics in U.S. swine rations, p. 25-27. Iowa State University, Ames.
- Hide, E.J., Connaughton, I.D., Driessen, S.J., Hasse, D., Monckton, R.P., Simmons, H.G. (1995).** The presence of F107 fimbriae and their association with Shiga-like toxin II in *E. coli* strains from weaned pigs. *Veterinary Microbiology* 47:235-243.
- Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Okamoto, K. (1994).** Binding Protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 297-302.
- Højberg, O., Canibe, Nuria., Damgaard Poulsen, Hanne., Hedemann, M. S., Jensen, B. B. (2005).** Influence of Dietary Zinc Oxide and Copper Sulfate on the Gastrointestinal Ecosystem in Newly Weaned Piglets. *Applied And Environmental Microbiology*, 71 (5): 2267–2277.
- Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Stamm, M., Sydler, T., Pohl, P., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Lintermans, P. (1994).** Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. *Veterinary Microbiology* (40): 219-30.
- Imberechts, H., Deprez, P., Van Driessche, E., Pohl, P. (1997).** Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Vet Microb* (54): 329-341.

- Isaacson, R.E., (1977).** K99 surface antigen of *Escherichia coli*. Purification and partial characterization. *Infect. Immun.* 15, 272±279.
- Isaacson, R.E., Richter, P., (1981).** *Escherichia coli* 987P pilus: purification and partial characterization. *J. Bacteriol.* 146, 784±789.
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R., Zhao, X., (2000).** A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4200–4204.
- Johansen M, Andresen LO, Jorsal SE, Thomsen LK, Waddell TE, Gyles CL. (1997).** Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxin. *Can J Vet Res*;61:280-285.
- Kausche, F.M., Dean, E.A., Arp, L.H., Samuel, J.E. and Moon, H.W. (1992).** An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. *American Journal of Veterinary Research* (53):281-287.
- Khac, H. V. Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, Azucena., Dhabí, G., López, Cecilia., González, E. A, Blanco, J. (2006).** Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *BMC Veterinary Research*, 2:10.
- Kiers, J.L., Nout, M.J., Rombouts, F.M., Nabuurs, M.J., van der Meulen, J., (2002).** Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 311–315.
- Klemm, P., (1981).** The complete amino acid sequence of the K88 antigen, a fimbrial protein from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 117, 617±627.
- Kudva, I.T., Blanch, K., Hovde, C.J. (1998).** Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*; 64: 3166–3174.
- Kwon, D.C., Choi, T., Jung, H.K., Chung, J.P. Kim, S.S., Bae, W.S., Kim, O., Chae, C. (2002).** Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, Sta, STb, and Stx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea. *Vet. Rec.* 12:35-37.

- Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P. (2003).** Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91:73–84.
- Lazo, P.L., Pernas, L.L.E., Martínez Alfonso Buenaventura, Sánchez S.E. (1988).** Evaluación de una vacuna oral para la prevención de la colibacilosis en porcinos jóvenes. Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencia Animal. Universidad Central de Las Villas. Cuba.
- Lazo, P.L. (2007).** Comportamiento Epidemiológico de la colibacilosis entérica porcina en la Provincia de Villa Clara, patotipos, genes de virulencia, y resistencia a antibióticos de los aislados de *E. coli*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Dpto. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villa Clara, Cuba.
- Lee, E., Platt, R., Kang, S., Roth, J.A., Phillips, G.J., (2001).** Chromosomal integration and expression of the *Escherichia coli* K88 gene cluster in *Salmonella enterica* ser. *Choleraesuis* strain 54 (SC54). *Vet. Microbiol.* 83, 177–183.
- Ludwig, A., von Rhein, C., Bauer, S., Huttinger, C., Goebel, W., (2004).** Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 186, 5311–5320.
- Macleod DL, Gyles CL. (1991).** Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. *Vet Microbiol*; 29:309-318.
- MacLeod, D. L., Gyles, C. L., Wilcock, B. P. (1991).** Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet. Pathol.* 28: 66-73.
- Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Cariolet, R., Duval-Iflah, Y., Hampson, D.J., Jestin, A., (2000).** Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Vet. Microbiol.* 72, 295–310.
- Madec, F., et al. (2000).** Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Veterinary Microbiology*; 72: 295–310.

- Mainil, J. E., Jacquemin, E., Pohl, P., Kaeckenbeeck, A., Benz, I. (2002).** DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet. Microbiol.* 86: 303-311.
- Marquardt, R.R., Jin, L.Z., Kim, J.W., Fang, L., Frohlich, A.A., Baidoo, S.K., (1999).** Passive protective effect of egg yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 283–288.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Lariviere, S., Harel, J. (2004).** Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.* 42:5444–5452.
- Melkebeek, V., Sonck, E., Verdonck, F., Goddeeris, B. M., Cox, E. (2007).** Optimized FaeG Expression and a Thermolabile Enterotoxin DNA Adjuvant Enhance Priming of an Intestinal Immune Response by an FaeG DNA Vaccine in Pigs. *Clinical And Vaccine Immunology*, 14 (1): 28–35.
- Merrell, D.S., Camilli, A. (2002).** Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*; 5: 51–55.
- Milon, A.; Oswald, E.; De Rycke, J. (1999).** Rabbit EPEC: a model for the study of *enteropathogenic Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30: 203 -219.
- Monserratt González Mary. (2004).** E. coli, Enterotoxicosis en el cerdo. [en línea]. [Fecha de consulta 13/01/09]. Disponible en: Porcicultura.com.colibacilosis.
- Mooi, F.R., de Graaf, F.K., (1985).** Molecular biology of fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118, 119±138.
- Moon, H.W., Bunn, T.O., (1993).** Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11, 213–219.
- Moon, H.W., Kohler, E.M., Schneider, R.A., Whipp, S.C., (1980).** Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types, and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27, 222±230.
- Moormann, C., Benz, I., Schmidt, M.A., (2002).** Functional substitution of the TibC protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains for the autotransporter adhesion heptosyltransferase of the AIDA system. *Infect. Immun.* 70, 2264–2270.

- Mora, A., Usera, M.A., Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Prats, G., Stirrat, A., Carter, F.M., y Blanco, J. (2000).** Bacteriophage typing and virulence genes of verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) O157:H7 strains isolated in Spain. En: Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe, 3. Pathogenicity and virulence of verocytotoxigenic *E. coli*. Concerted Action CT98-3935. Eds. Duffy G, P Garvey, J Coia, Y Wasteson & DA McDowell. Teagasc, The National Food Centre, Dublin: 189.
- Morgan, R.I., Isaacson, R.E., Moon, H.W., Brinton, C.C., To, C.-C., (1978).** Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect. Immun.* 22, 771±777.
- Moxley, R.A., Duhamel, G.E. (1999).** Comparative pathology of bacterial enteric diseases of swine. *ExpMedBiol* (473):83-101
- Nagy, B., Casey, T.A., Moon, H.W. (1990).** Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolate from pigs with postweaning diarrhoea in Hungary. *Jornal of Clinical Microbiology* (28):651-653.
- Nagy, B., Fekete, P. Z. (2005).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295: 443–454.
- Nagy, B., Fekete, P. Z. (1999).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30: 259-284.
- Nagy, B., Whipp, S. C., Imberechts, H., Bertschinger, H. U., Dean- Nystrom, E. A., Casey, T. A., E. P. Salajka. (1997).** Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microb. Pathog.* 22:1–11.
- Nagy, B., Wilson, R. A., Whittam, T. S. (1999).** Genety diversity among *Escherichia coli* isolates carrying F18 genes from pigs with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *J. Clin. Microbiol.* 37:1642-1645.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
- Nemoy, L.L., Kotetishvili, M., Tigno, J., Keefer-Norris, A., Harris, A.D., Perencevich, E.N., Johnson, J.A., Torpey, D., Sulakvelidze, A., Morris, J.G., Stine, O.C. (2005).** Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of

extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 43 (4):1776-81.

- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G. Middleton, D. M., Fairbrother, J.M. (2003).** Isolation and association of *E. coli* AIDA-I/STb, rather than pathotype with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 242-252.
- Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G.; Fairbrother, J.M. (2002).** Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh, pap, pil, iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and cloacae of broilers. *Avian Dis.* 46: 143-152.
- Nielsen, E. M., Andersen, M. T. (2003).** Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol* 41:2884-2893.
- Niewold, T.A., van Dijk, A.J., Geenen, P.L., Roodink, H., Margry, R., van der Meulen, J. (2007).** Dietary specific antibodies in spray-dried immune plasma prevent enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 (ETEC) post weaning diarrhoea in piglets. *Vet. Mic.-* 3676.
- Noamani, B.N., Fairbrother, J.M., Gyles, C.L. (2003).** Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Vet Microbiol*, 97:87-101.
- Nurmi, E., Rantala, M., (1973).** New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature* 241, 210–211.
- Ofek, I., Beachey, E.H., (1980).** General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: Beachey, E.H. (Ed.), *Bacterial Adherence*, Chapman and Hall, London, pp. 3±29.
- Ojeniyi, B., Ahrens, P., Meyling, A. (1994).** Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *Zentralbl. Veterinärmed* (41):49-59.
- Ørskov, F. y Ørskov, I. 1992.** *Escherichia coli* serotyping y enfermedad en hombres y animals. *Can. J. Microbiol.* 38: 699-704.
- Ørskov, I., Ørskov, F., (1983).** Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog. Allergy* 33, 80±105.

- Osek J. (1999b).** Prevalence of shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet Rec* (145):557-558.
- Osek, J. (1999a).** Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol* (68):209-217.
- Osek, J., Gallien, P., Truszczynski, M., Protz, D. (1999).** The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in Poland. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis* (22):163-174.
- Owusu-Asiedu, A., Baidoo, S.K., Nyachoti, C.M., Marquardt, R.R., (2002).** Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma-based diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci.* 80, 2895–2903.
- Parma AE, Sanz ME, Viña MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J, Blanco M. (2000).** Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Vet Microbiol* (72):269-276.
- Paton, J. C., Paton, A. W. (1998).** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 450-479.
- Pedroso Miriam, Talavera, C.A. (1983).** Inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de *E. coli* cepas K88+ y K99+ en cerdos diarreicos y no diarreicos. *Revista Salud Animal* Vol. 5 (3):493-502.
- Pérez, E.M., Talavera, C.A. (1984).** Caracterización de una línea celular de riñón de ternero III. Sensibilidad frente a la enterotoxina termolábil de *E. coli*. *Revista Salud Animal* 6(4):655-658.
- Pernas, J.L., Pino Delfina, Barreto G, Loret M María Eugenia (1989).** Algunas consideraciones sobre cepas de *E. coli* aisladas de cerdos diarreicos en unidades porcinas de la provincia de Camaguey. *Revista Ciencia y Técnica en la Agricultura. Veterinaria.* 11(1):59-69.
- Pernas, L.L.E. (1980).** Estudio de la presencia de plásmidos virulentos y plásmidos de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas en unidades porcinas de la provincia de Villa Clara. [Tesis doctoral]. Escuela Superior de Medicina Veterinaria. Kosice. Checoslovaquia.

- Pernas, L.L.E., Bravo, A.R. (1986).** Diagnóstico, tratamiento e inmunoprofilaxis de las diarreas colibacilares del cerdo. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 17 (3 y 4):131-138.
- Pernas, L.L.E., Bravo, A.R., González, G.G., Llorens, F.B., Llanes, A. (1986).** Valoración del poder patógeno de cepas de *Escherichia coli* mediante la prueba del intestino ligado en cerdos. *Revista Ciencia y Técnica en la Agricultura. Ganado Porcino.* 9 (2):81-89
- Pernas, L.L.E., Rojas, Delfa (1985).** Circulación de plásmidos K88, K99, Hly en dos unidades porcinas. *Revista Ciencia y Técnica en la Agricultura. Ganado Porcino* 7 (1):65.
- Pfeiffer, D. (2002).** Introducción a la epidemiología Veterinaria. Escuela real de Veterinaria. Universidad de Londres. pp. 1-102.
- Pichel, M.G., Binsztein, N., Qadri, F., Giron, J.A., (2002).** Type IV longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*: occurrence and association with toxin types and colonization factors among strains isolated in Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 40, 694–697.
- Qadri, F., S. K. Das, A. S. Faruque, G. J. Fuchs, M. J. Albert, R. B. Sack, and A.-M. Svennerholm. (2000).** Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 38:27–31.
- Reischl, U., Youssef, M. T., Wolf, H., Hyytia-Trees, E. and Strockbine, N. A. (2004).** Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42:4092–4100.
- Rippinger, P., H. U. Bertschinger, H. Imberechts, B. Nagy, I. Sorg, M. Stamm, P. Wild, and W. Wittig. (1995).** Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P, and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease. *Vet. Microbiol.* 45: 281–295.
- Rutter, J.M., Jones, G.W., (1973).** Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* - a model for vaccination with a virulence determinant? *Nature* 242, 532±532.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., Guerry, P., (1993).** Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3093–3097.

- Simons, B.L., Mol, O., van Breemen, J.F.L., Oudega, B., (1994).** Morphological appearances of K88ab fimbriae and optical diffraction analysis of K88 paracrystalline structures. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 83±88.
- Sjöling, Å., Wiklund, G. Savarino, S. J., Cohen, D. I., Svennerholm, A.-M. (2007).** Comparative Analyses of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Toxins and Colonization Factors. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45 (10): 3295–3301.
- Smith, H. W., Gyles, C. L. (1970).** The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J. Med. Microbiol.* 3:387–401.
- Smith, H.W., Linggood, M.A., (1971).** Observations of the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent Plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. *J. Med. Microbiol.* 4: 467-485.
- Smyth, C. J., Marrion, M., Smith, S.G.J. (1994).** Fimbriae of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles (ed.). Oxon UK: CAB International, pp. 399-436.
- Snoeck, V., Verdonck, F., Cox, E., Goddeeris, B.M., (2004).** Inhibition of adhesion of F18+ *Escherichia coli* to piglet intestinal villous enterocytes by monoclonal antibody against blood group H-2 antigen. *Vet. Microbiol.* 100, 241–246.
- Sojka, W. J. (1965).** *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, pp. 104-125.
- Sojka, W.J., Wray, C., Morris, J.A., (1978).** Passive protection of lambs against experimental enteric colibacillosis by colostral transfer of antibodies from K99-vaccinated ewes. *J. Med. Microbiol.* 11, 493±499.
- Souza AS, Freesz VG, Amante PM, Guimaraes BB, da Silva LD. (2001).** *Escherichia coli* strains from edema disease: O serogroup, and genes for Shiga toxin, enterotoxins, and F18 fimbriae. *Veterinary Microbiology* (80):227-233.
- Stein, H. H. (2002).** Experience of feeding pigs without antibiotics: a European perspective. *Anim. Biotechnol.* 13:85–95.
- Steinsland, H., P. Valentiner-Branth, H. M. Grewal, W. Gastra, K. K. Molbak, and H. Sommerfelt. (2003).** Development and evaluation of genotypic assays for the detection

and characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45:97–105.

Stok, W., van der Heijden, P.J., Bianchi, A.T.J., (1994). Conversion of orally induced suppression of the mucosal immune response to ovalbumin into stimulation by conjugating ovalbumin to cholera toxin or its B subunit. *Vaccine* 12, 521±526.

Strobel, S., Mowat, A.M., (1998). Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today* 19, 173±181.

Sun, R., Anderson, T.J., Erickson, A.K., Nelson, E.A., Francis, D.H., (2000). Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88ac fimbria to its receptor, intestinal mucin-type glycoproteins, by a monoclonal antibody directed against a variable domain of the fimbria. *Infect. Immun.* 68, 3509–3515.

Swarbrick, E.T., Stokes, C.R., Soothill, J.F., (1979). Absorption of antigens after oral immunisation and the simultaneous induction of specific systemic tolerance. *Gut* 20, 121±125.

Talavera, A., Montes de Oca, Nivia. (1987). Obtención de sueros diagnóstico a partir de fimbria de *E. coli*. Informe de la Academia de Ciencias de Cuba. La Habana. Cuba.

Talavera, C.A. (1981). Enteropatogenicidad de cepas de *Escherichia coli* aisladas de terneros y cerdos. [Tesis Doctoral]. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana. Centro Nacional de Salud Animal. La Habana. Cuba.

Talavera, C.A. (1982). Determinación de los antígenos K88 y K99 de las cepas *Escherichia coli* (*E. coli*) aisladas de cerdos sanos y diarreicos. *Revista Salud Animal* Vol. 4 (3):17-23.

Talavera, C.A. (1983). Diagnóstico de la diarrea enterotóxica por *E. coli*. Método de aglutinación rápida (K: 88) y (K: 99) en laboratorios de Diagnóstico. Informe Técnico. CENSA.

Tauschek, M., Strugnell, R. A., Robins-Browne, R. M. (2002). Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of Rabbit-Specific strains of enteropathogenic. *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44: 1533-1550.

- Thomas, A.C., Cheryl, J.H., Robert, A.S., Brad, T.B., Shannon, C.W. (1998).** Expression of heat-stable enterotoxin Stb by adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs. *Infection and immunity* 66 (3):1270-1272.
- Thomson, J. (2001).** Etiología y control de las principales infecciones entéricas porcinas. *Revista del Consejo General de Colegios Veterinarios de España. Información Veterinaria. Ciencias Veterinarias.* [en línea]. [Fecha de consulta: 7 de abril de 2008]. Disponible en: <http://www.colvet.es/infovet>
- USDA. (2001).** Part I: reference of swine health and management in the United States, 2000. Publication N338.0801. National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B. M. (1999).** Seroprevalence of F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in regions with different pig farm densities. *Veterinary Microbiology* 69 (1999) 207±216.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., (1999a).** Receptor-specific binding of purified F4 to isolated villi. *Vet. Microbiol.* 68, 255±263.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., (1999b).** Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vaccine* 17, 2020±2029.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., (1999c).** Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infect. Immun.* 67, 520±526.
- Van den Broeck, W.; Cox, E.; Oudega, B., Goddeeris, B.M. (2000).** The F4 Fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Veterinary Microbiology* 71. 223-244.
- Verdonck, F., Cox, E., van Gog, K., Van der Stede, Y., Duchateau, L., Deprez, P., Goddeeris, B.M., (2002).** Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vaccine* 20, 2995–3004.
- Verdonck, F., Tiels, P., van Gog, K., Goddeeris, B.M., Lycke, N., Clements, J., Cox, E. (2007).** Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ *Escherichia coli* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120: 69–79
- Verfaillie, T., Melkebeek, V., Snoek, V., Douterlungne, S., Cox, E., Verdonck, F., Vanrompay, D., Goddeeris, B., Cox, E., (2004).** Priming of piglets against

enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 fimbriae by immunisation with FAEG DNA. Vaccine 22, 1640–1647.

Vidal, R., Vidal, M., Lagos, R., Levine, M. and Prado, V. (2004). Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 42:1787–1789.

VuKhad, H., Holada, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora Azucena, Dhabí, G., Lopez, C., González, E.A., Blanco, J. (2006). Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. Vet. Rec. Mar 20:2-10.

Waddell, T. E., Gyles, C. L. (1995). Sodium deoxycholate facilitates systemic absorption of verotoxin 2e from pig intestine. Infect. Immun. 63: 4953-4956.

Wang, Y., Wang, H., Xiang, Q., Sun, S.X., Yu, S.Y., (2002). Detection of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* in enterotoxigenic and enteropathogenic *E. coli* strains. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 22, 580–583.

Wasteson, Y., Lund, A., Olsvik, O. (1992). Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pig with edema disease. Vet Microbiol (30):179-190.

Wenneras C, Holmgren J, Svennerholm AM. (1990). The binding of colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal cell membrane proteins. FEMS Microbiol Lett (66):107-112.

Wilson, I.B., Staley, T.E., Bush, L.J., Gilliland, S.E., (1984). Recovery of intestinal membrane binding sites for K88 *E. coli* from pig mucosal organ cultures. Mol. Cell. Biochem. 62, 57±65.

Wittig, W., H. Klie, P. Gallien, S. Lehmann, M. Timm, and H. Tschape. (1995). Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. Zentralbl. Bakteriologie. 283:95–104.

Wong Idania, Bover, E., Ramos, M., Gonzalez, N., Exposito, M., Segura Rutdalys Eladio Salazar, E., Agraz, A., Jiménez Idalmis, Herrera, L., de la Fuente, J. (1996). Eficacia en condiciones de campo de una vacuna recombinante contra la colibacilosis porcina. Biotecnología Aplicada, 13:16-19.

- Woodward, J.M., Connaughton, I.D., Fahy, V.A. (1993).** Clonal analysis of *Escherichia coli* of serogroups O9, O20, and O101 isolated from Australian pigs with neonatal diarrhoea. *J Clin Microbiol* (31):1185-1188.
- Xu, C.B., Wei, G.S., (2002).** Construction of recombinant strain expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac-ST1-LTB fusion protein. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2, 216–220.
- Yanes, S.A., Pernas, L.L.E., Bravo, A.R., Castro, B.L. (1983).** Valoración del poder patógeno de cepas de *E. coli* mediante la prueba de intestino ligado en cerdos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de Las Villas. Facultad de Ciencia Animal. Villa Clara. Cuba.
- Yokoyama, H., Peralta, R.C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y., Kodama, Y., (1992).** Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Inf. Immun.* 60, 998–1007.
- Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., and Francis, D. (2007).** Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* 123:145–152.

ANEXOS.

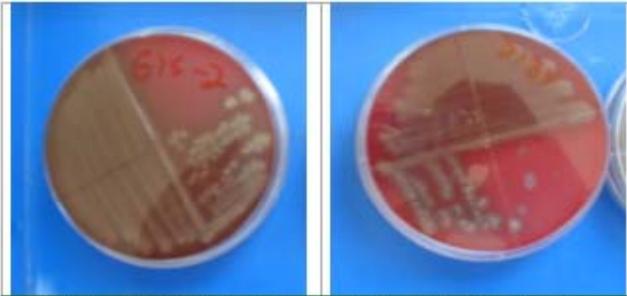


Figura 1: Cepa G626 serotipo O149:H1:F4a:LT:STa:STII
 Figura 2: Cepa 2184 serotipo O157:H19:F18a:3:STa:STII



Figura 3: Actividad Hemolítica
 Figura 4: Detección de antígeno F4



Figura 5: Detección de antígenos F18



Figura 6: muestras positivas a F18 y F4 de izquierda a derecha.

[1] Tabla de contingencia 5 : Tablas 2x2 simples

Factor de Virulencia	Actividad Hemolítica		Total
	Positiva	Negativa	
F4 ⁺	3	11	14
F4 ⁻	8	68	76
Total	11	79	90

	Estimación	IC(95,0%)	
Riesgo relativo	2,035714	0,614237	6,746795
Prueba Ji-cuadrado de asociación	Estadístico	Valor p	
Sin corrección	1,3098	0,2524	
Corrección de Yates	0,4907	0,4836	
Prueba exacta de Fisher	Valor p		
Unilateral	0,2295		
Bilateral	0,3672		

[2] Tabla de contingencia 6 : Tablas 2x2 simples

Factor de Virulencia	Actividad Hemolítica		Total
	Positiva	Negativa	
F18 ⁺	4	5	9
F18 ⁻	7	74	81
Total	11	79	90

	Estimación	IC(95,0%)	
Riesgo relativo	5,142857	1,859510	14,223627
Prueba Ji-cuadrado de asociación	Estadístico	Valor p	
Sin corrección	9,6778	0,0019	
Corrección de Yates	6,6283	0,0100	
Prueba exacta de Fisher	Valor p		
Unilateral	0,0116		
Bilateral	0,0116		