



CARACTERIZACION DE ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI*
AISLADAS DE DIARREAS NEONATALES DE
CORDEROS Y CABRITOS

MARIA DOLORES CID VAZQUEZ

DPTO. PATOLOGIA ANIMAL I
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Dirigida por el Dr. Ricardo de la Fuente López

MADRID 1993

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en veterinaria

INDICE

I. INTRODUCCION	1
I.1. Las diarreas neonatales en los rumiantes	1
I.2. Etiología de las diarreas neonatales de los corderos y cabritos	4
I.3. <u>Escherichia coli</u>	10
I.3.1. Enfermedades producidas por <u>E. coli</u> en los animales domésticos	12
I.3.2. Clasificación de las cepas de <u>E. coli</u> productoras de diarrea	13
I.4. <u>E. coli</u> enterotoxigénicos (ECET)	17
I.4.1. Factores de patogenicidad	17
I.4.1.1. Factores de colonización de la mucosa intestinal	17
I.4.1.1.1. Concepto	17
I.4.1.1.2. Especificidad de hospedador	18
I.4.1.1.3. Características comunes	19
I.4.1.1.4. Fimbrias encontradas en las cepas de ECET de origen ovino y caprino: F5 y F41	21
I.4.1.2. Enterotoxinas	23
I.4.1.2.1. Enterotoxinas termolábiles (LTs)	23
I.4.1.2.2. Enterotoxinas termoestables (STs)	26
I.4.2. Patogenia	26
I.4.3. Epizootiología	27
I.4.3.1. Receptividad	27
I.4.3.2. Prevalencia de la infección por ECET en corderos y cabritos	29
I.4.4. Cuadro clínico y lesiones	30
I.4.5. Diagnóstico	30
I.4.5.1. Detección de las fimbrias	31
I.4.5.2. Detección de enterotoxinas	31
I.4.6. Prevención	32
I.5. <u>E. coli</u> no enterotoxigénico	34
I.5.1. <u>E. coli</u> "attaching-effacing" (ECEA)	35
I.5.2. <u>E. coli</u> que expresan las fimbrias F17, CS31A y F165	37
I.5.3. <u>E. coli</u> verotoxigénicos (ECVT)	40
I.5.3.1. Verotoxinas (VTs)	40
I.5.3.2. <u>E. coli</u> verotoxigénicos	43
I.5.3.3. Asociación con la enfermedad	44
I.5.4. <u>E. coli</u> productores de CNF (ECNT)	46
I.5.4.1. Factores citotóxicos necrotizantes	46
I.5.4.2. Asociación con la enfermedad	47
I.5.5. <u>E. coli</u> septicémicos	48
I.6. Propiedades hemaglutinantes	50
II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	53
III. MATERIAL Y METODOS	56
III.1. Recogida de muestras de campo	57
III.2. Aislamiento, identificación y conservación de cepas de <u>E. coli</u>	62
III.2.1. Aislamiento	62
III.2.2. Identificación	63
III.2.3. Conservación	64

III.3. Detección de los antígenos fimbriales F5, F41 y F17 por aglutinación en porta con sueros policlonales	65
III.3.1. Producción de sueros policlonales monoespecíficos frente a las fimbrias F5, F41 y F17	65
III.3.1.1. Producción de sueros hiperinmunes en conejos	66
III.3.1.2. Absorción de los sueros hiperinmunes	68
III.3.1.3. Comprobación de la especificidad de los sueros policlonales monoespecíficos	70
III.3.2. Estudio de la prevalencia de las fimbrias F5, F41 y F17 en las cepas de <u>E. coli</u> aisladas	71
III.4. Detección de las fimbrias F5 y F41 con el reactivo comercial Fimbrex	1
III.5. Detección de la enterotoxina termoestable STa por el ensayo en ratón lactante (ERL)	72
III.5.1. Detección de STa en cepas de <u>E. coli</u> aisladas de campo	72
III.5.2. Determinación estadística de los valores de los límites mínimo positivo y máximo negativo de los coeficientes de deshidratación	74
III.6. Detección de verotoxinas (VTs), factores citotóxicos necrotizantes (CNFs) y enterotoxinas termolábiles (LTs) por el ensayo en la línea celular Vero	76
III.6.1. Mantenimiento de la línea celular Vero	76
III.6.2. Ensayo en la línea celular Vero	77
III.7. Detección de cepas de <u>E. coli</u> productoras de colicinas	78
III.8. Estudios de hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) y manosa-sensible (HAMS) de cepas de <u>E. coli</u>	80
III.8.1. Estudio de la capacidad HAMR y HAMS de células enteras	80
III.8.2. Estudio de la actividad HAMR de los extractos térmicos de cepas de <u>E. coli</u> HAMR positivas	81
III.9. Estudios de sensibilidad a antimicrobianos	82
III.9.1. Preparación de las diluciones de los antimicrobianos en placa	82
III.9.2. Inoculación de las placas	85
III.9.3. Incubación y lectura de las placas	85
III.10. Detección y caracterización de antígenos superficiales distintos de los antígenos F5, F41 y F17 en cepas de <u>E. coli</u> HAMR positivas	86
III.10.1. Cepas utilizadas	86
III.10.2. Obtención de los extractos térmicos	86
III.10.3. Producción de antisueros	87
III.10.4. Observación de fimbrias por microscopía electrónica	87
III.10.5. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	88
III.10.5.1. Preparación de los geles	88
III.10.5.2. Preparación de las muestras	90
III.10.5.3. Aplicación de las muestras y electroforesis	90
III.10.5.4. Teñido y conservación de los geles	91
III.10.6. Detección inmunoenzimática de proteínas sobre soportes de nitrocelulosa ("immunoblotting")	92
III.10.7. Semipurificación del antígeno LC168 a partir de la cepa CL-168	93
III.10.7.1. Obtención y extracción del antígeno LC168 a partir de la cepa CL-168	94
III.10.7.2. Precipitación con sulfato amónico	95
III.10.7.3. Cromatografía de gel filtración en columna (Sepharosa CL 4B)	95
III.10.7.4. Tratamiento con deoxicolato sódico (DOC)	95
III.10.8. Estudio de la prevalencia de los antígenos LC168 y LC686 en las cepas de <u>E. coli</u> aisladas de los procesos diarreicos estudiados	96

IV. RESULTADOS	98
IV.1. Recogida de muestras de campo	98
IV.2. Aislamiento e identificación de cepas de <u>E. coli</u>	100
IV.3. Detección de las fimbrias F5, F41 y F17 en las cepas de <u>E. coli</u> aisladas de campo	102
IV.3.1. Especificidad de los sueros policlonales absorbidos	102
IV.3.2. Detección de las fimbrias F5, F41 y F17 en los aislados de campo	104
IV.4. Detección de STa por el ensayo en ratón lactante (ERL)	105
IV.4.1. Determinación de los valores de los límites mínimo positivo y máximo negativo de los coeficientes de deshidratación	105
IV.4.2. Detección de STa en cepas de <u>E. coli</u> aisladas de campo	107
IV.5. Detección de verotoxinas (VTs), factores citotóxicos necrotizantes (CNFs) y enterotoxinas termolábiles (LTs) por el ensayo en la línea celular Vero	108
IV.5.1. Origen de las cepas productoras de citotoxinas	113
IV.6. Resultados de la detección de cepas de <u>E. coli</u> productoras de colicina V	115
IV.7. Resultados de hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) y manosa-sensible (HAMS)	117
IV.7.1. Resultados de la HAMR y HAMS con células enteras	117
IV.7.2. Modelos de HAMR de las células enteras	120
IV.7.3. Actividad hemaglutinante en presencia de D-manosa (HAMR) de los extractos térmicos (ET) de las cepas de <u>E. coli</u> HAMR ⁺	121
IV.8. Sensibilidad a los antimicrobianos	123
IV.9. Detección y caracterización de antígenos superficiales distintos de los antígenos F5, F41 y F17 en cepas de <u>E. coli</u> HAMR positivas	131
IV.9.1. Características de las cepas seleccionadas	131
IV.9.2. Reacciones de aglutinación de las tres cepas seleccionadas con los sueros policlonales	132
IV.9.3. Estudios de microscopía electrónica	134
IV.9.4. Análisis de proteínas de extractos térmicos bacterianos en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y detección inmunoenzimática sobre soportes de nitrocelulosa ("immunoblotting")	138
IV.9.5. Semipurificación del antígeno LC168 a partir de la cepa de <u>E. coli</u> CL-168	139
IV.9.6. Prevalencia y características de las cepas de <u>E. coli</u> que expresan el antígeno LC168	146
IV.9.7. Relación entre la expresión del antígeno LC168 y la actividad hemaglutinante	148
V. DISCUSION	152
V.1. <u>E. coli</u> enterotoxigénicos (ECET)	152
V.2. <u>E. coli</u> no enterotoxigénicos (NO-ECET)	157
V.2.1. Aislamiento de cepas F17 ⁺	157
V.2.2. Aislamiento de estirpes de <u>E. coli</u> toxigénicas	161
V.2.2.1. Aislamiento de cepas de <u>E. coli</u> productoras de VT (ECVT)	161
V.2.2.2. Aislamiento de cepas productoras de CNF (ECNT)	164
V.3. Sensibilidad a los antimicrobianos	165
V.4. Nuevos antígenos	168
V.5. Características de los procesos estudiados: análisis global de los resultados	174
VI. CONCLUSIONES	179
VI. BIBLIOGRAFIA	181

I. INTRODUCCION

La explotación de ganado ovino y caprino tiene una gran importancia dentro de la producción ganadera en España, como lo demuestra el hecho de que en 1986 el sector ovino aportó a la producción final agraria 115.067,4 millones de pesetas, lo que significa el 11.1 % de la producción final ganadera (Berga Monge et al., 1990).

Los factores que condicionan la productividad de las explotaciones ovinas y caprinas son múltiples y, entre ellos, cabe destacar la incidencia de procesos infecciosos y parasitarios. Por lo tanto, la lucha eficaz frente a estos procesos influye decisivamente en la rentabilidad de las explotaciones.

La mortalidad perinatal tiene una especial repercusión en la productividad puesto que la producción de carne es el primer o segundo objetivo de las explotaciones. En España no se han publicado estudios precisos sobre las causas de mortalidad perinatal en corderos y cabritos, si bien, en general, puede afirmarse que los procesos infecciosos son la principal causa.

1.1. LAS DIARREAS NEONATALES EN LOS RUMIANTES

Entre los procesos patológicos que afectan a los animales recién nacidos en general, y a los corderos y cabritos en particular, las gastroenteritis infecciosas son los más frecuentes y los que ocasionan mayores pérdidas económicas (House, 1978; Tzipori, 1985; Holland, 1990). Las pérdidas ocasionadas por las diarreas neonatales son consecuencia del retraso en el crecimiento de los animales, de los gastos en tratamientos medicamentosos y, fundamentalmente, de la mortalidad.

La etiología de las diarreas neonatales es multifactorial y pluricausal. En su presentación y evolución intervienen diferentes agentes infecciosos causales junto con las variaciones individuales de los animales (edad, estado nutricional, estado inmune,..) y las condiciones medio ambientales y de manejo (Moon et al., 1976; Morin, et al., 1976; Moon

et al., 1978; Acres et al., 1979; Radotstits y Acres, 1983; Waltner-Toews et al., 1986).

La lista de enteropatógenos identificados como causantes de diarreas neonatales en los animales de renta es muy amplia e incluye virus, bacterias y parásitos. Entre las bacterias que originan diarrea en los neonatos las más frecuentes y las que ocasionan mayores pérdidas económicas son Escherichia coli y Salmonella spp. (House, 1978; Tzipori, 1985; Holland, 1990). También se han identificados como causa de enfermedad entérica o diarrea Clostridium perfringens (Tzipori, 1985), Bacterioides fragilis (Border et al., 1985; Myers y Shoop, 1987), Campylobacter spp. (Firehammer y Myers, 1981; Prescott y Monroe, 1982; Myers et al., 1984) y Yersinia enterocolitica (Myers et al., 1984).

Los virus principalmente implicados en las diarreas neonatales de los animales domésticos son los rotavirus y los coronavirus (Flewett y Woode, 1978; House, 1978; Torres-Medina et al., 1985; Bridger y Pocock, 1986). Otros virus identificados como causantes de diarreas neonatales son: togavirus, parvovirus, calicivirus, adenovirus, bredavirus y astrovirus (Holland, 1990).

Entre los parásitos, Cryptosporidium parvum es el principal responsable de diarreas neonatales (Holland, 1990).

La mayoría de los enteropatógenos no producen sintomatología clínica en los animales adultos. Esto, junto con el hecho, relativamente frecuente, de que los diferentes agentes se detectan también en neonatos sanos, pone de manifiesto la importancia de los otros factores en la aparición y evolución de la enfermedad.

Entre los factores ligados al animal, el estado inmune juega un papel muy importante en el desarrollo de estos procesos. Los rumiantes son inmunocompetentes cuando nacen. No obstante, las respuestas que su sistema inmune genera frente a los estímulos antigénicos (inmunidad activa) suelen ser tardías y a menudo ineficaces para combatir las infecciones (Tizard, 1987). Por lo tanto, la inmunidad de los recién nacidos depende casi exclusivamente de la transferencia de inmunoglobulinas maternas a través del calostro (inmunidad pasiva)

(Sawyer *et al.*, 1977; Hopkins *et al.*, 1984).

La inmunidad pasiva adquirida por los neonatos depende de la cantidad y calidad de las inmunoglobulinas presentes en el calostro y de la adecuada absorción de las mismas por el recién nacido (Selman, 1973). El epitelio intestinal permanece permeable a la absorción de inmunoglobulinas durante las primeras 24 horas de vida en los terneros (Penhale *et al.*, 1973) y durante las primeras 48 horas en los corderos (Halliday y Williams, 1976). No obstante, la absorción de las inmunoglobulinas es más eficaz durante las primeras horas de vida, por lo que los corderos deben realizar más de una toma durante las primeras 6 horas para que la concentración de las inmunoglobulinas séricas sea adecuada (Halliday y Williams, 1976).

La ingestión de las cantidades adecuadas de calostro en las primeras horas de vida, además de proporcionar protección, aporta nutrientes y factores de crecimiento que estimulan el desarrollo y diferenciación del tubo digestivo, especialmente durante las primeras 24-48 horas (Norcross, 1982; Oda *et al.*, 1989; Mellor, 1990).

Las condiciones medio ambientales adversas y las deficiencias en el manejo de los animales se consideran, desde estudios muy tempranos, factores que juegan un papel importante en la aparición, difusión y evolución de los procesos diarreicos en los rumiantes (Inglis, 1960; Loosmore, 1964; Wray y Thomlinson, 1975). No obstante, en muchos casos el grado de influencia de estos y otros factores extrínsecos es difícil de precisar.

La gravedad y duración de los brotes diarreicos, por lo tanto, están influenciadas, además de por la virulencia del agente o agentes implicados, por una amplia gama de factores intrínsecos y extrínsecos.

I.2. ETIOLOGIA DE LAS DIARREAS NEONATALES DE LOS CORDEROS Y CABRITOS

En el apartado anterior se ha destacado el carácter multifactorial y pluricausal de las diarreas neonatales. Sin embargo, con frecuencia estos procesos se clasifican atendiendo al agente infeccioso implicado. En la revisión que sigue se ha adoptado este criterio etiológico, por su mayor sencillez, si bien es necesario considerar que en los brotes diarreicos con frecuencia intervienen más de un enteropatógeno.

La participación de los diferentes agentes infecciosos en las diarreas neonatales de terneros y lechones ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Comparativamente, sin embargo, son muy pocos los estudios publicados sobre la etiología y la epidemiología de las diarreas en corderos y cabritos. A pesar de los escasos estudios realizados en los rumiantes pequeños, o quizás precisamente por ello, en la literatura con mucha frecuencia se asume que los agentes infecciosos implicados en las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes son los mismos encontrados en los terneros. De ahí que, en esta revisión, se haga referencia frecuente a datos publicados sobre ganado vacuno.

Los enteropatógenos más frecuentemente asociados a las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes son los rotavirus, Cryptosporidium spp. y E. coli enterotoxigénico (ECET) (Nagy et al., 1983; Yvone et al., 1984; Fassi-Fehri et al., 1988)

Los rotavirus son una de las causas más importantes de diarrea en neonatos de muchas especies animales (Holland 1990). Mebus et al., en 1969, describieron por primera vez la participación de estos virus en diarreas de terneros recién nacidos. En la década de los setenta se demostró la intervención de los rotavirus en diarreas de corderos (McNulty et al., 1976; Snodgrass et al., 1976b; Ansari et al., 1978) y cabritos (Scott et al., 1978).

Los rotavirus se dividen en 7 grupos (serogrupos) denominados con letras mayúsculas de la A a la G (Pedley et al., 1986; Burns et al., 1989). Los rotavirus del grupo A son los mejor conocidos y los más frecuentemente asociados a las diarreas en el hombre y los

animales recién nacidos. Tienen un antígeno común o de grupo y, a su vez, se dividen en 9 serotipos. Los restantes grupos, que no comparten el antígeno común del grupo A, por lo que no se detectan con los ensayos inmunológicos convencionales (ELISA, IF) desarrollados para la detección de los rotavirus del grupo A (Bridger, 1980; Saif et al., 1980), se conocen como rotavirus atípicos. Estos rotavirus atípicos se han estudiado mucho menos que los del grupo A dado que no se replican fácilmente en cultivos celulares.

Los rotavirus asociados a las diarreas neotales de los rumiantes pertenecen a los serogrupos A y B, si bien los del grupo A son más importantes clínicamente y presentan unas prevalencias de infección más elevadas (Snodgrass et al., 1977a; Snodgrass y Gray, 1977; Ihara et al., 1983; Chasey y Bands, 1984; Chasey y Davies, 1984; Fijtman et al., 1987; Theil y McCloskey, 1989). En ovinos y caprinos existen pocos estudios sobre la prevalencia de cada uno de estos grupos. No obstante, según los resultados de algunos estudios la prevalencia del grupo B podría ser importante, al menos en algunos países. Así, por ejemplo, Chasey y Banks (1984) en un estudio realizado en Inglaterra y Gales sobre 138 casos de diarrea en corderos detectaron rotavirus del grupo B en 17 casos y, sin embargo, en ningún caso detectaron rotavirus del grupo A. Por otra parte, en heces de ganado caprino no se han detectado rotavirus diferentes al grupo A, pero se han encontrado prevalencias altas de sueros con anticuerpos frente al grupo B (Brown et al., 1987).

La infección con rotavirus puede ser asintomática o dar lugar a sintomatología clínica de intensidad variable (Tzipori et al., 1980b; Crouch y Acres, 1984; Dea et al., 1985; Bridger y Pocock, 1986). En terneros se ha descrito que las variaciones en la presentación clínica de la enfermedad dependen de una serie de factores que incluirían la virulencia de la cepa de rotavirus implicada, la dosis infectante, la edad del hospedador, la existencia de infecciones mixtas, las condiciones medioambientales y de manejo adversas y el estado nutricional e inmunitario de los animales (Mebus et al., 1977; Acres y Babiuk, 1978; McNulty y Logan, 1983; Radostits y Acres, 1983; Tsunemitsu et al., 1989).

La receptividad a la infección por rotavirus, al igual que sucede con los otros enteropatógenos asociados a las diarreas neonatales, disminuye con la edad. Tzipori et al.

(1981d) en corderos gnotobióticos infectados experimentalmente con rotavirus pusieron de manifiesto que los animales de 4 o más días de edad desarrollaban sólo una infección subclínica, mientras que los corderos de 2 días desarrollaban la enfermedad. En otro estudio, Snodgrass et al. (1976a) infectaron corderos gnotobióticos el primero y el décimosegundo día de vida comprobando que en los primeros se producía diarrea y deshidratación grave, mientras que en los infectados el décimosegundo día de vida únicamente aparecía una diarrea leve. Además, en los corderos infectados el primer día de vida eliminaban virus por las heces durante 6-7, en tanto que los infectados el décimosegundo lo hacían solo uno o dos días.

La presentación clínica de la infección por rotavirus se caracteriza por diarrea acuosa intensa, anorexia, depresión y deshidratación, y, en los casos más graves, los animales mueren. Las lesiones originadas por los rotavirus se limitan generalmente al intestino delgado donde infectan las células apicales de las vellosidades intestinales. Esto origina la destrucción de las células epiteliales maduras que son sustituidas por células inmaduras (Moon, 1978; Woode y Crouch, 1978; Woode et al., 1978; Argenzio, 1985). Las vellosidades se atrofian y se reducen las funciones absortivas y enzimáticas desencadenando la diarrea por un mecanismo de mala digestión y malabsorción (Moon, 1978; Woode y Crouch, 1978; Woode et al., 1978).

La sintomatología y las lesiones originadas por los rotavirus atípicos son similares a las inducidas por los rotavirus del grupo A (Bohl et al., 1982; Askaa y Bloch, 1984; Chasey y Banks, 1986), excepto en la formación de sincitios en las células epiteliales infectadas que se considera una lesión específica de los rotavirus del grupo B (Chasey y Banks, 1986).

La participación de otros virus distintos a los rotavirus en las diarreas neonatales de corderos y cabritos se ha descrito en muy pocos casos. Los coronavirus, que constituyen una de las principales causas de diarrea en ganado vacuno, se han detectado muy ocasionalmente en ovinos y caprinos (Tzipori et al., 1978; Snoodgrass et al., 1980b; Pass et al., 1982; Nagy et al., 1983). Por otra parte, en dos estudios se han detectado astrovirus en corderos afectados de diarrea (Snodgrass y Gray, 1977b; Wray et al., 1981).

El protozoo Cryptosporidium spp. fue considerado por primera vez como un agente causal de diarrea en un ternero por Panciera et al. en 1971. Posteriormente se ha asociado a gastroenteritis y diarrea en una gran variedad de especies animales y en el hombre (Holland, 1990). En los primeros trabajos se discutía su papel como agente patógeno primario en los procesos diarreicos debido a que frecuentemente se detectaba asociado a otros enteropatógenos tanto en terneros (Meuten et al., 1974; Pohlenz et al., 1978b; Snodgrass et al., 1980b) como en corderos (Barker y Carbonell, 1974; Berg et al., 1978). Actualmente, los estudios epizootiológicos y experimentales permiten considerarle como un importante enteropatógeno asociado a las diarreas neonatales de los rumiantes recién nacidos (Holland, 1990). C. parvum es la especie que origina gastroenteritis y diarrea en los animales domésticos (Tzipori et al., 1981a, Anderson, 1982 y 1984, Pearson y Logan, 1983).

Aunque la infección con Cryptosporidium spp. había sido descrita en corderos con diarrea por Barker y Carbonell en 1974 y por Berg et al. en 1978, la primera asociación causal con la diarrea en corderos fue establecida y comprobada experimentalmente en 1981 por Tzipori et al. (1981b). En cabritos la infección por Cryptosporidium spp. se describió por primera vez por Mason et al. en 1981 y posteriormente se denunciaron otros brotes (Tzipori et al. 1982b; Matovelo et al., 1984; Nagy et al. 1984; Rossangio et al., 1987).

En España la primera descripción de la infección por Cryptosporidium spp. en corderos y cabritos recién nacidos fue realizada por Rojo Vázquez et al. en 1985. Los trabajos publicados posteriormente han puesto de manifiesto una amplia distribución geográfica de esta parasitosis en nuestro país y unas tasas de prevalencia muy elevadas (Gonzalez-Hidalgo y Respaldiza-Cardeñosa, 1987; Rojo Vázquez et al., 1987; Villacorta et al., 1987; Clavel et al., 1989; Gomez Bautista et al., 1989).

La criptosporidiosis se presenta únicamente en animales recién nacidos o inmunocomprometidos. Experimentalmente se ha comprobado que existen diferencias en la receptividad a la criptosporidiosis relacionadas con la edad de los animales: las infecciones realizadas el primer día de vida dan lugar a periodos de incubación más cortos, patencias más largas y cuadros clínicos más graves que las realizadas en la segunda, tercera o cuarta semana

de vida (Tzipori et al., 1981b; Anderson, 1982); los corderos de un mes de vida pueden infectarse pero no desarrollan sintomatología clínica y la eliminación de ooquistes en las heces dura solamente uno o dos días (Tzipori et al., 1981b). No obstante, los corderos son receptivos a la criptosporidiosis durante períodos más largos que a la diarrea originada por la infección con rotavirus o Escherichia coli enterotoxigénico (ECET) (Tzipori et al., 1981). Los cuadros más graves se producen en corderos de 5 días de edad (Tzipori et al., 1981d y 1982, Anderson, 1984), mientras que la diarrea originada por rotavirus y ECET se produce en corderos menores de 2 días de vida (Tzipori et al., 1981d).

La sintomatología clínica originada por C. parvum no presenta características específicas. La diarrea es el signo más constante y se acompaña de anorexia, depresión, deshidratación, emaciación y, en los casos más graves, de la muerte de los animales (Tzipori et al., 1981c; Foreyt, 1990).

En los animales muertos se observa macroscópicamente distensión del abomaso, con presencia de leche coagulada, y un contenido intestinal acuoso y amarillento. La mucosa intestinal se encuentra hiperémica, pero no hemorrágica, y las lesiones se limitan generalmente al intestino delgado aunque el ciego puede aparecer dilatado y con contenido líquido. Los gánglios linfáticos mesentéricos están aumentados de tamaño, congestivos y edematosos (Angus et al., 1982; Tzipori et al., 1983).

Las lesiones histológicas se caracterizan por atrofia y, frecuentemente, fusión de las vellosidades. En las vellosidades afectadas el epitelio columnar está sustituido por células inmaduras cuboides o redondeadas. Entre las vellosidades se observan adheridos distintos estados de desarrollo del parásito (Pohlenz et al., 1978a y b; Angus et al., 1982; Tzipori et al., 1983; Anderson, 1984; Heine et al., 1984; Argencio et al., 1990). Las lesiones afectan generalmente al intestino delgado en su parte distal, yeyuno e íleon, aunque también pueden aparecer en el intestino grueso, fundamentalmente en ciego y colon, donde la imagen histopatológica es similar (Heine et al., 1984).

Los mecanismos por los cuales C. parvum provoca la diarrea no se conocen

totalmente. Las lesiones histopatológicas observadas en el intestino delgado inducen la pérdida de función de las vellosidades originando alteraciones de la digestión y de la absorción de los nutrientes (Tzipori, 1988).

La participación de E. coli enterotoxigénico (ECET) y otras estirpes de E. coli en las diarreas neonatales, al ser el objeto de estudio de esta tesis, se revisa detalladamente en los siguientes apartados.

La intervención de otras bacterias distintas de E. coli en la etiología de las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes no se ha establecido con claridad. Así, por ejemplo, Salmonella spp. y Clostridium perfringens se han asociado a cuadros entéricos en los corderos y cabritos recién nacidos, pero no suelen considerarse como agentes etiológicos del "síndrome diarreico del recién nacido" debido a que originan procesos con características clínicas y epidemiológicas bien definidas y a que su participación no se limita al periodo neonatal (Tzipori, 1985).

En el diagnóstico etiológico de brotes diarreicos neonatales en rumiantes con frecuencia se detectan infecciones múltiples con dos o más enteropatógenos. En los estudios de campo las infecciones mixtas generalmente se asocian a cuadros más graves y a tasas de mortalidad más altas que cuando se detecta un solo agente (Snodgrass et al., 1986, Reynolds et al., 1986).

Diferentes infecciones experimentales realizadas en terneros con ECET y rotavirus sugieren la existencia de un efecto sinérgico por el que los rotavirus favorecerían la colonización por ECET sin agravar los síntomas de la enfermedad (Dubourghier et al., 1978; Gouet et al., 1978; Runnels et al., 1980b; Tzipori et al., 1981c). No obstante, en otro estudio llevado a cabo en terneros Hall et al. (1988a) observaron que, más que un efecto sinérgico, la coinfección con varios enteropatógenos originaba un efecto aditivo de las alteraciones producidas en diferentes tramos intestinales que desencadenaban un cuadro de malabsorción.

En condiciones de campo sólo ocasionalmente se han descrito infecciones múltiples

en corderos (Anderson, 1982; Ramisse *et al.*, 1984) y cabritos (Nagy *et al.*, 1983, 1984 y 1987; Sanford *et al.*, 1991). Por lo tanto, la importancia y difusión de las infecciones mixtas en estos animales se desconoce.

Las posibles interacciones entre ECET, rotavirus y Cryptosporidium en corderos se han investigado experimentalmente en tres trabajos. Tzipori *et al.* (1981d) empleando corderos gnotobióticos encontraron que los animales de 4 o más días no desarrollaban sintomatología clínica cuando se infectaban con ECET o con rotavirus por separado ni cuando se infectaban conjuntamente con ambos agentes. Además, los corderos eran receptivos a la diarrea inducida por Cryptosporidium spp. hasta al menos los 6 días de edad, pero la infección conjunta del parásito con ECET o con rotavirus no agravaba la sintomatología clínica ni las lesiones.

Wray *et al.* (1981, 1984) observaron que la coinfección el primer día de vida de corderos privados de calostro con ECET y rotavirus, a las mismas dosis utilizadas en infecciones simples, producía una mortalidad mayor a la inducida por las infecciones simples, aunque no influía en la duración de la diarrea. La discrepancia de estos resultados con los obtenidos por Tzipori *et al.* (1981d) posiblemente se deba a la diferencia de edad de los animales utilizados.

I.3. ESCHERICHIA COLI

E. coli es un bacilo corto, Gram-negativo, no esporulado, móvil o inmóvil y anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae.

El hábitat primario de E. coli es el tracto gastrointestinal, y principalmente el intestino, de los mamíferos y las aves. La bacteria se encuentra muy difundida en la naturaleza, sobre todo en el suelo, el agua y los alimentos, generalmente como consecuencia de contaminaciones fecales.

E. coli coloniza y se establece en el tracto intestinal en las primeras horas de vida de los animales. La mayoría de las cepas no son patógenas y forman parte de la flora saprofita

normal del intestino, pero determinadas estirpes poseen distintos "factores de patogenicidad" que les confieren la capacidad de producir diferentes procesos clínicos tanto en el hombre como en los animales: infecciones entéricas, septicemias, infecciones del tracto urinario, mastitis, infecciones de heridas, meningitis, etc.

Desde hace muchos años las investigaciones se han orientado hacia la diferenciación entre las cepas patógenas y las comensales. Un primer avance importante en este sentido fue la clasificación serológica propuesta por Kauffman en 1947 basada en los antígenos superficiales de la bacteria. Estos antígenos son los O o somáticos, que son lipopolisacáridos complejos (LPS) que forman parte de la membrana externa, constituyen la endotoxina bacteriana y no se inactivan a 121°C, los K o capsulares, que son polisacáridos ácidos que forman una envoltura o cápsula alrededor de la bacteria, y los H o flagelares, que son de naturaleza proteica y se inactiva a 100°C. Hasta el momento se conocen al menos 171 antígenos O, 103 antígenos K y 56 antígenos H. Cada serotipo viene definido por su fórmula O:K:H y, aunque existen multitud de serotipos distintos, cada uno de los procesos producidos por E. coli se asocia a un número relativamente reducido de serotipos (Morris y Sojka 1985). De ahí el interés, desde el punto de vista epidemiológico e incluso diagnóstico, de esta clasificación serológica.

Los distintos serotipos, además, tienen cierta especificidad de hospedador. Así, por ejemplo, los serotipos que originan enfermedades en el hombre son distintos de los que ocasionan procesos patológicos en los animales domésticos y, entre estos, son diferentes los serotipos implicados en enfermedades del cerdo de los que ocasionan procesos patológicos en terneros y corderos. No obstante, los serogrupos implicados en enfermedades de terneros y corderos son los mismos (Sojka, 1971; Morris y Sojka 1985; Wray y Morris, 1985).

En las últimas décadas las investigaciones se han centrado en buena medida en el estudio de los factores que determinan la patogenicidad de las estirpes de E. coli implicadas en los diferentes procesos patológicos. Los factores patogénicos mejor conocidos hasta la fecha pueden clasificarse en dos grandes grupos: la expresión de factores de colonización y la producción de toxinas.

I.3.1. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR E. COLI EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

Los procesos producidos por E. coli en los animales domésticos se denominan tradicionalmente colibacilosis. En función de la presentación clínica y las lesiones anatomopatológicas se reconocen dos formas principales, que afectan fundamentalmente a los animales jóvenes, una entérica y otra sistémica. La bacteria produce también mamitis en las vacas (Morris y Sojka 1985).

La colibacilosis entérica puede a su vez subdividirse en dos síndromes principales: la diarrea colibacilar, también denominada diarrea neonatal por E. coli, y la toxemia colibacilar. En ambos casos hay una intensa proliferación en el intestino de las cepas de E.coli implicadas, pero las bacterias permanecen localizadas en el tracto intestinal, aunque en los estadios terminales pueden invadir otros órganos.

La diarrea neonatal, que es la colibacilosis entérica más frecuente, está ocasionada por cepas de E. coli productoras de enterotoxinas las cuales dan lugar a un aumento neto de secreción de líquidos a la luz intestinal. De la diarrea neonatal y de los factores de patogenicidad de las cepas responsables nos ocupamos ampliamente más adelante.

La toxemia colibacilar es un proceso ocasionado por la absorción de la endotoxina (LPS) que puede estar asociado a cepas de E. coli enterotoxigénicas o no enterotoxigénicas. Los animales mueren repentinamente sin otras manifestaciones clínicas. Esta enfermedad no es frecuente en los terneros, corderos y lechones recién nacidos, pero es un problema importante en los cerdos tras el destete. En esta forma entérica se incluye la enfermedad de los edemas del cerdo.

En la colibacilosis sistémica, que afecta frecuentemente a terneros, corderos y aves, las bacterias atraviesan la mucosa intestinal o respiratoria y pasan al torrente circulatorio. Esta invasión puede dar lugar a una infección generalizada (septicemia colibacilar o colisepticemia) o a infecciones localizadas tales como meningitis y/o artritis en terneros y corderos y

aerosaculitis y pericarditis en las aves.

En el ganado vacuno la forma sistémica generalmente afecta a animales hipogammaglobulinémicos en los primeros días de vida. El proceso es agudo y frecuentemente mortal. Los animales afectados pueden presentar diarrea antes de morir pero ésta no es constante. En algunos animales el proceso se prolonga y las bacterias se localizan con predilección en las articulaciones y las meninges causando poliartritis y/o meningitis.

La colibacilosis sistémica en los corderos presenta unas características muy similares a la de los terneros. Además los serotipos responsables son los mismos que los que afectan a los corderos: O78:K80 (el más frecuente), 0137:K79, 015:K, 035:K, 0115:K, 0117:K98, 0119:K, 026:K60 y 086:K61 (Morris y Sojka 1985).

Los mecanismos de patogenicidad de las cepas septicémicas no se conocen con precisión. No obstante, un alto porcentaje de las cepas aisladas de terneros, corderos y aves portan un plásmido que codifica la colicina V y otras cepas procedentes de terneros y corderos tienen otro plásmido denominado Vir (Smith, 1974). La presencia de estos plásmidos se ha relacionado con la capacidad de las cepas para producir septicemia.

I.3.2. CLASIFICACION DE LAS CEPAS DE E.COLI PRODUCTORAS DE DIARREA

Las estirpes de E. coli capaces de producir diarrea constituyen un grupo heterogéneo en función de los factores de patogenicidad que expresan, de los mecanismos de interacción con la mucosa intestinal, de los cuadros clínicos que originan y de los serotipos a los que pertenecen. Atendiendo a estas características, Levine, en 1987, clasificó las cepas de E. coli capaces de producir diarrea en el hombre en cuatro categorías principales: enterotoxigénicas (ECET), enteroinvasivas (ECEI), enteropatógenas (ECEP) y entrohemorrágicas (ECEH) (Levine, 1987). Este autor consideró además una quinta categoría peor definida a la que denominó E. coli enteroadherentes (ECEA) (Levine, 1987), y que posteriormente se ha denominado por otros autores E. coli enteroagregativos (Vial et al., 1988).

El grupo de ECET es el mejor conocido y en él se incluyen las cepas que producen enterotoxinas (que son las que desencadenan la diarrea) y que generalmente poseen una o más fimbrias por las que se fijan a los enterocitos.

Las estirpes de ECEI invaden y proliferan en las células intestinales, fundamentalmente del colon, originando un cuadro diarréico clínicamente similar al producido por Shigella dysenteriae (DuPont, 1971). La capacidad invasiva, al igual que en Shigella, reside en la presencia de un plásmido de 140 MDa (Harris et al., 1982) que codifica la producción de varias proteínas externas de membrana, semejantes o idénticas a las de Shigella (Hale et al., 1983). Las cepas de ECEI generalmente son inmóviles y no fermentan la lactosa lo que las asemeja también a Shigella. Además, ambas bacterias muestran muchas reacciones cruzadas entre sus antígenos O (Edwards y Ewing, 1972; Orskov et al., 1977).

La categoría de ECEP incluye determinados serotipos que fueron epidemiológicamente responsabilizados de graves epidemias de diarrea infantil en los años 50 (Neter et al., 1955) y que, posteriormente, se comprobó que no producían enterotoxinas ni poseían capacidad invasiva (Sack et al., 1975, Gross et al., 1976, Echevarria et al., 1976, Goldschmidt y DuPont, 1976, Gurwith et al., 1977). La capacidad patógena de estos serotipos se comprobó experimentalmente en voluntarios, en los que producían diarrea por un mecanismo desconocido hasta entonces (Levine et al., 1978).

Las cepas de ECEP se adhieren íntimamente a la membrana de los enterocitos (Levine y Edelman, 1984) y producen una lesión ultraestructural típica denominada de adhesión y borrado ("attaching-effacing"), que se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades sin que exista penetración en los enterocitos (Polotsky et al., 1977).

Cravioto et al., en 1979, observaron que las estirpes de ECEP tenían la capacidad de adherirse a las células Hep-2 en cultivo celular. Posteriormente se comprobó que esta capacidad se debía a un factor de colonización, al que se denominó factor de adherencia de ECEP (EAF, en sus siglas inglesas), que estaba codificado por un plásmido de 60 MDa (Baldini et al., 1983). Nataro et al., en 1985, dividieron las estirpes humanas de ECEP en dos

clases en función del modelo de adherencia de las bacterias a las células Hep-2: la clase I presenta un modelo de adherencia localizado y la clase II un modelo difuso o no adherente.

En 1982, Riley *et al.* describieron un brote de colitis hemorrágica clínicamente distinto de los originados por *Shigella* o las estirpes de ECEI. El agente causal era una cepa de *E. coli* del serotipo O157:H7, serotipo que no se había reconocido previamente como causante de diarrea en el hombre. Posteriormente se comprobó que dicho serotipo producía también en el hombre el síndrome urémico hemolítico (HUS, en sus siglas inglesas) (Karmali *et al.*, 1983) y que el serotipo O26:H11 era clínica y epidemiológicamente semejante al O157:H7 (Levine 1987). Ambos son los serotipos clásicos del grupo de ECEH. Las estirpes de este grupo aisladas del hombre producen potentes citotoxinas (denominadas verotoxinas o toxinas semejantes a la Shiga) activas en las células Vero y HeLa (Jonhson *et al.*, 1983) y poseen un plásmido de 60 MDa que codifica la expresión de una fimbria que media la adhesión a las células intestinales Henle 407 en cultivo celular (Karch *et al.*, 1987). Al igual que el grupo de ECEP, las cepas de ECEH se adhieren íntimamente a la mucosa intestinal y producen una lesión semejante (Tzipori *et al.*, 1986).

Aparte de la clasificación de Levine, en la literatura se emplean con más o menos frecuencia otras denominaciones para referirse a grupos de estirpes de *E. coli* patógenos para el hombre y los animales. Entre ellas cabe destacar las siguientes: *E. coli* "attaching-effacing" (ECAE), que incluye las cepas capaces de adherirse a la mucosa intestinal y producir la típica lesión de borrado, *E. coli* verotoxigénicos (ECVT), que engloba las estirpes productoras de verotoxinas y *E. coli* necrosantes (ECNT), que comprende las cepas productoras de factores necrosantes citotóxicos.

En el caso de las cepas de *E. coli* productoras de diarrea en los animales domésticos, la clasificación de Levine, como se expone a continuación, es aplicable sólo parcialmente.

La importancia de las estirpes de *E. coli* enterotoxigénicas (ECET) como agentes causales de diarreas neonatales en rumiantes y cerdos está ampliamente reconocida. De hecho, fue en medicina veterinaria donde primero se descubrió el mecanismo patogénico de las

estirpes enterotoxigénicas: Smith y Halls, en 1967, demostraron que inyectando filtrados de cultivo de cepas de E.coli aisladas de diarreas de lechones se producía una acumulación de líquidos en el intestino de los cerdos inoculados (Smith y Halls, 1967a). También en cepas aisladas de cerdos se describió el primer antígeno fimbrial (K88) (Orskov et al., 1961) y su asociación con la capacidad de las cepas que lo expresaban de proliferar en el intestino delgado (Moon et al., 1972). Más tarde, se demostró la producción de enterotoxinas en cepas de origen humano (Sack et al., 1971 y Dean et al., 1972), muy semejantes a las de las cepas porcinas (Gill et al., 1981) y la expresión de antígenos fimbriales (Evans et al., 1975).

En los animales domésticos, sin embargo, no se han encontrado cepas que posean el mecanismo enteroinvasivo, aunque se ha descrito una cepa de E. coli aislada de un ternero con diarrea con capacidad invasiva (Pohl et al., 1983).

Por otra parte, en medicina veterinaria el término enteropatógenos históricamente se ha utilizado para referirse a las estirpes de E. coli que producían colibacilosis entérica e incluso sistémica (Holland, 1990). Por lo tanto, dicha denominación aplicada a las cepas animales no ha tenido tradicionalmente el carácter restrictivo y bien definido del caso de las estirpes humanas.

No obstante, en los últimos años se ha encontrado en animales afectados de diarrea la lesión típica de adhesión y borrado (Cantey y Blake, 1977; Hall et al., 1985; Moxley y Francis, 1986). Asimismo, también se han aislado de distintos animales domésticos estirpes de E. coli productoras de citotoxinas: verotoxinas y factores citotóxicos necrotizantes (De Rycke, 1991; Blanco et al., 1992c). Aunque algunas de estas características permitiría, en principio, catalogarlas como ECEP o ECEH según la clasificación de Levine, con frecuencia se acostumbra a referirse a ellas con la denominación genérica de "no-enterotoxigénicos" (Okerman, 1987; Holland, 1990) para diferenciarlas de las estirpes enterotoxigénicas clásicas bien conocidas en los animales. Pensamos que, al menos por el momento, este criterio es adecuado puesto que los estudios sobre dichas estirpes animales son todavía limitados.

I.4. E. COLI ENTEROTOXIGENICOS (ECET)

I.4.1. Factores de patogenicidad

Las cepas de ECET poseen dos propiedades fundamentales que les confieren la capacidad de originar diarrea: la expresión de factores de colonización, a través de los cuales se unen a la mucosa intestinal, y la elaboración de enterotoxinas que alteran el transporte intestinal de agua y electrolitos.

I.4.1.1. Factores de colonización de la mucosa intestinal: fimbrias

I.4.1.1.1. Concepto

Los factores de colonización descritos hasta el momento en las cepas de ECET son estructuras filamentosas, no flagelares, de naturaleza proteica situadas en la superficie bacteriana y denominadas fimbrias (Gastrá y De Graaf, 1982; Klemm, 1985; Hirsh, 1985; Moon, 1990; Blanco *et al.*, 1991). Ya en 1908 Guyot describió las propiedades adhesivas de determinadas cepas de E. coli por su capacidad para aglutinar los eritrocitos de distintas especies animales. Pero fue en 1955 cuando Duguid *et al.* establecieron la correlación entre las propiedades adhesivas de E. coli y la presencia de apéndices filamentosos no flagelares observados por microscopía electrónica a los que denominaron fimbrias (Duguid *et al.* 1955)

El término adhesina se aplica a cualquier componente superficial bacteriano que media la adhesión específica a las membranas de células eucariotas y no presupone ninguna estructura en particular ni ninguna función específica en la infección (Parry y Rooke, 1985). Las adhesinas que promueven la colonización de tejidos del hospedador por un microorganismo se consideran factores de colonización. Las fimbrias, por lo tanto, son adhesinas con estructura filamentosas.

La presencia de determinadas adhesinas fimbriales en las estirpes de ECET, tanto de origen humano como animal, se asocia con la capacidad de las cepas que las expresan de

adherirse y proliferar en el intestino (Gaastra y De Graaf, 1982). Estos antígenos fimbriales son, por lo tanto, factores de colonización. Sin embargo, las fimbrias tipo 1, pese a ser adhesinas de E. coli que intervienen en la unión a distintos tipos de células, no se consideran factores de colonización, dado que su intervención en la infección no está clara (Moon, 1990).

En principio se pensó que las fimbrias eran antígenos capsulares y por eso se denominaron con la letra K (p.e. K88 y K99). Para evitar la confusión con los auténticos antígenos capsulares, Orskov et al., en 1977, propusieron denominar a los antígenos fimbriales con la letra F: el K88 pasó a denominarse F4, el K99 F5 y el 987P F6 (Orskov et al., 1977).

I.4.1.1.2. Especificidad de hospedador.

Los antígenos fimbriales descritos como factores de colonización en las cepas de ECET presentan cierta especificidad de hospedador. Así, por ejemplo, los antígenos fimbriales que expresan las estirpes que originan diarrea en el hombre son distintos de los que expresan las cepas que producen diarrea en los animales. Y en estos últimos son diferentes las fimbrias expresadas por las cepas de origen porcino de las encontradas en las cepas procedentes de terneros y corderos, excepción hecha de las fimbrias F5 (K99) y F41 que se encuentran tanto en las cepas de ECET aisladas de los rumiantes como en las de origen porcino (Gaastra y De Graaf, 1982).

En las estirpes de ECET de origen animal se presentan fundamentalmente las cuatro fimbrias siguientes: F4, F5, F6 y F41. Algunas de las características de estas fimbrias, y de las encontradas en las cepas de origen humano, se detallan en la tabla 1. La primera fimbria descrita, hallada en cepas de E.coli procedentes de cerdos con enteritis, fue la F4 (K88) (Orskov et al., 1961). Más tarde se describieron la F5 (K99), en cepas enterotoxigénicas de terneros y corderos (Smith y Linggod, 1972), la F6 (987P), en estirpes de ECET de cerdos que no expresaban la F4 (K88) (Nagy et al., 1976 y 1977), y la F41, que se encontró en la cepa de origen bovino B41 conjuntamente con la F5 (K99) (Morris et al., 1980a). Posteriormente, se aisló una mutante de esta cepa (B41m) que sólo expresa la fimbria F41

(Morris et al., 1982). Las fimbrias F5 y F41 se presentan también en cepas de ECET de origen porcino (Moon et al., 1977 y Morris et al., 1983a, respectivamente). De la fimbria F4 se conocen tres variantes antigénicas: K88ab, K88ac y K88ad (Orskov et al., 1964, Orskov et al., 1977, Mooi y de Graaf, 1979).

Las fimbrias descritas en las cepas de ECET de origen humano se denominan CFA ("colonization factor antigens") (Levine, 1987). El primer factor de colonización fimbrial descrito en las cepas de ECET de origen humano se denominó CFA/I (Evans et al., 1975, 1978b). Más tarde se describió un segundo factor de colonización, antigénicamente distinto al anterior, el CFA/II (Evans et al., 1978a). Este segundo factor de colonización está formado por tres antígenos superficiales distintos, CS1, CS2 y CS3 (Cravioto et al., 1982, Smyth, 1982), que pueden expresarse en diferentes combinaciones (Smyth, 1982), si bien el CS3 está presente en todas las cepas de ECET que expresan el factor de colonización CFA/II (Levine, 1987). Más tarde se describieron los factores de colonización CFA/III (Honda et al., 1984) y CFA/IV, este último se halló en la cepa E8775 (Thomas et al., 1982). El CFA/IV, al igual que el CFA/II, está formado por tres antígenos superficiales distintos: CS4, CS5 y CS6 (McConnell et al., 1985).

I.4.1.1.3. Características comunes.

Las fimbrias son apéndices filamentosos superficiales de distribución peritrica en la superficie celular. Su diámetro oscila entre 2 y 7 nm. La morfología de las fimbrias puede ser como varillas rígidas de un diámetro de 7 nm aproximadamente (fimbrias), o como hebras ondulantes de un diámetro de 2 nm (fibrillas). La primera morfología la presentan la mayoría de las fimbrias de origen humano y la de origen porcino F6, mientras que la segunda la presentan la mayoría de las de origen animal (F4, F41) (Klemm, 1985).

Todas ellas son proteicas constituídas por subunidades cuyos pesos moleculares varían desde 14 a 31 kDa y suelen estar codificadas por plásmidos, excepto la F6 y la F41 que son de codificación cromosómica. Las fimbrias se expresan in vitro cuando las bacterias se cultivan a 37°C pero no cuando se hace a 18°C, y excepto la F6 poseen la capacidad de

aglutinar los eritrocitos de determinadas especies animales en presencia de D-manosa. La expresión de estos factores de colonización se asocia a determinados serotipos de ECET (Moon, 1990; Blanco *et al.*, 1991).

TABLA 1. Factores de colonización descritos en las estirpes de ECET

Antígeno fimbrial		Pm (Kda)	Diámetro (nm)	Origen
CFA/I (F2)		15,5	6-7	Humano
CFA/II (F3)	CS1	16,3	6-7	Humano
	CS2	15,3	6-7	Humano
	CS3	14,7	2-3	Humano
CFA/III		18	6-7	Humano
CFA/IV	CS4	17	6-7	Humano
	CS5	21	6-7	Humano
	CS6	14,5-16	2-3	Humano
K88 (F4)		23,5-26	2,1	Porcino
K99 (F5)		18,5	4,8	Porcino, bovino, ovino, caprino
987P (F6)		20	7	Porcino
F41		29,5	3,2	Porcino, bovino, ovino

En los últimos años se han encontrado nuevos antígenos fimbriales en cepas de ECET de origen porcino cuya intervención como factores de colonización todavía no se ha esclarecido completamente. Estos nuevos antígenos son el F42, encontrado en cepas productoras de STa (Yano *et al.*, 1986), el CS1541, descrito en cepas productoras de LT y STb del serotipo 08:KX105 (Broes *et al.*, 1988 y 1989), y el PCF0141, hallado en cepas enterotoxigénicas (STa⁺ STb⁺) del serotipo 0141:K85ab (Kennan y Monckton, 1990).

Las fimbrias F17, CS31A y F161, descubiertas también recientemente en cepas de origen animal, se tratan en el apartado dedicado a las estirpes de *E. coli* no-enterotoxigénicas.

I.4.1.1.4. Fimbrias encontradas en las cepas de ECET de origen ovino y caprino: F5 y F41

En las cepas de ECET que originan diarrea en los corderos se han detectado las fimbrias F5 (Smith y Lingood, 1972) y F41, esta última en asociación con la F5 (Woodward y Wray, 1990), mientras que en las cepas que producen diarrea en los cabritos se ha encontrado la F5 (Nagy *et al.*, 1987)

La fimbria F5 fue descrita por primera vez por Smith y Lingood en 1972 como un antígeno capsular (K) común a cepas enterotoxigénicas de terneros y corderos. Inicialmente se denominó Kco (Smith y Lingood, 1972) y posteriormente K99 (Orskov *et al.*, 1975). En los intentos iniciales de purificar esta fimbria a partir de la cepa enterotoxigénica B41 (Morris *et al.*, 1977) y de un *E. coli* K-12 que contenía el plásmido que la codifica (Isaacson, 1977) se obtuvieron resultados discrepantes atendiendo al punto isoeléctrico y a las propiedades hemaglutinantes en presencia de D-manosa del material purificado. Más tarde se comprobó que el material purificado a partir de la cepa B41 contenía dos componentes: uno catiónico y otro aniónico (Morris *et al.*, 1978b). La fimbria F5 se correspondía con el componente catiónico (Morris *et al.*, 1980a), mientras que el componente aniónico se identificó como una nueva fimbria, que se denominó F41 (Morris *et al.*, 1982).

La fimbria F5 está compuesta por subunidades proteicas de 18,5 kDa y con un punto isoeléctrico de 9,5. Observada por microscopía electrónica tiene una estructura fibrilar con un diámetro de 4,8 nm (De Graaf *et al.*, 1980). El antígeno F41 tiene un punto isoeléctrico de 3,2, está formado por subunidades proteicas de 29,5 kDa y posee una estructura fibrilar con un diámetro de 3,2 nm (Morris *et al.*, 1982). Ambas fimbrias poseen propiedades hemaglutinantes en presencia de D-manosa: la F5 aglutina los eritrocitos de caballo y oveja mientras y la F41 los de cobaya y humanos y débilmente los de caballo y oveja (De Graaf y Roorda, 1982).

Las cepas de ECET que expresan la fimbria F5 se adhieren y colonizan el intestino tanto de terneros y corderos (Smith y Lingood, 1972; Isaacson *et al.*, 1978; Morris *et al.*,

1982) como de cerdos (Smith y Huggins, 1978; Morris et al., 1982). Aunque el papel de la fimbria F41 como factor de colonización está menos definido (Moon, 1990), debido a que la mayoría de las cepas de ECET que lo expresan lo hacen conjuntamente con la F5 o poseen el gen que codifica a esta última (Moseley et al., 1986). En estudios experimentales se ha demostrado que la cepa de origen porcino 1706 (0101:F41), que expresa la fimbria F41 pero no la F5 in vivo, coloniza el epitelio intestinal y produce diarrea en corderos (Morris et al., 1983b).

La colonización promovida por las fimbrias F5 y F41 tiene lugar en la parte posterior del intestino delgado, yeyuno e íleon, de terneros, corderos y cerdos (Smith y Lingood, 1972, Isaacson et al., 1978, Morris et al., 1982, Smith y Huggins, 1978), a diferencia de las cepas que expresan la fimbria F4 que colonizan el intestino delgado anterior de los cerdos (Hohmann y Wilson, 1978, Smith y Halls, 1967a). Esto parece deberse, más que a la distribución de receptores en el intestino, a las condiciones de bajo pH de la parte anterior del intestino que inhiben la expresión de las fimbrias F5 y F41 pero no la de la F4 (Francis et al., 1989).

La capacidad de las cepas de ECET que expresan el antígeno fimbrial F5 de inducir diarrea se restringe a los 4-5 primeros días de vida tanto en terneros y corderos (Smith y Halls, 1967a) como en lechones (Runnels et al., 1980). Esta restricción a los primeros días de vida ha sido comprobada experimentalmente en corderos (Tzipori et al., 1981a, Wray et al., 1984).

La expresión de las fimbrias F5 y F41, al igual que la del resto de las fimbrias descritas como factores de colonización en los animales domésticos, se asocia a un número reducido de serogrupos (Gaastra y de Graaf, 1982). Las estirpes de ECET que producen diarrea en los terneros y corderos pertenecen a los mismos serotipos (Sojka, 1971). La expresión de la fimbria F5 en las cepas de ECET de origen bovino se asocia a los serogrupos 08, 09, 020 y 0101 (Orskov et al., 1975; Moon et al., 1976; Myers y Guinée, 1976; Acres et al., 1977; Isaacson et al., 1978; Guinée y Jansen, 1978; Larivière et al., 1979; Mainil et al., 1990). Las cepas de los serogrupos 09 y 0101 suelen expresar conjuntamente las fimbrias F5

y F41, mientras que las de los serogrupos 08 y 020 expresan sólo la F5 (Mainil *et al.*, 1990).

Las cepas de ECET de origen porcino que expresan los antígenos fimbriales F5 y F41 pertenecen igualmente a los serogrupos 08, 09, 020 y 0101, y al serogrupo 064 que expresa ambos conjuntamente (Fairbrother *et al.*, 1988b, Söderlind *et al.*, 1988, Blanco *et al.*, 1991).

La expresión del antígeno F5 guarda una estrecha correlación con la capacidad enterotoxigénica de las cepas que lo expresan (Guinee y Jansen, 1979, Lariviere *et al.*, 1979, Sherwood y Snodgrass, 1983). Las cepas de ECET que expresan la fimbria F5 y/o la F41 producen la enterotoxina termoestable STa, que puede estar codificada por el mismo plásmido que codifica la fimbria F5 o por un plásmido independiente (Harnett y Gyles, 1985).

I.4.1.2. Enterotoxinas

Las cepas de ECET que originan diarrea en el hombre y en los animales producen enterotoxinas que alteran el transporte intestinal de agua y electrolitos (Holgren, 1985). En función de su estabilidad al calor las enterotoxinas se clasifican en dos grupos: termolábiles (LTs), que se inactivan con un tratamiento a 60°C durante 30 minutos, y termoestables (STs), que no se inactivan a 100°C durante 30 minutos. Las características de estas enterotoxinas se resumen en la tabla 2.

I.4.1.2.1. Enterotoxinas termolábiles (LTs)

La LT clásica, hoy denominada LT-I, es una proteína de elevado peso molecular (85.000-90.000 Da), inmunogénica y funcionalmente relacionada con la toxina del Vibrio colera (CT) (Richards y Douglas, 1978; Spangler, 1992). Sin embargo, a diferencia de la CT está codificada por un plásmido (So *et al.*, 1978; Dallas *et al.*, 1979).

La LT, al igual que la CT, actúa sobre los enterocitos activando la adenilato ciclasa, lo que produce un aumento de AMPc y como consecuencia un aumento neto de la secreción de agua y electrolitos a la luz intestinal (Evans *et al.*, 1972; Moss y Richardson, 1978; Gill

y Richardson, 1980). La LT y la CT están formadas por una subunidad A y cinco subunidades B (Gill *et al.*, 1971). La toxina se une a través de las subunidades B a los receptores GM1 gangliósido de la membrana de los enterocitos (van Heyningen, 1974; Moss *et al.*, 1979). A continuación, la subunidad A penetra en los enterocitos y se libera el fragmento A1 que se une al NAD y cataliza la ribosilación del ADP provocando el aumento de concentración intracelular del AMPc (Gill y Richardson, 1980).

Se conocen dos variantes de la LT clásica o LT-I: la LTh, de origen humano, y la LTp, de origen animal. Estas variantes presentan algunas diferencias antigénicas y genéticas (Honda *et al.*, 1981; Finkelstein *et al.*, 1987b) pero tienen prácticamente la misma estructura molecular, idéntica a la de la CT (Sixma *et al.*, 1991), y ambas se neutralizan con el suero preparado frente a la toxina del cólera (Honda *et al.*, 1981; Clements *et al.*, 1982; Geary *et al.*, 1982; Belisle *et al.*, 1984a y b; Finkelstein *et al.*, 1987a).

En 1983 se descubrió un nuevo tipo de enterotoxina termolábil, que, aunque tenía una estructura y una actividad biológica semejantes a la LT clásica, no se neutralizaba con el suero producido frente a la toxina del cólera ni con los sueros anti-LTh o anti-LTp (Green *et al.*, 1983; Guth *et al.*, 1986a). Esta enterotoxina se denominó LT-II y la clásica pasó a denominarse LT-I (Pickett *et al.*, 1986). Se han descrito dos variantes antigénicas de la LT-II: LT-IIa y LT-IIb (Guth *et al.*, 1986b, Holmes *et al.*, 1986), que a diferencia de las LT-I están codificadas por genes cromosómicos (Pickett *et al.*, 1986). La LT-IIa se ha purificado e identificado como una proteína de 87.000 Da de peso molecular formada por una subunidad A y cinco subunidades B (Holmes *et al.*, 1986).

Las LT-I y las LT-II producen el mismo efecto citopático en las células adrenales Y-1, caracterizado por redondeamiento de las células, y activan la adenilato ciclasa en cultivo celular (Holmes *et al.*, 1986; Pickett *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1987).

La LT-I la producen fundamentalmente las cepas de ECET de origen humano y las de origen porcino que expresan el antígeno fimbrial F4 (Gaastra y De Graaf, 1982; Levine, 1983). También se ha descrito la producción de LT-I ocasionalmente en cepas de ECET

aisladas de rumiantes (Mainil *et al.*, 1986), sin embargo, no se ha demostrado la patogenicidad de estas cepas en los rumiantes. En algunas cepas de ECET de rumiantes también se ha descrito la producción de LT-II (Sherwood *et al.*, 1983; Blanco, 1991). Seriwatana *et al.* (1988), utilizando sondas de DNA, comprobaron que la mayoría de las cepas de origen humano que originaban redondeamiento de las células Y-1 producían LT-I, mientras que las de origen bovino producían LT-II. No obstante, la intervención de las LT-II en la patogenia de la diarrea todavía no se ha establecido.

TABLA 2 . Características de las enterotoxinas de los ECET de origen humano y animal

		LTs		STs	
		LT-I	LT-II	ST-I (STa)	ST-II (STb)
Peso molecular (Kda)		85-90	87	1,9	5
Inmunogenicidad		Sí		Haptenos	
Codificación		Plasmídica	Cromosómica	Plasmídica	Plasmídica
Subunidades		A(1):B(5)	A(1):B(5)	No	No
Receptores		Gangliósido GM1		Desconocidos	
Acción molecular		Adenilato ciclasa		Guanilato ciclasa	Desconocida
Efecto molecular		Aumento AMPc		Aumento GMPc	Desconocido
Actividad intestinal		Hipersecreción			
Actividad biológica	Asa intestinal ligada	Cerdos lactantes y detetados, conejos		Cerdos lactantes y conejos	Cerdos lactantes, destetados y conejos
	Ratones lactantes	No		Sí	No
Efecto citopático en líneas celulares		Y-1, CHO, VERO		No	
Neutralización con suero anti-CT		Sí	No		
Origen		Humano, porcino	Humano, bovino	Humano, Porcino, Bovino y ovino	Humano, Porcino
Asociación con antígenos fimbriales		F4	No	F5, F6, F41	F5, F6

I.4.1.2.2. Enterotoxinas termoestables (STs)

Las STs son toxinas de bajo peso molecular y resistentes a temperaturas de 100°C durante 30 minutos. Constituyen un grupo heterogéneo de toxinas que se clasifican atendiendo a su solubilidad en metanol y a su actividad en distintas especies animales en dos grupos: STa (ST-I) y STb (ST-II) (Burgess et al., 1978).

La STa es soluble en metanol y activa en el intestino de lechones y ratones recién nacidos (Gianella, 1976; Burgess et al., 1978). Existen dos formas genéticamente relacionadas pero distintas de STa: la STa-I (STI-P) y la STa-II (STI-H). La primera de ellas está compuesta por 18 aminoácidos y la producen las cepas enterotoxigénicas de origen humano y animal (Moseley et al., 1983b; Sekizaki et al., 1985). La STa-II se compone de 19 aminoácidos y solamente la producen las cepas de origen humano (Moseley et al., 1983a). La STa actúa activando el enzima guanilato ciclasa lo que produce un aumento de la concentración intracelular de GMPc y, como consecuencia, un aumento neto de la secreción de agua y electrolitos a la luz intestinal. (Guerrant et al., 1980; Deyfrus et al., 1984).

La STa la producen cepas de ECET que expresan los antígenos fimbriales F5 y/o F41 y F6 (Gaatra y De Graaf, 1982).

La STb o metanol insoluble es activa en cerdos destetados pero no en el ratón lactante (Burgess et al., 1978). Se compone de 71 aminoácidos y se ha detectado exclusivamente en cepas de ECET de origen porcino (Lee et al., 1983; Pickett et al., 1983). Su mecanismo de acción se desconoce.

I.4.2. Patogenia

Los recién nacidos se infectan por vía oral en las primeras horas de vida a partir del ambiente contaminado, fundamentalmente los pezones de la madre o las tetinas de lactancia artificial. Las bacterias se adhieren a la mucosa intestinal a través de las fimbrias, para las que existen receptores específicos en los enterocitos, evitando así su eliminación con el flujo

intestinal por los movimientos peristálticos (Moon et al., 1979; Cheney et al., 1980). La colonización en los rumiantes tiene lugar en el intestino delgado posterior, fundamentalmente en yeyuno e íleon (Isaacson et al., 1978, Morris et al., 1982).

Las bacterias se multiplican intensamente y elaboran las enterotoxinas (en el caso de las cepas de ECET de rumiantes la STa). Las enterotoxinas se liberan a la luz intestinal y se unen a receptores específicos de los enterocitos. Los dos tipos de enterotoxinas alteran el transporte intestinal de agua y electrolitos produciendo un aumento neto de secreción a la luz intestinal. El movimiento de agua a través del epitelio intestinal se debe fundamentalmente a gradientes osmóticos creados por el transporte activo de electrolitos de un lado a otro de la membrana de los enterocitos. La LT actúa sobre la ATPasa produciendo un aumento de la concentración intracelular de AMPc. Este nucleótido es un mediador en la secreción intestinal que actúa estimulando la secreción de iones cloro, que arrastran osmóticamente agua en las criptas intestinales, e inhibiendo la absorción de cloro copulado al sodio en las células de las vellosidades intestinales. La STa aumenta la concentración intracelular de GMPc que actúa de igual modo que el AMPc. No obstante, el GMPc es menos efectivo que el AMPc estimulando la secreción en las criptas intestinales (Holgrem, 1985). La diarrea hipersecretora origina acidosis metabólica y choque hipovolémico.

I.4.3. Epizootiología

Al igual que el resto de los agentes participantes en el síndrome diarreico del recién nacido, las estirpes de ECET se transmiten por la vía fecal-oral. Los animales enfermos eliminan altas concentraciones de bacterias por las heces, a partir de las cuales se contagian directa o indirectamente otros animales sensibles. Las madres y los animales jóvenes sanos pueden actuar como portadores.

I.4.3.1. Receptividad.

Especie. Como se mencionó anteriormente, las cepas de ECET muestran cierta especificidad respecto del hospedador. Las cepas de ECET de origen porcino no reproducen

la enfermedad experimentalmente en los terneros y corderos (Smith y Halls, 1967a). Sin embargo, las estirpes de ECET de origen ovino producen diarrea en los terneros y viceversa (Smith y Halls, 1967a; Smith y Linggood, 1972). Esta especificidad se debe probablemente a la presencia o ausencia en la mucosa intestinal de las distintas especies de receptores específicos para los distintos antígenos fimbriales (Laux et al., 1986; Dean et al., 1989; Conway et al., 1990; Teneberg et al., 1990).

Las cepas de ECET de los rumiantes expresan los antígenos F5 y/o F41 y elaboran STa (Smith y Linggood, 1972; Isaacson et al., 1978; Sherwood et al., 1983; Mainil et al., 1986 y 1990; Woodward y Wray, 1990; Blanco, 1991; Woodward et al., 1992). Aunque se ha descrito el aislamiento de cepas de E. coli que expresan o portan los genes que codifican el antígeno F6 (Isaacson et al., 1978; Mainil et al., 1986 y 1990; Wray et al., 1992) y las toxinas LT y STb (Sherwood et al., 1983; Mainil et al., 1986 y 1990; Woodward et al., 1992) no se ha demostrado su patogenicidad para los rumiantes.

Edad. La resistencia a la infección aumenta con la edad. En los corderos se ha demostrado experimentalmente que las cepas de ECET originan diarrea en los 3-4 primeros días de vida (Tzipori et al., 1981; Wray et al., 1984), aunque los animales pueden infectarse a edades superiores.

Estado inmune. Los recién nacidos que no han recibido calostro o en los que la absorción de inmunoglobulinas calostrales ha sido insuficiente son más receptivos a la infección con ECET y al desarrollo de la diarrea. Experimentalmente se ha reproducido la diarrea inoculando por vía oral corderos recién nacidos que habían recibido calostro (Smith y Halls, 1967a; Smith y Linggood, 1972; Acres et al., 1975; Acres y Radostits, 1976; Sojka et al., 1978). Sin embargo, fueron necesarias dosis de 10^9 - 10^{10} UFC, concentraciones que probablemente no se dan en infecciones naturales (Acres, 1985). En los corderos privados de calostro dosis inferiores (10^3 - 10^5) inducían diarrea experimentalmente (Wray et al., 1981, 1984).

I.4.3.2. Prevalencia de la infección por ECET en corderos y cabritos

En las especies ovina y caprina son muy escasos los estudios epizootiológicos la participación de las estirpes de ECET en los procesos diarreicos de los recién nacidos. Como se expuso anteriormente, las cepas de ECET que originan diarrea en los pequeños rumiantes pertenecen a los mismos serogrupos y expresan los mismos factores de patogenicidad que las que producen diarrea en los terneros (Morris y Sokja, 1985; Wray y Morris, 1985; Woodward y Wray, 1990).

Aunque generalmente se considera que las estirpes de ECET son una importante causa de diarrea y mortalidad en los ovinos y caprinos (Kimberling, 1988), los escasos estudios etiológicos y epidemiológicos realizados en los pequeños rumiantes en estas especies, basados en la detección de los factores de patogenicidad (el antígeno F5 y la enterotoxina STa), indican que la prevalencia de la infección por cepas de ECET es relativamente baja. Nagy *et al.* (1983) en un estudio realizado en Hungría en ganado ovino detectaron el antígeno fimbrial F5 en el 5,7% de las cepas aisladas. Estos autores no estudiaron la producción de STa. Fassi-Fehri (1988), en Marruecos, detectó el antígeno F5 en el 10% de las cepas de origen ovino. No obstante, menos de la tercera parte de estas las F5⁺ eran productoras de STa. En Inglaterra, entre las cepas de origen ovino estudiadas por Wray *et al.* en el período comprendido entre 1986 y 1991, la frecuencia de detección del antígeno F5 varió del 16% en 1988 al 3,3% en 1990, aunque solamente el 1,5% del total de los aislados producía STa (Wray *et al.*, enviado a publicar).

En la especie caprina los escasos datos publicados indican que la prevalencia de la infección por ECET es mucho menor. En Francia, Yvore *et al.* (1984) no detectaron la fimbria F5 en ninguna de las cepas aisladas de los 2.137 cabritos estudiados y Nagy *et al.* (1987), en Hungría, tan sólo detectaron el antígeno F5 en 3 cepas aisladas de otros tantos cabritos, dos de los cuales estaban sanos.

En nuestro país, en los estudios realizados por Muñoz (1992) en la Comunidad de Castilla-Leon, de 276 cepas de E. coli aisladas de corderos y cabritos sanos y diarreicos

solamente una de origen ovino era productora de STa, a pesar de que un porcentaje relativamente elevado de las cepas eran fimbriadas.

I.4.4. Cuadro clínico y lesiones

La diarrea producida por las estirpes de ECET en los rumiantes suele iniciarse a las 24 horas de vida de los animales. El signo predominante es una diarrea acuosa de color amarillento a grisáceo, que se acompaña de depresión, anorexia, hipotermia e intensa deshidratación (Kimberling, 1988). La morbilidad puede ser muy alta y la mortalidad varía del 15 al 75% (Sojka et al., 1979). Sin tratamiento los animales mueren en 24-36 horas como consecuencia del choque hipovolémico y la acidosis metabólica descompensada (Holland, 1990).

Lo más característico en la necropsia de los animales es la ausencia de lesiones específicas (Sojka et al., 1979). El abomaso, el intestino delgado (especialmente el fleon) y el intestino grueso presentan un contenido líquido amarillento o grisáceo. La pared intestinal puede presentar congestión y los ganglios mesentéricos están aumentados de tamaño (Kimberling, 1988). Las lesiones histológicas también son mínimas, siendo lo más característico la observación de una capa de bacterias adheridas al borde del epitelio del yeyuno e ileon (Holland, 1990).

I.4.5. Diagnóstico

Puesto E. coli es un habitante normal del intestino, su aislamiento de las heces o del contenido intestinal de los animales afectados de diarrea no es suficiente para establecer el diagnóstico. Este se basa en la diferenciación de las cepas patógenas de las saprofitas. Las cepas de ECET que originan diarrea en los animales domésticos pertenecen a un número limitado de serotipos. Debido a ello, antes del descubrimiento de los factores de patogenicidad que poseen las estirpes capaces de originar diarrea, la diferenciación entre las cepas patógenas y comensales se hacía atendiendo a su serotipificación (Holland, 1990). En la actualidad el

diagnóstico se basa en la detección de los factores de patogenicidad.

I.4.5.1. Detección de las fimbrias

La mayoría de las cepas de ECET de los rumiantes expresan los antígenos fimbriales F5 y/o F41. La expresión de estos antígenos in vitro depende, al igual que para otras fimbrias, de la temperatura de incubación (se expresan a 37°C pero no a 18°C -Orskov et al., 1975, Burrows et al., 1976-), y de la composición del medio (Guinee et al., 1976). Los medios enriquecidos reprimen su expresión, especialmente aquellos que contienen el aminoácido alanina. El medio indicado para su expresión es el Minca IsoVitalax, un medio mínimo que reprime la expresión de la cápsula. Los antígenos F5 y F41 se detectan por aglutinación con sueros absorbidos, producidos frente a bacterias vivas, (Orskov et al., 1975; Moon et al., 1976) o con anticuerpos monoclonales (Morris et al., 1985b; Thoms y Roeder, 1988; Thoms et al., 1989).

Puesto que se ha demostrado una estrecha correlación entre la expresión del antígeno F5 y la producción de enterotoxinas (Guinee y Jansen, 1979; Lariviere et al., 1979, Sherwood et al., 1983), la detección del antígeno F5 se ha utilizado como un método indirecto de detección de las cepas de ECET en estudios epizootiológicos realizados en ganado bovino (Martel et al., 1981; Pohl et al., 1984; Contrepois et al., 1985; De Rycke et al., 1986), ovino (Nagy et al., 1983) y caprino (Yvore et al., 1984; Nagy et al., 1987).

Las fimbrias también pueden detectarse in situ en cortes histológicos de intestino utilizando anticuerpos marcados con fluoresceína o peroxidasa.

I.4.5.2. Detección de enterotoxinas

Los primeros métodos de detección de las LTs consistían en ensayos in vivo, como la inoculación en asa intestinal ligada de conejo (Moon et al., 1970). Posteriormente se utilizaron determinadas líneas celulares en las que las LTs, al igual que la CT, inducen un

efecto citotónico caracterizado por el redondeamiento celular: células adrenales Y1 (Sack y Sack, 1975), células de ovario de hamster chino CHO (Guerrant et al., 1974) y células de riñón de mono verde africano VERO (Sperirs et al., 1977).

En la actualidad la detección rutinaria de las LTs se realiza fundamentalmente por técnicas inmunológicas y, entre ellas, la más empleada es el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Holgrem y Svennerholmm, 1973 y 1978; Yolken et al., 1979; Honda et al., 1983; Svennerholm y Wiklund, 1983). Otras técnicas inmunológicas menos empleadas son la inmunohemólisis pasiva, la aglutinación con partículas de latex y el radioinmunoensayo (Evans y Evans, 1977, Greenberg et al. 1977, Brill et al., 1979, Towin et al., 1979, Serafim et al., 1981, Shah et al., 1982, Ito et al., 1983).

La prueba clásica para la detección de la STa es el ensayo biológico en ratones lactantes (Dean et al., 1972). Basandose en la capacidad de la STa de funcionar como hapteno al ligarla a una proteína portadora, se han descrito métodos inmunológicos para su detección. Se trata fundamentalmente de ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs), algunos de los cuales han sido comercializados, si bien, debido a su alto coste, todavía no suelen utilizarse rutinariamente en los estudios epidemiológicos en Veterinaria (Ronnberg et al., 1984; Lockwood y Robertson, 1984; Svennerholm y Lindblad, 1985).

La STb se detecta por el ensayo en asa intestinal ligada de cerdo, aunque en la actualidad se ha desarrollado un ELISA (Handl et al., 1988).

Recientemente se han construído sondas de DNA para la detección de las toxinas LT, STa y STb (Holland, 1990).

I.4.6. Prevención

En estudios experimentales realizados en terneros se ha comprobado la eficacia de la inmunidad pasiva, obtenida a través del calostro de madres vacunadas, para prevenir las infecciones por ECET (Myers et al., 1973; Newman et al., 1973). Asimismo, en infecciones

naturales se ha encontrado una reducción en la morbilidad y mortalidad de los terneros nacidos de madres vacunadas (Wilson y Jutila, 1975 a y b; Varga y Farid, 1975; Acres y Radostits, 1976; Myers, 1976).

La vacunación de las madres en el último tercio de la gestación induce la formación de anticuerpos frente a los antígenos fimbriales necesarios para la colonización intestinal por ECET. Estos anticuerpos presentes en el calostro ejercen un efecto protector local inhibiendo la adhesión de los ECET al epitelio intestinal (Nagy et al., 1978; Acres et al., 1979; Morris et al., 1980b; Acres, 1985; Jayappa et al., 1985).

Los tipos de vacunas desarrollados frente a la infección por ECET incluyen bacterinas que contienen una mezcla de los serotipos más frecuentemente asociados a la diarrea de cada especie animal y preparados conteniendo los antígenos fimbriales purificados. En las primeras la protección inducida se atribuye no sólo a la formación de anticuerpos frente a los antígenos fimbriales sino también a los producidos frente a los antígenos somáticos y capsulares (Tzipori, 1985).

En condiciones de campo, sin embargo, la vacunación no siempre ha dado buenos resultados (Soderlind et al., 1982; Wray et al., 1985; Tzipori, 1985). Los fallos vacunales se atribuyen a la etiología multifactorial del síndrome diarreico del recién nacido, a que las estirpes de ECET implicadas en un brote pueden expresar factores de virulencia distintos de los vacunales y a que la vacunación con determinados antígenos puede ejercer una presión selectiva que determine la emergencia de estirpes de ECET que expresen otros antígenos.

El tratamiento antibiótico de los animales infectados experimentalmente con cepas de ECET reduce la mortalidad y la duración de la diarrea (Bywater, 1977). Sin embargo, en condiciones de campo la antibioterapia ejerce un escaso efecto beneficioso debido, además de a las posibles resistencias, a la etiología multicausal del síndrome y a la influencia que ejercen los factores medio ambientales y de manejo en el desarrollo de estos procesos (Wray y Morris, 1985). El control de los brotes debe incluir un tratamiento sintomático y medidas higiénicas (Roussel y Brumbaugh, 1991).

I.5. E. COLI NO-ENTEROTOXIGENICO

Bajo la denominación genérica de E. coli no enterotoxigénicos se incluyen en medicina veterinaria un grupo heterogéneo de cepas de E. coli capaces de originar diarrea o septicemia en los animales domésticos y que, lógicamente, no poseen los mecanismos de patogenicidad de las cepas enterotoxigénicas (Okerman, 1987, Holland, 1990) (Ver el apartado dedicado a la clasificación de las cepas de E. coli productoras de diarrea).

En el ganado bovino, al igual que en el hombre, se han encontrado determinadas estirpes de E. coli que se adhieren íntimamente a la mucosa intestinal originando la lesión histológica de borrado (Cantey y Blake, 1977; Chanter et al., 1984; Moxley y Francis, 1986; Popsichil et al., 1987; Janke et al., 1989). Estas estirpes, que se asocian a diarrea y disentería (Chanter et al., 1984 y 1986; Hall et al., 1985; Schoonderwoerd et al., 1988; Pearson et al., 1989; Wray et al., 1989), reproducen las lesiones y la enfermedad en infecciones experimentales en terneros gnotobióticos y privados de calostro (Hall et al., 1985; Schoonderwoerd et al., 1988; Wray et al., 1989). Este grupo de estirpes se conoce como E. coli "attaching-effacing" (ECEA).

Asimismo, en los animales domésticos se han encontrado estirpes de E. coli que poseen determinados factores de patogenicidad relacionados con la capacidad de originar procesos entéricos. Algunas de estas cepas expresan fimbrias distintas de las clásicas, como la CS31A (Contrepolis et al., 1986), la F165 (Fairbrother et al., 1986) y la F17 (Pohl et al., 1984 y 1986; Contrepolis et al., 1985; Morris et al., 1987). Otras estirpes producen toxinas activas en cultivo celular: verotoxinas (Kashiwazaki et al., 1980; Blanco et al., 1983b; Dobrescu, 1983; Smith et al., 1983; Gonzalez y Blanco, 1985 y 1989; Sherwood et al., 1985; Mohammad et al., 1986; Baloda et al., 1987; Orskov et al., 1987; Blanco et al., 1988) y factores citotóxicos necrotizantes (Gonzales y Blanco, 1985; McLaren y Wray, 1986; De Rycke et al., 1987; Blanco et al., 1988). Estas estirpes toxigénicas se conocen como E. coli verotoxigénicos (ECVT) y E. coli productores de CNF o necrosantes (ECNT), respectivamente.

Algunos de estos grupos de E. coli están interrelacionados. Así, por ejemplo, la mayoría de las estirpes de ECEA producen verotoxinas aunque no parece que estas toxinas sean esenciales en la patogenia de la lesión (Tzipori et al., 1987, Hall et al., 1988).

Los mecanismos patogénicos de la mayoría de las cepas de E. coli no enterotoxigénicas se desconocen, como se desconoce también el grado de participación de estas estirpes en los procesos entéricos de los animales domésticos (Holland, 1990). En los corderos y cabritos se han descrito cepas de E. coli que originan la lesión de adhesión y borrado (Janke et al., 1989), cepas verotoxigénicas (Mohammad et al., 1986; Baloda et al., 1987) y cepas productoras de CNF (De Rycke et al., 1987). Sin embargo, hasta el momento son muy pocos los estudios realizados sobre la patogenicidad de estas estirpes y sobre su importancia relativa en la etiología de las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes.

A continuación se revisan los grupos de E. coli no enterotoxigénicos descritos en los rumiantes, haciendo especial referencia a los factores de patogenicidad que expresan.

1.5.1. E. coli "attaching-effacing" (ECEA)

Cantey y Blake, en 1977, describieron un brote de diarrea en conejos de laboratorio que se asoció con el serotipo 015:NM (RDEC-1). Estas cepas no enterotoxigénicas inducían en el intestino delgado y en el grueso una lesión histológica caracterizada por la apariencia festoneada irregular de la capa epitelial que los autores denominaron de adhesión y borrado ("attaching-effacing" en inglés). Las bacterias se adhieren estrechamente a las microvellosidades de los enterocitos originando su desaparición, seguida de descamación epitelial, atrofia de la vellosidad y diarrea por malabsorción. En estudios posteriores se comprobó que este tipo de infección estaba ampliamente extendida en los conejos lactantes y de cebo tanto en Europa como en Estados Unidos. Actualmente, las cepas de ECEA se consideran una importante causa de diarrea tanto en conejos lactantes como de cebo (Okerman, 1987; Peeters et al., 1988).

Posteriormente, la lesión típica se descubrió en terneros en diferentes países, el Reino

Unido (Chanter et al., 1984), Estados Unidos (Moxley et al., 1986) y Alemania (Popischil et al., 1987), y también en lechones, en corderos y en perros (Janke et al., 1989). Asimismo, se comprobó que determinadas cepas de los serotipos 05 y 0111, que se asocian a síndromes disentéricos en terneros (Chanter et al., 1984; Schoonderwoerd et al., 1988), originaban la lesión de adhesión y borrado tanto en infecciones naturales como experimentales (Hall et al., 1985; Chanter et al., 1986). Aunque estas cepas producen verotoxinas, estas toxinas no parecen ser esenciales en la patogenia de la lesión. En efecto, Tzipori et al. (1987) comprobaron en infecciones experimentales realizadas en cerdos gnotobióticos que la diarrea se asociaba a la lesión de adhesión y borrado pero no a la producción de VT. Asimismo, Hall et al. (1988) reprodujeron la lesión con cepas de E. coli no verotoxigénicas en cerdos gnotobióticos infectados experimentalmente. Este hecho parece confirmarse en al menos algunas infecciones naturales, puesto que se han aislado cepas de E. coli de terneros con diarrea que originan la lesión histológica pero no producen VTs (Pearson et al., 1989).

Estirpes de ECEA se han aislado de terneros de 2 días a 1 mes de edad (Hall et al., 1985; Janke et al., 1989) y de corderos de 1 semana (Janke et al., 1989). En los terneros afectados se produce disentería, caracterizada por diarrea mucosa y en algunos casos sanguinolenta (Chanter et al., 1984 y 1986; Janke et al., 1989). Los corderos en los que se ha descrito la lesión procedían de una explotación con un historial clínico de muertes por neumonía y diarrea (Janke et al., 1989). En la necropsia de los animales infectados naturalmente se observa, macroscópicamente, hiperemia del intestino y petequias, e incluso hemorragias, en la mucosa (Chanter et al., 1984; Hall et al., 1985) o, en algunos casos, un contenido intestinal amarillento y ausencia de sangre (Pearson et al., 1989). Las lesiones afectan al intestino grueso, fundamentalmente al ciego y al colon (Hall et al., 1985; Moxley y Francis, 1986; Mainil et al., 1987; Schoonderwoerd et al., 1988) pero también se han descrito infecciones naturales en las que las lesiones más graves se localizaban en el íleon (Pearson et al., 1989).

I.5.2. E. coli que expresan las fimbrias F17, CS31A y F165

En los últimos años se han descrito en cepas de E. coli enterotoxigénicas (ECET) y no enterotoxigénicas, aisladas de animales diarreicos, nuevos antígenos fimbriales que se han relacionado con la patogenicidad de las cepas que los expresan. Estas nuevas fimbrias son la F17 (Pohl et al., 1983; Contrepolis et al., 1985), la CS31A (Contrepolis et al., 1986; Girardeau et al., 1988) y la F165 (Pohl et al., 1986; Fairbrother et al., 1986).

El antígeno CS31A se describió originalmente en cepas de E. coli que originaban diarrea y septicemia en terneros (Contrepolis et al., 1986) y posteriormente en cepas enterotoxigénicas de origen bovino del serotipo 08:K85 que expresaban conjuntamente el antígeno F5 y producían STa (Girardeau et al., 1988).

La fimbria CS31A está formada por subunidades proteicas de 29 kDa y codificada por un plásmido de 105 MDa. Esta fimbria está inmunológica y estructuralmente relacionada con la F4 (Girardeau et al., 1988). Observada por microscopía electrónica muestra una estructura fibrilar de 2 nm de diámetro (Girardeau et al., 1988). Aunque las cepas de E. coli que expresan la fimbria hemaglutinan los eritrocitos de varias especies en presencia de D-manosa y se adhieren a las vellosidades intestinales de ternero in vitro, Girardeau et al. (1988) comprobaron que el antígeno purificado no presenta dichas propiedades hemaglutinantes ni adhesivas. Estos autores han sugerido que dichas características pueden deberse a otras adhesinas fimbriales codificadas por genes cromosómicos que estén presentes en las cepas de E. coli CS31A⁺ estudiadas por ellos. En estudios posteriores Korth et al. (1991) clonaron un fragmento de ADN que codifica un determinante antigénico relacionado con las fimbrias F4 y F41 y que media la expresión de la fimbria CS31A y comprobaron que la expresión de esta fimbria confiere a las bacterias la capacidad de adherirse a las células intestinales Henle 407 en cultivo celular y que, sin embargo, no interviene en la hemaglutinación manosa-resistente propia de las cepas de campo.

La inoculación oral de cepas de E. coli no enterotoxigénicas CS31A⁺ produce en terneros privados de calostro los síntomas de una septicemia hiperaguda, caracterizada por

neumonía, edema de los riñones y de la vesícula biliar y muerte en menos de 48 horas (Contrepois et al., 1986). No obstante, puesto que las cepas CS31A⁺ expresan igualmente otros antígenos fimbriales conocidos como factores de colonización (F5) u otros no caracterizados y con propiedades adhesivas, su papel como factor de patogenicidad en las enfermedades entéricas de los rumiantes está por determinar.

En cepas de E. coli del serogrupo 0115 se ha descrito el antígeno fimbrial F165 (Fairbrother et al., 1986). De este serogrupo se han aislado cepas enterotoxigénicas de cerdos con diarrea (Renault et al., 1978) y cepas no enterotoxigénicas asociadas a enteritis y septicemia en cerdos y terneros (Glantz et al., 1966 y 1967; Pohl et al., 1986; Fairbrother et al., 1989). Las cepas enterotoxigénicas del serotipo 0115:K"V165" producen STb y no expresan las fimbrias clásicas ni la F165 y, aunque colonizan el intestino delgado de cerdos privados de calostro infectados oralmente, no siempre inducen diarrea (Fairbrother et al., 1989). Sin embargo, cepas no enterotoxigénicas del mismo serotipo que expresan la fimbria F165 producen septicemia en cerdos infectados experimentalmente y se adhieren a la mucosa intestinal (Fairbrother et al., 1989).

El antígeno F165 tiene una estructura fibrilar con un diámetro de 5-8 nm y, en realidad, se trata de un complejo formado por dos subunidades proteicas de 19 y 17,5 kDa de peso molecular que se denominan, respectivamente, F165₁ y F165₂ (Fairbrother et al., 1988). La subunidad F165₁ es la responsable de las propiedades hemaglutinantes (Harel et al., 1992).

En estudios sobre la intervención de esta fimbria en la patogenia de la septicemia originada por las cepas que la expresan en cerdos gnotobióticos, Ngeleka et al. (1993) recientemente han comprobado que esta fimbria no interviene en la colonización de la mucosa intestinal ni en el paso desde el epitelio a la submucosa y posteriormente a los ganglios linfáticos. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que esta fimbria confiere a las bacterias la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en el torrente circulatorio.

El antígeno F17 se describió en cepas de E. coli aisladas de terneros diarreicos bajo

la denominación de FY en Francia (Girardeau et al., 1980) y de Att 25 en Bélgica (Pohl et al., 1982). Posteriormente se comprobó, por ensayos inmunológicos (Morris et al., 1985b) y por su composición aminoacídica (Lintermans et al., 1988a), que se trata del mismo antígeno.

El antígeno fimbrial F17 ha sido purificado y caracterizado como una proteína fimbrial formada por subunidades proteicas de 20 kDa de peso molecular y con un diámetro de 3-4 nm (Lintermans et al., 1988a). La expresión de esta fimbria confiere a las bacterias la capacidad de adherirse a los enterocitos de ternero in vitro, y esta adhesión se inhibe con el suero anti-F17. La fimbria purificada no aglutina en presencia de D-manosa los eritrocitos humanos (de los grupos A, B y O) ni los de ternera, oveja, pollo o cobaya (Lintermans et al., 1988a), a diferencia de las cepas de campo F17⁺ que suelen expresar hemaglutininas manosa-resistentes (Shimizu et al., 1987; Blanco, 1991).

La fimbria F17 se ha encontrado en cepas enterotoxigénicas (ECET) que expresan los antígenos fimbriales F5 y/o F41 y producen STa y en cepas no enterotoxigénicas (Pohl et al., 1984 y 1986, Contrepois et al., 1985, Morris et al., 1987). Inicialmente se describieron cepas productoras de STa que expresaban únicamente el antígeno F17 (Pohl et al., 1982), sin embargo, más tarde se comprobó que estas cepas enterotoxigénicas expresaban el antígeno F5 (Pohl et al., 1984b). Recientemente Gulati et al. (1992) han descrito en la India cepas aisladas de terneros diarreicos productoras de STa en el ensayo en ratón lactante que expresan el antígeno F17 y que, sin embargo, no expresan la fimbria F5 ni la F41.

Las cepas F17⁺ se aíslan de animales desde los primeros días de vida hasta un mes de edad. No obstante, las cepas de ECET que expresan la fimbria F17 se aíslan de terneros menores de tres días de vida (Contrepois et al., 1985, Morris et al., 1987).

La patogenicidad de las cepas de E. coli que expresan el antígeno F17 todavía no se ha determinado. La fimbria F17 parece contribuir en las estirpes de ECET que la expresan conjuntamente con la F5 y/o la F41 a la colonización del intestino delgado (Moon, 1990). En efecto, en infecciones experimentales se ha comprobado que la presencia de anticuerpos frente

a los antígenos F5 y F41 en el calostro no es suficiente para prevenir la infección por las cepas de ECET que expresan los antígenos F5, F41 y F17, mientras que la presencia de anticuerpos frente a las tres fimbrias parece conferir la protección suficiente (Contrepois y Guirardeau, 1985).

Por otro parte, las cepas no enterotoxigénicas F17⁺ se han asociado a diarrea y septicemia en terneros (Pohl *et al.*, 1984 y 1986). Estas cepas se aíslan en porcentajes superiores de animales diarreicos que de no diarreicos (Pohl *et al.*, 1984). Pohl *et al.* (1987) estudiaron 134 cepas de E. coli F17⁺ de varios países de Europa y Japón y encontraron que el 45% de las cepas producían aerobactina y presentaban resistencia al suero, dos factores de patogenicidad relacionados con la capacidad de las cepas de E.coli de originar septicemia. Además, recientemente se ha encontrado una cepa de origen bovino F17⁺ no enterotoxigénica ni verotoxigénica que produce la lesión de adhesión y borrado (Hall *et al.*, 1988).

Los serogrupos más frecuentes entre las cepas no enterotoxigénicas F17⁺ aisladas en distintos países europeos y en Japón son el 08, 09 y 0101, serogrupos a los que clásicamente pertenecen las estirpes de ECET de los rumiantes. Además, se han descrito los serogrupos 01, 011, 015, 017, 035, 078 y 086. No obstante, un número elevado de cepas no son tipificables (Morris *et al.*, 1987; Pohl *et al.*, 1987).

En nuestro país Blanco (1991) aisló cepas de E. coli F17⁺ de terneros diarreicos y sanos en un elevado porcentaje (20%). Ninguna de las cepas aisladas por este autor producía STa y solamente una producía LT y tres CNF2. Los serotipos más frecuentes fueron el 08, 09, 01,017, 023 y 0153.

I.5.3. E. coli verotoxigénicos (ECVT)

I.5.3.1. Verotoxinas (VTs)

Las verotoxinas, llamadas así porque tienen actividad citotóxica en las células Vero, fueron detectadas inicialmente en cepas de E.coli enteropatógenas (ECEP) aisladas de casos

de diarrea infantil (Konowalchuck et al., 1977).

Konowalchuck et al. (1977) detectaron la presencia de una toxina que destruía las células Vero en los filtrados de cultivos de la clásica cepa enteropatógena humana H30 (026:H11), de otras seis cepas aisladas de enteritis infantil, de una cepa asociada a diarrea en cerdos lactantes y de dos cepas aisladas de quesos. Ninguna de estas cepas producía LTs ni STs. El efecto citopático producido en las células Vero por 8 de estas 10 cepas se neutralizaba con el suero producido frente a la verotoxina de la cepa H30, pero no así el de las dos restantes.

O'Brien et al., en 1982, comprobaron que determinadas cepas de E. coli enteropatógenas para el conejo, que originaban la lesión de adhesión y borrado (Cantey y Blake, 1977), y varias cepas de ECEP de origen humano producían una toxina semejante a la de Shigella dysenteriae tipo 1, a la que denominaron toxina "shiga-like" (SLT). Al igual que la toxina de Shigella, la SLT era citotóxica para las células HeLa, enterotóxica en el asa intestinal ligada de conejo y letal y paralítica para el ratón. Además, su actividad se neutralizaba con el suero monoespecífico producido frente a la toxina Shiga. Más tarde se comprobó que las VTs y las SLTs eran las mismas toxinas (O'Brien et al., 1983).

Shigella dysenteriae origina en el hombre la denominada disentería bacilar. Esta bacteria es enteroinvasiva y elabora una toxina proteica, descrita por primera vez en 1903 como letal para el conejo. En los años 40 se comprobó que, además, era citotóxica para algunas líneas celulares de mamíferos, y en 1956 que era enterotóxica en asa intestinal ligada de conejo y paralítica y letal para el ratón y el conejo (O'Brien y Holmes, 1987).

Scotland et al. (1985) describieron en cepas del serotipo 0157, asociado al síndrome urémico hemolítico (HUS) y a la colitis hemorrágica (HC), un segundo tipo de VT (VT2) que no era neutralizable con el antisuero frente a la toxina shiga ni con el suero producido frente a la VT de la cepa H30. Los investigadores denominaron a esta última VT1 y VT2 a la descubierta por ellos. Quedaba demostrada, por lo tanto, la heterogeneidad de las VTs, lo cual ya había sido sugerido por Konowalchuck en 1977 cuando las describió por primera vez.

Stockbine *et al.* (1986) identificaron los dos fagos que codifican las toxinas VT1 (SLT-I) y VT2 (SLT-II) en la cepa 933 (0157:H7) y comprobaron que ambas toxinas eran citotóxicas para las líneas celulares Vero y HeLa, paralíticas y letales para el ratón y enterotóxicas en asa intestinal ligada de conejo.

Las cepas de *E. coli* de los serotipos asociados a la enfermedad de los edemas del cerdo producen una variante antigénica de la VT2, denominada VTe o SLT-IIv (Blanco *et al.*, 1983b; Smith *et al.*, 1983; Marques *et al.*, 1987), que no es citotóxica para las células HeLa y que es el anteriormente denominado principio de la enfermedad de los edemas (EDP) (McLeod y Gyles, 1990).

La VT1 (SLT-I) se ha purificado a partir de las cepas humanas H30 (026:H11) y 933 (0157:H7) comprobándose que tiene una estructura de subunidades idéntica a la de la toxina shiga, una subunidad A y cinco subunidades B. También el pI, la estabilidad al calor y las actividades biológicas eran idénticas a las de la toxina shiga, pero el peso molecular era distinto (O'Brien y La Veck, 1983). La composición aminoacídica y la secuencia de las subunidades A y B de ambas toxinas son similares pero no idénticas (Stockbine *et al.*, 1987 y 1987bis).

Head *et al.* (1988) purificaron la VT2 (SLT-II) a partir de la cepa humana E32511 (0157:H-). La VT2 presenta diferencias en sus actividades biológicas con la VT1: es menos activa en las células VERO y la dosis letal-50 para el conejo es mucho mayor. Además, inoculada en conejos produce una evidente cecitis hemorrágica, mientras que la VT1 origina una diarrea moderada no sanguinolenta. Downes *et al.* (1988) también purificaron la VT2 a partir de cepas del serotipo 0157:H7 encontrando que su punto isoeléctrico era 5,2, a diferencia del valor hallado (6,5) por Head *et al.* (1988). Por otra parte, Padhye *et al.* (1986) purificaron una VT a partir de la cepa 932 (0157:H7), aislada de un caso de colitis hemorrágica y de la que se había indicado que producía SLT-I y SLT-II. Esta VT no es neutralizable por el suero anti-toxina shiga, por lo que se supone que es una SLT-II. Sin embargo, la toxina purificada por estos autores no tiene estructura de subunidades y produce hemorragias en el colon de ratones inoculados intraperitonealmente (Padhye *et al.*, 1987).

El mecanismo de acción de estas toxinas en las células eucariotas se supone que es el mismo que el de la toxina shiga: las subunidades B se unen a un receptor glicolipídico GB3 (Lingood et al., 1987; Waddell et al., 1988), mientras que la subunidad A inhibe la síntesis proteica en las células eucariotas, probablemente por inactivación catalítica de la subunidad 60S de los ribosomas (O'Brien y Holmes, 1987).

I.5.3.2. E. coli verotoxigénicos (ECVT)

Se han aislado de cepas productoras de VTs (ECVT) tanto del hombre como de prácticamente todos los animales domésticos. En medicina humana se ha descrito la producción de VTs en cepas de ECEP (Konowalchuck et al., 1977; O'Brien et al., 1982) y en las cepas del serotipo 0157:H7, que están integradas en el grupo de ECEH y producen el síndrome urémico hemolítico (Karmali et al., 1985) y la colitis hemorrágica (Riley et al., 1982). También elaboran verotoxinas las cepas de los serotipos 0113:H21 (Jonhson et al., 1987) y 0111:NM (Marques et al., 1986) asociadas igualmente al síndrome urémico hemolítico.

En los animales domésticos se han aislado cepas de E. coli productoras de VTs de cerdos diarreicos y afectados por enfermedad de los edemas (Kashiwazaki et al., 1980 y 1981; Blanco et al., 1983b; Dobrescu, 1983; Smith et al., 1983 y 1988; Gonzalez y Blanco, 1985; Hampson et al., 1986), de terneros afectados de diarrea (Sherwood et al., 1985; Mohammad et al., 1985 y 1986; Orskov et al., 1987; Borczyk et al., 1987; Blanco et al., 1988 y Gonzalez y Blanco, 1989) y de disentería (Chanter et al., 1986; Moxley y Francis, 1986; Mainil et al., 1987), de corderos (Baloda et al., 1987; Dorn et al., 1989) y de cabritos (Mohammad et al., 1986).

Las cepas de ECVT de origen bovino producen VT1 (Sherwood et al., 1985; De Rycke et al., 1987) y VT2 (Smith et al., 1988) aunque no se ha descrito la expresión conjunta de ambas toxinas por una misma cepa.

Aunque el serotipo más frecuente de las cepas de ECVT de origen humano es el

0157:H7, se ha demostrado la producción de VTs en al menos 29 serogrupos distintos (Levine *et al.*, 1987; Smith y Scotland, 1988). El serotipo 0157:H7 se ha aislado de terneros con diarrea (Orskov *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1988; Gonzalez y Blanco, 1989), de carne fresca (Doyle y Schoeni, 1987) y de leche no pasteurizada (Borzcyk *et al.*, 1987), por lo que se considera que el ganado bovino podría actuar de reservorio de estas cepas patógenas para el hombre. Sin embargo, el serotipo 0157:H7 también se ha aislado de productos de origen porcino, ovino y aviar (Doyle y Schoeni, 1987), por lo que es posible que estos animales actúan también como reservorio (Karmali, 1989).

Las cepas de ECVT de origen bovino pertenecen al menos a 13 serogrupos diferentes, entre ellos algunos como el 026, el 0111 (Sherwood *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1988), el 0128 y el 0157 (Orskov *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1988; Gonzalez y Blanco, 1989) se han encontrado también en cepas humanas. No obstante, un porcentaje relativamente elevado de cepas de ECVT aisladas de rumiantes no son tipificables (Sherwood *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1988; Gonzalez y Blanco, 1989).

I.5.3.3. Asociación con la enfermedad

El papel jugado por las verotoxinas como factores de patogenicidad en las estirpes de *E. coli* que producen distintos procesos patológicos tanto en el hombre como en los animales domésticos no está totalmente esclarecido.

La producción de VTs es una característica común de los serotipos de *E. coli* implicados en el síndrome urémico hemolítico (HUS), la colitis hemorrágica (HC) y la púrpura trombótica trombocitopénica del hombre (Riley *et al.*, 1983; Karmali *et al.*, 1983 y 1985b, Pai *et al.*, 1984) y que constituyen el grupo denominado ECEH (Levine, 1987).

La inoculación de estas toxinas en conejos origina lesiones vasculares similares a las que se desarrollan en los pacientes con HUS y HC (Richardson *et al.*, 1987). La VT1 produce diarrea moderada y parálisis en conejos, mientras que la VT2 origina diarrea sanguinolenta como resultado de una intensa cecitis, clínica y anatomopatológicamente semejante a la colitis

hemorrágica del hombre (Head et al., 1988).

Por otra parte, las estirpes de ECEH poseen otras características comunes, distintas de la producción de VTs, como son la presencia de un plásmido de 60 MDa que codifica la expresión de un antígeno fimbrial que posiblemente media la adhesión a las células intestinales Henle 407 (Karch et al., 1987). Se ha observado, asimismo, que las cepas de ECEH se adhieren estrechamente a los enterocitos originando la lesión histopatológica de adhesión y borrado (Tzipori et al., 1986). Tzipori et al. (1987) investigaron experimentalmente en cerdos el posible papel jugado en la patogenia de la diarrea por el antígeno fimbrial codificado por el plásmido y por la VT comprobando que ni la VT ni la presencia del plásmido de 60 MDa eran necesarios para el desarrollo de la diarrea, sin embargo, esta se asociaba siempre con la presencia de la lesión histopatológica de adhesión y borrado.

La enfermedad de los edemas del cerdo se asocia a determinados serotipos de E. coli que producen una variante antigénica de la VT2 (VTe). La inoculación de la toxina reproduce la sintomatología clínica, caracterizada por edemas periféricos y trastornos nerviosos, y las lesiones vasculares características que son similares a las observadas en el HUS.

En estudios realizados en diferentes países se han encontrado frecuencias de aislamiento de cepas de ECVT de terneros diarreicos muy variables: 1% en Canadá (Mainil et al., 1987), 3% en Francia (De Rycke et al., 1987) y Reino Unido (Sherwood et al., 1985), 20% en España (Blanco et al., 1988; Blanco, 1991) y 28% en Sri-Lanka (Mohammad et al., 1985). No obstante, también se han aislado cepas de ECVT con elevada frecuencia de terneros sanos (Borczyk et al., 1987; Blanco et al., 1988; Blanco, 1991; Wells et al., 1991).

Chanter et al. (1984), en el Reino Unido, describieron un brote de disentería en terneros producido por una cepa de E. coli atípica (S102-9). Esta cepa pertenece al serotipo 05:K-:H-, es ureasa positiva y anaerogénica, reproduce la enfermedad en terneros gnotobióticos (Chanter et al., 1984) y origina la lesión histológica de adhesión y borrado en el colon y el recto (Hall et al., 1985). Posteriormente se comprobó que esta cepa de E. coli produce VT en las líneas celulares Vero y HeLa y origina la lesión de adhesión y borrado en infecciones

experimentales realizadas en terneros convencionales (Chanter et al., 1986).

En Canadá también se ha aislado una cepa verotoxigénica del serotipo 0111:NM de terneros con disentería en los que se observaban las lesiones de adhesión y borrado (Schoonderwoerd et al., 1988). La inoculación de esta cepa en terneros privados de calostro reprodujo la lesión característica pero no los síntomas de la enfermedad.

Mainil et al. (1987) reprodujeron las lesiones de adhesión y borrado pero no la diarrea en terneros privados de calostro infectados experimentalmente con cepas productoras de VT1 y VT2. Sin embargo, Wray et al. (1989) reprodujeron la enfermedad y las lesiones en terneros convencionales privados de calostro inoculados con cepas productoras de VT1 y VT2. Sin embargo, en los terneros que habían recibido calostro no consiguieron reproducir la enfermedad ni las lesiones.

1.5.4. E. coli productores de CNF (ECNT)

1.5.4.1. Factores citotóxicos necrotizantes.

El denominado factor citotóxico necrotizante (CNF), que origina multinucleación y agrandamiento de las células Vero y HeLa y necrosis en la piel de conejo, se describió por primera vez en cepas de E. coli aisladas de casos de enteritis infantil (Caprioli et al., 1983).

En los animales domésticos se han aislado cepas productoras de CNF de lechones afectados de diarrea, primero en España (Gonzalez y Blanco, 1985) y posteriormente en el Reino Unido (McLaren y Wray, 1986), y de terneros afectados de diarrea en Francia (De Rycke et al., 1987) y en España (Blanco et al., 1988).

Esta nueva citotoxina, hoy denominada CNF1, es una proteína de 115 kDa (Caprioli et al., 1984, De Rycke et al., 1989).

De Rycke et al., en 1987, describieron un tipo distinto de efecto citopático en célula

HeLa inducido por los extractos sonicados de cepas de E. coli aisladas de terneros con diarrea y de la cepa de referencia del plásmido Vir (S5). Previamente se conocía que esta última cepa, aislada de un cordero con septicemia, producía una toxina letal para el ratón (Lopez-Alvarez et al., 1980; Smith, 1978). Este nuevo factor citotóxico, aunque es distinto, está inmunológicamente relacionado con el CNF descrito por Caprioli et al. y, dado que también induce necrosis en la piel de conejo (Blanco et al., 1988), se denominó CNF2, reservándose la denominación de CNF1 al descrito anteriormente. El CNF2 está codificado por el plásmido Vir de la cepa de referencia S5 (Oswald et al., 1989) y es una proteína de 110 kDa (Oswald et al., 1989; Oswald y Rycke, 1990).

I.5.4.2. Asociación con la enfermedad

La asociación de las cepas de ECNT con infecciones intestinales y extraintestinales en el hombre (Caprioli et al., 1983 y 1987; Alonso et al., 1987; Blanco et al., 1990; Cherefi et al., 1990) y en los animales domésticos (Blanco et al., 1985; McLaren y Wray 1986; De Rycke et al., 1987; Blanco et al., 1988) así como las propiedades necrotizantes y letales de los CNFs en animales de experimentación sugieren que estas nuevas toxinas podrían jugar un papel en la patogenicidad de las cepas que las producen.

Estudios experimentales realizados en corderos de 7 a 10 días de edad inoculados intravenosamente con la toxina purificada a partir de la cepa BM2-I, aislada de enteritis de terneros, demuestran que esta toxina es letal y neurotóxica para los corderos y que reproduce la sintomatología clínica de depresión y diarrea mucosa observada en terneros y las lesiones consistentes en congestión y hemorragias en el sistema nervioso central, necrosis coagulativa del miocardio e hipersecreción mucosa en el tracto gastrointestinal (De Rycke, 1990).

Estirpes de ECNT se han aislado con una frecuencia relativamente elevada de terneros diarreicos (De Rycke et al., 1987; Blanco et al., 1988) pero también de terneros sanos. Blanco (1991), en un estudio realizado en Galicia, aisló cepas de ECNT del 21% de los terneros afectados de diarrea y del 35% de los sanos, lo que, según el autor, podría indicar que las estirpes de ECNT forman parte de la flora normal del intestino del ganado bovino.

Las cepas de ECNT que se asocian con infecciones extraintestinales en el hombre generalmente producen CNF1, mientras que las estirpes de ECNT de origen bovino aislados de animales diarreicos, septicémicos y sanos generalmente producen CNF2 (Blanco *et al.*, 1988; Blanco, 1991). En los estudios realizados por Blanco *et al.* en Galicia, el 96% de las cepas de ECNT aisladas producían CNF2, mientras que únicamente el 4% producían CNF1 (Blanco *et al.*, 1988; Blanco, 1991). Estas últimas pertenecían a los mismos serotipos que las cepas de ECNT de origen humano (Blanco *et al.*, 1990), en tanto que las productoras de CNF1 pertenecían a 12 serogrupos distintos de los anteriores. No obstante, el 12% de las cepas resultó no tipificable. Estos investigadores encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la producción de CNF2 y la producción de colicinas, que es una de las características frecuentes de las cepas septicémicas de *E. coli* (Said *et al.* 1988), por lo que sugieren que las cepas de *E. coli* productoras de CNF2 podrían estar implicadas en los procesos septicémicos de los terneros recién nacidos hipogammaglobulinémicos (Blanco *et al.*, 1992b).

Recientemente Wray *et al.* (1989) han descrito un brote de disentería en terneros de 14 meses de edad asociado a una cepa hemolítica de *E. coli* del serotipo 02 productora de CNF y que expresa el antígeno fimbrial F6. Las lesiones observadas eran las de una colitis hemorrágica.

1.5.5. *E. coli* septicémicos.

Los factores de patogenicidad descritos en las cepas septicémicas de *E. coli* se relacionan con la presencia de plásmidos. Determinados plásmidos codifican la producción de colicina V (plasmidos Col. V), una proteína con actividad antimicrobiana producida por una elevada proporción de cepas de *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales del hombre y de los animales (Smith, 1974). La actividad que la colicina V pueda tener en células eucariotas ha sido poco estudiada.

La producción de colicina V se considera un marcador de patogenicidad. La actividad de la colicina V no es esencial para la acción patógena de las cepas de *E. coli* que la

producen (Binns *et al.*, 1979; Quakenbush y Falkow, 1979; Williams y Warner, 1980). No obstante, los plásmidos que codifican su producción codifican también otras propiedades que contribuyen a la patogenicidad de las cepas como la producción de aerobactina, el aumento de supervivencia en el suero, la resistencia a la fagocitosis, y la adherencia a células intestinales (Williams, 1979; Binns *et al.*, 1979; Braun, 1981; Clancy y Savage, 1981; Warner *et al.*, 1981). Algunos de los primeros estudios indican que las cepas productoras de colicina V poseen mayor capacidad de sobrevivir y colonizar el intestino (Smith y Huggins, 1978).

Los plásmidos que codifican la producción de colicina V constituyen un grupo heterogéneo en tamaño, composición genética, capacidad de conjugación y expresión de factores de patogenicidad. No todos codifican los factores de patogenicidad anteriormente mencionados. Excepto la producción de aerobactina, que es común a casi todos ellos, la frecuencia y combinación de los otros fenotipos entre los plásmidos Col. V se desconoce (Waters y Crosa, 1991).

Recientemente Fernandez-Beras *et al.* (1990) han comprobado que el genotipo colicina V es predominantemente cromosómico en las cepas de *E. coli* de origen humano aisladas de proceso diarreicos y predominantemente plasmídico en las aisladas de infecciones extraintestinales.

La aerobactina es un sistema de captación de hierro (Stuart *et al.*, 1980; Williams y Warner, 1980) que está relacionado directamente con la virulencia de las cepas de *E. coli* capaces de originar infecciones extraintestinales (Williams, 1979). La concentración de hierro disponible en los líquidos extracelulares de los vertebrados es muy inferior a los requerimientos nutricionales de las bacterias (Martinez *et al.*, 1990). Aunque las cepas de *E. coli* producen una enterobactina, que es también un agente quelante del hierro, se supone que la producción de aerobactina confiere a las cepas de *E. coli* que la producen una ventaja selectiva para multiplicarse en condiciones restrictivas de concentración de hierro (Der Vartanian, 1988, Ford *et al.*, 1988). La aerobactina, a diferencia de la enterobactina, se recicla después de la liberación del hierro en el interior de las células (Braun *et al.*, 1983; Williams y Carboneti, 1986).

Al igual que la colicina V, la producción de aerobactina en algunas cepas de E. coli está codificada por genes cromosómicos (Valvano y Crosa, 1984; Marolda et al., 1987).

Además del plásmido col. V, Smith (1974) describió otro plásmido independiente, denominado plásmido Vir, que codifica la producción de una toxina letal y de un antígeno superficial (Lopez-Alvarez y Gyles, 1980). La transferencia del plásmido Vir por conjugación confiere a las cepas receptoras las propiedades letales atribuidas a la toxina Vir (Smith, 1974). Las cepas que poseen el plásmido Vir producen la muerte por septicemia de los terneros convencionales privados de calostro (Smith, 1978). El plásmido Vir es mucho menos común entre las cepas de E. coli que los plásmidos Col. V y solamente se ha detectado en cepas de E. coli aisladas de terneros y corderos (Wray y Morris, 1985). La toxina Vir induce alteraciones morfológicas en las líneas celulares Vero y Hela y es probablemente idéntica al denominado CNF2 (Oswald et al., 1989; Oswald y De Rycke, 1990).

La septicemia colibacilar afecta generalmente a los terneros y corderos hipogammaglobulinémicos. En los corderos suele presentarse en animales de 2 a 3 semanas de vida y generalmente es de curso fatal. El proceso puede acompañarse de diarrea pero esta no es constante (Kimberling, 1988). Las estirpes septicémicas de E. coli pertenecen a un número limitado de serotipos siendo el más común en los terneros y corderos el 078:K80 (Wray y Morris, 1985).

I.6. PROPIEDADES HEMAGLUTINANTES DE E. COLI

Las primeras adhesinas descritas en cepas de E. coli fueron las hemaglutinantes (Guyot, 1908). Posteriormente se comprobó que la capacidad hemaglutinante se debía a determinados antígenos fimbriales presentes en la superficie celular (Duguid et al., 1955).

Las hemaglutininas se clasifican en manosa-sensibles (HAMS) y manosa-resistentes (HAMR) atendiendo a que la hemaglutinación que producen se inhiba o no en presencia del monosacárido D-manosa (Duguid et al., 1955). Una misma cepa puede expresar

hemaglutininas manosa-resistentes y manosa-sensibles.

La hemaglutinación manosa-sensible se corresponde con la presencia de las fimbrias tipo 1 (Duguid et al., 1955, Briton, 1959). Aunque estas fimbrias aglutinan los eritrocitos de diversas especies animales, generalmente se han utilizado los eritrocitos de cobaya para su estudio (Hirsh, 1985).

A diferencia de las fimbrias tipo 1, la mayoría de las fimbrias que actúan como factores de colonización aglutinan los eritrocitos de una o generalmente varias especies animales en presencia de D-manosa (Jones y Rutter, 1974; Orskov et al., 1975; Tixier y Gouet, 1975; Burrows et al., 1976; Evans et al., 1977; Orskov y Orskov, 1977; Morris et al., 1977 y 1978; Smyth et al., 1979; Thorne et al., 1979; Back et al., 1980; Levine et al., 1980; Deneke et al., 1981; De Graaf y Roorda, 1982), lo que permite clasificarlas en distintos modelos de hemaglutinación (Evans et al., 1979 y 1980; Blanco et al., 1985, Gonzalez y Blanco, 1985b; Bijlsma y Frink, 1987).

No obstante, algunas de las fimbrias descritas, como la F6, no tienen actividad hemaglutinante (Isaacson y Richter, 1981). La fimbria CS31A purificada tampoco tiene actividad hemaglutinante, aunque las cepas de campo que la expresan suelen ser hemaglutinantes. Se supone que estas cepas expresan además otros antígenos, probablemente fimbriales, que son los responsables de dicha actividad (Girardeau et al., 1988, Korth et al., 1991). Asimismo, la fimbria F17 purificada no tiene actividad hemaglutinante manosa-resistente (HAMR) (Lintermans et al., 1988a), aunque sí suelen tenerla las cepas de campo que la expresan (Shimizu et al., 1987, Blanco et al., 1991).

El estudio de la actividad HAMR ha permitido detectar nuevos antígenos superficiales, todavía no caracterizados, en cepas de E. coli de origen animal aisladas de procesos diarreicos. Así, por ejemplo, De Avila et al., (1988) en Brasil describieron un antígeno superficial en cepas de E. coli aisladas de cebús afectados de diarrea que hemaglutinaba los eritrocitos de oveja, cerdo y caballo en presencia de D-manosa y tenía una estructura fimbrial de 2-3 nm de diámetro observado por microscopía electrónica. También en Brasil, Yano et

al., (1988) encontraron en cepas verotoxigénicas de origen bovino, que mostraban actividad HAMR con eritrocitos humanos del grupo A, un antígeno que denominaron factor de adherencia EAF-44. Las bacterias que lo expresaban se adherían difusamente a las células Hep-2 y, observadas por microscopía electrónica, mostraban en su superficie estructuras semejantes a las fimbrias. Recientemente, Varga (1991) han descrito otro antígeno fimbrial en cepas de E. coli aisladas de terneros diarreicos que hemaglutinaban en presencia de D-manosa los eritrocitos de ternera.

Blanco et al. (1988) comprobaron que una elevada proporción de cepas productoras de CNF tenían actividad HAMR y recientemente han indicado que cepas de E. coli productoras de CNF2 expresan un antígeno (B23) distinto del pilus *Vir* (Blanco et al., 1992b).

La expresión de hemaglutininas manosa-resistentes, sin embargo, no siempre se corresponde con la presencia de estructuras fimbriales (Duguid et al., 1955 y 1978; Ip et al., 1981). Se han descrito adhesinas de naturaleza proteica manosa-resistentes que son no fimbriales (Labigne-Roussel et al., 1984; Williams et al., 1984; Nowiki et al., 1990; Aubel et al., 1991). En estudios de inmunomicroscopía electrónica se ha observado que algunas de estas adhesinas no fimbriales rodean a las bacterias a modo de cápsulas (Orskov et al., 1985; Goldhar et al., 1987; Kroncke et al., 1990; Jann y Hoschutzky, 1990) y ha propuesto denominarlas "capsulas proteicas adhesivas" (Orskov et al., 1985). No obstante, Orskov et al. (1985) han sugerido que algunas de estas cápsulas podrían estar constituidas por fibrillas muy finas y abundantes. Recordemos que algunas de las fimbrias conocidas se describieron inicialmente como sustancias amorfas que rodeaban a las células. Este es el caso del antígeno CS3 que forma parte del complejo CFA/II (Cravioto et al., 1982; Smyth, 1982) y que, aunque inicialmente se describió como no fimbrial (Mullany et al., 1983), tiene una estructura fibrilar con un diámetro de 2 nm (Levine et al., 1984). Igualmente, la fimbria F4 de origen porcino se describió originalmente como una masa de finos filamentos (Stirm et al., 1967) y posteriormente como fibrillas de 2 nm de diámetro (Gaastra y De Graaf, 1982). Las estructuras de estas dimensiones no son fáciles de observar con las técnicas de tinción ordinarias utilizadas en microscopía electrónica.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La explotación de ganado ovino y caprino tiene una gran importancia dentro de la producción ganadera en España. Los factores que condicionan la productividad de las explotaciones ovinas y caprinas son múltiples y, entre ellos, cabe destacar la incidencia de procesos infecciosos y parasitarios.

Entre los procesos patológicos que afectan a los corderos y cabritos recién nacidos, las gastroenteritis infecciosas son los más frecuentes y los que ocasionan mayores pérdidas económicas. La etiología de estos procesos es multifactorial y pluricausal. En su presentación y evolución intervienen, además de las variaciones individuales de los animales y de los factores ambientales y de manejo, múltiples agentes infecciosos, entre los que se incluyen bacterias, virus y parásitos, que pueden presentarse en infecciones simples o mixtas.

El conocimiento de los enteropatógenos que puedan estar implicados en la etiología de los procesos diarreicos neonatales de los pequeños rumiantes, de la prevalencia e importancia relativa de cada uno de ellos e incluso de las interacciones que puedan existir entre los diferentes agentes es fundamental para orientar el diagnóstico y para establecer las medidas terapéuticas y profilácticas adecuadas.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios etiológicos y epidemiológicos sobre los procesos diarreicos neonatales de los terneros y lechones. Comparativamente, sin embargo, son muy escasos los estudios realizados en las especies ovina y caprina, de tal manera que, en general, tiende a asumirse que los agentes infecciosos implicados en las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes son los mismos que intervienen en este tipo de procesos en los terneros.

E. coli se ha considerado tradicionalmente una de las principales causas, sino la principal, de los procesos diarreicos neonatales de los corderos y cabritos. No obstante, al igual que sucede con el resto de los enteropatógenos, la información disponible sobre su incidencia en los pequeños rumiantes y sobre las características de las estirpes implicadas es

muy limitada.

Este estudio, que forma parte de un proyecto más amplio sobre la etiología y la epizootiología de las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes, se planteo con el objetivo básico de investigar la participación de los diferentes grupos de estirpes de E. coli patógenos descritos hasta el momento en los animales domésticos. Ello implica considerar, por una parte, las estirpes de E. coli enterotoxigénicas (ECET), que son las mejor conocidas y prácticamente las únicas implicadas hasta el momento en las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes, y, por otra, las estirpes "no enterotoxigénicas", que constituyen un grupo heterogeneo cuyos mecanismos patogénicos se desconocen pero que se han asociado con proceso entéricos y septicémicos en los animales domésticos.

Para realizar el trabajo nos propusimos, junto con el equipo de la Dra. Gómez Bautista, estudiar un buen número de brotes diarreicos en explotaciones ovinas y caprinas ubicadas en la zona centro de España. De las muestras tomadas en los diferentes brotes se aislarían cepas de E. coli para su posterior caracterización.

La caracterización de las estirpes de ECET se basaría en la detección de fimbrias (F5 y F41) y de enterotoxinas (STa y LT). En las estirpes no enterotoxigénicas se investigarían distintas características que se han asociado con la patogenicidad de las cepas, como la producción de citotoxinas (verotoxinas y factores citotóxicos necrotizantes), la expresión de antígenos superficiales distintos de las fimbrias clásicas y la producción de colicinas.

Por otra parte, se investigaría la capacidad hemaglutinante de las cepas aisladas con los eritrocitos de distintas especies animales como un método indirecto de conocer sus propiedades adhesivas y de orientar el estudio de posibles nuevos antígenos superficiales, distintos de las fimbrias clásicas, que pudiesen estar relacionados con la capacidad de las cepas de colonizar tejidos del hospedador.

Por último, se estudiaría la sensibilidad de las cepas de E. coli a distintos antimicrobianos.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE CAMPO

Durante el período comprendido entre enero de 1989 y diciembre de 1991 se estudiaron diferentes brotes diarreicos de animales recién nacidos en explotaciones de ganado ovino y caprino. Las explotaciones estaban ubicadas en la zona centro de España, principalmente en la Comunidad de Madrid y en menor medida en las comunidades de Castilla-La Mancha y Castilla-León.

En la tabla 3 se especifica la localización de los brotes estudiados, el número de animales adultos que integraban cada rebaño, el número de animales menores de 4 semanas en el momento de la toma de muestras así como el número de animales de los que se recogieron muestras fecales en cada brote. Se estudiaron un total de 51 brotes diarreicos, 38 en explotaciones de ganado ovino y 13 en rebaños de caprino. En 17 de los brotes ovinos (correspondientes a 11 explotaciones) y en 8 de los caprinos (7 explotaciones) la toma de muestras fue realizada directamente por nosotros en las explotaciones. Dichas explotaciones figuran con un asterisco en la tabla 3. En el resto de los casos la toma de muestras fue realizada, siguiendo nuestras indicaciones, por los profesionales clínicos que además se encargaban de remitir las muestras a nuestro laboratorio el mismo día de su recogida.

En todos los casos se *recogió personalmente o a través de los profesionales clínicos* la información concerniente a las características clínicas del brote diarreico, las tasas de morbilidad y mortalidad de los animales menores de 4 semanas, características de la explotación, manejo de las animales, etc. En la figura 1 se muestra la ficha modelo utilizada para recabar dicha información.

Las muestras consistían en material fecal tomado directamente del recto de los animales muestreados. De cada animal se tomaban muestras para investigar la presencia de

los tres tipos posibles de enteropatógenos implicados: bacterias (E.coli), virus (rotavirus) y parásitos (Cryptosporidium sp.). Las muestras destinadas a los estudios bacteriológico y virológico se recogían con hisopos rectales estériles y las muestras utilizadas para el análisis parasitológico con un guante de plástico desechable. Con cada muestra se adjuntaba una ficha en la que se especificaban los datos del animal del que procedía: la especie (cordero o cabrito), la edad, el estado general, el aspecto de las heces, los tratamientos recibidos, etc. (ver fig. 1).

En los casos en que fue posible se realizó en nuestro laboratorio la necropsia de algunos de los animales con síntomas clínicos, previo sacrificio por exanguinación. En estos casos se recogieron muestras, también por triplicado, de distintas porciones intestinales y vísceras internas. El número de animales en los que se realizó la necropsia figuran entre paréntesis en la tabla 3.

DIARREAS NEONATALES DE PEQUEÑOS RUMIANTES					
CASO Nº: _____		FECHA: _____			
MUESTRAS: Dos hisopos rectales por cada animal. Animales de 0 a 15 días.					
REMITE: _____					
PUEBLO: _____					
EXPLOTACION: _____					
<u>Nº de animales</u>	<u>Actitud</u>	<u>Tipo</u>	<u>Ordeño</u>	<u>Lactancia</u>	<u>Paridera</u>
ovino _____	leche _____	intensivo _____	Manual _____	Materna _____	sincronizada _____
caprino _____	carne _____	extensivo _____	mecánico _____	artificial _____	no _____
Índice de fertilidad _____			<u>Alimentación de madres:</u>		
Mortalidad de recién nacidos _____			pastoreo _____	pienso _____	
Abortos _____			agua _____	medicaciones _____	
Antecedentes clínicos _____					
Vacunaciones: _____					
Tratamientos: _____					
Nº ANIMALES AFECTADOS: _____			Nº ANIMALES NACIDOS _____		
Nº ANIMALES MUERTOS: _____					
¿CUANTO TIEMPO HACE QUE EMPEZO LA DIARREA _____					
ENTRE QUE EDADES ESTAN LOS ANIMALES CON DIARREA _____					
MUESTRA Nº: _____					
Cordero _____ cabrito _____		Desde cuándo tiene diarrea? _____			
Edad _____		Ha tomado calostro? SI _____ NO _____ Antes de 12 horas? SI _____ NO _____			
Fiebre SI _____ NO _____		Estado general _____			
Mamitis madre SI _____ NO _____		Parto simple _____ gemelar _____			
<u>Aspecto heces</u>	<u>COLOR</u>	<u>OLOR</u>	<u>CONSISTENCIA</u>		
incolora _____	verdosa _____	inodora _____	acuosa _____		
blanquecina _____	sanguinolenta _____	ácido _____	semilíquida _____		
amarillenta _____	negruzca _____	pútrido _____	normal _____		
MUESTRA Nº: _____					
Cordero _____ cabrito _____		Desde cuándo tiene diarrea? _____			
Edad _____		Ha tomado calostro? SI _____ NO _____ Antes de 12 horas? SI _____ NO _____			
Fiebre SI _____ NO _____		Estado general _____			
Mamitis madre SI _____ NO _____		Parto simple _____ gemelar _____			
<u>Aspecto heces</u>	<u>COLOR</u>	<u>OLOR</u>	<u>CONSISTENCIA</u>		
incolora _____	verdosa _____	inodora _____	acuosa _____		
blanquecina _____	sanguinolenta _____	ácido _____	semilíquida _____		
amarillenta _____	negruzca _____	pútrido _____	normal _____		
MUESTRA Nº: _____					
Cordero _____ cabrito _____		Desde cuándo tiene diarrea? _____			
Edad _____		Ha tomado calostro? SI _____ NO _____ Antes de 12 horas? SI _____ NO _____			
Fiebre SI _____ NO _____		Estado general _____			
Mamitis madre SI _____ NO _____		Parto simple _____ gemelar _____			
<u>Aspecto heces</u>	<u>COLOR</u>	<u>OLOR</u>	<u>CONSISTENCIA</u>		
incolora _____	verdosa _____	inodora _____	acuosa _____		
blanquecina _____	sanguinolenta _____	ácido _____	semilíquida _____		
amarillenta _____	negruzca _____	pútrido _____	normal _____		

Figura 1. Ficha modelo utilizada para recoger la información concerniente a las características de cada brote diarreico estudiado.

TABLA 3. Brotes diarreicos estudiados.

LOCALIDAD	Nº adultos de la explotación	Nº animales menores de 4 semanas**	Nº animales muestreados
Brotos diarreicos en explotaciones ovinas			
<u>Madrid</u>			
Mesón de Braojos	100	30	8
Villanueva del Pardillo 1	-	80	43
Villanueva del Pardillo 2	600	-	4
Valdeolmos	950	60	5
Cenicientos 1	500	100	2
Villanueva del Pardillo 3*	500	-	23
Villanueva del Pardillo 3*	500	30	27
El Alamo*	460	180	4
Cenicientos 2*	500	100	8(1)*
Alcobendas*	550	30	7
Alcalá de Henares*	1100	540	15
Alcalá de Henares*	1100	-	39
Colmenar Viejo*	160	20	10
Villanueva del Pardillo 3*	500	40	12(1)
<u>Burgos</u>			
Pinilla de Barruecos	R	60	1
Hontoria del Pinar	R	160	2
Huerta Abajo	R	60	1
Navas del Pinar	R	150	1
Villahoz	100	120	2
<u>Segovia</u>			
Segovia	1000	100	5
Armuña*	600	30	6
Santiuste de S.J.Bautista*	-	180	10
Aldeasuena	250	60	3
Fuentesaúco de F.	250	50	2
Segovia	300	-	3
Adrados	500	-	1
Armuña	600	-	4
Aldea del Codonal	375	-	4
Fuentepiñel	350	130	6
Carbonero el Mayor	275	-	1
<u>Valladolid</u>			
Coceges del Monte	300	-	1
<u>Toledo</u>			
Puebla de Montalbán 1º*	-	250	50(1)
Puebla de Montalbán 2º*	-	-	22(2)
<u>Ciudad Real</u>			
Los Pozuelos de Calatrava*	2000	230	19
Los Pozuelos de Calatrava*	-	-	24(1)
<u>Cuenca</u>			
Mazarrulleque*	500	100	13
<u>Guadalajara</u>			
Molina de Aragón	50	6	1
<u>Albacete</u>			
Tinarejos*	8000	1000	37(2)
Nº de brotes: 38 (17*)		Nº de corderos: 426	

TABLA 3 (continuación). Brotes diarreicos estudiados.

LOCALIDAD	Nº adultos de la explotación	Nº animales menores de 4 semanas**	Nº animales muestreados
Brotos diarreicos en explotaciones caprinas			
<u>Madrid</u>			
San Mamés*	450	100	7
S.Martin de Valdeiglesias	200	-	1
Villanueva del Pardillo*	15	7	4
Pelayos de la Presa	200	6	1(1)
Robledo de Chavela*	270	248	12
Brunete	-	-	1
Robledo de Chavela	250	80	3
<u>Toledo</u>			
Navalermosa	150	60	4
Hormigos*	-	170	29
Talavera de la Reina*	200	-	18
Hormigos*	-	-	16
<u>Ciudad Real</u>			
Aproba de los Montes*	1200	80	30
La Solana*	500	50	16
Nº de brotes:13 (8 ^a)	Nº de cabritos:		142

* Explotaciones muestreadas directamente.

** En el momento de la toma de muestras.

- No se obtuvieron estos datos.

^a Entre paréntesis número de animales en los que se realizó la necropsia.

En los brotes estudiados se recogieron muestras fecales de animales desde las primeras horas hasta la cuarta semana de vida. No obstante, la mayoría de los animales estudiados se hallaban en las dos primeras semanas de vida debido a que la diarrea solía iniciarse entre los 4º-5º día y persistir hasta los 15º-21º día de vida de los animales.

La mayoría de las muestras recogidas procedían de animales afectados de diarrea, si bien, la clasificación en animales afectados se hacía atendiendo exclusivamente a la consistencia de las heces. En algunos casos, se recogieron muestras de animales en los cuales la consistencia de las heces no estaba alterada y se clasificaron como animales sanos. Generalmente, se trataba de animales en los primeros días de vida, es decir, menores de la edad en la que solía iniciarse el proceso diarreico en la explotación.

En la tabla 4 se resume el número total de animales de los que se recogieron muestras en los 51 brotes estudiados. Se obtuvieron muestras fecales de 568 animales: 426 corderos

y 142 cabritos. De los 426 corderos estudiados, 391 presentaban diarrea en el momento de la toma de muestras y los 35 restantes estaban sanos. De los 142 cabritos, 128 estaban afectados y los 14 restantes estaban sanos.

TABLA 4. Número de animales afectados y sanos de los que se obtuvieron muestras.

	Nº brotes diarreicos	Nº animales		Nº Total animales
		Afectados	sanos	
Ovino	38	391	35	426
Caprino	13	128	14	142
Total	51	519	49	568

El estudio parasitológico fue realizado por Mercedes Gómez Bautista y su equipo de la Unidad de Parasitología de nuestro Departamento y el virológico por María Muñoz en el Departamento de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria de León.

III.2. AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CONSERVACION DE CEPAS DE E. COLI.

III.2.1. Aislamiento.

Las muestras de campo recogidas con hisopos rectales y las obtenidas en las necropsias de los animales (contenido intestinal y raspados de mucosa de distintas porciones) se sembraban el mismo día de su obtención o de su llegada al laboratorio en el medio selectivo para enterobacterias agar McConkey (DIFCO). Después de la incubación de las placas a 37°C durante 18 horas, se seleccionaban colonias de cada tipo morfológico distinto y se resembraban en agar base para sangre (DIFCO) suplementado con un 5% de sangre de camero (OXOID).

A partir de las placas de agar sangre se realizaba la lectura de la posible producción de hemólisis.

III.2.2.- Identificación.

La identificación de E.coli se realizó mediante un método rápido que se basa en la determinación de tres pruebas bioquímicas: la fermentación de la lactosa en agar McConkey, la actividad del enzima β -glucuronidasa y la producción de indol (Edberg y Trepeta, 1983).

La capacidad de fermentar la lactosa se detectaba en el agar McConkey (DIFCO) utilizado para el aislamiento. En este medio, las colonias fermentadoras de la lactosa aparecen de color rosa, debido a la caída localizada del pH y a la absorción del indicador rojo neutro, y generalmente rodeadas de una zona rosada debido a la precipitación de las sales biliares que contiene el medio. La lectura de las placas se realizaba a las 18 horas de incubación.

La actividad β -glucuronidasa y la producción de indol se determinaban por una prueba conjunta en tubo (I+G). Esta prueba consiste en enfrentar una suspensión densa de bacterias con un sustrato cromógeno del enzima (el ácido β -glucopiranosido urónico ligado al grupo para-nitrofenil) y con el aminoácido L-triptófano.

Para la realización de la prueba I+G se preparaba una solución conteniendo por ml de PBS, pH 7,5, 0,5 mg de para-nitrofenil- β - glucopiranosido urónico (SIGMA) y 7 mg de L-triptófano (SIGMA). La solución se esterilizaba por filtración y se conservaba a 4°C hasta el momento de su utilización.

En el momento de realizar la prueba, la solución se distribuía asépticamente en tubos de vidrio estériles en volúmenes de 250 μ l. Estos tubos se inoculaban con los aislados haciendo una suspensión densa de bacterias a partir de su crecimiento en agar sangre. La lectura se realizaba después de una hora de incubación en un baño a 44°C (Iritani e Inzana, 1988).

La actividad del enzima β -glucuronidasa viene indicada por la aparición de un color amarillo intenso en el medio que se debe al desdoblamiento del enlace del grupo para-

nitrofenil. En una reacción negativa el medio permanece incoloro. Para revelar la producción de indol se añadía una gota de reactivo de Kovac. La formación de un anillo rojo en la superficie indica una reacción positiva.

Las cepas lactosa (McConkey), β -glucuronidasa e indol positivas se identificaron como E.coli. La actividad β -glucuronidasa es casi específica de E.coli. Solo algunas cepas de Shigella y Salmonella son también positivas.

Teniendo en cuenta que un tanto por ciento de cepas de E.coli son β -glucuronidasa negativas, especialmente las cepas verotoxigénicas del serotipo 0157 (Thompson et al., 1990), y que algunas cepas de E.coli lactosa negativas han sido relacionadas con procesos patológicos (Chanter et al., 1984), en todos los aislados que resultaron negativos a uno de las tres pruebas estudiadas se confirmó su identificación por pruebas bioquímicas clásicas o por el sistema comercial Api-20E según las instrucciones del fabricante.

En la prueba de I+G se utilizaron como testigos 6 especies de enterobacterias cuya identificación se confirmó por pruebas bioquímicas clásicas. Las especies utilizadas fueron E.coli, Salmonella enterica sp arizonae, Shigella sonnei, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae y Proteus mirabilis.

III.2.3. Conservación.

Los aislados identificados como E. coli se conservaban congelados a -20°C . La composición del medio utilizado para congelar las cepas es la siguiente :

Triptona (DIFCO)	10 g
Leche descremada (Nestlé)	20 g
Glicerina (PANREAC)	80 ml
Agua destilada	320 ml

Una vez disueltos los componentes por agitación, el medio se esterilizaba en autoclave a 110°C durante 10 minutos y se distribuía en tubos estériles en volúmenes de 3 ml.

La conservación de las cepas se realizaba preparando suspensiones densas de bacterias a partir del crecimiento en agar sangre al 5% y procediendo a su inmediata congelación a -20°C.

Cada cepa se congelaba por duplicado asignándole un número de referencia y las letras CL o CK según la especie de la que había sido aislada (ovino o caprino respectivamente). Cuando las cepas se precisaban para estudios posteriores se descongelaban y se sembraban en un medio general o en agar McConkey.

III.3. DETECCION DE LOS ANTIGENOS FIMBRIALES F5, F41 Y F17 POR AGLUTINACION EN PORTA CON SUEROS POLICLONALES

III.3.1. Producción de sueros policlonales monoespecíficos frente a las fimbrias F5, F41 y F17

Los sueros policlonales frente a los antígenos fimbriales F5, F41 y F17 se obtuvieron por hiperinmunización en conejos con cepas de referencia para cada antígeno cultivadas en medios que favorecen la expresión de las fimbrias. La especificidad de los sueros frente a cada fimbria se obtenía absorbiendo los sueros hiperinmunes con sus cepas homólogas cultivadas a 18°C durante 48 horas para eliminar los anticuerpos producidos frente a antígenos de la pared celular, de la cápsula e intracelulares (Orskov et al., 1977) y, en algunos casos, con cepas heterólogas cultivadas a 37°C que dan reacciones cruzadas debidas a antígenos distintos de los deseados.

En la tabla 5 se especifican las características de las cepas utilizadas. Las cepas B41, Moon 1676 y A11a₂ se utilizaron para la producción de los sueros hiperinmunes frente a las fimbrias F5, F41 y F17 respectivamente. La cepa enterotoxigénica B41, de origen bovino, es la cepa de referencia para el antígeno fimbrial F5 pero también expresa el antígeno F41. La cepa B41m es una mutante de laboratorio de la cepa B41 que solo expresa el F41. Como se detalla más adelante, esta cepa se utilizó para absorber los anticuerpos producidos frente al antígeno F41 del suero hiperinmune producido frente a la cepa B41 y obtener así un suero

específico frente al F5 (Morris *et al.*, 1983). La cepa 39a da reacciones cruzadas con el suero hiperinmune producido frente a la cepa A11a₂ debidas a antígenos distintos del F17 (Contrepois *et al.*, 1985).

TABLA 5. Cepas de referencia utilizadas para la producción de sueros policlonales monoespecíficos frente a los antígenos fimbriales F5, F41 y F17.

Cepa	Serotipo	Fimbrias	Toxinas	Origen
B41	0101:K-	F5,F41	STa	Bovino
B41m	0101:K-	F41	STa	Laboratorial
Moon 1676	0101:K30	F41	STa	Bovino
A11a ₂	0101:K32:H9	F5,F41,F17	STa	Bovino
39a				

III.3.1.1. Producción de sueros hiperinmunes en conejos

Para la producción de cada suero se utilizaron dos conejos adultos de raza Nueva Zelanda. Dos días antes de la primera inoculación se sangraban los animales para obtener suero preinmune.

Los inóculos consistían en suspensiones de bacterias vivas obtenidas a partir del crecimiento de las cepas de referencia B41, Moon 1676 y A11a₂ en el medio Minca-IsoVitalax (Minca-Is) que favorece la expresión de los antígenos fimbriales (Guinée *et al.*, 1977). Este medio contiene por litro de agua destilada:

Casaminoácidos (DIFCO)	1 g
KH ₂ PO ₄	1,36 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	10,1 g
solución de sales	1 ml
Agar (DIFCO)	12 g

La composición de la solución de sales por litro de agua destilada es la siguiente:

MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,135 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 g

Una vez disueltos los componentes el medio se esterilizaba en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El medio esterilizado se dejaba enfriar hasta una temperatura de 50°C y se añadía asépticamente IsoVitaleX (BBL) al 1% (v/v).

Las suspensiones bacterianas obtenidas a partir del crecimiento de las cepas en Minca-Is a 37°C durante 18 horas se ajustaban a una concentración aproximada de $4,5 \times 10^7$ UFC/ml.

La inoculación de los conejos se realizaba por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja. En la tabla 6 se detalla la pauta de inoculación utilizada que se basa en la descrita por Sojka (1965). Los conejos recibían dos inoculaciones semanales con un intervalo de 3 días. La dosis inicial era de 0,1 ml de inóculo. En las inoculaciones sucesivas se iba duplicando el volumen de inóculo hasta llegar a 1,6 ml en la quinta inoculación. Después de esta inoculación se esperaba una semana y se repetía la misma dosis. Al cabo de 5-6 días de esta última inoculación se sangraban los conejos para la obtención de los sueros. Estos se conservaban congelados a -20°C.

TABLA 6. Pauta de inoculación de los conejos para la producción de los sueros hiperinmunes.

Día 0	1ª inoculación	0,1 ml
Día 3	2ª inoculación	0,2 ml
Día 7	3ª inoculación	0,4 ml
Día 11	4ª inoculación	0,8 ml
Día 15	5ª inoculación	1,6 ml
Día 21	6ª inoculación	1,6 ml

Los sueros se titulaban frente a las cepas homólogas cultivadas en Minca-Is a 37°C durante 18 horas. La titulación se realizaba en placas microtiter haciendo diluciones dobles del suero en volúmenes de 25 µl y añadiendo 50 µl de la suspensión bacteriana correspondiente a una concentración aproximada de $4,5 \times 10^7$ UFC/ml. Las placas se incubaban a 37°C durante 2 horas al cabo de las cuales se realizaba la lectura. El título se consideraba la dilución más alta que daba aglutinación completa.

III.3.1.2.- Absorción de los sueros hiperinmunes.

La especificidad de los sueros frente a los antígenos fimbriales se obtenía absorbiendo los sueros hiperinmunes con los cultivos adecuados en cada caso para retirar los anticuerpos producidos frente a los demás antígenos expresados por las cepas utilizadas para su obtención. En la tabla 7 se detallan las cepas y condiciones de cultivo utilizadas para la absorción de los antígenos no específicos en cada suero.

Cada suero se absorbía en primer lugar con su cepa homóloga cultivada en Minca-Is a 18°C durante 48 horas. A esta temperatura se reprime la expresión de las fimbrias y, por lo tanto, se retiran de los sueros solamente los anticuerpos producidos frente a los antígenos somáticos, capsulares, flagelares e intracelulares (Orskov et al., 1975).

Para obtener el suero específico anti F5, el suero hiperinmune obtenido con la cepa B41 se absorbió además con la cepa B41m cultivada en Minca-Is a 37°C durante 18 horas, lo que permite eliminar los anticuerpos producidos frente al antígeno F41 (Morris et al., 1983). En el caso del suero anti-F17 fue necesario absorber el suero hiperinmune con las cepas B41 y 39a cultivada en Minca-Is a 37°C durante 18 horas. La primera de estas absorciones elimina los anticuerpos frente a los antígenos F5 y F41 y la segunda elimina reacciones cruzadas debidas a antígenos distintos del F17 (Contrepois et al., 1985).

La absorciones se realizaban recogiendo el crecimiento de los cultivos adecuados con solución salina-fenol al 0,25% y añadiendolos a 1 ml del suero correspondiente. Después de incubar la suspensión a 44°C durante dos horas se centrifugaba (900 g X 30 min) y se recogía

el sobrenadante. Este suero quedaba generalmente diluído 1:10 y se conservaba congelado a -20°C .

Con el fin de comprobar si los anticuerpos no específicos habían sido eliminados se realizaban tras cada absorción controles de aglutinación en porta con las cepas empleadas en cada caso.

TABLA 7. Obtención de sueros monoespecíficos frente a los antígenos fimbriales F5, F41 y F17: cepas y condiciones de cultivo utilizadas para la absorber de los sueros hiperinmunes los anticuerpos producidos frente a los antígenos no deseados.

Sueros anti	Anticuerpos presentes en los sueros hiperinmunes frente a los antígenos	Absorciones		
		Cepa	Condiciones de cultivo	Anticuerpos absorbidos
F5	Somáticos 0101	B41	18°C,48h	Somáticos
	Fimbriales F5,F41	B41m	37°C,18h	F41
F41	Somáticos y capsulares 0101:K31	Moon 1676	18°C,48h	Somáticos y capsulares
	Fimbriales F41			
F17	Somáticos, capsulares, flagelares 0101:K32:H9	A11a ₂	18°C,48h	somáticos, capsulares, flagelares
	Fimbriales F5,F41,F17	B41	37°C,18h	F5 y F41
	Otros	39a	37°C,18h	Reacciones cruzadas

III.3.1.3. Comprobación de la especificidad de los sueros policlonales monoespecíficos.

La especificidad de los sueros policlonales producidos frente a las fimbrias F5, F41 y F17 se comprobaba por aglutinación en porta con 15 cepas de referencia de E. coli. Las cepas utilizadas y sus características más relevantes se detallan en la tabla 8. Las aglutinaciones se realizaban con cultivos de las cepas en Minca-Is y en agar sangre de carnero al 5% a 37°C durante 18 horas. La lectura de las aglutinaciones se realizó según el criterio siguiente:

negativa	-
débil	+
moderada	++
fuerte	+++

Las cepas utilizadas para este estudio fueron cedidas por los Drs. Wray (Central Veterinary Laboratory de Weybridge, Reino Unido), Contrepolis (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia) y Blanco y González (Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria, Lugo).

TABLA 8. Cepas de referencia utilizadas para el control de la especificidad de los sueros policlonales producidos frente a las fimbrias F5, F41 y F17.

Cepas	Serotipo	Fimbrias	Toxinas	Origen
B41	0101:K-	F5,F41	STa	Bovino
B44	09:K30	F5,F41	STa	Bovino
483	09:K35	F5,F41	STa	Bovino
B44m	09:K30	F5	STa	Bovino
B80	020:K17	F5	STa	Bovino
S13	08:K85	F5	STa	Ovino
B41m	0101:K-	F41	STa	Bovino
Moon 1676	0101:K30	F41	STa	Bovino
Moon 1751	0101:K27	F41	STa	Bovino
503/86	0149:K91	F4	LT,STa	Porcino
NR3	0138:K81	F4	LT	Porcino
NR246	08:K87	F4	LT	Porcino
1Aa	0141:K85ab	F6	STa	Porcino
Sz-S-22	08:K85	F6	STa	Porcino
A11a,	0101:K32:H9	F5,F41,F17	STa	Bovino

III.3.2. Estudio de la prevalencia de las fimbrias F5, F41 y F17 en las cepas de E. coli aisladas.

La detección de las fimbrias F5, F41 y F17 en las cepas de E. coli aisladas de los procesos diarreicos estudiados se realizó por aglutinación en porta con los sueros policlonales monoespecíficos. Las cepas se cultivaban en Minca-Is a 37°C durante 18 horas para favorecer la expresión de los antígenos fimbriales. Se sembraban directamente en este medio a partir de su crecimiento en el medio agar McConkey utilizado para el aislamiento o se descongelaban y se sembraban previamente en agar McConkey.

Las aglutinaciones se realizaban en portaobjetos de cristal limpios y desengrasados haciendo suspensiones homogéneas de los cultivos sobre gotas de 20 µl de los sueros. La lectura se realizaba tras rotar el porta durante un minuto. La aparición de grumos blancos indica una reacción positiva. Las cepas autoaglutinantes se detectaban enfrentando las suspensiones bacterianas con solución salina al 3,5%. En cada ensayo se utilizaron como testigos positivos las cepas de referencia S13, B41m y A11a₂ que expresan las fimbrias F5, F41 y F17 respectivamente (tabla 8).

III.4. DETECCION DE LAS FIMBRIAS F5 Y F41 CON EL REACTIVO COMERCIAL FIMBEX

En las cepas de E. coli que resultaron autoaglutinantes con los sueros policlonales así como en todas aquellas en las que se detectó algún factor patogénico se utilizó el reactivo comercial FIMBEX (C.V.L.-LAT 01-04) para detectar las fimbrias F5 y F41 (Thorns et al., 1989).

Esta prueba comercial utiliza anticuerpos monoclonales frente a las fimbrias F5 y F41 copulados a partículas de latex azules de 0.8 µm de diámetro como reactivo de aglutinación. La prueba incluye un testigo positivo, consistente en una suspensión del antígeno correspondiente, y uno negativo, en el que se han sustituido los anticuerpos monoclonales por suero de ratón normal.

Las aglutinaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante, mezclando volúmenes iguales de los reactivos y de suspensiones bacterianas sobre cartones blancos revestidos con plástico. La lectura se realizaba después de rotarlos durante 2 minutos. La formación de grumos azules indicaba una reacción positiva.

III.5. DETECCION DE LA ENTEROTOXINA TERMOESTABLE STa POR EL ENSAYO EN RATON LACTANTE (ERL).

La detección de la enterotoxina termoestable (STa) se realizó por el ensayo en ratón lactante descrito originalmente por Dean *et al.* (1972) con algunas de las modificaciones introducidas por Blanco *et al.* (1983a) y Sriranganathan y Burger (1987).

III.5.1. Detección de STa en cepas de E. coli aisladas de campo

La producción de STa se estudió en todas las cepas de E. coli en las que se había detectado la expresión de la fimbria F17 y en 127 de las aisladas de animales menores de 7 días, de las cuales 115 habían sido aisladas de otros tantos animales afectados y 12 de animales sanos.

El ensayo se basa en la capacidad de la STa de inducir acumulación de líquido en el lumen intestinal de los ratones lactantes. Los ratones se inoculaban con los sobrenadantes de cultivos de las cepas de E. coli en el medio líquido Casaminoácidos-Extracto de Levadura (CA-YE) (Alderette y Robertson, 1977 y Evans *et al.*, 1983) que contiene por litro de agua destilada:

Casaminoácidos (DIFCO)	20 g
Extracto de Levadura (DIFCO)	6 g
NaCl ₂ ,	5 g
K ₂ HPO ₄	8,7 g
Sales traza	1 ml

La solución de sales traza se prepara disolviendo en 100 ml de H₂SO₄ (0,001 N): 5 g de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g de MnCl₂.4H₂O y 0,5 g de FeCl₃.6H₂O.

Una vez disueltos todos los componentes del medio, se ajustaba el pH a 7,5 con NaOH (5N) y se esterilizaba en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Las cepas de E.coli se cultivaban en 4 ml del medio CA-YE contenidos en tubos de 20 ml durante 18 horas a 37°C con agitación (160 rpm). Los sobrenadantes se recogían por centrifugación (900 x g, 30 minutos) y se utilizaban en el mismo día para el ensayo o se conservaban congelados a -20°C. En el momento del ensayo se añadían 40 µl de Azul de Evans al 2% (p/v) en PBS (pH 7,5) por ml de sobrenadante.

La detección de STa se realizaba en ratones lactantes de las razas NMR-I, BALB-C y SWISS mezclados al azar (Blanco et al., 1983a). Cada raza se mantenía por separado en unidades de cría formadas por un macho y tres hembras. Las camadas de distintas madres y razas se mezclaban el mismo día del ensayo. Se utilizaban ratones menores de 4 días, generalmente en el tercer día de vida, los cuales se separaban de las madres cuatro horas antes del ensayo y se mantenían a temperatura ambiente hasta el momento de la inoculación (Sriranganathan y Burger, 1987).

El sobrenadante de cada una de las cepas se ensayaba en lotes de 3 ratones. Cada ratón se inoculaba con 0,1 ml del sobrenadante vía oral usando una sonda gástrica. Después de la inoculación se mantenían 4 horas a temperatura ambiente (20°C) y a continuación se sacrificaban por dislocación cervical. En cada ensayo se utilizaban como testigo positivo el sobrenadante del cultivo de la cepa enterotoxigénica S13 y como testigo negativo el medio líquido CA-YE estéril.

La acumulación de líquido en el intestino de los ratones debido a la actividad de la STa se estima por el denominado coeficiente de deshidratación. Dicho coeficiente se obtiene calculando la relación entre el peso de los intestinos de cada lote y el peso del resto de los

cuerpos. El peso de los intestinos se hallaba restando al peso total de los cuerpos el peso del resto de los cuerpos una vez realizada la disección del paquete intestinal distal al estómago.

$$\text{Coeficientes de deshidratación} = \frac{\text{Peso total de cuerpos} - \text{Peso del resto de cuerpos}}{\text{Peso del resto de los cuerpos}}$$

III.5.2. Determinación estadística de los valores de los límites mínimo positivo y máximo negativo de los coeficientes de deshidratación

La intensidad de la respuesta a la actividad de la STa depende de la dosis de toxina inoculada (Dean et al., 1972) pero también del estado nutricional de los ratones (Sringanathan y Burger, 1987) y del método de disección y pesada utilizados (Blanco et al., 1983a), es decir, de las condiciones de realización del ensayo propias de cada laboratorio.

Por lo tanto, para determinar los valores de los límites mínimo positivo y máximo negativo de los coeficientes de deshidratación en nuestras condiciones de trabajo, se realizó el estudio estadístico de los coeficientes obtenidos con 14 cepas de rumiantes conocidas: 7 cepas enterotoxigénicas productoras de STa y 7 no enterotoxigénicas. En la tabla 9 figuran las cepas empleadas y algunas de sus características. Estas cepas fueron cedidas por los Drs. Wray (Central Veterinay Laboratory de Weybrige, Reino Unido), Contrepolis (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia) y Blanco y Gonzalez (Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria, Lugo).

Los ensayos en ratón lactante con las 14 cepas conocidas se realizaron por triplicado, de tal manera que se obtuvieron para cada cepa tres valores distintos correspondientes a los coeficientes de deshidratación de los 3 sobrenadantes ensayados. Con estos tres valores se calculó, para cada una de las cepas, la media aritmética (X), su error estándar (Sm) y el intervalo de confianza del 95% (IC-95%). Asimismo, se calculó la media aritmética (X), el error estándar (Sm) y el intervalo de confianza del 95% (IC-95%) de los dos grupos de

valores obtenidos, es decir, del grupo de valores positivos correspondientes a los coeficientes de deshidratación obtenidos con los 21 sobrenadantes de las 7 cepas productoras de STa y del grupo de valores negativos correspondientes a los coeficientes de deshidratación de los 21 sobrenadantes de las 7 cepas no enterotoxigénicas.

TABLA 9. Cepas utilizadas para la determinación de los límites máximo positivo y mínimo negativo del ensayo en ratón lactante utilizado para la detección de la STa.

CEPA	SEROTIPO	TOXINA	ORIGEN
S13	08:K85,F5	STa	Ovino
B41	0101:F5,F41	STa	Bovino
B41m	0101:F41	STa	Bovino
B44	09:K30,F5,F41	STa	Bovino
B44M	09:K30,F5	STa	Bovino
B80	020:K17,F5	STa	Bovino
483	09:K35,F5F41	STa	Bovino
S5	015:K ⁺ :H21	CNF2	Ovino
RVC-330	078:K80	-	Bovino
RVC-95	026:K60	-	Bovino
RVC-4925	08:K87	-	Bovino
711+		CNF2	Bovino
711-		-	Bovino
BM2-I		CNF1	Bovino

El valor mínimo positivo para el ensayo se consideró el límite inferior del IC-95% de los valores positivos y el valor máximo negativo el límite superior del IC-95% de los valores negativos. Los coeficientes intermedios se consideraron estadísticamente dudosos.

III.6. DETECCIÓN DE VEROTOXINAS (VTs), FACTORES CITOTÓXICOS NECROTIZANTES (CNFs) Y ENTEROTOXINAS TERMOLABILES (LTs) POR EL ENSAYO EN LA LINEA CELULAR VERO.

En todas las cepas de E. coli aisladas de los brotes diarreicos estudiados se investigó la producción de verotoxinas (VTs), factores citotóxicos necrotizantes (CNFs) y enterotoxina termolábil (LT) por el ensayo en la línea celular Vero (células de riñón de mono verde africano). Este método está basado en el descrito por Konowalchuck et al. (1977) y permite la detección de los tres tipos de toxinas por la distintas alteraciones que inducen en estas células. Las VTs, precisamente denominadas así por ejercer un efecto citotóxico en las células Vero, originan la muerte celular en 24 a 72 horas (Konowalchuck et al.,1977). La LT, sin embargo, induce un efecto citotónico que da lugar a alteraciones morfológicas características (Speirs et al., 1977). El denominado factor citotóxico necrotizante (CNF) induce alteraciones morfológicas caracterizadas por agrandamiento celular y formación de células gigantes y multinucleadas (Caprioli et al., 1983).

III.6.1.- Mantenimiento de la línea celular Vero.

Para el mantenimiento de la línea celular Vero se utilizó el Medio Mínimo Esencial (MEM, GIBCO) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (SFB). A este medio se añadía una solución de antibióticos comercial (Antibiotyc-Antimicotyc, GIBCO) para obtener una concentración final de:

Penicilina	100 UI/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
Fungizona	25 µg/ml

Las células se mantenían en frascos de cultivo celular de 75 cm² con 20 ml de MEM-SFB y se subcultivaban a una relación 1:3 dos veces por semana. Para la tripsinización de las monocapas se utilizaba una solución de tripsina-EDTA. Esta se preparaba a partir de una solución madre (10x) que contiene por litro de agua destilada desionizada

NaCl (MERCK)	80 g
KCl (MERCK)	4 g
glucosa (MERCK)	10 g
tripsina 1:250 (DIFCO)	5 g
EDTA (MERCK)	2 g
CO ₃ HNa (MERCK)	5,8 g
Antibióticos (GIBCO)	4 ml

Una vez disueltos todos los componentes se esterilizaba por filtración y se conservaba a -20°C. Esta solución madre se diluía 1:10 en agua destilada desionizada estéril antes de su utilización. Por lo tanto, la concentración final de tripsina era del 0,05% y la de EDTA de 0,02%.

Después de tripsinizar y resuspender una monocapa de células Vero, una parte de la suspensión se utilizaba para el mantenimiento de la línea celular y la otra se diluía con MEM-SFB hasta obtener una concentración de 5×10^4 cels/ml para ser utilizada en el ensayo.

III.6.2.- Ensayo en la línea celular VERO.

La detección de las toxinas se realizaba en sobrenadantes de cultivos de las cepas tratados con Polimixina B que facilita la liberación de proteínas del espacio periplásmico (Evans et al., 1974 y Karmali et al., 1985a).

Las cepas de E.coli se cultivaban en 4 ml de medio CA-YE, pH 7,5, contenidos en tubos de 20 ml durante 18 horas a 37°C con agitación (160 rpm). La inoculación de los tubos se realizaba a partir del crecimiento en medio sólido tomando por barrido una porción de cultivo (Karmali et al., 1985a).

Tras las 18 horas de incubación se añadían a los cultivos 10.000 U/ml de polimixina B y se incubaban 4 horas más a 37°C. A continuación se centrifugaban a 900 x g durante 20 minutos y los sobrenadantes obtenidos se utilizaban para el ensayo en el mismo día o se conservaban congelados a -20°C.

El ensayo para la detección de las toxinas se realizaba en placas microtiter de 96 pocillos (Costar). La suspensión de células Vero a una concentración de 5×10^4 cels/ml se distribuía en la placa microtiter en volúmenes de 190 μ l por pocillo. Cada pocillo se inoculaba con 10 μ l de sobrenadante y cada sobrenadante se ensayaba por duplicado.

Las placas se incubaban a 37°C con 5% de CO₂ y la lectura se realizaba con microscopio invertido a las 24, 48 y 72 horas. En algunos casos la lectura de las placas se realizaba después de teñir las células con cristal violeta al 5% (p/v). Después de retirar el medio, las células se fijaban con metanol durante 5 minutos y se teñían con cristal al 5% durante 45 minutos. A continuación se lavaban con agua destilada y se dejaban secar al aire.

En cada ensayo se utilizaron como testigos positivos las cepas de E.coli P3 (VT⁺), H296 (LT⁺), BM2-I (CNF⁺) y 711+ (CNF2⁺) cedidas por los Drs Wray (Central Veterinary Laboratory, Reino Unido) y de Rycke (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia).

III.7. DETECCION DE CEPAS DE E.COLI PRODUCTORAS DE COLICINAS

La producción de Colicina V, considerada como un marcador de patogenicidad, se investigó en 224 de las cepas de E. coli aisladas. De ellas 66 eran aislados en los que se había detectado la expresión de la fimbria F17 o la producción de algunas de las toxinas investigadas. Las 158 cepas restantes se seleccionaron al azar, utilizando una tabla de números aleatorios, entre los aislados en los que no se había detectado la expresión fimbrias ni la producción de toxinas.

La detección de cepas de E.coli productoras de Colicina V se realizó por el método de doble capa descrito originalmente por Frederiq (1964).

En el ensayo se utilizaron como cepas indicadoras la C-104, sensible a todas las colicinas, y la RVC-330 (078:K80, Col. V⁺) productora de Colicina V. Además, como testigos positivo y negativo se utilizaron las cepas RVC-330 y la B188 respectivamente.

Las cepas de E.coli seleccionadas y las dos cepas utilizadas como testigos se sembraban en 3 ml de caldo nutritivo (DIFCO) y se incubaban a 37°C durante 3 horas. A partir del crecimiento en medio líquido, se resembraban en dos placas de agar nutritivo (DIFCO) depositando una gota de cultivo con una asa de platino. En cada una de las dos placas se sembraban 22 cepas problema y las dos utilizadas como testigo. De esta forma se obtenía por duplicado el crecimiento de las 24 cepas. Las placas de Petri utilizadas eran de cristal, de 11 cm de diámetro, y contenían 15 ml de agar nutritivo.

Las bacterias crecidas después de incubar las placas a 37°C durante 18 horas se exponían a vapores de cloroformo durante 30 minutos depositando 1 ml de cloroformo sobre un papel de filtro situado en la tapa de las placas invertidas. Después de retirar el papel de filtro, las placas se dejaban abiertas al aire una hora para eliminar los restos de cloroformo. A continuación se añadía a cada placa una segunda capa de 8 ml de agar nutritivo, fundido y estabilizada su temperatura a 55°C, y se dejaban a temperatura ambiente durante 4 horas para que difundieran las colicinas.

Después de las 4 horas, una de las placas se sembraba por inundación con un cultivo en caldo nutritivo de la cepa indicadora C-104 y su duplicado con la cepa indicadora RVC-330. Se dejaban reposar durante 20 minutos y después de retirar el caldo se incuban a 37°C durante 18 horas.

La producción de colicinas en cada de las cepas se detectaba por la aparición alrededor de las mismas de una zona de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora C-104, sensible a todas las colicinas. Si el crecimiento de la cepa RVC-330 no era inhibido el tipo de colicina producido era Colicina V.

III.8. ESTUDIOS DE HEMAGLUTINACION MANOSA-RESISTANTE (HAMR) Y MANOSA-SENSIBLE (HAMS) DE CEPAS DE E.COLI.

III.8.1. Estudio de la capacidad HAMR y HAMS de células enteras.

La capacidad de E. coli de aglutinar los eritrocitos de diversas especies animales se corresponde en muchos casos con la presencia de fimbrias. Estas se clasifican por su capacidad hemaglutinante en manosa-sensibles (MS) o manosa-resistentes (MR) según sea inhibida o no la hemaglutinación en presencia del monosacárido D-manosa. La HAMR con eritrocitos de diversas especies animales permite clasificar las cepas de E. coli en distintos modelos de HA que pueden corresponderse con la presencia de distintas adhesinas (Duguid et al., 1955).

El estudio de los modelos de HAMS y HAMR se realizó en las mismas 224 cepas seleccionadas para el estudio de la producción de colicina V. Recordemos que de las cepas seleccionadas 66 eran aislados en los que se había detectado previamente la expresión de fimbrias o la producción de toxinas y las 158 restantes se seleccionaron al azar entre las cepas en las que no se había detectado la presencia de estos factores patogénicos.

Para el estudio de la HAMS se utilizaron eritrocitos de cobaya y para el estudio de la HAMR eritrocitos de cobaya, caballo, oveja, pollo, ternera y humanos del grupo A. A partir de la sangre extraída de las distintas especies animales en tubos con anticoagulante (EDTA) se separaban los eritrocitos por centrifugación, se lavaban tres veces con PBS 0,02M, pH 7,5 y se diluían al 3% (v/v) en PBS. Estas suspensiones de eritrocitos se conservaban a 4°C hasta una semana.

Las cepas de E.coli se cultivaban en Minca-Is (Guinée et al., 1977) a 37°C durante 18 horas. A partir del crecimiento en este medio se realizaban suspensiones densas de bacterias en tampón fosfato sódico 0,02 M, pH 7,5, para obtener una concentración aproximada de 10⁹ UFC/ml.

Las hemaglutinaciones se realizaban según el método de Evans et al. (1977) en portas de cristal rotándolos manualmente. Para el estudio de la HAMR se añadían 25 µl de la suspensión de bacterias, 25 µl de una solución al 1,5% de D-manosa en PBS y 25 µl de las suspensiones de eritrocitos al 3% de las distintas especies. La HAMS se investigaba del mismo modo sustituyendo la solución de D-manosa por PBS. Tras rotar los portas durante 2 minutos a temperatura ambiente se hacía una primera lectura de los resultados. A continuación, los portas se mantenían a 4°C durante 2 minutos y se hacía la lectura definitiva.

En algunas de las cepas HAMR positivas se investigó también la capacidad hemaglutinante de las bacterias crecidas a 18°C durante 48 horas, temperatura que inhibe la expresión de las fimbrias.

III.8.2. Estudio de la actividad HAMR de los extractos térmicos de cepas de E. coli HAMR positivas.

Para el estudio de la actividad HAMR de sus extractos térmicos se seleccionaron cepas de E. coli representativas de cada uno de los distintos modelos de HAMR obtenidos en el apartado anterior. A partir del crecimiento de cada cepa en una placa de Minca-Is a 37°C durante 18 horas se realizaban suspensiones densas de bacterias (10^9 UFC/ml) en 0,5 ml de PBS y se sometían a un tratamiento térmico de 60°C durante 20 minutos en baño con agitación. El sobrenadante (extracto térmico) y el sedimento se separaban por centrifugación a 8.000 x g durante 20 minutos. El sedimento se resuspendía en 0,5 ml de PBS (Stirm et al. 1967).

Las hemaglutinaciones se realizaban en placas microtiter de 96 pocillos con fondo en V (Jones y Rutter, 1974) haciendo, en primer lugar, diluciones al doble en volúmenes de 25 µl de PBS, por una parte, de los sedimentos resuspendidos y, por otra, de los sobrenadantes. A continuación se añadían 25 µl de la solución de D-manosa y 25 µl de una suspensión de eritrocitos al 1% (v/v). La incubación de las placas se realizaba a 4°C durante 18 horas. El título se consideraba la dilución más alta que daba hemaglutinación completa.

III.9. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

En 92 de las cepas de E.coli aisladas se estudió su sensibilidad a distintos antimicrobianos. De ellas, 49 eran cepas en las que se había detectado la expresión de la fimbria F17 o la producción de alguna toxina. Las 43 cepas restantes se seleccionaron al azar, utilizando una tabla de números aleatorios, entre las cepas en las que no se habían detectado estos factores patogénicos.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron por la técnica de dilución en agar siguiendo la metodología recomendada por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990).

En la tabla 10 se relacionan los antimicrobianos utilizados, y se indican su actividad o potencia y los solventes y diluyentes utilizados para cada uno de ellos.

III.9.1. Preparación de las diluciones de los antimicrobianos en placa.

Para preparar las diluciones de los antimicrobianos se partía de una solución inicial de cada antimicrobiano con una concentración de 2.560 µg/ml o UI/ml. La cantidad de antimicrobiano necesaria para obtener la concentración deseada se obtenía según la fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración (µg/ml)}}{\text{Actividad (µg/mg)}}$$

A partir de las soluciones iniciales de cada antimicrobiano se preparaban diluciones al doble según el esquema de Ericson y Sherris (1971) modificado, como se indica en la tabla 11. De esta forma se obtenía una batería de 13 tubos conteniendo concentraciones decrecientes de antimicrobiano desde 2.560 hasta 0,62 µg o UI/ml.

TABLA 10. Antimicrobianos utilizados.

ANTIMICROBIANO	POTENCIA	SOLVENTE	DILUYENTE
Amoxicilina (INDUKERN)	99,2 %	Tampón fosfato 0,1M, pH 6	Tampón fosfato 0,1M, pH 6
Ampicilina (GEMA)	98,2 %	Tampón fosfato 0,1M, pH 8	Tampón fosfato 0,1M pH 6
Cefaclor (Lilly, S. A.)	95,6 %	Agua destilada	Agua destilada
Cefalexina (Antibióticos, S. A.)	93,7 %	Agua destilada	Agua destilada
Cefamandol (Lilly, S. A.)	86 %	Agua destilada	Agua destilada
Cefazolina (Antibióticos, S. A.)	91,8 %	Agua destilada	Agua destilada
Ceftizoxima (Smith Kline & Frenh, S.A.E.)	87,3 %	Agua destilada	Agua destilada
Cefuroxima (GLASO) (GLASO)	94,9 %	Agua destilada	Agua destilada
Ciprofloxacina clorhidrato (BAYER)	80,7 %	1/2 volúmen de agua caliente, 0,1N sosa	Agua destilada
Cloranfenicol (FLUKA)	99 %	Alcohol metílico	Agua destilada
Colistina sulfato (MEIJI SEIKA KAISHA)	710 µg /mg	Agua destilada	Agua destilada
Doxiciclina (INDUKERN)	850 UI/mg	1/2 volúmen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Enoxacina (ALMIRALL)	91,57 %	1/2 volumen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Enrofloxacin (BAYER)	99,2 %	1/2 volúmen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Estreptomycin sulfato (Antibióticos, S.A.)	735 U/mg	Agua destilada	Agua destilada
Gentamicina sulfato (INDUKERN)	601 R/M	Agua destilada	Agua destilada
Kanamycin sulfato (RASFLER)	76 %	Agua destilada	Agua destilada
Nalidíxico, ácido (SERVA)	99 %	Sosa 0,1N	Agua destilada
Neomicina sulfato (INDUKERN)	694 U/mg	Agua destilada	Agua destilada
Oxitetraciclina base (IMPEX QUIMICA)	89,1 %	Agua destilada	Agua destilada
Oxonílico, ácido (INDUKERN)	100 %	Sosa, 0,1N	Agua destilada
Pipemídico, ácido (ALMIRALL)	85,64 %	1/2 volúmen agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Polimixina B (SIGMA)	7610 U/mg	Agua destilada	Agua destilada
Sparfloxacina (RHONE)	100 %	1/2 volúmen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Sulfadoxina (INDUSTRIAS GMB)	99,5 %	1/2 volúmen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Sulfadimetoxina (INDUKERN)	100 %	1/2 volúmen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Sulfametacina ácida (INDUKERN)	100 %	1/2 volúmen de agua caliente, sosa 0,1N	Agua destilada
Tetraciclina clorhidrato (INDIKERN)	98,6 %	Agua destilada	Agua destilada

TABLA 11.Preparación de las diluciones de antibióticos según el esquema de Ericson y Sherris modificado (1971).

Preparación de las diluciones.	Concentración µg. o UI/ml	Concentración final en placa.
solución madre (20 ml de solvente)	2.560	256
4 ml (2.560)* + 4 ml	1.280	128
2 ml (2.560) + 6 ml	640	64
2 ml (2.560) + 14 ml	320	32
4 ml (320) + 4 ml	160	16
2 ml (320) + 6 ml	80	8
2 ml (320) + 14 ml	40	4
4 ml (40) + 4 ml	20	2
2 ml (40) + 6 ml	10	1
2 ml (40) + 14 ml	5	0,5
4 ml (5) + 4 ml	2,5	0,25
2 ml (5) + 6 ml	1,25	0,125
2 ml (5) + 14 ml	0,62	0,062

* Concentración del tubo a partir del cual se realizaban las siguientes diluciones.

Para preparar las placas se utilizaba el medio agar Mueller-Hinton (DIFCO). Después de rehidratar y disolver el medio, se esterilizaba en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se dejaba estabilizar su temperatura a 44°C manteniéndolo en un baño. A continuación se añadían en placas de Petri 2 ml de la dilución correspondiente de antimicrobiano y 18 ml de agar Mueller-Hinton. Se mezclaban haciendo rotar las placas con movimientos circulares de derecha a izquierda y viceversa, y se dejaban enfriar a temperatura ambiente hasta que

solidificase el agar. De esta manera, la concentración final de antimicrobiano en cada placa era la décima parte de la concentración en los tubos (tabla 9). Las placas se preparaban siempre en el mismo día en que iban a ser utilizadas.

III.9.2. Inoculación de las placas.

Para la realización de las pruebas de sensibilidad las cepas de E.coli se cultivaban en 4 ml de caldo tripticasa-soja (TSB, DIFCO), inoculados tocando ligeramente con el asa de platino 4-5 colonias a partir del crecimiento de las cepas en medio sólido, y se incubaban a 37°C durante 2 horas. En este tiempo de incubación aparecía una turbidez visible equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland que se corresponde con una concentración aproximada de 10^8 UFC/ml.

Las placas de agar con las distintas diluciones de antimicrobiano se inoculaban con un replicador de Steers (Steers et al., 1959), que permite la inoculación simultánea de 32 cepas. En cada pocillo del replicador se depositaban 450 μ l de solución salina estéril y 50 μ l del crecimiento de las cepas en el medio líquido TSB que se encontraban en fase logarítmica (10^8 UFC/ml). De esta forma los inóculos quedaban diluidos 1:10 (10^7 UFC/ml). Puesto que el replicador utilizado depositaba de 1 a 2 μ l del inóculo de cada pocillo en la superficie del agar, se obtenía finalmente un inóculo de aproximadamente 10^4 UFC de cada cepa en la superficie de las placas.

En cada serie de placas correspondiente a un antimicrobiano se iniciaba la inoculación por la de más baja concentración de antimicrobiano. Al principio y final de cada serie se inoculaba una placa conteniendo 20 ml de agar Mueller-Hinton sin antimicrobiano como testigos de crecimiento.

III.9.3. Incubación y lectura de las placas.

Las placas inoculadas se dejaban a temperatura ambiente hasta que se absorbía el inóculo en el agar y a continuación se incubaban a 37°C durante 18 horas.

Después de la incubación se determinaba la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los antimicrobianos para cada cepa. Esta se define como la dilución de antimicrobiano más baja que inhibe el crecimiento bacteriano, despreciando la presencia de una única colonia o un ligero halo originado por el inóculo.

Con las CMIs de las 92 cepas estudiadas se determinaban las CMI-50 y CMI-90 para cada antimicrobiano que se definen como la concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento del 50% y el 90% de las cepas respectivamente.

El punto de ruptura ("break point") se define como la concentración de un antimicrobiano, específica para cada uno de ellos, a partir de la cual se consideran como resistentes a los microorganismos que puedan crecer en ella o en una concentración superior.

III.10. DETECCION Y CARACTERIZACION DE ANTIGENOS SUPERFICIALES DISTINTOS DE LOS ANTIGENOS F5, F41 Y F17 EN CEPAS DE E. COLI HAMR POSITIVAS

III.10.1. Cepas utilizadas

Teniendo en cuenta que un elevado número de cepas de E.coli en las que no se habían detectado la expresión de las fimbrias F5, F41 ni F17, presentaban el fenotipo HAMR⁺, se investigó la posible asociación entre la hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) y la expresión de nuevos antígenos fimbriales. Para ello se seleccionaron tres cepas de E.coli (CL-168, CL-245 y CL-686), cada una de un modelo distinto de hemaglutinación, cuyos extractos térmicos presentaban actividad hemaglutinante manosa-resistente con los eritrocitos humanos del grupo A.

III.10.2. Obtención de los extractos térmicos

A partir del crecimiento de las cepas en una placa de Minca-Is a 37° ó 18°C se realizaban suspensiones densas en 0,5 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,2, y se

mantenían en un baño a 60°C durante 20 minutos con agitación. Después de centrifugar a 8.000 x g durante 10 minutos se recogía el sobrenadante y se utilizaba para los ensayos o se conservaba congelado a -20°C (Stirm *et al.*, 1967).

Estos extractos térmicos se concentraban por precipitación con sulfato amónico al 20% de saturación antes de realizar un análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El sedimento obtenido tras la precipitación se resuspendía en PBS, pH 7,2, y se dializaba frente al mismo tampón. La concentración final de proteína en los extractos oscilaba entre 0,4 y 0,7 µg/µl de muestra.

III.10.3. Producción de antisueros

La producción de sueros hiperinmunes frente a las cepas seleccionadas se realizó del mismo modo descrito en el apartado 3.1.1. La especificidad de los sueros frente a los antígenos que se expresan exclusivamente a 37°C se obtenía absorbiéndolos con sus cepas homólogas cultivadas a 18° durante 48 horas. Estos sueros absorbidos se denominaban con la letra S seguida del número de la cepa homóloga. En los casos que se estimó oportuno, de acuerdo con las reacciones de aglutinación, estos sueros S se absorbieron con la cepa heteróloga cultivada a 37°C con la que daban reacciones cruzadas.

III.10.4. Observación de fimbrias por microscopía electrónica

Para detectar la posible presencia de estructuras fimbriales las bacterias se observaron por microscopía electrónica mediante tinción negativa. A partir del crecimiento en Minca-Is a 37° ó 18°C durante 18 ó 48 horas respectivamente, se preparaban suspensiones densas de bacterias (10^{10} cels/ml aproximadamente) en agua de peptona estéril con o sin un 4% de formaldehído (bacterias fijadas o sin fijar). Estas suspensiones se diluían 1:4 en agua destilada y se depositaba una gota sobre una rejilla de microscopía electrónica revestida con Formvar. Después de 3 minutos se retiraba el exceso de líquido con papel de filtro y se realizaba la tinción negativa con ácido fosfotungstico al 1% durante 30 ó 60 segundos (McConnell *et al.*, 1981).

Las observaciones de microscopía electrónica se realizaron en el Centro de Microscopía Electrónica de la U.C.M. El microscopio electrónico de transmisión utilizado fue el modelo ZEISS 80KV EM 902.

III.10.5. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de proteínas de los extractos térmicos y de los antígenos semipurificados se realizó según el sistema de electroforesis discontinuo descrito por Laemmli (1970) utilizando geles verticales de 0,75 mm de espesor.

Las electroforesis se realizaron en una cubeta de electroforesis modelo Mini-Protean II (Bio-Rad), que permite la preparación simultánea de dos geles verticales de 0,75 mm de espesor.

III.10.5.1. Preparación de los geles

En la tabla 12 se detalla la composición de los geles de empaquetamiento y separación utilizados indicando la concentración final en los geles de cada uno de los componentes y las cantidades necesarias de cada uno de ellos para preparar 5 ml del gel de empaquetamiento y 10 ml del gel de separación. Ambos geles contenían SDS al 0,1% que se añadía a partir de una solución madre al 10%. Para preparar el gel de empaquetamiento se utilizaba un tampón Tris-HCl, 1M, a pH 6,8, mientras que para el gel de separación se empleaba a pH 8,8.

La concentración final de acrilamida era del 3% en el gel de empaquetamiento y del 14% en el de separación. Ambos geles se preparaban a partir de una solución inicial de acrilamida al 30% con la siguiente composición:

Acrilamida (Bio-Rad)	30 g
N,N' metilenbisacrilamida (Bio-Rad)	0,8 g
Agua destilada (volumen final)	100 ml

Una vez mezclados los componentes, esta solución se filtraba a través de un papel Whatman nº 1 y se almacenaba a 4°C en un recipiente de vidrio oscuro.

El sistema catalizador utilizado para la polimerización de la acrilamida fue el persulfato amónico-N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (PSA-TEMED). El persulfato amónico (PSA) se añadía a partir de una solución al 10% (p/v) preparada en el momento de su utilización.

En el momento de preparar los geles, se mezclaban los componentes del gel de separación y se añadían 5 ml entre los cristales previamente montados. En el borde superior se añadía agua destilada con el fin de conseguir un borde liso y evitar el contacto con el oxígeno atmosférico que podría interferir en la polimerización. Esta tenía lugar en 30-45 minutos.

Una vez polimerizado el gel de separación se retiraba el agua del borde superior y se lavaba con agua destilada. Se mezclaban los componentes del gel de empaquetamiento e inmediatamente se añadía 1 ml en el borde superior del gel de separación. Se aplicaba un peine de 0,75 mm de espesor para la formación de 10 pocillos en el gel y se dejaba polimerizar durante 45 minutos aproximadamente.

TABLA 12. Composición de los geles de poli(acrilamida) de empaquetamiento y separación utilizados en el sistema de electroforesis discontinuo en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Componentes	Gel de empaquetamiento		Gel de separación	
	Concentración final*	Volumen (ml) [†]	Concentración final	Volumen (ml)
Acrilamida-bisacrilamida 30%	14%	0,50	3%	4,66
Tampón Tris-HCl, 1M, pH 8,8.	-	-	0,375M	3,75
Tampón Tris-HCl, 1M, pH 6,8.	0,125M	0,63	-	-
SDS-10%	0,1%	0,05	0,1%	0,1
Agua destilada	75,4%	3,77	14,4%	1,44
Persulfato amónico (PSA) 10%		0,05		0,05
TEMED		0,004		0,005

* Concentración final de cada uno de los componentes en los geles.

† Volumen en ml de cada uno de los componentes necesario para preparar 5 ml del gel de empaquetamiento y 10 ml del gel de separación.

III.10.5.2. Preparación de las muestras

Las muestras analizadas mediante electroforesis eran los extractos térmicos (60°C, 20 min.) de las cepas de E.coli seleccionadas, concentrados por precipitación con sulfato amónico y dializadas, y los antígenos semipurificados a partir de la cepa CL-168.

Antes del análisis electroforético de las muestras se añadía a cada una la cantidad adecuada del tampón de muestra para obtener una concentración final aproximada de proteína de 0,2-0,4 µg/µl. La composición del tampón de muestra era la siguiente:

Tris HCl 0,125M, pH 6,8	25 ml
SDS-10%	2,5 g
Sacarosa 30% (p/v)	7,5 g
2 mercaptoetanol 10% (v/v)	2,5 ml
Azul de Bromofenol	0,005 %

Las muestras disueltas con el tampón se sometían a un tratamiento térmico de 100°C durante 3-5 minutos para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas.

Como marcador de pesos moleculares se utilizó el preparado comercial Pre-Stained SDS-PAGE Standars Low Range (Bio-Rad) que contiene las siguientes proteínas:

Proteínas	Pm
Fosforilasa B	106.000
Albúmina sérica bovina	80.000
Ovoalbúmina	49.000
Anhidrasa carbónica	32.000
Inhibidor de tripsina	27.000
Lisocima	18.500

III.10.5.3. Aplicación de las muestras y electroforesis

Como tampón de electroforesis se utilizaba Tris-glicina, pH 8,3, (0,025M tris, 0,192 M glicina y 0,1% SDS).

Las muestras se aplicaban en volúmenes de 10 µl en cada uno de los pocillos del gel de empaquetamiento. Inicialmente se aplicaba una corriente continua de 50 V durante 10 minutos o el tiempo necesario para la concentración de las muestras en el gel de empaquetamiento. A continuación se aplicaba una corriente de 125 V durante aproximadamente 60 minutos para el desarrollo de la electroforesis en el gel de separación. La electroforesis finalizaba cuando el marcador (azul de bromofenol) llegaba al borde inferior del gel.

III.10.5.4. Teñido y conservación de los geles

La visualización de las bandas de proteína se realizaba tiñendo los geles de separación con azul de Coomassie R-250. En algunos casos se teñía también el gel de empaquetamiento para comprobar si las proteínas habían entrado en el gel de separación.

La solución de teñido utilizada contenía azul de Coomassie R-250 al 0,1%, ácido acético glacial al 10% y metanol al 3% en agua destilada. Los geles se mantenían en esta solución durante 30 minutos. A continuación se desteñían hasta obtener un fondo transparente de los geles con una solución de desteñido que contenía ácido acético glacial al 7,5% y metanol al 7,5%.

La conservación de los geles se realizaba sumergiendolos durante 30 minutos en una solución conservadora que contenía etanol al 30%, ácido acético al 10% y glicerol al 10%. Seguidamente se depositaban sobre un soporte de vidrio y se cubrían con papel de celofán humedecido en la solución conservadora. En estas condiciones se mantenían a temperatura ambiente hasta su completa desecación.

Además del sistema tradicional de electroforesis descrito anteriormente, también se utilizó el sistema de electroforesis semiautomático "PhastSystem" (Pharmacia), para cuya realización se siguieron las instrucciones del fabricante. En este caso se emplearon geles ultrafinos (45 x 35 x 0,5 mm) con un gradiente de concentración del 8 al 25% de

poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS (Phast Gel Gradiente 8-25, Pharmacia).

III.10.6. Detección inmunoenzimática de proteínas sobre soportes de nitrocelulosa ("immunoblotting")

III.10.6.1. Electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de nitrocelulosa

Para la detección inmunoenzimática de las proteínas de los extractos térmicos y los antígenos semipurificados, estas se transferían desde los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa según la técnica descrita por Towin et al. (1979).

La electrotransferencia se realizaba en una cubeta de transferencia modelo 2005 Transphord (LKB). El tampón de transferencia utilizado era un tris-glicina-metanol, pH 8,3, con la siguiente composición: Tris 2 mM, glicina 0,192 mM y metanol al 20%.

Inmediatamente después de la separación electroforética de proteínas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se situaba el gel sobre una membrana de nitrocelulosa (Membranfilter BA 85, Renner) previamente equilibrada en tampón de transferencia. Este conjunto gel-membrana se situaba a su vez entre dos papeles de filtro equilibrado en el mismo tampón y a continuación se introducía en la cubeta de transferencia colocando el gel del lado el cátodo y la membrana del lado del ánodo. En estas condiciones las proteínas migran desde el polo negativo al positivo.

La electrotransferencia se realizaba a una intensidad de corriente constante de 0,3 amperios durante 4 horas. Una vez realizada la electrotransferencia de las proteínas a la membrana, cuya eficacia se comprobaba tiñendo los geles con azul de Coomassie, se procedía al lavado de la misma. El lavado se realizaba sumergiendo la membrana tres veces durante 5 minutos con agitación en una solución con la siguiente composición:

NaCl	8,76 g
Tween 20	5 ml
Agua destilada	1 l

III.10.6.2. Detección inmunoenzimática de proteínas.

La inmunodetección de las proteínas sobre las membranas se realizaba con los sueros absorbidos específicos frente a los antígenos deseados. Estos sueros se utilizaban a una dilución 1/500. Como conjugado se utilizaba suero anti-inmunoglobulinas de conejo, obtenido en cerdo, marcado con peroxidasa.

La membrana de nitrocelulosa, una vez lavada, se sumergía en tampón fosfato sódico 0,01M, pH 7,3, conteniendo Tween-20 al 0,5% (tampón de bloqueo) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación se dejaba reaccionar con el suero deseado diluído en tampón de bloqueo, durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Transcurrido este tiempo se lavaba de nuevo la membrana y se añadía el conjugado diluído 1/1000 en solución de lavado. Se dejaba reaccionar durante 90 minutos y se volvía a lavar la membrana de la misma forma.

El revelado de la membrana se realizaba sumergiendola en una solución de sustrato. Esta se preparaba en el momento de su utilización añadiendo a 100 ml de tampón fosfato sódico 0,01M, pH 7,3, 50 mg de diaminobencidina y 100 µl de peróxido de hidrógeno al 33%. La reacción se detenía lavando la membrana con agua destilada.

III.10.7. Semipurificación del antígeno LC168 a partir de la cepa CL-168.

La semipurificación del antígeno LC168 se realizó según el método de De Graaf y Roorda para la purificación de fimbrias (1982).

III.10.7.1. Obtención y extracción del antígeno LC168 a partir de la cepa CL-168.

Para la obtención del antígeno LC168 se partía de un cultivo de la cepa CL-168 en 10 litros de un medio líquido mínimo esencial (MLM) a 37°C durante 18 horas con agitación constante. El medio MLM contiene por litro de agua destilada:

KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	7,5 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,011 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g

Una vez disueltos todos los componentes se esterilizaba en autoclave a 121°C durante 20 minutos, se dejaba equilibrar la temperatura a 50°C en baño y se añadía glucosa esterilizada por filtración a una concentración final de 0,5%.

El sedimento bacteriano obtenido por centrifugación del cultivo a 8.000 x g durante 30 minutos se resuspendía en tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, conteniendo urea 2 M (PBSU), de tal manera que la concentración de células de la suspensión bacteriana se correspondiese con una D.O.=100 a 660 nm.

La extacción de los antígenos superficiales proteicos se realizaba por tratamiento térmico de la suspensión bacteriana a 60°C durante 20 minutos en baño con agitación constante (150 r.p.m.) (Stirm et al., 1967). Después de este tratamiento térmico se centrifugaba a 30.000 x g durante 15 min., obteniendo, por un lado, el sedimento celular y, por el otro, el sobrenadante que contenía las proteínas superficiales extraídas de las bacterias.

III.10.7.2. Precipitación con sulfato amónico.

El sobrenadante obtenido después de la última centrifugación se dividió en tres fracciones de igual volumen. Estas fracciones se precipitaron con sulfato amónico a distintas concentraciones de saturación: 10% (fracción A), 20% (fracción B) y 60% (fracción C). El sedimento obtenido por centrifugación de cada uno de ellas se resuspendía en 2 ml de PBSU y se dializaba frente a este mismo tampón.

Dado que en el análisis electroforético se encontró que las tres fracciones tenían proteínas mayoritarias de semejante movilidad electroforética, se reunieron las tres soluciones para su posterior procesado.

III.10.7.3. Cromatografía de gel filtración en columna (Sephacosa CL 4B).

Las tres soluciones proteicas obtenidas por precipitación con sulfato amónico y dializadas se reunieron y se aplicaron a una columna (1,5 x 90 cm) de cromatografía de gel filtración (Sephacosa CL 4B, Pharmacia). Este gel tiene un rango de separación molecular de 60 a 20.000 kilodaltons.

La columna de cromatografía se equilibraba previamente con tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, conteniendo urea 2 M, y se eluía con este mismo tampón a un flujo constante de 10 ml/hora. El cromatograma se obtenía midiendo la absorbancia de las fracciones obtenidas a 280 nm. Asimismo se comprueba qué fracciones mostraban actividad hemaglutinante manosa-resistente con los eritrocitos humanos.

III.10.7.4. Tratamiento con deoxicolato sódico (DOC).

Las fracciones con actividad HAMR con eritrocitos humanos se reunieron y se trataron con deoxicolato sódico (DOC) para retirar restos de membranas (Korhonen *et al.*, 1980). El deoxicolato sódico (DOC) se añadía a una concentración final del 0,5% (p/v) y, a continuación, esta preparación se dializaba frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, sin urea,

durante 72 horas a 4°C. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 30.000 x g 15 min., o fracción DOC-soluble, se dializaba extensamente frente a tampón fosfato 50 mM y frente a agua destilada. El dializado se concentraba por liofilización y se resuspendía en 0,5 ml de agua destilada.

III.10.8. Estudio de la prevalencia de los antígenos LC168 y LC686 en las cepas de E.coli aisladas de los procesos diarreicos estudiados

La detección de estos antígenos se realizó en todas las cepas de E.coli aisladas por aglutinación rápida en porta con los sueros específicos frente a dichos antígenos diluidos 1/20. Las cepas de E.coli aisladas se descongelaban y sembraban en McConkey. Después de la incubación de las placas a 37°C durante 18 horas se seleccionaban 10 ó 12 colonias de cada cepa, se sembraban en Minca-Is y se incubaban a 37°C durante toda la noche. Las cepas autoaglutinantes se detectaban con solución salina al 3%.

IV. RESULTADOS

IV.1. RECOGIDA DE MUESTRAS DE CAMPO

En la figura 2a se representa gráficamente la distribución por edades de los 568 animales de los que se obtuvieron muestras fecales para la realización de este estudio. En la figura los animales se han agrupado por semanas de vida. Teniendo en cuenta que, como se indicó en el apartado de material y métodos, se recogieron muestras mayoritariamente de animales que presentaban síntomas de diarrea en el momento de tomar las muestras (519/568), y que esta solía iniciarse en el 4º día de vida y persistir hasta los 15º o 21º días, la mayoría de los los animales de los que se obtuvieron muestras estaban en las dos primeras semanas de vida. De los 568 animales, 365 se hallaban en la segunda semana de vida y 153 en la primera, mientras que los 50 restantes eran animales en la tercera y cuarta semanas de vida.

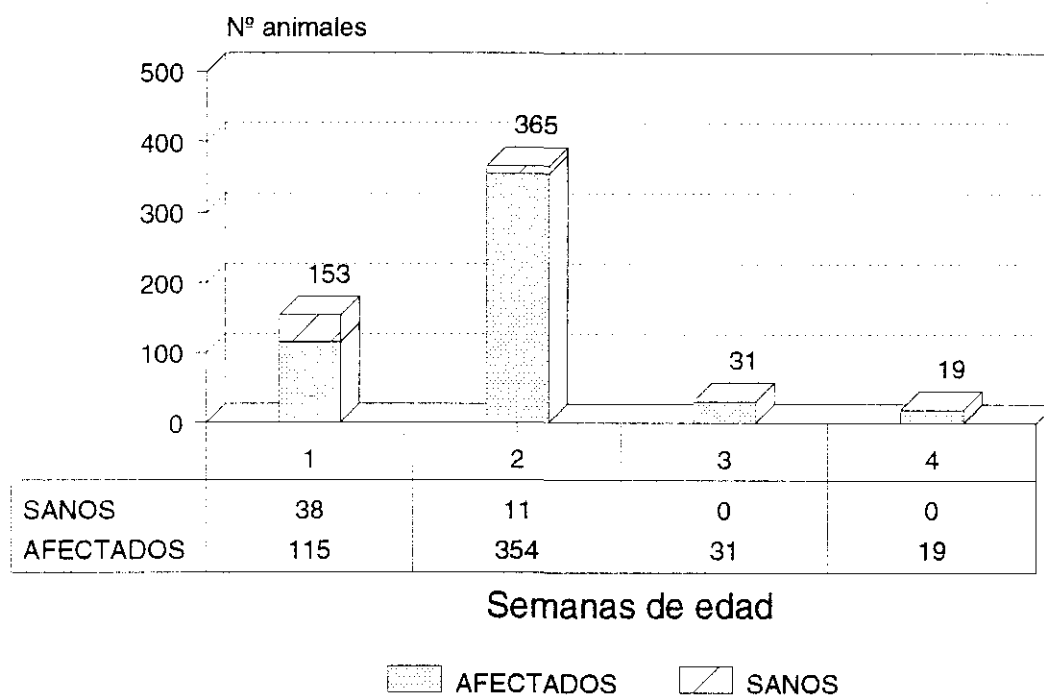


Figura 2a. Distribución de los animales estudiados por semanas de edad.

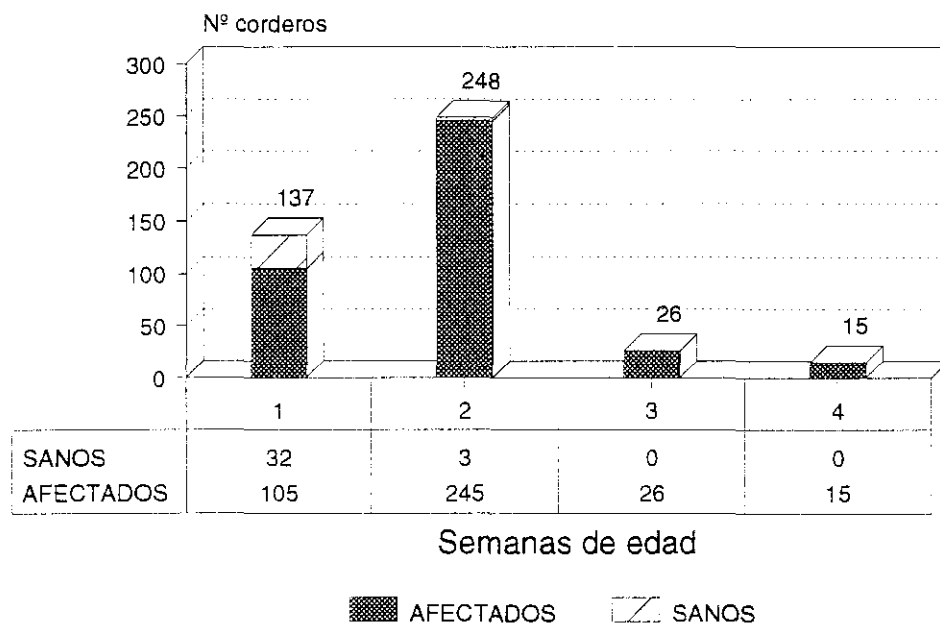


Figura 2b. Distribución de los corderos estudiados por semanas de edad.

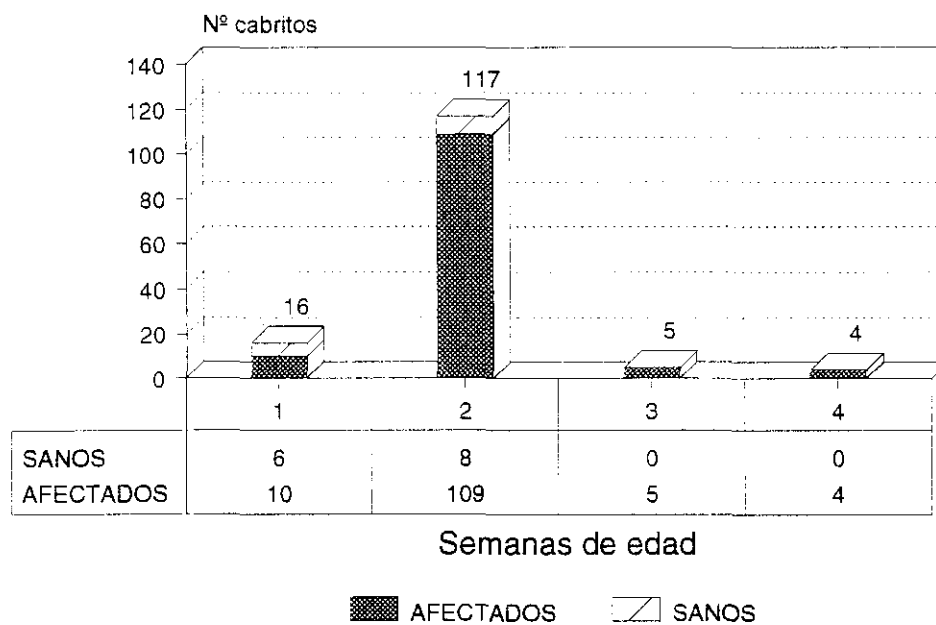


Figura 2c. Distribución de los cabritos estudiados por semanas de edad.

Esta distribución mayoritaria en la segunda semana de vida fue mucho más marcada en el caso de los cabritos dado que de los 142 cabritos de los que se recogieron muestras, 117 estaban en la segunda semana de vida (figura 2c). En el caso de los corderos, de los 426 animales estudiados 276 eran animales en la segunda semana de vida y 137 en la primera (figura 2b).

Todos los animales sanos de los que se recogieron muestras se hallaban en las dos primeras semanas de vida (figura 2a). El 77,55% (38/49) de ellos eran animales menores de cinco días de vida, edad a la que solía iniciarse el proceso.

IV.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DE E.COLI.

En la tabla 13 se exponen los resultados de la detección de la actividad del enzima β -glucuronidasa y de la producción de indol de las 6 especies de enterobacterias utilizadas como testigos en la prueba rápida de identificación I+G. La actividad β -glucuronidasa se detectó en la cepa de E.coli y en la de Shigella sonnei en la primera hora cuando se incubaban a 44°C, y en la segunda hora cuando se hacía a 37°C. Las otras especies de enterobacterias siguieron siendo negativas a esta prueba a las 24 horas de incubación.

TABLA 13. Resultados de la prueba de identificación rápida I+G de las 6 especies de enterobacterias utilizadas como testigos.

	Detección de β -glucuronidasa tras incubar a								Detección de Indol
	37°C				44°C				
	durante (hrs)				durante (hrs)				
	1	2	6	24	1	2	6	24	24
<u>E.coli</u>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. enterica sp. arizonae</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Shigella sonnei</u>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<u>K.pneumoniae</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>E.cloacae</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>P. mirabilis.</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La producción de indol solamente se detectó en E.coli. La reacción positiva aparecía después de una hora de incubación tanto a 44° como a 37°C.

De acuerdo con estos resultados, para la identificación de los aislados de campo por la prueba de I+G se eligió la temperatura de incubación de 44°C por ser la que daba reacciones más intensas en un hora.

Los resultados de la identificación de los aislados de campo con la prueba de I+G se detallan en la tabla 14. De los aislados fermentadores de la lactosa, 670 resultaron β -glucuronidasa e indol positivos en la prueba de I+G y, por lo tanto, se identificaron como E.coli. De los aislados lactosa positivos que resultaron negativos a una de las dos pruebas, se identificaron como E.coli, por pruebas bioquímicas o por API-20E, 26 cepas β -glucuronidasa negativas y 1 cepa indol negativa. En total se identificaron como E.coli 697 cepas fermentadoras de la lactosa.

TABLA 14. Resultados de la identificación de los aislados de campo.

Fermentación lactosa	Prueba de I+G		N° cepas de <u>E.coli</u> identificadas		
	β -gluc.	indol	por I+G	por API-20E	TOTAL
+	+	+	670	-	702
+	+	-		1	
+	-	+		26	
-	+	+	5	5	

En 5 aislados lactosa negativos se detectó la producción de β -glucuronidasa e indol y su identificación como E.coli se confirmó por el sistema API-20E. En total se identificaron como E.coli 702 de las cepas aisladas, de las cuales 27 eran negativas a una de las dos pruebas de I+G y 5 no fermentaban la lactosa. Por lo tanto, la sensibilidad del método de identificación basado en estas tres pruebas fue del 95,44%.

De las 702 cepas de E.coli aisladas, 8 (1,13%) fueron hemolíticas en agar sangre de carnero al 5%.

En la tabla 15 se indica el número de cepas de E.coli aisladas de corderos y cabritos afectados de diarrea y sanos. De las 702 cepas identificadas como E.coli, 495 se aislaron de corderos y 207 de cabritos. De las 495 cepas de origen ovino, 430 se aislaron de animales diarreicos y 65 de animales sanos, mientras que de las 207 de origen caprino, 187 se aislaron de animales diarreicos y 20 de animales sanos.

TABLA 15. Número de cepas de E.coli aisladas de animales afectados de diarrea y sanos.

	N° de cepas aisladas de animales		Total
	Afectados	Sanos	
OVINO	430	65	495
CAPRINO	187	20	207
TOTAL	617	85	702

IV.3. DETECCION DE LAS FIMBRIAS F5, F41 Y F17 EN LAS CEPAS DE E.COLI AISLADAS DE CAMPO

IV.3.1. Especificidad de los sueros policlonales absorbidos

En la tabla 16 se muestran los resultados de las reacciones de aglutinación de los sueros policlonales monoespecíficos producidos por nosotros frente a las fimbrias F5, F41 y F17 con las 15 cepas de referencia utilizadas como testigos. Estos sueros detectaron los antígenos correspondientes en las cepas homólogas cultivadas a 37°C tanto en el medio Minca-Is como en agar sangre, si bien, las reacciones positivas fueron mucho más intensas y rápidas a partir del crecimiento en Minca-Is. Ninguno de los sueros reaccionó con las cepas de referencia que expresaban los antígenos F4 o F6.

TABLA 16. Reacciones de aglutinación de los sueros policlonales monoespecíficos producidos por nosotros frente a las fimbrias F5, F41 y F17 con las cepas de referencia utilizadas como testigos.

CEPAS	Antígenos fimbriales	Minca-Is 37°,18 hr.			Agar sangre 37°,18 hr.		
		F5	F41	F17	F5	F41	F17
B41	F5,F41	+++	+++	-	+	+	-
B44	F5,F41	+++	+++	-	+	+	-
483	F5,F41	+++	+++	-	+	+	-
B44m	F5	+++	-	-	++	-	-
B80	F5	+++	-	-	+	-	-
S13	F5	+++	-	-	+	-	-
B41m	F41	-	++	-	-	+	-
M1676	F41	-	++	-	-	+	-
M1751	F41	-	++	-	-	+	-
503/86	F4	-	-	-	-	-	-
NR246	F4	-	-	-	-	-	-
NR 3	F4	-	-	-	-	-	-
1Aa	F6	-	-	-	-	-	-
Sz-S-22	F6	-	-	-	-	-	-
A11a ₂	F5,F41,F17	++	++	+++	+	-	+

Negativa:-, positiva débil:+, positiva moderada:++, positiva fuerte:+++

IV.3.2. Detección de las fimbrias F5, F41 y F17 en los aislados de campo.

La expresión de las fimbrias F5 y F41 no se detectó, por aglutinación en porta con los sueros policlonales, en ninguna de las 702 cepas de E.coli aisladas de campo. No obstante, 8 de las cepas (1,13%) resultaron autoaglutinantes con dichos sueros. Estas cepas autoaglutinantes se estudiaron, asimismo, con la prueba comercial FIMBREX resultando negativas 3 de ellas y 5 autoaglutinantes (0,71% del total).

La fimbria F17, sin embargo, se detectó en 33 de las 702 cepas de E.coli, lo que supone el 4,7% de los aislados (tabla 15). El porcentaje de cepas F17⁺ entre las aisladas de corderos fue del 3,03% (15/495) y del 8,69% (18/207) entre las aisladas de cabritos (tabla 15). En ninguna de las cepas F17⁺ se detectó la expresión de las fimbrias F5 ni F41 con los sueros policlonales monoespecíficos ni con el reactivo comercial FIMBREX. Las cepas 33 F17⁺ se aislaron de otros tantos animales, todos ellos afectados de diarrea. La frecuencia de aislamiento fue del 3,83% de los corderos diarreicos y del 14,06% de los cabritos diarreicos (tabla 15).

TABLA 17. Detección de la Fimbria F17 en cepas de E.coli aisladas de corderos y de cabritos.

	Nº cepas aisladas	Nº (%) [*] cepas F17 positivas	Nº de animales estudiados (diarreicos/sanos)	% de animales diarreicos infectados ^{**}
OVINO	495	15 (3,03)	426 (391/35)	3,83
CAPRINO	207	18 (8,69)	142 (128/14)	14,06
TOTAL	702	33 (4,7)	568 (519/49)	6,35

* % calculado respecto al número de cepas aisladas.

** % calculado respecto al número de animales diarreicos estudiados.

Las 33 cepas de E.coli que expresaban el antígeno F17 se aislaron de animales afectados de diarrea, de edades comprendidas entre los 5 y los 30 días. En la figura 3 se muestra la distribución de las cepas F17⁺ por semanas de edad de los animales de los que se aislaron. Como puede observarse, la mayoría de las cepas se aislaron de animales en la segunda semana de vida: 12 de las 15 cepas ovinas y 17 de las 18 caprinas. Las 3 cepas

restantes de origen ovino procedían de animales en la 1ª, 3ª y 4ª semanas y la restante de caprino de un animal en la 3ª semana de vida.

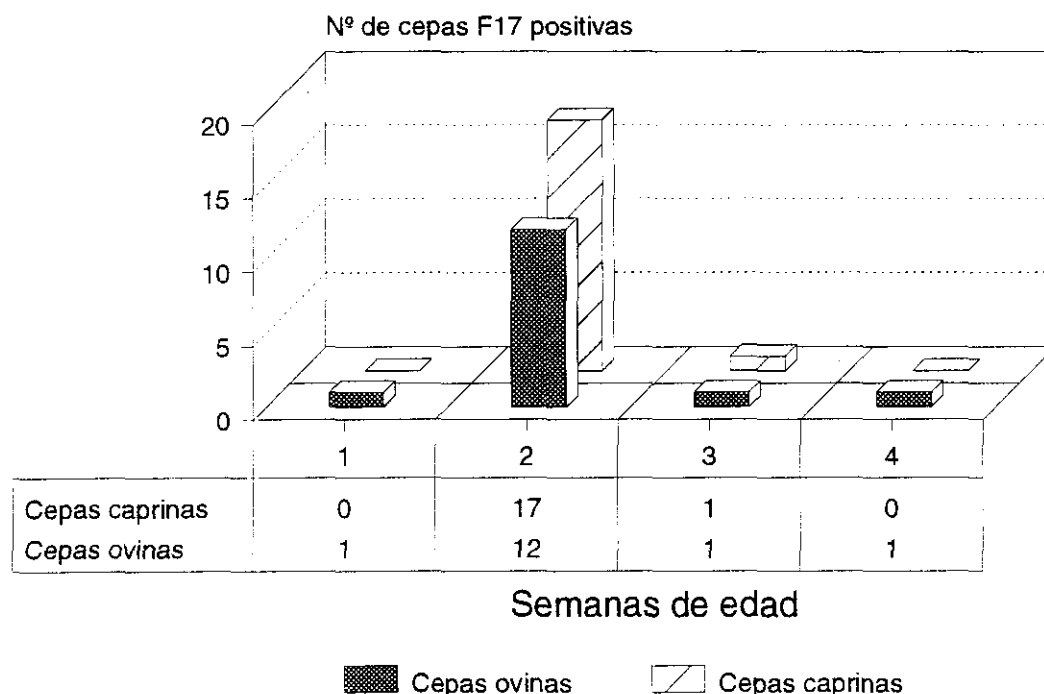


Figura 3. Distribución de las cepas F17⁺ por semanas de edad de los animales de los que fueron aisladas.

IV.4. DETECCIÓN DE STa POR EL ENSAYO EN RATON LACTANTE (ERL)

IV.4.1. Determinación de los valores de los límites mínimo positivo y máximo negativo de los coeficientes de deshidratación.

Para determinar los valores de los límites mínimo positivo y máximo negativo de los coeficientes de deshidratación en nuestras condiciones de trabajo se utilizaron 14 cepas de referencia de origen bovino y ovino: 7 productoras de STa y 7 no productoras. De cada una de ellas se ensayaron tres sobrenadantes obtenidos independientemente. En la tabla 18 figura

la media aritmética y la desviación estandar de los coeficientes de deshidratación obtenidos para cada una de las cepas de referencia con los tres sobrenadantes ensayados.

TABLA 18. Coeficientes de deshidratación obtenidos con las cepas de referencia STa⁺ y STa⁻.

Cepa	STa	Nº de sobrenadantes	Media ± D.E.
S13	+	3	0,136 ± 0,010
B41	+	3	0,142 ± 0,013
B41m	+	3	0,115 ± 0,001
B44	+	3	0,153 ± 0,007
B44m	+	3	0,181 ± 0,007
B80	+	3	0,133 ± 0,007
483	+	3	0,174 ± 0,011
S5	-	3	0,062 ± 0,002
RVC-330	-	3	0,068 ± 0,007
RVC-95	-	3	0,073 ± 0,006
RVC-5925	-	3	0,067 ± 0,006
711+	-	3	0,065 ± 0,002
711-	-	3	0,072 ± 0,006
BM2-I	-	3	0,059 ± 0,002

D.E. desviación estandar.

Analizando globalmente los resultados, los valores de los coeficientes obtenidos con los 21 sobrenadantes de las 7 cepas enterotoxigénicas dieron una media aritmética de $0,148 \pm 0,023$. El intervalo de confianza del 95% (IC-95) para este grupo de valores fue de 0,102-0,194 ($0,148 \pm 0,46$). Con el grupo de valores de los 21 coeficientes de las 7 cepas no productoras de STa se obtuvo una media aritmética de $0,067 \pm 0,006$ y un intervalo de confianza del 95% de 0,055-0,079 ($0,067 \pm 0,012$).

De acuerdo con estos resultados, el límite inferior positivo del ensayo se estableció en 0,102 y el límite superior negativo en 0,079. Los valores intermedios se consideraban estadísticamente dudosos.

IV.4.2. Detección de STa en cepas de E.coli aisladas de campo

En la figura 4 se muestra la distribución de los coeficientes de deshidratación obtenidos con los 149 aislados de campo ensayados y con las 14 cepas de rumiantes utilizadas como testigos. Los resultados obtenidos con los aislados de campo se han diferenciado en dos grupos en la figura 4. En uno de ellos se incluyen las 33 cepas en las que previamente se había detectado la fimbria F17 y en el otro las 127 cepas restantes en las que no se había detectado ninguna de las fimbrias estudiadas (NF) y que habían sido aisladas de animales de edades comprendidas entre las primeras horas de vida y una semana. Como se observa en la figura, los coeficientes se distribuyen en dos grupos de valores claramente diferenciados. Los valores positivos corresponden a los 21 sobrenadantes de las 7 cepas productoras de STa de referencia cuyo límite inferior positivo era de 0,102.

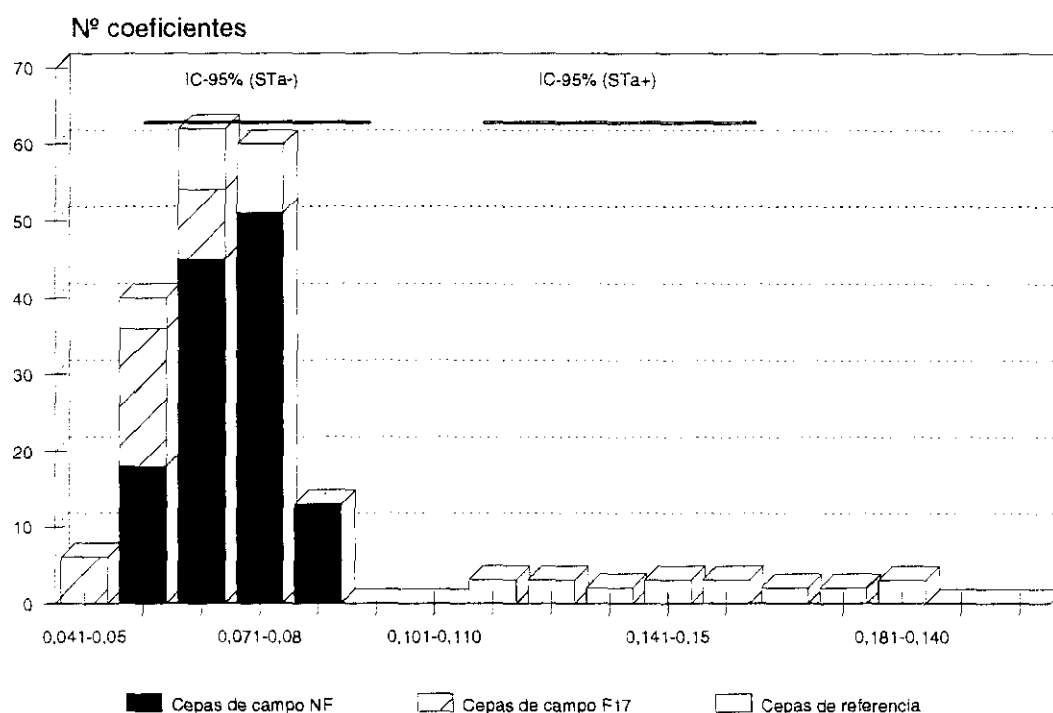


Figura 4. Distribución de los valores de los coeficientes de deshidratación de 160 cepas aisladas de campo (33 cepas F17⁺ y 127 cepas no fibriadas) y de las 14 cepas de referencia.

Los coeficientes de 151 de las 160 cepas de campo estudiadas fueron menores que el límite superior negativo del ensayo y, por lo tanto, las cepas se consideraron no productoras de STa. No obstante, los coeficientes de deshidratación de 9 de las cepas de campo estudiadas fueron superiores a 0,079 pero inferiores a 0,102. Después de repetir el ensayo en dos ocasiones más con cada una de las cepas se consideraron no productoras de STa puesto que en ningún caso se obtuvieron valores superiores a 0,09 y tampoco se observó a simple vista dilatación del intestino de los ratones lactantes.

IV.5. DETECCIÓN DE VEROTOXINAS (VTs), FACTORES CITOTOXICOS NECROTIZANTES (CNFs) Y ENTEROTOXINAS TERMOLABILES (LTs) POR EL ENSAYO EN LA LINEA CELULAR VERO

Los resultados de la detección de cepas de E.coli productoras de verotoxinas (VT), factor citotóxico necrotizante (CNF) y enterotoxina termolábil (LT) en el ensayo en células Vero se detallan en la tabla 19. La producción de verotoxinas se detectó en los sobrenadantes tratados con polimixina B de 11 de las 495 cepas aisladas de corderos (2,22%) y de 5 de las 207 cepas aisladas de cabritos (2,41 %). En total, 16 de las 702 cepas ensayadas (2,27%) eran productoras de verotoxinas.

TABLA 19. Detección de verotoxinas (VT), factor citotóxico necrotizante (CNF) y enterotoxina termolábil (LT) en cepas de E.coli aisladas de campo por el ensayo en línea celular Vero.

Origen de las cepas	N° cepas ensayadas	N°(%) de cepas productoras de		
		VT	CNF	LT
CORDEROS	495	11 (2,22)	7 (1,41)	4 (0,80)
CABRITOS	207	5 (2,41)	5 (2,41)	1 (0,48)
TOTAL	702	16 (2,27)	12 (1,70)	5 (0,71)

Las alteraciones morfológicas características inducidas por el factor citotóxico necrotizante (CNF) en las células Vero se detectaron en los sobrenadantes tratados de 12 de las cepas de E.coli (1,70%): 7 de las 495 aisladas de corderos (1,41%) y 5 de las 207 aisladas de cabritos (2,41%).

Los sobrenadantes tratados con polimixina B de 5 de las 702 cepas ensayadas (0,71%) originaron en las células alteraciones morfológicas semejantes a las inducidas por el sobrenadante tratado de la cepa H296, productora de enterotoxina termolábil utilizada como testigo positivo. Este efecto era termolábil, puesto que después de un tratamiento térmico de 80°C durante 30 minutos los sobrenadantes no inducían alteración alguna en las células Vero.

En las figuras 5a, 5b y 5c se muestran las alteraciones inducidas en las células Vero por los sobrenadantes de tres cepas aisladas de campo productoras, respectivamente de verotoxinas, factores citotóxicos y enterotoxina termolábil.

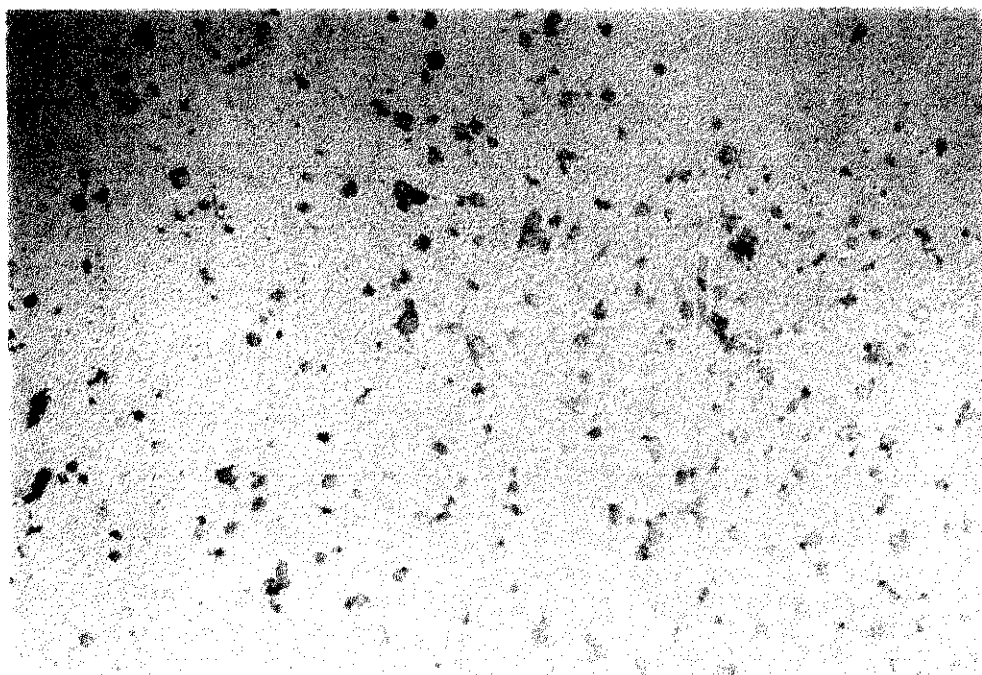


Figura 5a. Células Vero: efecto citotóxico inducido por el sobrenadante tratado con polimixina B de la cepa de campo CL-82 característico de la verotoxina. Tinción: cristal violeta al 5%.

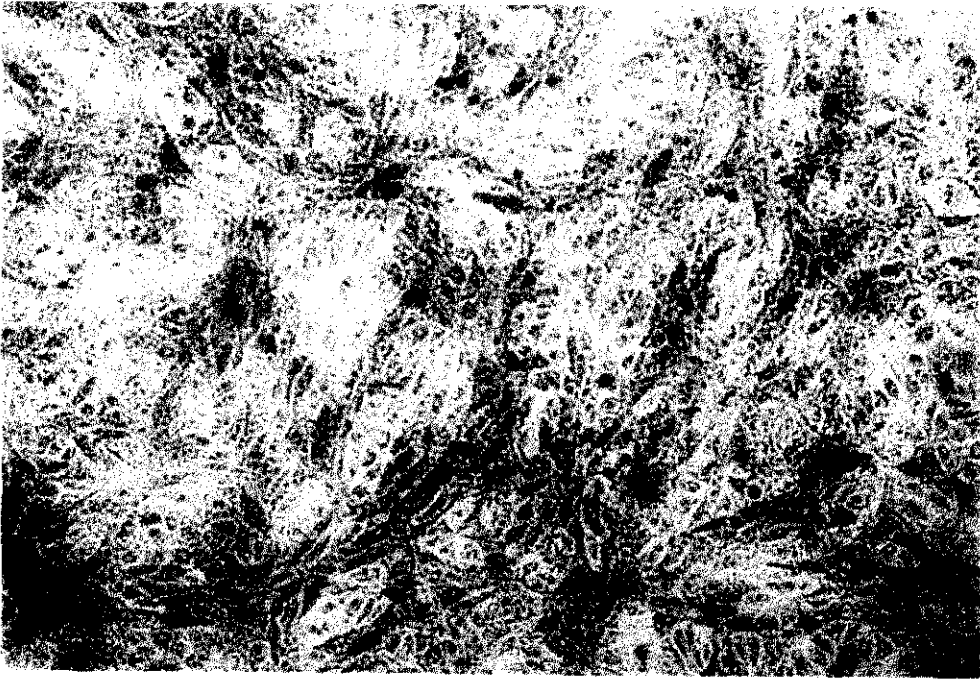


Figura 5b. Células Vero: efecto citotóxico inducido por el sobrenadante tratado con polimixina B de la cepa de campo CI.-245, característico de los factores citotóxicos necrotizantes. Tinción: cristal violeta al 5%.

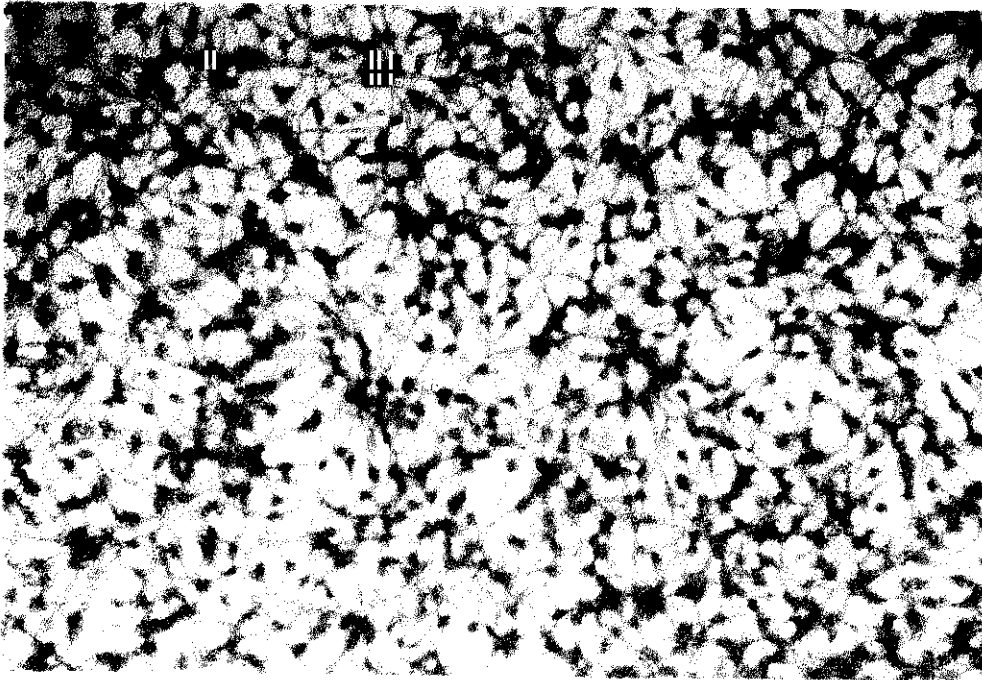


Figura 5c. Células Vero: efecto citotóxico inducido por el sobrenadante tratado con polimixina B de la cepa de campo CL-400 característico de las enterotoxinas termolábiles. Tinción: cristal violeta al 5%.

IV.5.1. Origen de las cepas productoras de citotoxinas

En las figuras 6a, 6b y 6c se muestra la distribución de las cepas productoras de VT, CNF y LT por semanas de edad de los animales de los que fueron aisladas y la presencia o no de diarrea en los mismos. Todas las cepas productoras de verotoxina se aislaron de animales en la primera y segunda semanas de vida (figura 6a). Como se observa, las 8 cepas verotoxigénicas se aislaron de animales sanos, todos ellos en la primera semana de vida. La edad media de los corderos sanos de los que se aislaron cepas verotoxigénicas era de 3 días, y de 2 días la de los cabritos. De las 8 cepas verotoxigénicas aisladas de animales afectados, 6 correspondían a animales en la segunda semana de vida y las 2 restantes a animales en la primera semana (figura 6a).

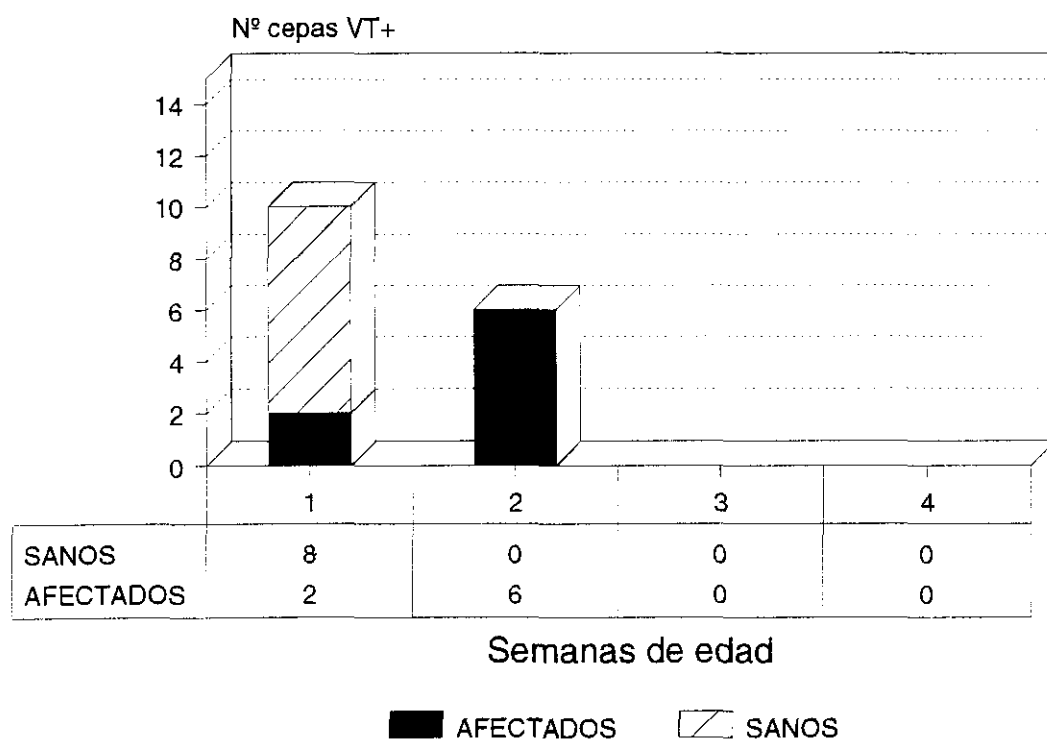


Figura 6a. Distribución de las cepas productoras de verotoxinas (VT⁺) según las semanas de edad y la presencia o no de diarrea en los animales de origen.

Las cepas productoras de CNF se aislaron de animales con de diarrea de hasta 21 días de edad (figura 6b), excepto una cepa procedente de un cabrito sano de menos de 24 horas de vida. La mayoría de las cepas (7/12) procedían de animales en la segunda semana de vida. La edad media de los corderos y cabritos de los que se aislaron las cepas productoras de CNF fue de 12,5 y 6,5 días respectivamente.

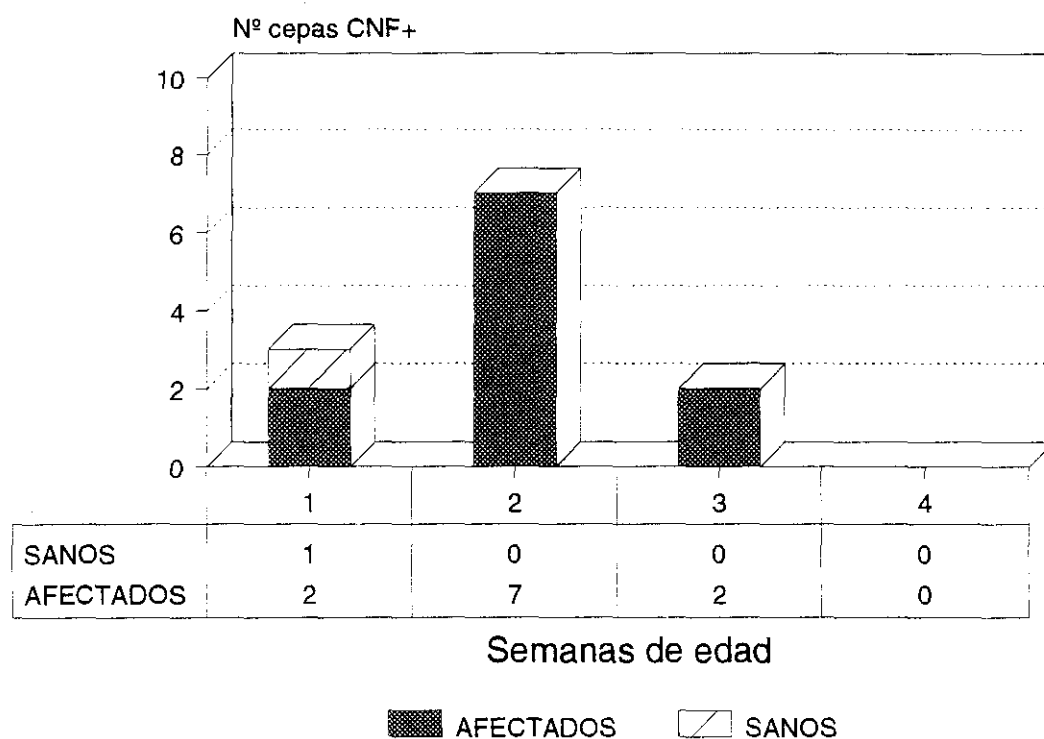


Figura 6b. Distribución de las cepas productoras de factores citotóxicos necrotizantes (CNF⁺) según las semanas de edad y la presencia o no de diarrea en los animales de origen.

De las 5 cepas productoras de LT, 4 se aislaron de animales en la primera semana de vida, como se observa en la figura 6c. De estas 4 cepas, 3 procedían de corderos sanos de 5 días de edad y la cuarta de un cabrito de 2 días afectado de diarrea. La cepa restante se aisló de un cordero de 15 días afectado de diarrea en el momento de la toma de las muestras.

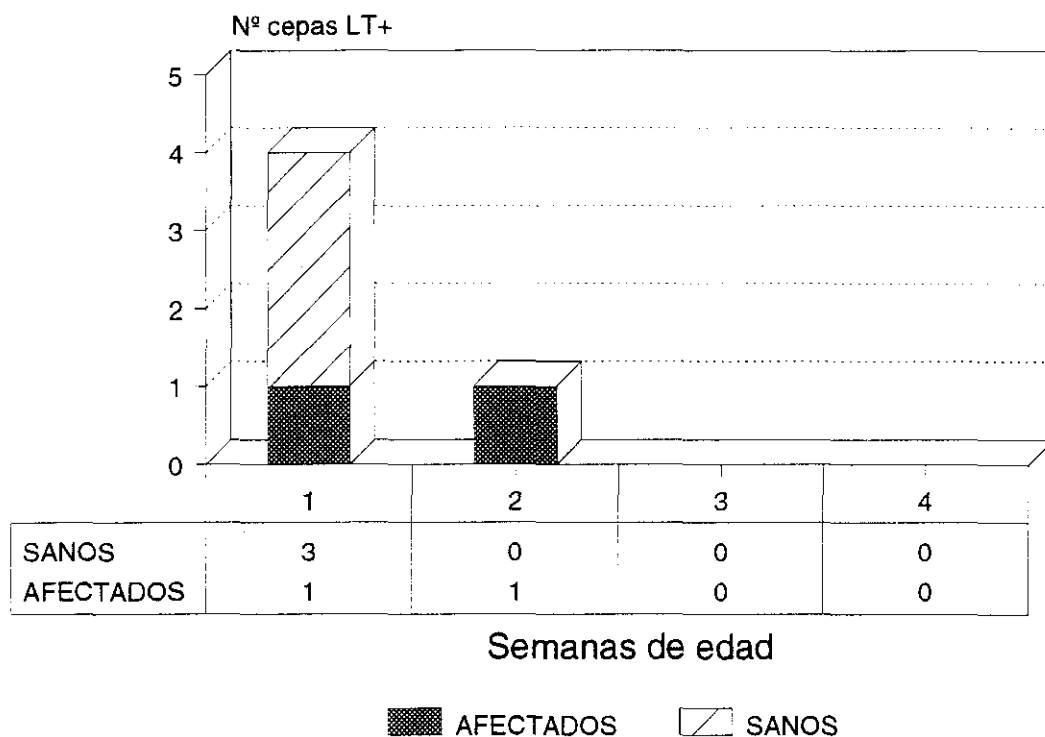


Figura 6c. Distribución de las cepas productoras de enterotoxinas termolábiles (LT⁺) según las semanas de edad y la presencia o no de diarrea en los animales de origen.

IV.6. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE CEPAS DE E.COLI PRODUCTORAS DE COLICINA V

En la tabla 20 se muestran los resultados de la detección de cepas productoras de colicinas. De los 224 aislados de campo estudiados, el 44,19% producían colicina V y el 6,25% otras colicinas. De las 156 cepas ovinas ensayadas, 64 (41,02%) produjeron colicina V y 12 (7,69%) otras colicinas. De las 64 cepas caprinas, 35 (51,47%) eran productoras de colicina V y 2 (2,94%) producían otras colicinas.

TABLA 20. Resultados de la detección de cepas de E.coli productoras de colicina V y de otras colicinas.

	N° de cepas ensayadas	N°(%) de cepas productoras de	
		Colicina V	Otras colicinas
OVINO	156	64 (41,02)	12 (7,69)
CAPRINO	68	35 (51,47)	2 (2,94)
TOTAL	224	99 (44,19)	14 (6,25)

Como se indicó en el apartado de material y métodos, entre las 224 cepas investigadas, se incluyeron las 33 en las que se detectó la fimbria F17, las 16 verotoxigénicas, las 12 productoras de CNF y las 5 productoras de LT. Las 158 cepas restantes se seleccionaron al azar entre los aislados en los que no se había detectado la expresión de las fimbrias ni la producción de las toxinas estudiadas (cepas NFNT). La distribución de cepas productoras de colicina V y de otras colicinas en los distintos grupos de cepas de E.coli estudiados se muestra en la figura 7.

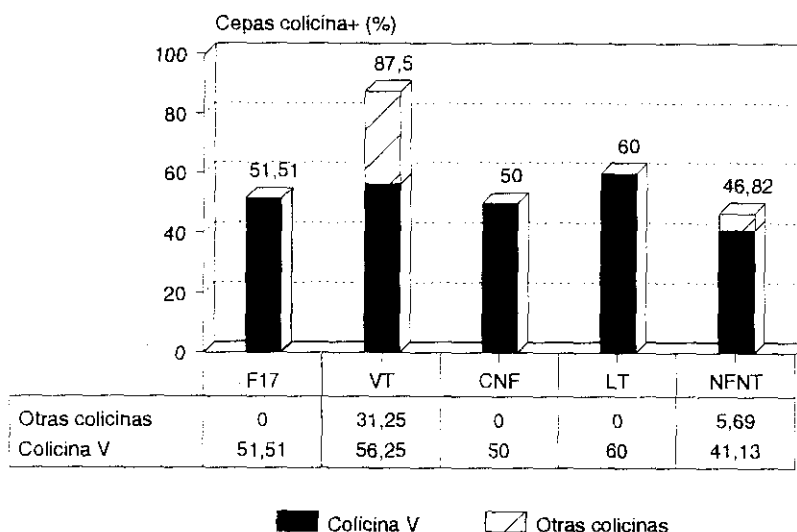


Figura 7. Distribución porcentual de las cepas productoras de colicinas en cada uno de los grupos de cepas estudiados: F17⁺, verotoxigénicas (VT), productoras de CNF (CNF), productoras de enterotoxinas termolábiles (LT) y cepas no fimbriadas y no toxigénicas (NFNT).

El porcentaje de cepas productoras de colicina V fue superior en los grupos de cepas fimbriadas y toxigénicas ($\geq 50\%$) que en el grupo de cepas en las que no se había detectado ninguno de estos factores (41,13%). De las cepas verotoxigénicas, el 56,25% (9/16) eran productoras de colicina V y el 31,25% (5/16) producían otras colicinas. De las 12 cepas productoras de CNF el 50% (6/12) producían colicina V y el 50% restante eran negativas. La producción de colicina V se detectó en 3 de las 5 cepas productoras de LT. La producción de colicinas distintas de la colicina V se detectó solamente en los grupos de cepas verotoxigénicas y NFNT, en porcentaje muy superior en las primeras (31,25% y 5,69% respectivamente) (Figura 7).

IV.7. RESULTADOS DE HEMAGLUTINACION MANOSA-RESISTENTE (HAMR) Y MANOSA-SENSIBLE (HAMS).

IV.7.1. Resultados de la HAMR y HAMS con células enteras.

En la tabla 21 se expresan el número y el porcentaje de cepas que resultaron positivas en los estudios de hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) y hemaglutinación manosa-sensible (HAMS) en cada uno de los grupos de E. coli investigados. De las 224 cepas estudiadas, el 43,30% aglutinó los eritrocitos de diversas especies animales en presencia de D-manosa (HAMR⁺). Sin embargo, los porcentajes de cepas HAMR positivas variaron notablemente en los distintos grupos así, por ejemplo, de las 16 cepas verotoxigénicas solamente 3 (18,75%) presentaban hemaglutininas manosa-resistentes, mientras que el 50% de las cepas productoras de CNF y el 84,84% de las cepas que expresaban la fimbria F17 resultaron HAMR positivas. De las 5 cepas productoras de LT, 2 eran HAMR positivas. Por último, el 36,50% de las 158 cepas seleccionadas al azar entre los aislados en los que no se había detectado la expresión de fimbrias ni la producción de las toxinas (cepas NFNT) presentaban hemaglutininas manosa-resistentes.

TABLA 21. Resultados de los estudios de HAMR y HAMS en los distintos grupos de cepas de E.coli.

Cepas de <u>E.coli</u>	N° (%) [*] de cepas de <u>E.coli</u>	
	HAMR positivas ¹	HAMS positivas ²
VT (n=16)	3 (18,75)	5 (31,25)
CNF (n=12)	6 (50,00)	5 (41,66)
LT (n=5)	2 (40,00)	3 (60,00)
F17 (n=33)	28 (84,84)	13 (39,39)
NFNT ³ (n=158)	58 (36,70)	55 (38,81)
Total (n=224)	97 (43,30)	81 (36,16)

^{*} Porcentajes calculados respecto al número (n) de cepas de cada grupo.

¹ Cepas hemaglutinantes en presencia de D-manosa con eritrocitos de diversas especies animales.

² Cepas cuya capacidad hemaglutinante con eritrocitos de cobaya era inhibida por el monosacárido D-manosa.

³ NFNT, Cepas de E.coli seleccionadas al azar utilizando una tabla de números aleatorios entre los aislados que no expresaban las fimbrias ni producían las toxinas estudiadas.

La presencia de hemaglutininas manosa-sensibles (HAMS), relacionada con la expresión de la fimbria tipo 1, se detectó en el 36,16% de las 224 cepas estudiadas en total. Los porcentajes en los distintos grupos fueron del 31,25% de las verotoxigéncias, el 41,66% de las productoras de CNF, el 60% de las productoras de LT (3/5), el 39,39% de las F17⁺ y el 34,81% de las cepas NFNT (tabla 21).

La expresión de hemaglutininas manosa-sensibles es independiente de la expresión de hemaglutininas manosa-resistentes. Por lo tanto, las cepas de E.coli pueden presentar cuatro fenotipos distintos atendiendo a las reacciones de hemaglutinación: HAMR⁺-HAMS⁻, HAMR⁺-HAMS⁺, HAMR⁻-HAMS⁺ y HAMR⁻-HAMS⁻. En la figura 8 se muestra la distribución de las cepas de cada grupo en los cuatro fenotipos posibles. En el grupo de cepas verotoxigénicas el fenotipo más frecuente fue el no hemaglutinante (HAMR⁻-HAMS⁻): 10 de las 16 cepas no expresaban hemaglutininas manosa-resistente ni manosa-sensibles. Entre las cepas productoras de CNF los fenotipos más frecuentes fueron el HAMR⁻-HAMS⁻ (5/12) y el HAMR⁺-HAMS⁺ (4/12). Las 5 cepas productoras de LT se distribuyeron casi por igual en los 4 fenotipos de hemaglutinación.

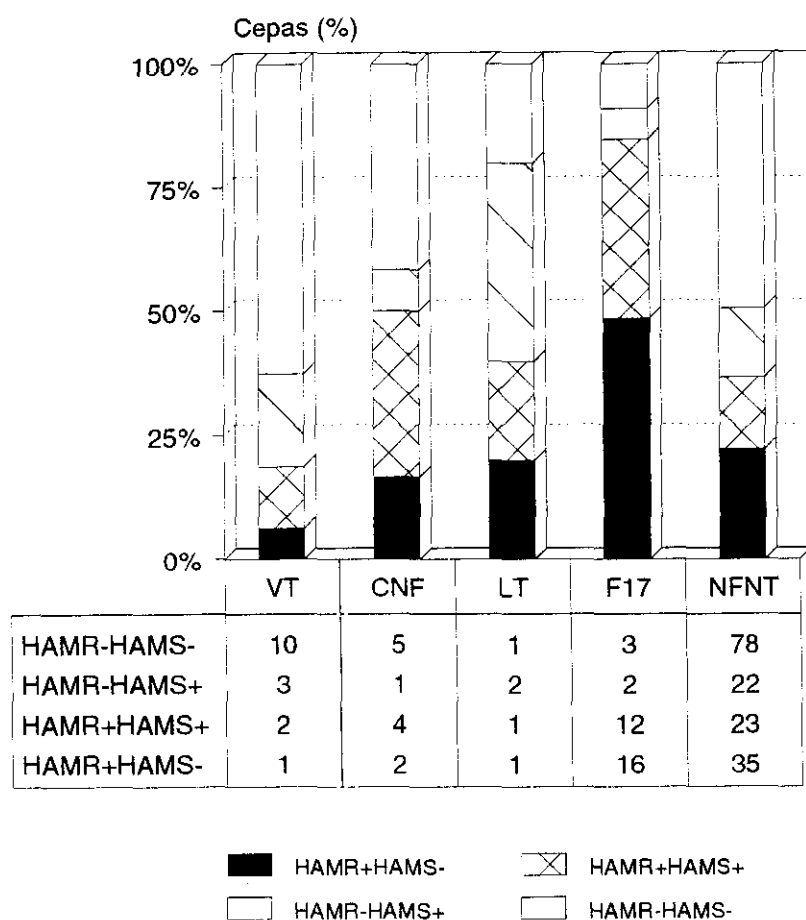


Figura 8. Distribución de las cepas de cada uno de los grupos estudiados (verotoxigénicas, productoras de CNF, productoras de LT, F17⁺ y no toxigénicas y no fimbriadas -NFNT-) en los 4 fenotipos de hemaglutinación.

Sin embargo, entre las cepas fimbriadas (F17⁺) los fenotipos más frecuentes fueron los hemaglutinantes: 16 de las 33 cepas F17⁺ expresaban hemaglutininas manosa-resistentes exclusivamente (HAMR⁺-HAMS⁻) y 12 expresaban conjuntamente hemaglutininas manosa-resistentes y manosa-sensibles (HAMR⁺-HAMS⁺).

En el grupo de las 158 cepas NFNT, seleccionadas al azar entre las que no expresaban las fimbrias ni producían las toxinas estudiadas, el fenotipo más frecuente fue el no hemaglutinante (78/158). No obstante, un número relativamente elevado de cepas expresaban

hemaglutininas manosa-resistentes exclusivamente (35/158) o conjuntamente con hemaglutininas manosa-sensibles (23/158).

IV.7.2. Modelos de HAMR de las células enteras

Las 97 cepas HAMR positivas pueden distribuirse en cinco tipos o modelos distintos de hemaglutinación de acuerdo con las especies de procedencia de los eritrocitos que aglutinan (tabla 22). Las cepas del tipo I aglutinaban, en presencia de D-manosa, los eritrocitos de ternera y los humanos del grupo A, las del tipo II los eritrocitos humanos del grupo A y las del tipo III los de ternera (tabla 21). En el tipo IV han incluido las cepas hemaglutinantes manosa-resistentes con los eritrocitos de oveja, bien exclusivamente (IVa) o bien conjuntamente con los humanos (IVb). La única cepa del tipo V aglutinaba en presencia de manosa los eritrocitos de cobaya exclusivamente.

TABLA 22. Distribución de las cepas de *E.coli* HAMR positivas en modelos de HAMR.

Tipos HAMR	Eritrocitos de (°)						Nº cepas (n=97)	% cepas respecto HAMR ⁺
	Co	Ca	Ov	Po	Te	Hm		
I	-	-	-	-	+	+	30	30,92
II	-	-	-	-	-	+	36	37,11
III	-	-	-	-	+	-	24	24,74
IVa	-	-	+	-	-	-	1	1,03
IVb	-	-	+	-	-	+	5	5,15
V	+	-	-	-	-	-	1	1,13

*Co: cobaya, Ca: caballo, Ov: oveja, Po: pollo, Te: ternera, Hm: humana del grupo A. V: variable.
n, número de cepas HAMR positivas.

El modelo II fue el más frecuente (37,11%) entre las 97 cepas con actividad HAMR, seguido del modelo I (30,92%) y del III (24,74%). Los modelos IV y V fueron poco frecuentes: 6,18% y 1,03% respectivamente (tabla 22).

En la tabla 23 se muestra la distribución de las cepas HAMR positivas de cada uno de los grupos de cepas estudiados en los 5 tipos hemaglutinantes. No se encontró una relación clara entre la expresión de factores patogénicos y el tipo de HAMR al que pertenecían las cepas positivas. No obstante, de las 28 cepas F17⁺ HAMR⁺ 16 pertenecían al tipo I (53,57%) y 11 al tipo III (39,28%). Por lo tanto, el 78,78% de las cepas F17⁺ aglutinaba los eritrocitos de ternera. Los modelos más frecuentes entre las 158 NFNT fueron el II (30/158) y el I (13/158), es decir, el 74,13% de las estas cepas aglutinaba los eritrocitos humanos del grupo A.

TABLA 23. Distribución de las cepas de cada uno de los grupos de cepas de E. coli estudiados en los distintos modelos de HAMR.

	Nº Cepas HAMR ⁺	Nº de cepas de los modelos de HAMR					
		I	II	III	IVa	IVb	V
VT	3	0	1	2	0	0	0
CNF	6	1	3	0	1	1	0
LT	2	1	1	0	0	0	0
F17	28	15	1	11	0	0	1
NFNT*	58	13	30	11	0	4	0

* NFNT, cepas de E.coli seleccionadas al azar utilizando una tabla de números aleatorios entre los aislados que no expresaban la fimbrias ni producían las toxinas estudiadas.

IV.7.3. Actividad hemaglutinante en presencia de D-manosa (HAMR) de los extractos térmicos (ET) de las cepas de E.coli HAMR⁺

En la tabla 24 se exponen los resultados del estudio de la capacidad HAMR de los extractos térmicos de las 97 cepas de E.coli que expresaban hemaglutininas manosa-resistentes en sus células enteras. Los extractos térmicos (ET) de 7 de las 30 cepas del tipo I, 17 de las del tipo II y una de las del tipo IV mostraban actividad hemaglutinante en presencia de D-manosa (HAMR) con los eritrocitos humanos. En total aglutinaron los eritrocitos humanos en presencia de D-manosa los extractos térmicos de 25 de las 71 cepas que presentaban dicha capacidad en sus células enteras (35,21%). En las 46 cepas restantes, cuyos ET fueron

negativos, la actividad hemaglutinante se mantenía en el sedimento bacteriano resuspendido después del tratamiento térmico.

TABLA 24. Resultados del estudio de la actividad HAMR de los extractos térmicos de las 97 cepas con actividad HAMR en sus células enteras.

Tipo de HAMR	Nº cepas HAMR ⁺	Nº de cepas cuyos ET fueron HAMR positivos con eritrocitos de*			
		Hm	Te	Ov	Co
I (Hm,Te) [†]	30	7	0		
II (Hm)	36	17			
III (Te)	24		0		
IVa (Ov)	1			0	
IVb (Ov,Hm)	5	1		1	
V (Co)	1				1

* ET: extractos térmicos.

† Entre paréntesis: eritrocitos con los que tenían actividad HAMR las cepas de cada tipo de HAMR. Hm: humanos del grupo A, Te: ternera, Ov: oveja, Co: cobaya.

Ninguna de las 54 cepas con actividad HAMR con los eritrocitos de ternera en sus células enteras, 30 del tipo I y 24 del III, mostró dicha actividad en sus extractos térmicos. La actividad HAMR con los eritrocitos de ternera se mantuvo en todos los casos en los sedimentos bacterianos resuspendidos después del tratamiento térmico (tabla 24).

De las 6 cepas del tipo IV solamente una mostró actividad HAMR en su extracto térmico con eritrocitos de oveja. El ET de esta cepa aglutinó también los eritrocitos humanos (tabla 24).

Ninguna de las 25 cepas de E.coli cuyos extractos térmicos mostraban actividad HAMR con eritrocitos humanos presentaba hemaglutininas manosa-resistentes en sus células enteras cuando se cultivaban a 18°C durante 48 horas.

IV.8. SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Los resultados del estudio de la sensibilidad de 92 de las 702 cepas de E.coli aisladas frente a 29 antimicrobianos se muestran en las tablas 25 a la 31. En cada dilución de antimicrobiano se indica el número de cepas para las cuales dicha dilución era la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el porcentaje de cepas sensibles a dicha dilución (porcentaje acumulativo). En la tabla 31 se especifican las concentraciones mínimas de cada antimicrobiano que inhiben el 50 y el 90% de las cepas (CMI-50 y CMI-90) y el porcentaje de cepas que resultó sensible a cada antimicrobiano según el criterio de la NCCLS.

De la 92 de cepas de E.coli, el 44,56% y el 50% resultaron sensibles a la ampicilina y a la amoxicilina respectivamente (tabla 31). Para inhibir el crecimiento del 50% de las cepas, las concentraciones mínimas de antibiótico necesarias (CMI-50) fueron de 8 µg/ml para la ampicilina y de 4 µg/ml para la amoxicilina, mientras que para inhibir el crecimiento del 90% de las cepas, las concentraciones mínimas (CMI-90) fueron de 256 µg/ml para la ampicilina y de 512 µg/ml o concentraciones superiores para la amoxicilina (tablas 25 y 31).

A las cefalosporinas de primera generación, cefalexina y cefazolina, resultaron sensibles el 62,21% y 98,91% de las cepas respectivamente (tabla 31). Las concentraciones mínimas de estos antimicrobianos para inhibir el 90% de las cepas fueron de 8 µg/ml para la cefalexina y 2 µg/ml para la cefazolina. El 71,73% de las cepas fueron sensibles a la cefuroxima, el 73,91% al cefamandol y el 98,91% al cefaclor. Las CMI-90 fueron de 8 µg/ml para los dos primeros y de 1 µg/ml para el cefaclor. La cefalosporina de tercera generación probada, la ceftizoxima, inhibió el crecimiento del 100% de las cepas de E.coli a la concentración de 1 µg/ml. Concentraciones iguales o inferiores a 0,062 µg/ml de ceftizoxima inhibieron el 90% de las cepas.

El 26,08% de las cepas resultaron sensibles a la polimixina mientras que fueron sensibles a la colistina el 100% de las cepas estudiadas (tablas 26 y 31).

El 27,17% de las cepas resultó sensible a la estreptomicina y el 51,08% a la kanamicina, mientras que el 80,43% lo fueron a la gentamicina y el 69,56% a la neomicina. El crecimiento del 90% de las cepas se inhibía a concentraciones de ≥ 512 U/ml (CMI-90) de estreptomicina, ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, 16 $\mu\text{g/ml}$ de la gentamicina y 64 U/ml de neomicina (tablas 27 y 31).

El 95,65% de las cepas resultó sensible al ácido nalidíxico. Las 92 cepas fueron sensibles al resto de las quinolonas. El crecimiento del 100% de las cepas se inhibía a concentraciones inferiores de 1-2 $\mu\text{g/ml}$ de las quinolonas fluoradas. La enoxacina y la enrofloxacinina inhibían el crecimiento de las 92 cepas de E.coli a concentraciones de 0,25 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que la esparfloxacinina y la ciprofloxacina lo inhibían a concentraciones iguales o inferiores a 0,062 $\mu\text{g/ml}$ (CMI-100) (tablas 28 y 31).

El 8,69% de las cepas resultaron sensibles a la sulfadoxina, el 9,78% a la sulfadimetoxina y el 7,60% a la sulfametacina. La CMI-50 fue igual o superior a 512 $\mu\text{g/ml}$ con las tres sulfonamidas probadas (tablas 29 y 31).

El 27,17% de las cepas se mostraron sensibles a la tetraciclina, el 3,26% a la oxitetraciclina y el 20,65% a la doxiciclina. El 50% de las cepas se inhibía a concentraciones de 128 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, de 512 $\mu\text{g/ml}$ o mayores de oxitetraciclina y de 16 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina (CMI-50) (tablas 30 y 31).

Resultaron sensibles al cloranfenicol el 10,86% de las cepas. La CMI-50 fue de 128 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI-90 de 256 $\mu\text{g/ml}$ (tablas 30 y 31).

TABLA 25. Resultados del estudio de la sensibilidad a las penicilinas y cefalosporinas.

Antimicrobiano	Diluciones de antimicrobiano													
	≤0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥521
Ampicilina	1 * 1,08 **	2 3,26	1 4,34	0 4,34	21 27,17	8 35,86	8 44,56	10 55,43	1 56,52	2 58,69	3 61,95	3 65,21	24 91,30	8 100
Amoxicilina					4 4,34	23 29,34	19 50	1 51,08	0 51,08	0 51,08	3 54,34	4 58,69	15 75,00	23 100
Cefalexina		2 2,17	0 2,17	0 2,17	5 7,60	37 47,82	16 62,21	30 97,82	1 98,91	0 98,91	0 98,91	1 100		
Cefazolina				5 5,43	59 69,56	27 98,91	0 98,91	0 98,91	1 100					
Cefuroxima					10 10,80	28 41,30	28 71,73	25 98,91	1 100					
Cefactor	5 5,43	0 5,43	15 21,73	3 25,00	63 93,47	5 98,91	0 98,91	1 100						
Cefamandol		1 1,08	15 17,39	1 18,47	13 32,60	35 70,65	3 73,91	23 98,91	0 98,91	0 98,91	1 100			
Ceftizoxima	87 94,56	4 98,91	0 98,91	0 98,91	1 100									

* Número de cepas con esa CMI.

** Porcentaje de cepas sensibles a cada concentración de antimicrobiano (porcentajes acumulativos).

TABLA 26. Resultados del estudio de la sensibilidad a las polimixinas.

Antimicrobianos	Diluciones de antimicrobiano													
	≤0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥521
Polimixina B	2 * 2,17 **	0 2,17	2 4,34	0 4,34	12 17,39	0 17,39	8 26,08	68 100						
Colistina sulfato	21 22,82	66 94,56	5 100											

TABLA 27. Resultados del estudio de la sensibilidad a los aminoglucósidos.

Antimicrobianos	Diluciones de antimicrobiano													
	≤0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥521
Estreptomina					8 * 8,69 **	4 18,47	1 14,13	1 14,13	8 27,17	2 29,34	20 51,08	16 68,47	19 89,13	10 100
Kanamicina				1 1,08	26 29,34	14 44,56	1 45,65	5 51,08	2 53,26	1 54,34	0 54,34	0 54,34	6 60,86	36 100
Gentamicina		4 4,34	5 9,78	8 18,43	46 68,47	11 80,43	0 80,43	6 86,95	3 90,21	5 95,65	4 100			
Neomicina			1 1,08	4 5,43	37 45,65	5 51,08	0 51,08	0 51,08	17 69,56	0 69,56	18 89,13	6 95,65	4 100	

* Número de cepas con esa CMI.

** Porcentaje de cepas sensibles a cada concentración de antimicrobiano (porcentajes acumulativos).

TABLA 28. Resultados del estudio de la sensibilidad a las quinolonas.

Antimicrobianos	Diluciones de antimicrobiano													
	≤0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥521
Nalidíxico					8 * 8,69 **	47 59,78	2 61,95	31 95,65	3 98,91	0 98,91	1 100			
Pipemídico				1 1,08	25 28,26	53 85,86	10 96,73	3 100						
Oxonflico		15 16,30	55 76,08	15 92,39	7 100									
Enoxacina	77 83,69	14 98,91	1 100											
Enrofloxacina	85 92,39	6 98,91	0 98,91	1 100										
Esparfloxacina	92 100													
Ciprofloxacina	92 100													

* Número de cepas con esa CMI.

** Porcentaje de cepas sensibles a cada concentración de antimicrobiano (porcentajes acumulativos).

TABLA 29. Resultados del estudio de la sensibilidad a las sulfonamidas.

Antimicrobiano	Diluciones de antimicrobiano													
	≤0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥521
Sulfadoxina									1 *	0	4	3	4	80
									1,08 **	1,08	5,43	8,69	13,04	100
Sulfadimetoxin						1	0	0	1	0	4	3	10	73
						1,08	1,08	1,08	2,17	2,17	6,52	9,78	20,65	100
Sulfametacina									1	0	3	3	5	80
									1,08	1,08	4,34	7,60	13,04	100
SxT			6	19	8	5	7	12	14	1	0	16	4	
			6,52	27,17	35,86	41,30	48,91	61,95	77,17	78,26	78,26	95,65	100	

* Número de cepas con esa CMI.

** Porcentaje de cepas sensibles a cada concentración de antimicrobiano (porcentajes acumulativos).

TABLA 30. Resultados del estudio de la sensibilidad a tetraciclinas y cloranfenicol.

Antimicrobianos	Diluciones de antimicrobiano													
	≤0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥521
Cloranfenicol						10 * 10,86 **	0 10,86	32 45,65	5 51,08	1 52,17	3 55,43	11 67,39	29 98,91	1 100
Tetraciclina					16 17,39	9 27,17	1 28,26	1 29,34	0 29,34	1 30,43	6 36,95	14 52,17	43 98,91	1 100
Oxitetraciclina						3 3,26	4 7,60	0 7,60	0 7,60	0 7,60	3 10,86	11 22,82	5 28,26	66 100
Doxiciclina		1 1,08	3 4,34	0 4,34	7 11,95	8 20,65	2 22,82	9 32,60	23 57,60	4 61,95	21 84,78	10 95,65	1 96,73	3 100

* Número de cepas con esa CMI.

** Porcentaje de cepas sensibles a cada concentración de antimicrobiano (porcentajes acumulativos).

TABLA 31. Concentraciones mínimas inhibitorias de los distintos antimicrobianos.

Antimicrobiano	Punto de ruptura*	CMI**			Cepas sensibles (%)
		Rango	50% ***	90% ***	
Ampicilina	8	≤0,062-≥512	8	256	44,56
Amoxicilina	8	1-≥512	4	≥512	50,00
Cefalexina	8	0,125-128	4	8	62,21
Cefazolina	8	0,5-16	1	2	98,91
Cefuroxima	8	1-16	4	8	71,73
Cefaclor	8	≤0,062-8	1	1	98,91
Cefamandol	8	0,125-64	2	8	73,91
Ceftizoxima	8	≤0,062-1	≤0,062	≤0,062	100
Polimixina B	8	≤0,062-8	8	8	26,08
Colistina sulfato	8	≤0,062-0,25	0,125	0,125	100
Estreptomina	32	1-≥512	64	≥512	27,17
Kanamicina	16	0,5-≥512	8	≥512	51,08
Gentamicina	4	0,125-64	1	16	80,43
Neomicina	32	0,25-256	2	64	69,56
Nalidixico	16	1-64	2	8	95,65
Pipemídico	16	0,5-8	2	4	100
Oxonílico	16	0,125-1	0,25	0,5	100
Enoxacina	2	≤0,062-0,25	≤0,062	0,125	100
Enrofloxacina	2	≤0,062-0,5	≤0,062	≤0,062	100
Esparfloxacina	2	≤0,062	≤0,062	≤0,062	100
Ciprofloxacina	1	≤0,062	≤0,062	≤0,062	100
Sulfadoxina	256	16-≥512	≥512	≥512	8,69
Sulfadimetoxina	256	2-≥512	≥512	≥512	9,78
Sulfametacina	256	16-≥512	≥512	≥512	7,60
SxT	2/38	0,25-256	8	128	
Cloranfenicol	8	2-≥512	16	256	10,76
Tetraciclina	4	1-≥512	128	256	27,17
Oxitetraciclina	4	2-≥512	≥512	≥512	3,26
Doxiciclina	4	0,125-≥512	16	128	20,65

* Concentración de antimicrobiano a partir de la cual se consideran como resistentes a los microorganismos que puedan crecer en ella o en una concentración superior.

** Concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos expresadas en µg/ml excepto para la doxiciclina, estreptomina sulfato, neomicina y polimixina B que se expresan en U/ml.

*** Concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento del 50% (CMI-50) y del 90% (CMI-90) de las cepas.

IV.9. DETECCION Y CARACTERIZACION DE ANTIGENOS SUPERFICIALES DISTINTOS DE LOS ANTIGENOS F5, F41 Y F17 EN CEPAS DE E. COLI HAMR POSITIVAS.

IV.9.1. Características de las cepas seleccionadas.

En la tabla 32 se detallan las características de las cepas seleccionadas para el estudio de la posible presencia de nuevos antígenos fimbriales en las cepas de E.coli aisladas de los procesos diarreicos estudiados. Las tres cepas, CL-686, CL-168 y CL-245, aglutinaban los eritrocitos humanos del grupo A en presencia de D-manosa cuando se cultivaban a 37°C pero no cuando la incubación se realizaba a 18°C. Estas hemaglutininas manosa-resistentes se extraían de las células por tratamiento térmico a 60°C durante 20 minutos. Los títulos de HAMR de los extractos térmicos con eritrocitos humanos fueron 1/1536 para la cepa CL-686, 1/96 para la CL-168 y 1/48 para la CL-245. Cada una de las cepas pertenecía a un modelo diferente de hemaglutinación: la cepa CL-686 al tipo I, la CL-168 al tipo II y la CL-245 al tipo IV (tabla 32).

TABLA 32. Características de las cepas seleccionadas para el estudio de la posible presencia de nuevos antígenos fimbriales.

Cepa	Origen	HAMS	HAMR de las células enteras		HAMR de los Extractos térmicos (título HA)	Produccion de Toxinas
			Tipo	Cultivadas 18°C, 48 hr		
CL-686	Cordero 5 días con diarrea	Negativa	I	Negativa	Hum. A 1/1536	Negativa
CL-168	Cordero 5 días con diarrea	Negativa	II	Negativa	Hum. A 1/96	Negativa
CL-245	Cordero 5 días con diarrea	Positiva	IV	Negativa	Hum. A 1/48 Oveja 1/12	CNF

Las tres cepas se aislaron de corderos diarreicos de cinco días de edad y procedían de explotaciones diferentes. Ninguna de ellas expresaba los antígenos fimbriales F5, F41 ni F17 ni producía las enterotoxinas clásicas (STa o LT) ni verotoxina y solamente la cepa CL-245 producía CNF en los ensayos en células Vero (tabla 32).

IV.9.2. Reacciones de aglutinación de las tres cepas seleccionadas con los sueros policlonales.

En la tabla 33 se indican los resultados de las reacciones de aglutinación de las tres cepas seleccionadas con los sueros policlonales producidos en conejo a partir de suspensiones de bacterias vivas (sueros OK). Como era de esperar, cada cepa cultivada a 37 o 18°C reaccionaba con su suero homólogo OK. Las cepas CL-168 y CL-686 daban reacciones cruzadas cuando se cultivaban a 37°C pero no cuando la incubación se realizaba a 18°C. La cepa CL-245 cultivada a ambas temperaturas reaccionaba también con el suero OK-686, sin embargo, la cepa CL-686 no daba reacciones cruzadas con el suero OK-245 a 37 ni a 18°C (tabla 33).

TABLA 33. Reacciones de aglutinación de las cepas seleccionadas para el estudio de antígenos superficiales, cultivadas a 37 y 18°C, con los sueros policlonales producidos en conejo antes (sueros OK) y después (sueros S) de ser absorbidos con sus cepas homólogas cultivadas a 18°C durante 48 horas.

Cepas de <i>E.coli</i>		Sueros OK			Sueros S		
		686	168	245	686	168	245
Cultivadas a 37°C, 18 hrs.	CL-686	+	+	-	+	+	-
	CL-168	+	+	-	+	+	-
	CL-245	+	-	+	-	-	+
Cultivadas a 18°C, 48 hrs.	CL-686	+	-	-	-	-	-
	CL-168	-	+	-	-	-	-
	CL-245	+	-	+	-	-	-

Después de absorber los sueros con sus cepas homólogas cultivadas a 18°C (sueros S) no se daban reacciones cruzadas entre las cepas cultivadas a 18°C (tabla 33). Sin embargo,

como cabía esperar, las reacciones cruzadas entre las cepas CL-168 y CL-686 persistían cuando la incubación de las mismas se realizaba a 37°C, puesto que los anticuerpos producidos frente a los antígenos que solo se expresan a 37°C no habían sido eliminados de los sueros.

Para comprobar si las reacciones de las cepas CL-168 y CL-686 cultivadas a 37°C con sus sueros homólogos se debían exclusivamente a antígenos comunes a ambas o si además estaban presentes antígenos propios de cada cepa, se absorbió exhaustivamente el suero S-168 con la cepa CL-686 cultivada en Minca-Is a 37°C y el suero S-686 con la cepa CL-168 cultivada a 37°C. Estos sueros se denominaron B-168 y C-686 respectivamente. Los resultados de las reacciones de aglutinación con dichos sueros se muestran en la tabla 34. El suero B-168 seguía reaccionando con su cepa homóloga cultivada a 37°C. Es decir, el suero B-168 detectaba antígenos superficiales de la cepa CL-168 que se expresan a 37°C pero no a 18° y que no son comunes a la cepa CL-686. Estos antígenos se denominaron provisionalmente LC168. El suero C-686 seguía reaccionando con su cepa homóloga después de la absorción de los anticuerpos producidos frente a los antígenos comunes con la cepa CL-168. Por lo tanto, este suero detecta antígenos específicos de la cepa CL-686 que denominamos LC686.

TABLA 34. Reacciones de aglutinación después de absorber los sueros S con la cepa heteróloga con la que tenían reacciones cruzadas cultivada a 37°C.

Sueros*	Cepas cultivadas a 37°C en Minca-Is, 18 hr.	
	CL-686	CL-168
B-168	-	+
C-686	+	-

* El suero B-168 se obtuvo absorbiendo el suero S-168 con la cepa CL-686 y el suero C-686 se obtuvo absorbiendo el suero S-686 con la cepa CL-168.

IV.9.3. Estudios de microscopía electrónica.

En los estudios de microscopía electrónica se observó en las células de la cepa CL-168 la presencia de estructuras filamentosas no flagelares semejantes a fimbrias de 4-7 nm de diámetro (figuras 9 y 10). Estas estructuras no se observaron cuando las bacterias se cultivaban a 18°C. En las células de las cepas CL-686 y CL-245 cultivadas a 37°C no se observaron estructuras filamentosas.

La observación por microscopía electrónica de la cepa CL-359, una cepa aislada de campo que expresa el antígeno F17 y que no reaccionaba con los sueros B168 ni C686, reveló la presencia de estructuras fimbriales rígidas de 3-4 nm de diámetro (figura 11).



Figura 9. Microscopía electrónica de la cepa de campo CL-168 cultivada en Minca-Is a 37°C durante 18 horas. Las bacterias se tiñeron negativamente con ácido fosfotungstico al 1%. X 50.000. Barra=15µm.



Figura 10. Microscopía electrónica de la cepa de campo CL-168 cultivada en Minca-Is a 37°C durante 18 horas. Las bacterias se tiñeron negativamente con ácido fosfotungstico al 1%. X 30.000. Barra=25µm.



Figura 11. Microscopía electrónica de la cepa de campo CL-359 cultivada en Minca-Is a 37°C durante 18 horas. Las bacterias se tiñeron negativamente con ácido fosfotungstico al 1%. X 50.000. Barra=15µm.

IV.9.4. Análisis de proteínas de extractos térmicos bacterianos en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y detección inmunoenzimática sobre soportes de nitrocelulosa ("immunobloting").

El análisis electroforético del extracto térmico de la cepa CL-168 cultivada a 37°C, precipitado con sulfato amónico al 20% de saturación y dializado frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, reveló la presencia de dos bandas proteicas mayoritarias como se observa en la figura 12 (carril b). Los pesos moleculares estimados según la movilidad electroforética relativa de estas bandas fueron 19.500 y 38.900 Da.

El perfil electroforético del extracto térmico de la cepa CL-686, obtenido en las mismas condiciones, fue claramente distinto al de la cepa CL-168, excepto para una banda polipeptídica de peso molecular estimado en 38.900 Da (figura 13, carril c). No se observó, sin embargo, en el extracto de la cepa CL-686 banda mayoritaria alguna a la misma distancia de migración electroforética que la banda proteica de peso molecular aproximado de 19.500 Da presente en el extracto de la cepa CL-168 (figuras 12 y 13). En el extracto térmico de esta cepa se observó la presencia de una banda mayoritaria de peso molecular estimado en 40.700 Da (figura 13).

Por otra parte, en el extracto térmico de la cepa CL-168 cultivada a 18°C no se detectó la presencia de banda mayoritaria alguna con la misma movilidad electroforética que la banda de menor peso molecular presente en el extracto térmico de la misma cepa cultivada a 37°C (figura 13, carril d).

En la figura 14 se muestran los resultados del análisis en SDS-PAGE de los extractos térmicos de las cepas CL-82 (carril b) y CL-158 (carril c) en las que previamente se había detectado la expresión del antígeno LC168 mediante aglutinación con el suero B-168. En los extractos de ambas cepas se observó la presencia de una banda proteica de movilidad electroforética semejante a la banda de 19.500 Da de la cepa CL-168.

En los ensayos de detección inmunoenzimática de las proteínas del extracto térmico de la cepa CL-168 cultivada a 37°C transferidas a soportes de nitrocelulosa, el suero S-168 reaccionó con las dos bandas mayoritarias de pesos moleculares aproximados de 19.500 y 38.900 Da (figura 15A, carril b) mientras que el suero B-168 reaccionó solamente con la banda de menor peso molecular (figura 15B, carril c).

De las bandas polipeptídicas observadas en el análisis en SDS-PAGE del extracto térmico de la cepa CL-686 cultivada a 37°C, solamente una de peso molecular aproximado de 40.700 Da reaccionó con el suero C-686 en los ensayos de detección inmunoenzimática de las proteínas transferida a membranas de nitrocelulosa (figura 16B, carril d).

IV.9.5. Semipurificación del antígeno LC168 a partir de la cepa de E.coli CL-168.

La extracción de las proteínas superficiales de una suspensión bacteriana densa de la cepa CL-168 se realizó por tratamiento térmico a 60°C durante 20 minutos. Después de este tratamiento térmico el sedimento bacteriano obtenido por centrifugación no reaccionaba con el suero B168, ni hemaglutinaba los eritrocitos humanos en presencia de D-manosa. Sin embargo, la actividad hemaglutinante manosa-resistente (HAMR) se mantenía en el sobrenadante.

La figura 17 muestra los resultados del análisis en SDS-PAGE (PhastSystem) de las proteínas precipitadas con diferentes concentraciones de saturación de sulfato amónico a partir de tres fracciones de igual volumen del sobrenadante, resuspendidas en PBSU y dializadas frente a ese mismo tampón. En las tres se observó en el gel de separación la presencia de dos bandas mayoritaria a la misma distancia de migración electroforética y varias bandas minoritarias. Por lo tanto, no se observaron diferencias significativas en el patrón de migración electroforética de las proteínas precipitadas con diferentes concentraciones de sulfato amónico. Debido a ello, se reunieron las tres soluciones dializadas y se aplicaron a una columna de gel filtración.

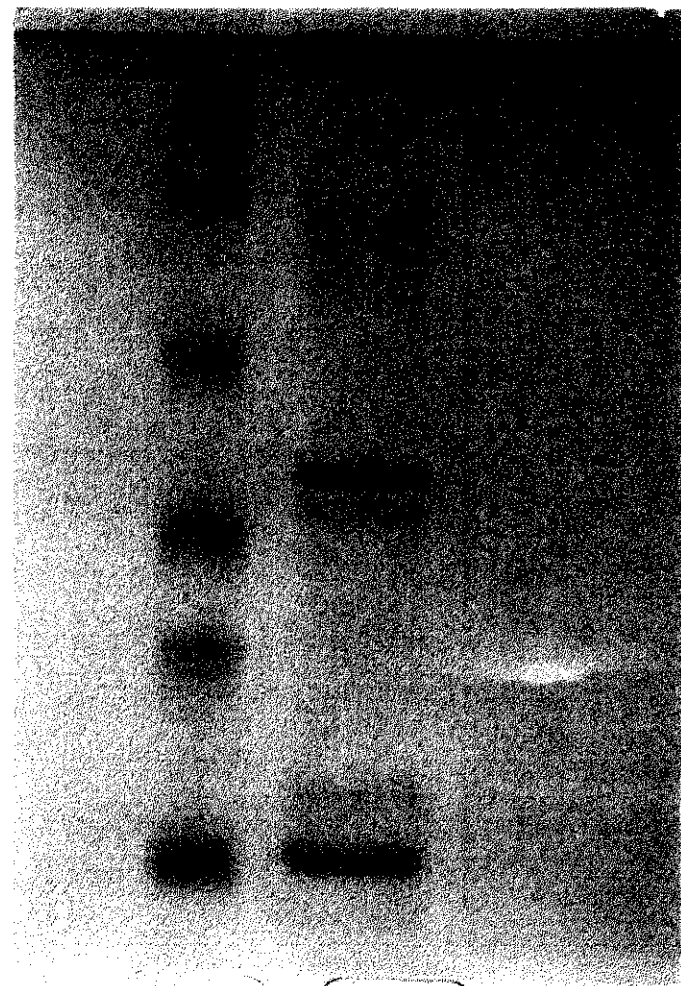


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14% (a) Patrón de peso molecular, (b) extracto térmico (60°C, 20 min.) de la cepa CL-168 cultivada a 37°C durante 18 horas, precipitado con sulfato amónico al 20% de saturación y dializado.

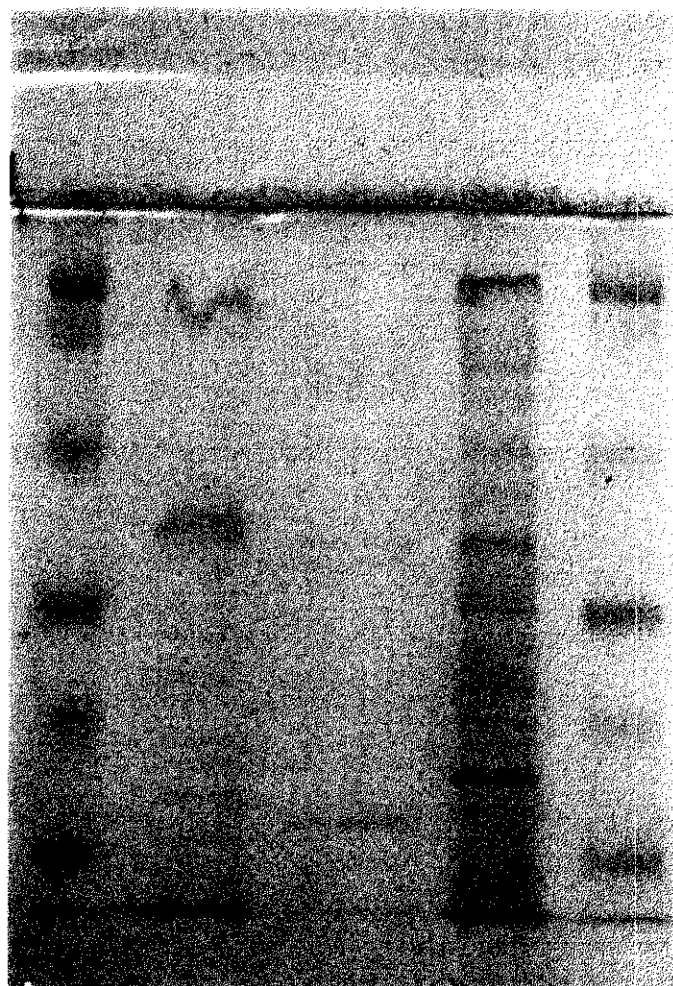


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14% (a) Patrón de peso molecular, y extractos térmicos (60°C, 20 min.) de las cepas (b) CL 686 cultivada a 37°C durante 18 horas, (c) CL-186 cultivada a 37°C durante 18 horas y (d) CL-168 cultivada a 18°C durante 48 horas, precipitados con sulfato amónico al 20% de saturación y dializados de las cepas.

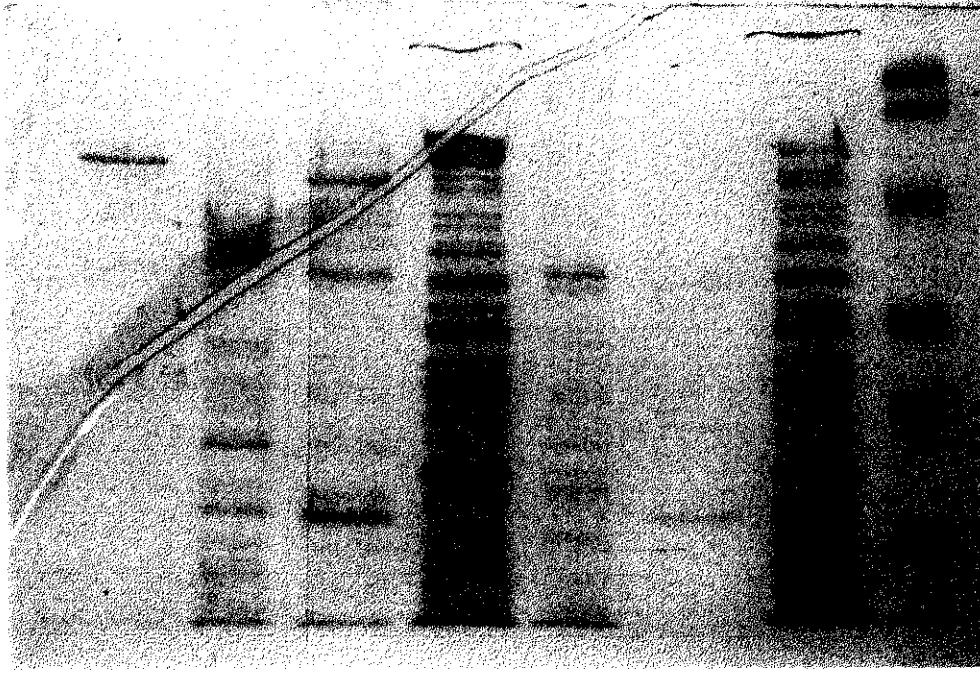


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14%. Extractos térmicos (60°C, 20 min.) de las cepas (a) 39a cultivada a 37°C, 18 horas, (b) CL-82 cultivada a 37°C, 18 horas, (c) CL-158 cultivada a 37°C, 18 horas, (d) CL-686 cultivada a 18°C durante 48 horas, (e) CL-686 cultivada a 37°C, 18 horas, (f) CL-168 cultivada a 37°C, 18 horas, (g) CL-168 cultivada a 18°C, 48 horas, (h) Patrón de peso molecular.

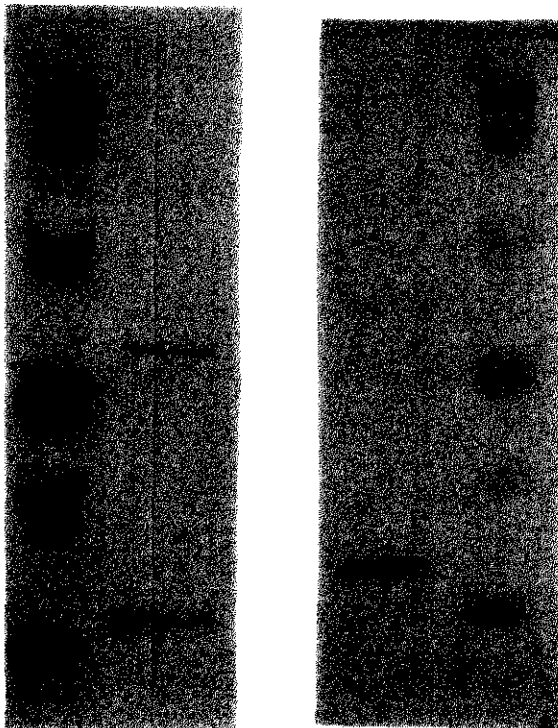


Figura 15. Detección inmunoenzimática de las proteínas del extracto térmico de la cepa CL-168 transferidas a soportes de nitrocelulosa con los sueros (A) S-168 y (B) B-168. De izquierda a derecha: (a) patrón de peso molecular, (b) y (c) extracto térmico de la cepa CL-168 transferido, (d) patrón de peso molecular.

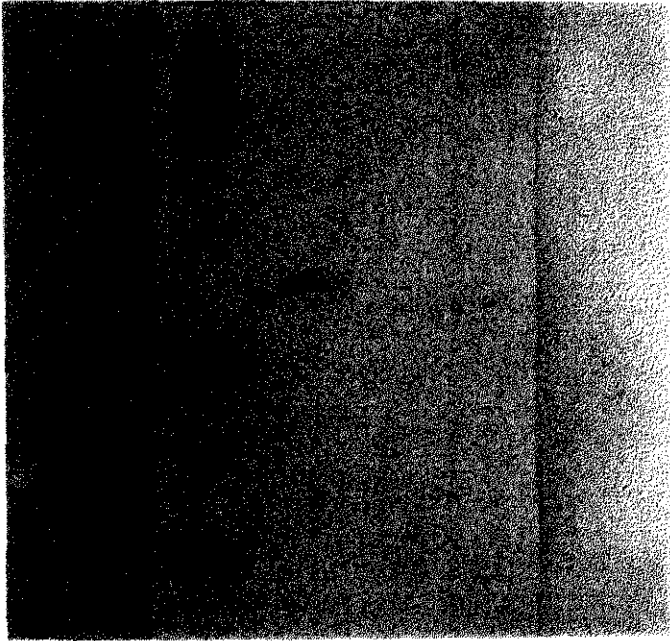


Figura 16. Detección inmunoenzimática de las proteínas del extracto térmico de la cepa CL-686 transferidas a soportes de nitrocelulosa con el suero C686. (a) Patrón de peso molecular. (b) extracto térmico de la cepa CL-686.

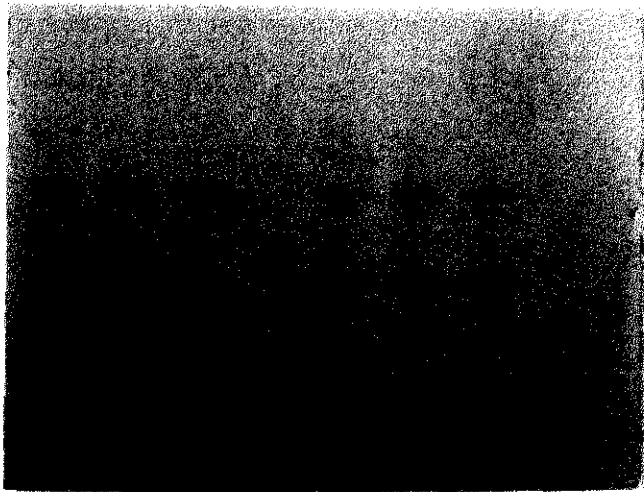


Figura 17. Semipurificación del antígeno LC168: Electroforesis en gel ultrafino de poliacrilamida del 8-25% (SDS-PAGE) del extracto térmico (60°, 20 min.) de la cepa CL-168 precipitado con sulfato amónico al (a) 10%, (b) 20% y (c) 60% de saturación durante 2 horas a 4°C.

En el cromatograma obtenido tras la elución de la columna de gel filtración con tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, conteniendo urea 2 M, se detectó una fracción proteica mayoritaria o pico de absorbancia máxima a 280 nm (figura 18). Las fracciones correspondientes a este pico mostraban actividad hemaglutinante manosa-resistente con los eritrocitos humanos.

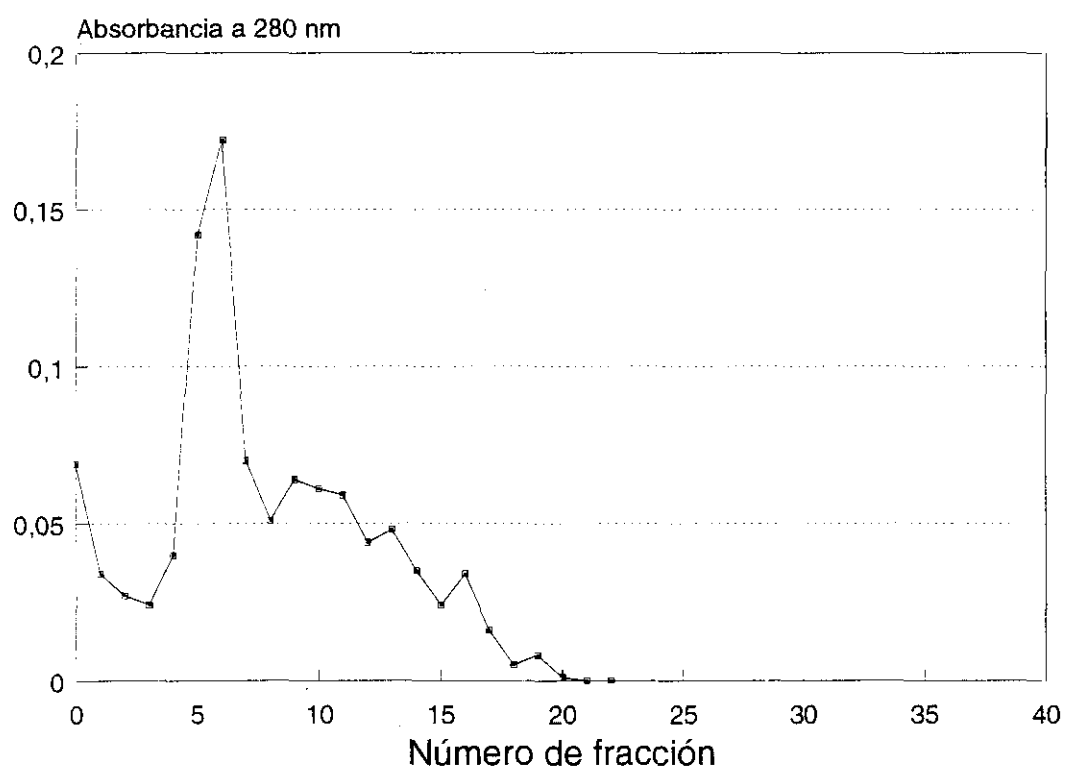


Figura 18. Semipurificación del antígeno LC168: cromatogra de gel filtración en columna de Sepharosa CL-4B de la fracción proteica obtenida a partir de la cepa CL-168 cultivada a 37°C, 18 horas, por tratamiento térmico (60°C, 20 min.) y precipitación con sulfato amónico. Elución con tampón fosfato 50 mM, pH 7,2, conteniendo urea 2M. Absorbancia a 280 nm.

Después del tratamiento con deoxicolato sódico y las sucesivas diálisis, el análisis de las proteínas concentradas por liofilización en geles de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) reveló la presencia de dos bandas mayoritarias de pesos moleculares aproximados de 19.500 y 38.900 Da. Estos resultados se muestran en la figura 19 (carril a). En los ensayos de detección inmunoenzimática de proteínas sobre soportes de nitrocelulosa, el suero B-168 reaccionó exclusivamente con la banda de peso molecular aproximado de 19.500 Da como se observa en la figura 20 (carril c). Sin embargo, el suero S-168 reaccionó con las dos bandas (figura 20, carril f).

Las proteínas semipurificadas mostraron actividad hemaglutinante manosa-resistente con los eritrocitos humanos del grupo A, con un título de 1/2048.

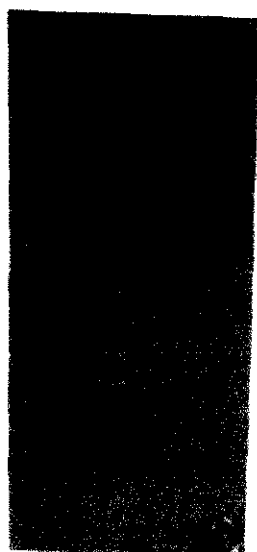


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14% del antígeno LC168 semipurificado a partir de la cepa CL-168.

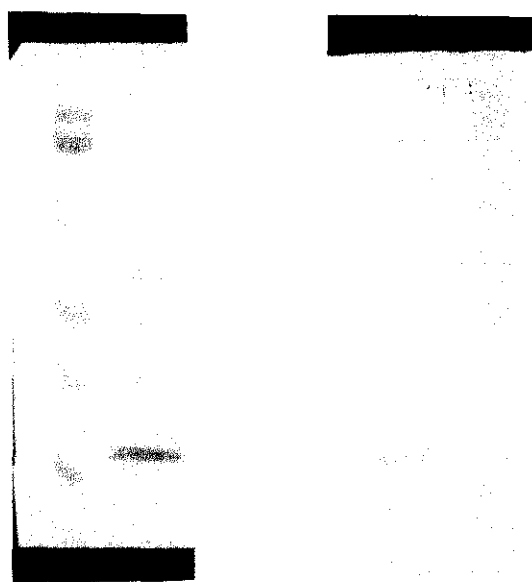


Figura 20. Detección inmunoenzimática de las proteínas de la fracción semipurificada a partir de la cepa CL-168 con los sueros (A) S-168 y (B) B-168.

IV.9.6. Prevalencia y características de las cepas de E.coli que expresan el antígeno LC168.

En la tabla 35 se detallan los resultados de la detección del antígenos LC168, por aglutinación en porta con el suero B-168, en las 702 cepas de E.coli aisladas de corderos y cabritos. La expresión del antígeno LC168 se detectó en 108 de las 702 cepas aisladas (15,38%). No obstante, es preciso destacar que el porcentaje de cepas aisladas de corderos LC168⁺ (18,58%) fue tres veces superior al de las cepas LC168⁺ procedentes de cabritos. El antígeno LC686 se detectó en 52 de las 702 cepas aisladas (7,4%).

TABLA 35 . Resultados de la detección de los antígenos LC168 y LC686 en las cepas de E. coli aisladas de corderos y cabritos.

	Nº de cepas aisladas	Nº de cepas LC168 positivas	% de cepas LC168 positivas
OVINO	495	95	18,58
CAPRINO	207	13	6,28
TOTAL	702	108	15,38

En la figura 21 se muestra la distribución de las 95 cepas LC168⁺ de origen ovino según la edad en semanas y la presencia o no de diarrea en los animales de los se aislaron. De las 95 cepas ovinas, 85 (89,47%) se aislaron de animales afectados de diarrea. Las edades de estos animales estaban comprendidas entre la primera y cuarta semanas de vida, si bien, la mayoría de las cepas (58/85) se aislaron de animales en la segunda semana de vida. Las 10 cepas procedentes de corderos sanos, se aislaron todas ellas de animales en la primera semana de vida: 6 cepas de otros tantos corderos de 3 días de edad de una misma explotación, 3 de corderos de 4 días de otra explotación y la restante de un cordero de 1 día de edad.

De las 13 cepas LC168 positivas de origen caprino, 12 se aislaron de animales en la primera semana de vida y una de un cabrito en la segunda semana y todas ellas procedían de animales afectados de diarrea (figura 22).

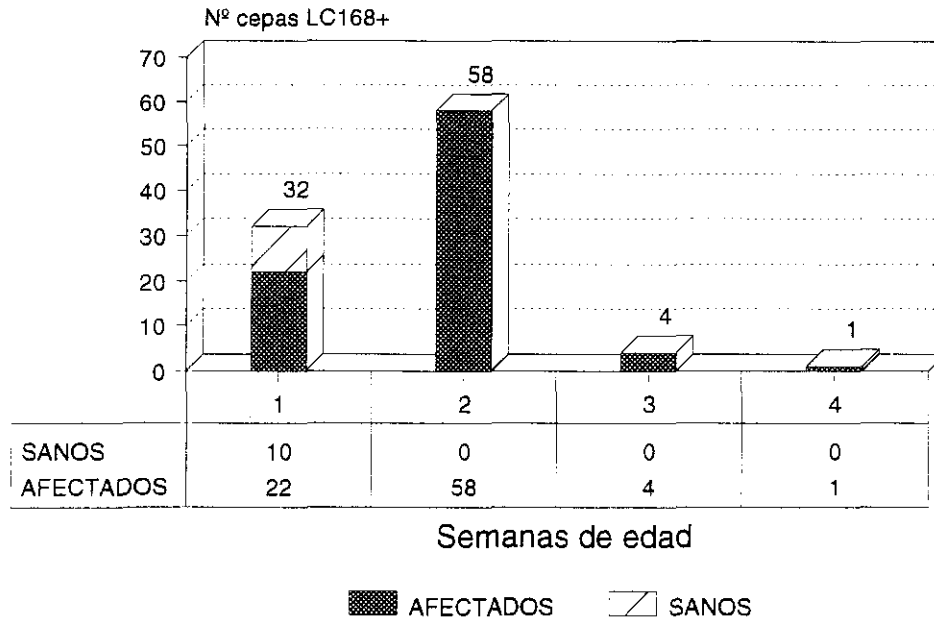


Figura 21. Distribución de las cepas LC168 positivas por semanas de edad y presencia o no de diarrea en los corderos de origen.

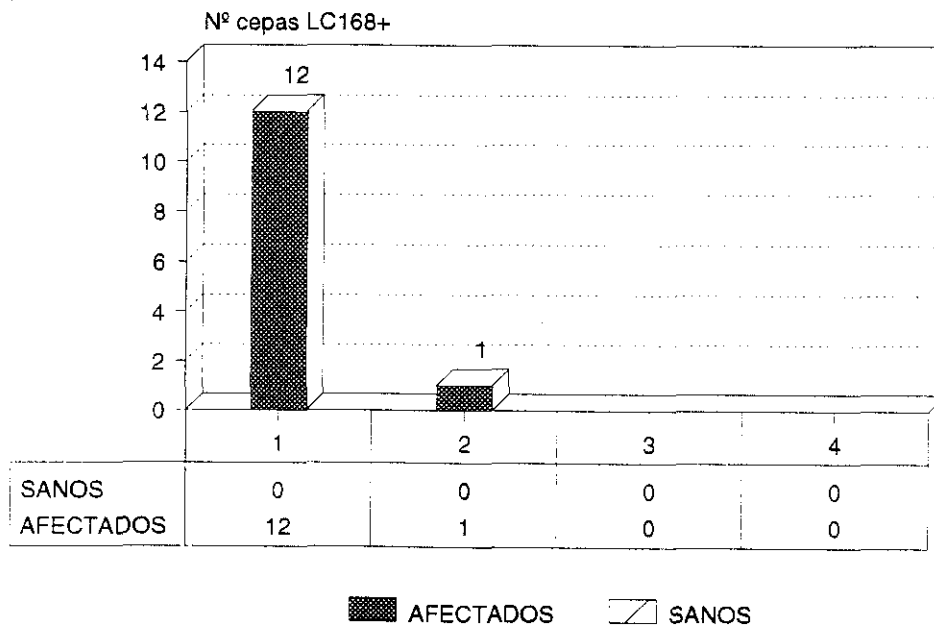


Figura 22. Distribución de las cepas LC168 positivas según semanas de edad y presencia o no de diarrea en los cabritos de origen.

En la tabla 36 se muestran los resultados de la detección del antígeno LC168 en las cepas que expresaban la fimbria F17 y en las productoras de las diferentes toxinas. En la tabla figura asimismo la edad de los animales de los que se aislaron las cepas positivas y si estaban o no afectados de diarrea en el momento de tomar las muestras. De las 33 cepas F17 positivas, 6 expresaban igualmente el antígeno LC168. Estas 6 cepas se aislaron de un cordero y de 5 cabritos, todos ellos mayores de 7 días y afectados de diarrea en el momento de tomar las muestras.

TABLA 36. Detección del antígeno LC168 en las cepas que expresaban la fimbria F17 y en las productoras de VT, CNF y LT.

Cepas de <i>E.coli</i>	Nº de cepas LC168 ⁺	Procedencia
F17 (n=33)	6	4 cabritos afectados y en la 2ª semana de vida 1 cabrito afectado y en la 3ª semana 1 cordero afectado y en la 2ª semana
VT (n=16)	2	1 cordero sano y de un día de vida 1 cordero afectado y en la 2ª semana
CNF (n=12)	1	1 cordero afectado y en la 2ª semana de vida
LT (n=5)	0	

Dos de las 16 cepas verotoxigénicas expresaban el antígeno LC168 y procedían una de un cordero con diarrea de 10 días y la otra de un cordero de un día de edad y sano. Solamente una de las 12 cepas productoras de CNF expresaba el antígeno LC168. Esta cepa se aisló de un cordero con diarrea de 8 días de vida. Finalmente, ninguna de las 5 cepas productoras de LT expresaban el antígeno LC168.

IV.9.7. Relación entre la expresión del antígeno LC168 y la actividad hemaglutinante.

En la figura 23 se muestran los resultados de la detección del antígeno LC168 en las 224 cepas en las que se investigó la capacidad hemaglutinante agrupadas por el tipo de hemaglutinación manosa-resistente (HAMR) que presentaba (I a V) o por no mostrar actividad

hemaglutinante en presencia de D-manosa (cepas HAMR⁺). La expresión del antígeno se detectó en 16 de las 30 cepas del tipo I (que hemaglutinan en presencia de D-manosa los eritrocitos humanos del grupo A y los de ternera) y en otras 10 de las 36 del tipo II (que aglutinan los eritrocitos humanos exclusivamente). De las 24 cepas del tipo III (que aglutinan en presencia de D-manosa los eritrocitos de ternera exclusivamente), 2 expresaban el antígeno, mientras que de las 6 del tipo IV (que aglutinan los eritrocitos de oveja y/o los humanos) otras 2 cepas fueron positivas. No se detectó la expresión del antígeno en la única cepa del tipo V (aglutinante con los eritrocitos de cobaya). Por último, de las 127 cepas que no mostraron actividad hemaglutinante en presencia de D-manosa (HAMR⁻), 8 expresaban el antígeno.

En la figura 24 se muestra la distribución de las 71 cepas HAMR⁺ con los eritrocitos humanos en las que se estudió la capacidad hemaglutinante de sus extractos térmicos en presencia de D-manosa en función de si dichos extractos fueron o no hemaglutinantes y de que expresasen o no el antígeno LC168. De las 25 cepas cuyos extractos aglutinaban los eritrocitos humanos en presencia del monosacárido (ET⁺), 8 expresaban el antígeno. No obstante, 13 de las 46 cepas cuyos extractos no eran hemaglutinantes también expresaban el antígeno LC168.

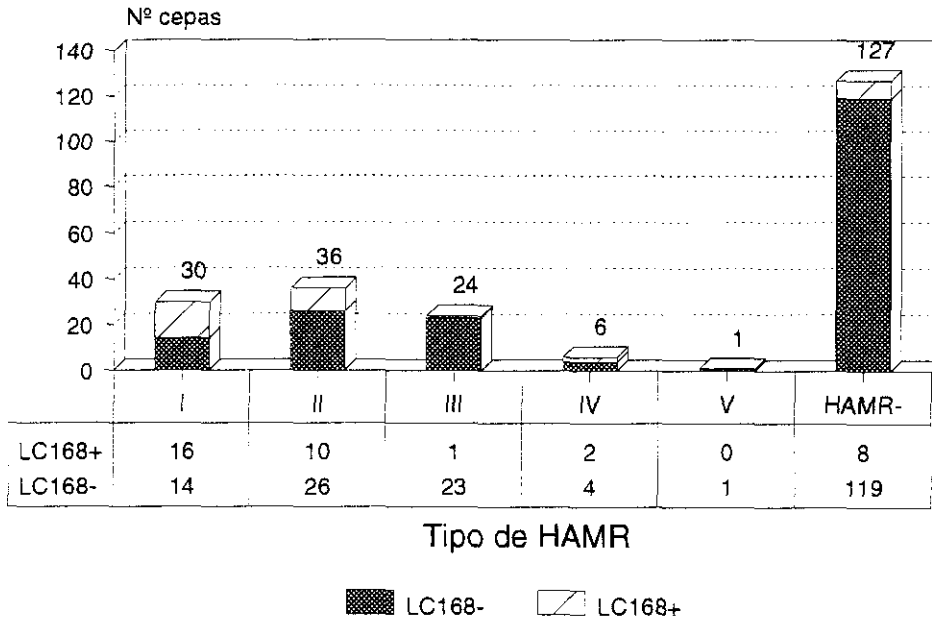


Figura 23. Relación entre la capacidad HAMR y la expresión del antígeno LC168 en 224 cepas de *E. coli*.

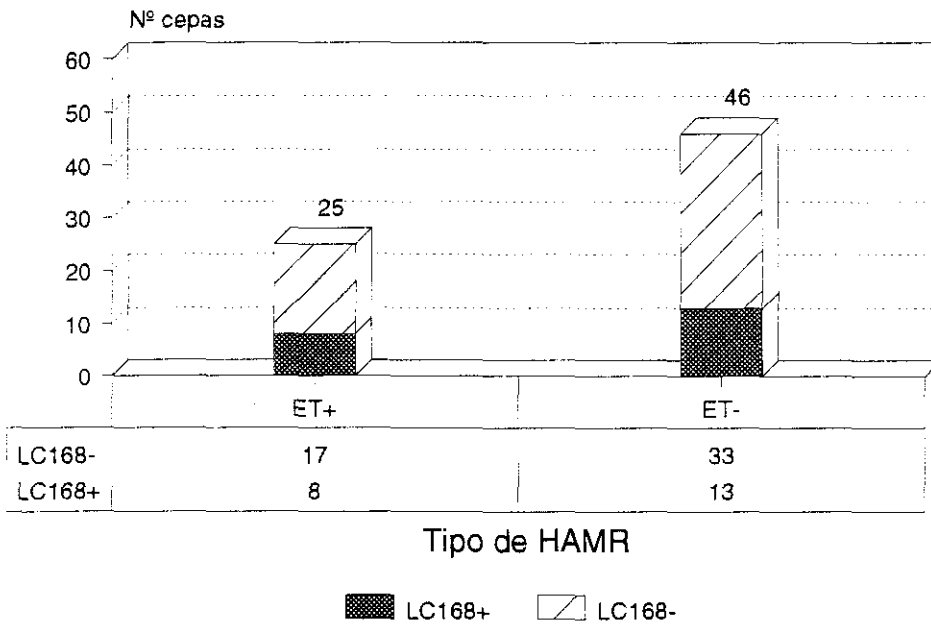


Figura 24. Relación entre la capacidad HAMR de los extractos térmicos (ET) y la expresión del antígeno LC168.

V. DISCUSSION

1. E. coli enterotoxigénicos (ECET).

La caracterización de las cepas de ECET en este estudio se ha basado en la detección de los antígenos fimbriales F5 y F41 y de la producción de enterotoxinas. Las estirpes de ECET que originan diarrea en los corderos y cabritos son las mismas que afectan a los terneros. De hecho, las cepas de ECET de origen ovino y caprino pertenecen a los mismos serogrupos y expresan los mismos factores de patogenicidad (factores de colonización y enterotoxinas) que las cepas de ECET de origen bovino (Morris y Sojka, 1985; Wray y Morris, 1985; Woodward y Wray, 1990). Además, experimentalmente se ha comprobado que las cepas enterotoxigénicas de origen ovino son capaces de originar diarrea en los terneros y viceversa (Smith y Halls, 1967a; Smith y Linggood, 1972).

La mayoría de las cepas de ECET de origen bovino expresan el antígeno F5 y/o el F41 y producen la enterotoxina STa (Isaacson *et al.*, 1978; Sherwood *et al.*, 1983; Mainil *et al.*, 1986, 1990; Woodward y Wray, 1990; Blanco, 1991; Woodward *et al.*, 1992). Aunque en algunas cepas de origen bovino se ha detectado la producción de las toxinas STb y LT (Sherwood *et al.*, 1983; Woodward *et al.*, 1992) y de la fimbria F6 (Isaacson *et al.*, 1978; Wray *et al.*, 1992) o los genes que codifican dichos factores de patogenicidad (Mainil *et al.*, 1986 y 1990), estas cepas son infrecuentes en los terneros y no se ha establecido relación alguna entre el aislamiento de estas cepas y la presentación de diarrea en los animales.

Los estudios realizados por Mainil *et al.* (1986 y 1990) con sondas de DNA que permitían detectar los genes de las toxinas STa-H, STa-P, STb y LT y de las fimbrias F4, F5, F6 y F41 han confirmado que, genotípicamente, la mayoría de las cepas de ECET de rumiantes son F5 y STa positivas. La STa que producían estas cepas era la de origen animal (STa-P). No obstante, algunas cepas bovinas portaban los genes que codifican las toxinas STb y LT y la fimbria F6 (1986 y 1990). Según Mainil *et al.* estas cepas eran posiblemente de origen porcino, aisladas accidentalmente de terneros, puesto que pertenecen a serotipos

frecuentes en el ganado porcino. Por otra parte, experimentalmente se ha comprobado que las cepas LT⁺ aisladas de cerdos eran patógenas para estos animales pero no para los terneros ni los corderos (Smith y Huggings, 1978).

Duff y Hunt (1989) aislaron cepas de E. coli F6 positivas del serotipo 0101:K103 de dos corderos de 4 días de edad afectados de septicemia. La posible patogenicidad de estas cepas para los corderos se desconoce. Los autores consideran que estas cepas eran muy posiblemente de origen porcino dado que los corderos se alojaron en corrales donde previamente se habían alojado cerdas y sus camadas.

En las cepas de ECET aisladas de rumiantes se ha establecido una estrecha correlación entre la expresión del antígeno F5 y la producción de enterotoxinas (Guinee y Jansen, 1979; Lariviere et al., 1979; Sherwood et al., 1983). Debido a ello, y al igual que en otros estudios epidemiológicos realizados en ganado bovino (Martel et al., 1981; Pohl et al., 1984; Contrepolis et al., 1985; De Rycke et al., 1986), ovino (Nagy et al., 1983) y caprino (Yvore et al., 1984; Nagy et al., 1987), en nuestro estudio se investigó en todas las cepas aisladas la expresión del antígeno F5 como un método indirecto de detección de las cepas enterotoxigénicas.

Ninguna de las cepas aisladas en este trabajo de corderos y cabritos diarreicos y sanos expresaba los antígenos fimbriales F5 o F41. Considerando estos resultados negativos y teniendo en cuenta que en los rumiantes se ha demostrado una cierta restricción de las cepas de ECET F5⁺STa⁺ a los primeros días de vida, se investigó la producción de la enterotoxina STa únicamente en las cepas de E. coli aisladas de animales afectados de diarrea menores de 7 días y en las cepas procedentes de animales sanos menores de 4 días.

Ninguna de las cepas ensayadas en ratones lactantes produjo STa. Inicialmente, los coeficientes de deshidratación de 9 de las cepas dieron valores superiores a 0,079, es decir, superiores al límite inferior de los valores negativos. No obstante, en ensayos sucesivos, los valores obtenidos con estas 9 cepas nunca fueron superiores a 0,102, el límite inferior positivo. Además en ningún caso se observó a simple vista dilatación de los intestinos de los ratones

lactantes . Por lo tanto, estas nueve cepas se consideraron finalmente no productoras de STa.

El 3,13% del total de las cepas estudiadas (22/702) expresaba el antígeno F17. No obstante, ninguna de las cepas F17⁺ dio resultado positivo en el ensayo en ratón lactante, por lo que se consideraron no enterotoxigénicas. Estos resultados se discuten más ampliamente en el apartado dedicado a las cepas de E.coli no enterotoxigénicas.

Aunque generalmente se considera que E. coli es una importante causa de diarrea y mortalidad en los ovinos y caprinos (Kimberling, 1988), los estudios etiológicos y epidemiológicos realizados en estos animales son muy escasos. Probablemente la idea generalizada sobre la elevada incidencia de la colibacilosis entérica en los pequeños rumiantes proceda de referencias de hace algunas décadas, la mayoría de ellas anteriores al descubrimiento de los factores de patogenicidad de los ECET (enterotoxinas y factores de colonización), en las que el diagnóstico de la diarrea se basaba en las características clínicas y anatomopatológicas del proceso y en el aislamiento de E. coli en proporciones elevadas del contenido intestinal de los animales afectados (Marsh y Tunncliff, 1938; Volkova, 1940; Roberts, 1957; Terlecki y Shaw, 1959; Hughes et al., 1962; Kater et al., 1963; Gates, 1977). Así, por ejemplo, en un estudio realizado por Gates (1977) en una unidad de experimentación ovina, las lesiones anatomopatológicas indicaban que la colibacilosis era la causa del 45,9% y del 37,6% del total de las muertes acaecidas en corderos de 1 a 30 días en los años 1975 y 1976 respectivamente. La mayoría de las muertes fueron atribuidas a la forma entérica de la enfermedad.

Sin embargo, en los escasos estudios realizados en explotaciones ovinas y caprinas basados en la detección del antígeno F5 y en la producción de STa la prevalencia de estirpes de ECET encontrada fue mucho menor. Nagy et al. (1983), en Hungría, detectaron el antígeno F5 en el 5,7% de las cepas ovinas investigadas, si bien, estos autores no estudiaron la producción de STa. Fassi-Fehri et al. (1988), en Marruecos, detectaron el antígeno F5 en el 10% de las cepas de origen ovino, sin embargo, menos de la tercera parte de estas cepas F5⁺ producían STa. En Inglaterra, de acuerdo con las investigaciones de Wray et al., en el período comprendido entre 1986 y 1991 la frecuencia de detección del antígeno F5 en cepas ovinas

osciló desde un 16% en 1988 a un 3,3% en 1990 (Wray et al. enviado a publicar). Sin embargo, únicamente el 1,5% del total de los aislados producían STa.

En cuanto a la especie caprina, los escasos datos publicados indican que la prevalencia de las cepas de ECET es mucho menor. Yvone et al. (1984), en Francia, no detectaron el antígeno F5 en ninguna de las cepas aisladas de 2.137 cabritos estudiados y Nagy et al. (1987), en Hungría, tan solo detectaron el antígeno F5 en cepas aisladas de 3 cabritos, dos de los cuales estaban sanos.

Muñoz (1992), en un estudio realizado en la Comunidad de Castilla-Leon, encontró sólo una cepa de E. coli de origen ovino, de 276 aisladas de corderos y cabritos afectados de diarrea y sanos, productora de STa, a pesar de que un porcentaje relativamente elevado de las cepas eran fimbriadas.

La prevalencia de las estirpes de ECET F5⁺-STa⁺ en los terneros recién nacidos varía desde porcentajes relativamente elevados (15-41%) en algunos estudios (EEUU, Canadá, Sri-Lanka, Turquía, Francia, Bélgica) a porcentajes mucho menores (0-5%) en otros casos (Inglaterra, Escocia, Francia, Japón) (revisado por Blanco et al. 1992c). Blanco et al. en dos estudios realizados en Galicia encontraron una prevalencia de cepas de ECET F5⁺-STa⁺ de tan solo el 1% y 0% en terneros afectados de diarrea y del 3% en terneros sanos (Blanco et al., 1988b; Blanco, 1991).

No obstante, la prevalencia de las estirpes de ECET en los rumiantes basada en la detección del antígeno F5 y en la producción de STa podría estar subestimada. En efecto, Ansari et al. (1978) utilizando un ensayo en asa intestinal ligada de corderos comprobaron que el 37% de las cepas aisladas de heces de corderos afectados de diarrea producían acumulación de líquidos en la luz intestinal. Los autores, sin embargo, no determinaron si la enterotoxina producida por las cepas positivas en el ensayo era la STa. Determinadas cepas enterotoxigénicas de origen porcino producen un segundo tipo de enterotoxina termoestable, la STb, que no es activa en el ratón lactante y que inicialmente se detectaba mediante un ensayo en asa intestinal ligada de cerdos (Gonzalez y Blanco, 1985c).

A pesar de que en este estudio no se detectaron cepas de ECET F5⁺STa⁺, el 0,71% de las cepas investigadas (5/702) produjeron una toxina termolábil que originaba en la línea celular Vero un efecto semejante al inducido por la LT. Estas cepas LT⁺ se corresponden con unas frecuencias de aislamiento en los animales estudiados del 0,25% y del 0,78% en los corderos y cabritos diarreicos respectivamente y del 8,7% en los corderos sanos.

Estos resultados son similares a los descritos por otros autores en corderos y terneros: Muñoz (1992), en una investigación realizada en corderos y cabritos en Castilla-León, detectó cepas LT⁺ en el 1,3% de los corderos estudiados; Sherwood *et al.* (1983) aislaron cepas productoras de LT del 0,3% de los terneros afectados de diarrea y del 5,45% de los sanos; Blanco (1991), en estudios realizados en Galicia, detectó cepas LT⁺ en el 0,3% de los terneros estudiados. Sin embargo, Mohamad *et al.* (1985) en Sri-Lanka aislaron cepas LT⁺ del 11% de los terneros afectados de diarrea y del 11% de los sanos.

No hemos realizado ensayos inmunológicos para determinar si la LT producida por estas cepas es la LT-I o la LT-II. Sin embargo, la LT-I es infrecuente en los aislados de rumiantes (Mainil *et al.*, 1986, 1990; Woodward y Wray 1990; Woodward *et al.*, 1992). Seriwatana *et al.* (1988) utilizando sondas de DNA comprobaron que la mayoría de las cepas de origen bovino cuyos sobrenadanes originaban redondeamiento en las células Y-1 producían LT-II. La LT producida por las cepas de *E. coli* aisladas de terneros y por Sherwood *et al.* (1983) y Blanco (1991) y de corderos por Muñoz (1992) era la LT-II.

Recientemente se ha descrito en cepas de *E. coli* de origen humano aisladas de diarreas la producción de una nueva citotoxina, la CLDT (Johnson y Lior, 1987 y 1988). Aunque esta toxina no ha sido todavía caracterizada ni se conoce su papel en la patogenicidad de *E. coli*, produce en las líneas celulares Vero, HeLa, Hep2 y CHO, pero no en la Y-1, una distensión celular y su degeneración progresiva después de 96-120 horas de incubación. Este efecto puede confundirse en las primeras 24 horas de incubación con el efecto originado por la LT que es por el contrario citotónico.

2. E. coli no enterotoxigénicos (NO-ECET).

2.1. Aislamiento de cepas F17⁺ .

El antígeno fimbrial F17 se describió por primera vez en cepas de E. coli aisladas de terneros en Francia (Girardeau et al., 1980) y Bélgica (Pohl et al., 1982) y posteriormente se ha encontrado, también en cepas procedentes de terneros, en otros países (Morris et al., 1987; Shimizu et al., 1987; Blanco, 1991; Gulati et al., 1992). Las estirpes de E. coli F17⁺ pueden presentar dos fenotipos distintos: uno enterotoxigénico y otro no enterotoxigénico (Pohl et al., 1984, 1987; Contrepolis et al., 1985; Morris et al., 1987; Blanco, 1991). Las cepas enterotoxigénicas producen STa y expresan, además de la fimbria F17, la F5 (Pohl et al., 1984; Contrepolis et al., 1985) y/o la F41 (Morris et al., 1987). Pohl et al. , en 1982, afirmaron haber aislado cepas STa⁺F17⁺F5⁻ pero posteriormente comprobaron que, en realidad, dichas cepas expresaban el antígeno F5 (Pohl et al., 1984). Hasta la fecha, únicamente se han descrito dos cepas de E. coli STa⁺F17⁺ que no expresaban la fimbria F5 ni la F41 (Gulati et al. 1992).

En los pequeños rumiantes, que nosotros tengamos conocimiento, sólo se han encontrado dos cepas de E. coli F17⁺, ambas no enterotoxigénicas: una de ellas fue aislada por Ramisse et al. (1984) de un cordero con diarrea y la otra (que era también F41⁺) por Card et al. (1987) de un cabrito afectado de diarrea que, además, eliminaba Cryptosporidium parvum.

En nuestro estudio se ha detectado la fimbria F17 en un porcentaje relativamente elevado de las cepas de E. coli investigadas: el 3,03% de las cepas aisladas de corderos (15/495) y el 8,69% de las aisladas de cabritos (18/207) (Cid et al., 1993). Este es el primer trabajo en el que se describe el aislamiento con cierta regularidad de cepas F17⁺ de los pequeños rumiantes.

Las cepas F17⁺ aisladas en este estudio no expresaban los antígenos F5 ni F41 y, como era de esperar, no producían STa. Por lo tanto, las cepas se consideraron no enterotoxigénicas.

La frecuencia de aislamiento de cepas F17⁺ no enterotoxigénicas de corderos y cabritos es comparable a la descrita por otros autores en ganado bovino: Morris *et al.* (1987), en el Reino Unido, y Gulati *et al.* (1992), en la India, detectaron el antígeno fimbrial F17 en el 3,4 y el 5% respectivamente de las cepas bovinas estudiadas.

Las 33 cepas F17⁺ se aislaron de otros tantos animales diarreicos. Dicho de otro modo, se aislaron cepas F17⁺ del 3,83% de los corderos (15/391) y del 14,06% de los cabritos (18/128) afectados de diarrea investigados. En ganado bovino Contrepois *et al.* (1985), en un estudio realizado en Francia, y Shimizu *et al.* (1987), en otro realizado en Japón, aislaron cepas de *E. coli* F17⁺ del 5,3 y el 5% respectivamente de los animales estudiados. Frecuencias de aislamiento bastante más elevadas, sin embargo, han sido descritas por Pohl *et al.* (1984) en Bélgica, quienes encontraron cepas F17⁺ en el 15% de los terneros diarreicos estudiados y en el 3% de los sanos, y por Blanco (1991) en Galicia, quien detectó estirpes F17⁺ en el 31% de los animales diarreicos analizados y en el 15% de los sanos. En uno de los brotes diarreicos de ganado caprino investigados en este trabajo (Hormigos 1) la frecuencia de aislamiento de *E. coli* F17⁺ fue del 26% de los animales estudiados .

En ninguna de las cepas de *E. coli* aisladas de animales sanos se detectó la fimbria F17. Debido al escaso número de muestras procedentes de animales sanos analizadas, no fue posible establecer estadísticamente si existía una asociación entre la infección con estas cepas y la presencia de diarrea. No obstante, varios autores han indicado que las cepas F17⁺, al igual que otros agentes enteropatógenos asociados con las diarreas neonatales, se aíslan también de animales sanos (Pohl *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1987; Blanco, 1991).

La edad de los animales de los que se aislaron las cepas F17⁺ oscilaba entre los 5 y 30 los días de vida. En los terneros las cepas de *E. coli* F17⁺ enterotoxigénicas (F5⁺STa⁺) se aislaron de animales menores de 3 días de edad, mientras que las no enterotoxigénicas se aislaron de animales mayores (Contrepois *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1987).

El posible papel de la fimbria F17 como factor de patogenicidad así como su posible intervención en la patogenia de la diarrea no han sido todavía esclarecidos. No obstante, la fimbria F17 parece contribuir a la capacidad de las estirpes de ECET (F5⁺STa⁺) que la expresan de colonizar el intestino delgado de los terneros (Moon, 1990). En efecto, la presencia de anticuerpos frente a los antígenos F5 y F41 en el calostro parece no ser suficiente para proteger a los terneros de la infección experimental con cepas de ECET F5⁺ F41⁺ F17⁺, mientras que la presencia de anticuerpos frente a los tres antígenos fimbriales parece conferir protección suficiente para prevenir la infección (Contrepois y Girardeau, 1985).

Por otra parte, las cepas de E. coli F17⁺ no enterotoxigénicas se han asociado a procesos septicémicos en el ganado bovino (Contrepois et al., 1985; Pohl et al., 1986). Pohl et al. (1986) estudiaron 134 cepas F17⁺ no enterotoxigénicas de origen bovino aisladas en diferentes países y comprobaron que el 45% de ellas producían aerobactina y presentaban resistencia al suero, dos características de las estirpes septicémicas de E. coli.

En nuestro estudio no se encontró una correlación absoluta entre la expresión de la fimbria F17 y la producción de colicina V, si bien un porcentaje elevado de las cepas F17⁺ aisladas (51,5%) producían dicha colicina. Esto podría indicar que estas cepas podrían intervenir también en procesos patológicos extraintestinales en los pequeños rumiantes. No obstante, es preciso tener en cuenta que la colicina V no se considera en si misma un factor de patogenicidad de E. coli sino un marcador de patogenicidad (Said et al., 1988). Esta proteína bactericida está codificada por un grupo heterogéneo de plásmidos (plasmidos Col. V) que codifican además otros factores de patogenicidad relacionados con las cepas septicémicas de E. coli, como son la producción de aerobactina y la resistencia al suero (Water y Crosa, 1991). Pohl et al. (1986) consideran que no existe correlación entre la presencia de estos factores de patogenicidad o la producción de colicina V y la expresión de la fimbria F17: de las 27 cepas septicémicas estudiadas por dichos autores, todas producían aerobactina y eran resistentes al suero, sin embargo, sólo el 63% producían colicina V y tan sólo 3 (11%) expresaban el antígeno F17.

La fimbria F17 también se ha detectado en una cepa de E. coli de origen bovino no enterotoxigénica ni verotoxigénica que producía la lesión típica de adhesión y borrado en cerdos gnotobióticos infectados experimentalmente (Hall et al., 1988a). Consideramos que antes de sacar alguna conclusión sería necesario disponer de otros hallazgos similares.

El antígeno F17 purificado no muestra actividad hemaglutinante con los eritrocitos de ternera, de oveja, de cobaya, de pollo ni del hombre (Lintermans et al., 1988a). Sin embargo, la presencia de hemaglutininas manosa-resistentes parece ser una característica frecuente de las cepas de E. coli F17⁺ aisladas de terneros (Shimizu et al., 1987; Blanco, 1991). Las cepas F17⁺ de origen bovino aisladas por Shimizu et al. (1987) en Japón mostraban actividad HAMR con los eritrocitos de ternera mientras que la mayoría de las aisladas por Blanco (1991) presentaban actividad HAMR con los eritrocitos de ternera (17%) o con los de ternera y humanos (77%).

El 84,84% (28/33) de las cepas de E. coli F17⁺ de origen ovino y caprino aisladas en este estudio presentaban actividad HAMR. La mayoría de estas cepas, al igual que las aisladas por Blanco (1991), mostraban actividad HAMR con los eritrocitos de ternera (tipo III) o con los de ternera y humanos (tipo I) (39,28% y 53,57%, respectivamente). Aunque estos modelos de HAMR fueron los más frecuentes, las 28 cepas HAMR⁺ se distribuyeron en 4 modelos distintos de hemaglutinación. Por lo tanto, estas adhesinas HAMR⁺ presentes en las cepas de E. coli F17⁺ parecen constituir un grupo heterogeneo.

Nosotros hemos comprobado que la cepa 39a, utilizada para absorber el suero policlonal producido frente a la cepa F17⁺ de referencia (A11a₂), con la que da reacciones cruzadas debidas a antígenos distintos del F17 (Contrepois et al., 1985), tiene actividad HAMR con los eritrocitos humanos del grupo A y con los de ternera. Sin embargo, los extractos térmicos (60°C, 20 minutos) de esta cepa, al igual que los de las cepas F17⁺ de este mismo modelo de hemaglutinación (tipo I) y los de las que aglutinan exclusivamente los eritrocitos de ternera (tipo III), no muestran dicha actividad HAMR. Por lo tanto, creemos que la actividad HAMR de las cepas F17⁺ aisladas por nosotros puede deberse a adhesinas no fimbriales.

La expresión de adhesinas distintas del antígeno fimbrial F17 en cepas de campo de origen bovino ha sido descrita por otros autores. Así, por ejemplo, el 5% de las cepas de E. coli aisladas por Shimizu et al. (1987) expresaban además el antígeno CS31. Pohl et al. (1986) detectaron la expresión conjunta de los antígenos F17 y F165 en cepas septicémicas de E. coli de origen bovino. El 74% (89/119) de las cepas F17⁺ aisladas por Blanco (1991) expresaban un antígeno distinto del F17 denominado B59a. Morris et al. (1985a) comprobaron que las cepas de referencia 25KH9 (Att-25⁺) y 28a (FY⁺) expresaban además del antígeno común F17 antígenos exclusivos de cada una de ellas.

La cepa de campo CL-359 que expresa el antígeno F17 y que tiene actividad HAMR con los eritrocitos humanos y de ternera (tipo I) observada por microscopía electrónica presenta unas estructuras superficiales rígidas de 3-4 nm de diámetro que probablemente se corresponden con el antígeno fimbrial F17, puesto que dicho antígeno ha sido purificado y caracterizado como una proteína fimbrial formada por subunidades de 20 Kd y de 3-4 nm de diámetro (Lintermans et al., 1988a).

2.2. Aislamiento de estirpes de E. coli toxigénicas.

2.2.1. Aislamiento de cepas de E. coli productoras de VT (ECVT).

Aunque ocasionalmente se han encontrado cepas de E. coli productoras de verotoxinas (ECVT) tanto en corderos (Baloda et al., 1987; Dorn et al., 1989) como en cabritos (Mohammad et al., 1986), no se han publicado estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de estas estirpes de E. coli en los pequeños rumiantes. De acuerdo con los resultados de este estudio, la infección con cepas de ECVT en los rebaños ovinos y caprinos de la zona centro de España es relativamente infrecuente. Tan sólo el 2,2% de las cepas de origen ovino y el 2,4% de las de origen caprino eran productoras de VT. Estos porcentajes son ligeramente inferiores al 4,8% encontrado por Muñoz (1992) en 227 cepas de E. coli aisladas de corderos en la Comunidad de Castilla-León.

En los estudios realizados en terneros recién nacidos en diferentes países se han

encontrado prevalencias de la infección con cepas de ECVT diferentes: del 1-3% en Canadá (Mainil et al., 1987), Francia (De Rycke et al., 1987) y Reino Unido (Sherwood et al., 1985), del 20% en Galicia (Blanco et al., 1988b) y del 28% en Sri-Lanka (Mohammad et al., 1985).

Las 16 cepas verotoxigénicas aisladas procedían: la mitad de animales diarreicos de 4 a 15 días de vida y la otra mitad de animales sanos todos ellos menores de 4-5 días de vida, edad a la que solía iniciarse la diarrea en los brotes clínicos estudiados. No se siguió la evolución clínica de los animales sanos de los que se aislaron cepas de ECVT. Por lo tanto, se desconoce si estos animales padecieron posteriormente un proceso diarreico. Aunque, aparentemente, la proporción de cepas aisladas de animales sanos (8/49) fue muy superior a la de cepas aisladas de animales diarreicos (8/519), consideramos que estos resultados deben interpretarse cautelosamente. No hemos considerado oportuno realizar un análisis de significación estadística por las siguientes razones: las poblaciones de animales afectados y sanos estudiadas son difícilmente comparables debido al escaso número de animales sanos, la toma de muestras se realizó en un único momento, no se hizo un seguimiento de los animales sanos en los que se detectaron cepas de ECVT y la distribución de los animales por edades en la población sana y enferma era muy diferente.

En investigaciones realizadas en ganado bovino, distintos autores han descrito el aislamiento de cepas de ECVT de animales sanos (Mohammad et al., 1985; De Rycke et al., 1987; Borczyk et al., 1987; Wells et al., 1991; Blanco, 1991). Mohammad et al. (1985), en un estudio realizado en Sri-Lanka, aislaron cepas de ECVT de terneros diarreicos en una proporción significativamente superior a la obtenida en animales sanos. Por el contrario, Blanco (1991) en Galicia detectó estirpes de ECVT en el 9% de los terneros diarreicos y en el 19% de los sanos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este autor considera que es posible que las cepas de ECVT formen parte de la flora normal del intestino de los bovinos.

Por otra parte, algunas de las cepas de ECVT aisladas de terneros pertenecen a los mismos serogrupos que las estirpes verotoxigénicas de origen humano (Sherwood et al., 1985; Orskov et al., 1987; Smith et al., 1988; Blanco et al., 1988b; Gonzalez y Blanco, 1989;

Blanco, 1991). Esto, unido al hecho de que se han aislado cepas de ECVT del serotipo 0157:H7, patógeno para el hombre, de productos de origen bovino (Doyle y Schoeni, 1987; Borzyck et al., 1987), ha llevado a distintos autores a considerar a la especie bovina como un reservorio de estirpes de ECVT patógenas para el hombre (Borzyck et al., 1987; Gonzalez y Blanco, 1989; Blanco et al., 1988b; Blanco, 1991). En nuestro estudio no se ha determinado el serotipo de las cepas de ECVT aisladas y, por lo tanto, desconocemos si en los ovinos y caprinos se presentan los serotipos humanos. No obstante, parece probable que así sea puesto que también se han aislado cepas de ECVT pertenecientes a serotipos humanos de productos de origen ovino (Doyle y Schoeni, 1987).

Determinadas cepas verotoxigénicas de los serogrupos 05 y 0111 se han asociado con un proceso de disentería en los terneros (Chanter et al., 1984; Chanter et al., 1986; Schoonderwoerd et al., 1988), en los que originan la lesión típica de adhesión y borrado tanto en infecciones naturales como experimentales (Hall et al., 1985; Chanter et al., 1986). No obstante la producción de VT no parece ser esencial para el desarrollo de la lesión. En efecto, Tzipori et al. (1987) comprobaron, en infecciones experimentales realizadas en cerdos gnotobióticos, que la diarrea se asocia a la lesión de adhesión y borrado pero no a la producción de VT y Hall et al. (1988a) reprodujeron la lesión en cerdos gnotobióticos infectados experimentalmente con cepas de E. coli no verotoxigénicas de origen bovino. Wray et al. (1989) reprodujeron la enfermedad y las lesiones en terneros convencionales privados de calostro con cepas productoras de VT1 y de VT2.

El 87,5% de las cepas de ECVT aisladas por nosotros produjeron algún tipo de colicina: el 56,25% producen colicina V (9/16) y el 31,25% otras colicinas (5/16).

Las estirpes de ECVT de origen animal constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a los serogrupos a los que pertenecen, al tipo de verotoxina que producen (VT1, VT2, VTe), a los procesos clínicos a los que se asocian (diarrea, disentería y enfermedad de los edemas del cerdo) y a la presencia de determinadas características relacionadas con la patogenicidad de E. coli, como son la producción de colicina V, las propiedades hemaglutinantes, la adhesión in vitro a células intestinales y la presencia de plásmidos de diferentes tamaños

(Dorn et al., 1989).

Es posible que determinadas cepas verotoxigénicas de origen animal en las que concurren otros factores de patogenicidad, fundamentalmente la capacidad de originar las lesiones de adhesión y borrado, puedan jugar un papel en los procesos patológicos intestinales de los animales, al igual que ocurre en el hombre con las cepas verotoxigénicas del grupo de ECEH, mientras que, al mismo tiempo, otras estirpes de ECVT de origen animal formen parte de la flora intestinal normal de los animales, sean o no patógenas para el hombre.

2.2.2. Aislamiento de cepas productoras de CNF (ECNT).

Estirpes de E coli productoras de CNF (ECNT) se han aislado con una frecuencia alta de terneros afectados de diarrea: en un estudio realizado en Francia (De Rycke et al., 1987) se detectaron en el 14 % y en dos estudios llevados a cabo en Galicia en el 18 y el 21% de los terneros diarreicos estudiados. En los pequeños rumiantes existen muy pocos datos sobre la prevalencia de las cepas de ECNT. En el Reino Unido en los años 1990 y 1991 se detectó la producción de CNF en el 9% de los aislados de origen ovino (Wray et al., enviado a publicar). En nuestro estudio el 1.4% de las cepas de origen ovino y el 2.4% de las de origen caprino produjeron CNF. Según estos resultados la infección con estirpes de ECNT parece ser infrecuente en las explotaciones ovinas y caprinas de la zona centro de España.

La detección de los CNFs, que son toxinas asociadas a las células, generalmente se realiza a partir de extractos sonicados de cultivos bacterianos (Caprioli et al., 1983; De Rycke et al., 1987; Blanco et al., 1988b). En nuestro estudio, sin embargo, se han utilizado, al igual que para la detección de las VTs y las LTs, sobrenadantes de cultivos bacterianos tratados con polimixina B (10.000 U/ml) durante cuatro horas a 37°C. El tratamiento con polimixina B es eficaz para liberar proteínas intracelulares de las bacterias gram-negativas y ha sido utilizado para potenciar la liberación de VTs del espacio periplásmico de las células al medio extracelular (Karmali et al., 1985a). Blanco et al. (1992b) han descrito recientemente una modificación del método de detección en la línea celular Hela basada en el tratamiento de los cultivos bacterianos con mitomicina C. Este método parece ser más específico y sensible que

el ensayo en la línea celular Vero de los extractos sonicados. También es posible que la sensibilidad del método utilizado por nosotros sea menor. Sin embargo, la baja frecuencia de aislamiento de cepas CNF⁺ en este estudio no parece que sea debida a la posible menor sensibilidad del método, puesto que Wray *et al.* (enviado a publicar) utilizando este mismo método detectaron un 9% de cepas ovinas productoras de CNF.

De las 12 cepas de ECNT aisladas, 11 procedían de animales diarreicos y la restante de un cabrito sano de menos de 6 horas de vida. En el estudio realizado por Blanco (1991) en Galicia en el período comprendido entre 1986 y 1991 se aislaron cepas de ECNT del 21% de los terneros diarreicos y del 35% de los sanos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este autor comprobó, asimismo, que la mayoría de las cepas de ECNT de origen bovino producían CNF2 y que existía una asociación estadística entre la producción de esta toxina y la producción de colicinas distintas de la colicina V. El investigador sugiere que las cepas de ECNT productoras de CNF2 podrían estar implicadas en los procesos septicémicos de los terneros hipogammaglobulinémicos. En nuestro estudio no se han realizado ensayos de seroneutralización y, por lo tanto, se desconoce el tipo de CNF que producen las cepas aisladas.

El papel que las cepas de ECNT pueden desempeñar en la patogenia de los procesos intestinales de los rumiantes recién nacidos todavía no ha sido establecido. Oswald *et al.* (1989) demostraron que el CNF2 está codificado por el plásmido Vir de la cepa de referencia S5 aislada previamente de un cordero con septicemia (Smith, 1974). Las cepas de *E. coli* que poseen el plásmido Vir producen una toxina letal (Smith, 1974) y un antígeno de superficie (Lopez-Alvarez y Gyles, 1980) y se aíslan de procesos septicémicos de corderos y terneros. Por otra parte, el CNF1, aunque parece ser más frecuente entre los aislados de origen humano (Blanco, 1991), también lo producen cepas de *E. coli* de origen bovino (De Rycke *et al.*, 1987; Blanco, 1991). Esta toxina inoculada intravenosamente en corderos de 7-10 días de edad origina en los animales diarrea mucosa y trastornos neurológicos (De Rycke, 1990).

3. Sensibilidad a los antimicrobianos.

El tratamiento antibiótico de los procesos diarreicos de los recién nacidos contribuye a reducir la mortalidad de los animales y la duración del cuadro clínico de diarrea. Sin embargo, la antibioterapia no resulta siempre eficaz debido fundamentalmente a la etiología pluricausal de estos procesos, en los que pueden estar implicados Cryptosporidium y rotavirus, y al rápido desarrollo de resistencias por parte de las cepas de E. coli frente a los antimicrobianos utilizados (Wray y Morris, 1985). El uso indiscriminado e irracional de los antimicrobianos en el tratamiento de los procesos diarreicos acentúa el problema de las resistencias.

En este trabajo se ha investigado la sensibilidad de 92 cepas de E. coli, todas ellas aisladas de corderos y cabritos diarreicos, frente a 29 antimicrobianos elegidos atendiendo a su amplia difusión en el tratamiento de los procesos diarreicos o a su reciente introducción en medicina veterinaria. Los antimicrobianos a los que resultaron sensibles un mayor número de cepas fueron las quinolonas, sobre todo las quinolonas fluoradas (100%), y las cefalosporinas (62-100%), mientras que las sulfamidas (7-9%) fueron los antimicrobianos frente a los cuales resultaron sensibles un menor número de cepas. Los altos porcentajes de cepas resistentes a las sulfamidas y a las tetraciclinas encontrados se deben con toda probabilidad al uso habitual de estos antimicrobianos tanto en el tratamiento como incluso en la prevención de los procesos diarreicos en las explotaciones ovinas y caprinas. Estos elevados porcentajes son equiparables a los descritos por otros autores en cepas de E. coli de origen bovino: del 67 al 87% de las cepas eran resistentes a las tetraciclinas y del 73 al 92% lo eran a las sulfamidas (Sherwood et al., 1983; Pohl et al., 1991; Blanco et al., 1993).

La mayoría de las cepas resultaron sensibles a las cefalosporinas ensayadas. Los porcentajes de sensibilidad oscilaron desde el 62% frente a la cefalexina, una cefalosporina de primera generación, hasta el 100% frente a la ceftizoxima, una cefalosporina de tercera generación. En estudios realizados con cepas bovinas también se han descrito porcentajes bajos de cepas resistentes a las cefalosporinas: Pohl et al. (1991), en Francia, encontraron un 4% de cepas resistentes en el grupo de estirpes F5⁺ y un 11% en el F17⁺ y Blanco et al. (1993) hallaron un 13% de cepas resistentes a las cefalosporinas de primera generación, un 2% a las de segunda y todas las cepas fueron sensibles a las de tercera generación.

Las quinolonas fluoradas constituyen un grupo de potentes antimicrobianos de amplio espectro que desde su introducción en los años 80 en medicina humana han demostrado poseer una excelente actividad frente a las bacterias gram-negativas incluida E. coli. El 100% de las cepas de origen ovino y caprino estudiadas resultaron sensibles a las cuatro quinolonas fluoradas ensayadas: enoxacina, enrofloxacin, esparfloxacin y ciprofloxacina. Al igual que lo descrito por Visser et al. (1991) en cepas de E. coli de origen humano, concentraciones iguales o inferiores a 0,062 µg/ml inhibieron el crecimiento del 90% de las cepas, excepto en el caso de la enoxacina cuya CMI-90 fue 0,125 µg/ml.

Este grupo de antimicrobianos se han introducido recientemente en medicina veterinaria y no parece que su uso este todavía muy difundido en los animales de renta. El único trabajo, que nosotros tengamos conocimiento, en el que se ha investigado la sensibilidad de cepas de origen animal frente a una quinolona fluorada, la enrofloxacin, fue publicado por Pohl et al. (1991), quienes incluyeron en su estudio cepas de E.coli de origen bovino, porcino y aviar. Un porcentaje relativamente elevado de las cepas de origen bovino estudiadas por estos autores resultaron resistentes a la enrofloxacin: el 28% de las cepas de E. coli F17⁺ y el 7,7% de las septicémicas. No obstante, todas las cepas del grupo de E. coli F5⁺ fueron sensibles. En cepas de E. coli de origen humano se ha indicado que la sensibilidad a las quinolonas fluoradas disminuye en las cepas resistentes al ácido nalidíxico (Barry y Fuchs, 1991). Este hecho podría explicar las diferencias entre los resultados de este estudio y los hallados por Pohl et al. (1991) en cepas bovinas, puesto que el 31 % de las cepas bovinas F17⁺, el 19% de las septicémicas y el 13 % de las F5⁺ fueron resistentes al ácido nalidíxico, mientras que el 95,5 % de las cepas estudiadas por nosotros fueron sensibles.

En el grupo de los aminoglucósidos estudiados los porcentajes de sensibilidad de las cepas variaron desde el 27% frente a la estreptomycin hasta el 80% frente a la gentamicina. Estos resultados son análogos a los obtenidos por otros autores en cepas de origen bovino y en los que también los mayores porcentajes de cepas resistentes correspondieron a la estreptomycin y los menores a la gentamicina (Sherwood et al., 1983; Pohl et al., 1991; Blanco et al., 1993).

Considerando por separado los cuatro grupos de cepas estudiadas (F17⁺, verotoxigénicas, productoras de CNF y no fimbriadas y no toxigénicas -NFNT-), los mayores porcentajes de cepas sensibles frente a los antimicrobianos ensayados se detectaron en el de las verotoxigénicas. Por el contrario, Gonzalez y Blanco (1989) en aislados de origen bovino detectaron mayores porcentajes de cepas resistentes entre las cepas verotoxigénicas que entre las productoras de CNF y las no toxigénicas.

En general puede decirse que las cepas de origen ovino y caprino estudiadas resultaron sensibles en porcentajes relativamente bajos a los antimicrobianos más comúnmente utilizados en el tratamiento de los procesos diarreicos como son las sulfamidas (<10%), las tetraciclinas (<30%) y la estreptomicina (<30%). Sin embargo, resultaron sensibles en porcentajes muy elevados a los antimicrobianos de uso menos frecuente o de reciente introducción en medicina veterinaria como son las cefalosporinas, sobre todo la cefalosporina de tercera generación ceftizoxima (100%), las quinolonas (>95%), sobre todo las quinolonas fluoradas (100%) y la gentamicina (<80%) cuyo uso es infrecuente debido a su elevado coste y a que su administración vía parenteral exige mayor mano de obra.

4. Nuevos antígenos.

Al estudiar las propiedades hemaglutinantes de los aislados de E. coli en presencia de D-manosa con eritrocitos de distintas especies animales se comprobó que un porcentaje relativamente elevado de ellos aglutinaba los eritrocitos humanos del grupo A. Esta capacidad hemaglutinante de los eritrocitos humanos se debía, al menos, a dos tipos distintos de adhesinas: unas resistentes al tratamiento térmico a 60°C durante 20 minutos y otras extraíbles de las células bacterianas con dicho tratamiento térmico. La tercera parte de las cepas HAMR⁺ con los eritrocitos humanos poseían este segundo tipo de hemaglutininas y en todas estas cepas se comprobó que dichas adhesinas se expresaban a 37°C pero no a 18°C. Además, ninguna de ellas expresaba los antígenos F5, F41 ni F17.

La capacidad HAMR de las estirpes de E. coli se debe en muchos casos a la presencia de antígenos superficiales proteicos de estructura fimbrial (Duguid et al., 1955) que actúan

como factores de colonización. De hecho, la mayoría de los factores de colonización descritos en cepas de E. coli, tanto de origen humano como animal, poseen actividad HAMR con eritrocitos de distintas especies animales (De Graaf y Roorda, 1982).

En nuestro estudio se han detectado dos antígenos, el LC168 y el LC686, distintos de los antígenos fimbriales F5, F41 y F17. El estudio inicial de las características antigénicas de las cepas de E. coli CL-168 y CL-686, ambas con actividad HAMR con los eritrocitos humanos del grupo A extraíble por tratamiento térmico, demostró que estas cepas poseían antígenos comunes que se expresaban a 37°C pero no a 18°C, puesto que los sueros policlonales producidos frente a cada una de ellas y absorbidos con su cepa homóloga cultivada a 18°C (sueros S168 y S686) reaccionaban con ambas cepas cuando se cultivaban a 37°C pero no cuando se cultivaban a 18°C. No obstante, ambas cepas expresaban además antígenos exclusivos de cada una de ellas, puesto que después de absorber exhaustivamente los sueros S168 y S686 con sus cepas heterólogas (sueros B168 y C686 respectivamente) cada uno de los sueros reaccionó con su cepa homóloga pero no con la heteróloga. Por lo tanto, el suero B168 detectaba uno o varios antígenos exclusivos de la cepa CL-168, mientras que el suero C686 detectaba uno o varios antígenos exclusivos de la cepa CL-686.

De acuerdo con los resultados de las electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de los extractos térmicos de las cepas CL-168 y CL-686 y posterior detección inmunoenzimática con los sueros S168 y B168, un antígeno presente en la cepa CL-168 que no comparte con la cepa CL-686, y que denominamos LC168, se corresponde con una banda proteica de un peso molecular aproximado de 19.500 daltons. El análisis electroforético de los extractos térmicos de la cepa CL-168 reveló la presencia de dos bandas mayoritarias de pesos moleculares aproximados de 38.900 y 19.500 daltons. Sin embargo, en el análisis electroforético de los extractos térmicos de la cepas CL-686 no se detectó banda alguna de movilidad electroforética semejante a la de menor peso molecular de la cepa CL-168, pero se observó una banda de movilidad electroforética semejante a la de 38.900 daltons de esta última.

El suero S168 reaccionó en los ensayos de inmunodetección con las dos bandas

mayoritarias observadas en los extractos térmicos de la cepa CL-168, mientras que el suero B-168 reaccionó exclusivamente con la banda de menor peso molecular. El análisis electroforético de los extractos térmicos de varios aislados de campo confirmó la presencia de la banda de peso molecular aproximado de 19.500 daltons en todos los extractos correspondientes a las cepas que previamente habían reaccionado con el suero B168 y la ausencia de dicha banda en los extractos de las cepas que habían sido negativas con dicho suero.

Por otra parte, un antígeno exclusivo de la cepa CL-686, denominado LC686, probablemente se corresponde con una banda protéica de peso molecular aproximado de 40.700 daltons, puesto que, en los ensayos de inmunodetección, el suero C686 reaccionó exclusivamente con una banda de ese peso molecular presente en los extractos térmicos de la cepa CL-686. No obstante, es posible que tanto el suero B168 como el C686 reaccionen en las células enteras con otros antígenos no extraíbles por tratamiento térmico suave dado que se trata de sueros policlonales producidos frente a las células enteras. Ahora bien, estos posibles antígenos se expresarían solo a 37°C y serían exclusivos de cada una de las cepas, puesto que los sueros B168 y C686 se obtuvieron absorbiendo exhaustivamente los sueros policlonales con sus cepas homólogas cultivadas a 18°C y con las cepas heterólogas cultivadas a 37°C.

En las bacterias de la cepa CL-168 cultivadas a 37° se observaron, por microscopía electrónica, unas estructuras superficiales semejantes a fimbrias de 4-7 nm de diámetro. Sin embargo, dichas estructuras no se encontraron en las mismas bacterias cultivadas a 18°C ni en las de la cepa CL-686. Estas estructuras podrían corresponderse con el antígeno LC168, puesto que este antígeno, al igual que la mayoría de las fimbrias descritas hasta el momento, se expresa a 37°C pero no a 18°C, se extrae de las células bacterianas por tratamiento térmico a 60°C durante 20 minutos, es de naturaleza proteica y está formado por subunidades cuyo peso molecular (aprox. 19,5 Kda) es equiparable al del resto de las fimbrias descritas (entre 17 a 31 Kda). No obstante, para confirmar este extremo es necesario realizar estudios de inmunomicroscopía electrónica .

El antígeno LC686 presente en la cepa CL-686 no parece, en principio, que sea fimbrial, puesto que no se ha observado por microscopía electrónica estructuras semejantes a fimbrias en las bacterias de dicha cepa. Además, el peso molecular de la banda proteica reconocida por el suero C686 en los extractos térmicos de la cepa CL686 es de 40.700 daltons, superior a los pesos moleculares de las fimbrias descritas hasta el momento. Otros autores han descrito en cepas de E. coli la expresión de adhesinas no fibriales. No obstante, es preciso recordar que algunos antígenos clasificados en la actualidad como fimbrias se describieron inicialmente como no fimbriales comprobándose posteriormente que se trataba de finos filamentos de 2-3 nm de diámetro (Gaastra y De Graaf, 1982; Levine et al., 1984; Orskov et al., 1985; Girardeau et al., 1988).

La cepa CL-245, que al igual que la CL-168 y CL-686 posee actividad HAMR con los eritrocitos humanos que se extrae por tratamiento térmico suave, posee uno o varios antígenos que se expresan a 37 pero no a 18°C y que no están relacionados con los antígenos LC168 ni LC686. La cepa CL-245 no fermenta la lactosa, es hemolítica y además produce CNF.

Recordemos que la cepa CL-168 mostró actividad HAMR con los eritrocitos humanos del grupo A y que dicha actividad, al igual que el antígeno LC168, se extraía por tratamiento térmico a 60°C durante 20 minutos. A pesar de que dicha cepa se seleccionó para el estudio de posibles nuevos antígenos debido a sus propiedades hemaglutinantes, la expresión del antígeno LC168 no guarda una relación directa con la actividad HAMR de las cepas que lo expresan. En efecto, el suero B168, que es específico para el antígeno LC168, aglutinó 13 de las 46 cepas cuyos extractos térmicos no mostraban actividad HAMR con los eritrocitos humanos y 6 cepas cuyas células enteras no aglutinaban en presencia de D-manosa los eritrocitos de ninguna de las seis especies utilizadas.

El antígeno semipurificado a partir de la cepa CL-168 por gelfiltración y tratamiento con deoxicolato sódico tenía actividad HAMR con los eritrocitos humanos. Sin embargo, en el análisis electroforético del preparado semipurificado se observaba, además de la banda propia del antígeno LC168, otra banda mayoritaria de peso molecular aproximado de 38.900

daltons que, en los ensayos de inmunodetección, reaccionaba con el suero S168 pero no con el suero B168, específico para el antígeno LC168. Por lo tanto, es posible que la actividad HAMR de la cepa CL-168 y del semipurificado se deba a otras adhesinas de naturaleza proteica o no. De hecho, el suero S168 que reconoce, además del antígeno LC168, otros antígenos distintos inhibe la actividad HAMR con los eritrocitos humanos de la preparación semipurifica. Desafortunadamente no pudo comprobarse si el suero B168, que detecta específicamente el antígeno LC168, inhibía o no la actividad HAMR de la preparación semipurificada, dado que el propio suero tenía actividad hemaglutinante, probablemente debida a la presencia de antígenos liberados de la cepa CL-686 con la que se absorbió repetidamente. Algunos de los antígenos fimbriales descritos en cepas de E. coli de origen animal, como el CS31A y el F17, no poseen actividad hemaglutinante aunque las cepas de campo que los expresan suelen mostrar actividad HAMR (Girardeau et al., 1988; Korth et al., 1991; Lintermans et al., 1988). De hecho, la mayoría de las cepas de campo aisladas en este estudio que expresaban el antígeno F17 poseían actividad HAMR.

El antígeno LC168, detectado en nuestro estudio en el 15% de los aislados de campo, es distinto de los antígenos F5 y F41, los antígenos fimbriales que expresan las estirpes de ECET de los rumiantes, dado que los sueros específicos frente a estos antígenos fimbriales no reaccionaron con ninguna de las cepas LC168⁺ y que el suero B168 no reaccionó con las cepas de referencia que expresan los antígenos F5 y/o F41.

En los últimos años se han descrito en cepas de E. coli enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas aisladas de rumiantes los nuevos antígenos fimbriales siguientes: el F17 (Pohl et al., 1983; Contrepolis et al., 1985), el CS31A (Contrepolis et al., 1986; Girardeau et al., 1988) y el F165 (Pohl et al., 1986; Fairbrother et al., 1986). El antígeno F17, que también se ha detectado en este estudio en cepas de origen ovino y caprino, es una proteína formada por subunidades de 20 Kda y posee estructura fimbrial de 3-4 nm de diámetro (Lintermans et al., 1988). Aunque 6 de las cepas F17⁺ aisladas en este estudio reaccionaron también con el suero B168, el antígeno LC168 es distinto del F17 puesto que, por una parte, las 27 cepas F17⁺ restantes no reaccionaron con el suero B168 y, por otra, el suero anti F17 no reaccionó con 102 cepas que expresaban el antígeno LC168. Además, las estructuras semejantes a

fimbrias observadas por microscopía electrónica en la cepa CL-168 son morfológicamente distintas a la estructura fimbrial rígida de 3-4 nm de diámetro característica del antígeno F17 y observada también en este estudio en una cepa de campo F17⁺.

A pesar de que no se han realizado estudios comparativos con los antígenos fimbriales CS31A y F165, por no disponer de las cepas de referencia, pensamos que, dadas las características descritas de estos antígenos, el antígeno LC168 es también distinto de ellos. En efecto, el antígeno CS31A se ha caracterizado como una proteína fimbrial formada por subunidades de 29 Kda y de 2 nm de diámetro (Girardeau *et al.*, 1988), características que no coinciden con las del antígeno LC168, y el F165 es, en realidad, un complejo antigénico formado por dos subunidades protéicas de 19 y 17,5 Kda y de estructura fimbrial de 5-8 nm, mientras que el antígeno LC168 se corresponde únicamente con una banda de 19,5 Kda. No obstante, para confirmar nuestra sospecha es preciso realizar estudios inmunológicos. Estos estudios nos permitirían, asimismo, comprobar si el antígeno LC168 tiene relaciones antigénicas con alguno de los otros dos.

Algunas cepas de E. coli que originan septicemia en terneros y corderos poseen el plásmido Vir (Smith, 1974) que codifica, además de una toxina, un antígeno superficial denominado antígeno Vir (Lopez-Alvarez y Gyles, 1980). Este antígeno no se ha caracterizado completamente, sin embargo, Contrepolis *et al.* (1986) detectaron en SDS-PAGE de extractos térmicos de la cepa de referencia para el plásmido Vir S5 (015:K+:H21) una banda correspondiente a un polipéptido de 20 Kda, que probablemente se corresponde con el antígeno Vir. A pesar de que este peso molecular es semejante al del antígeno LC168 detectado por nosotros, pensamos que, también en este caso, se trata de antígenos distintos, puesto que el suero B168 no aglutinó la cepa de referencia S5.

El antígeno LC168 es relativamente frecuente (15%) entre las cepas de E. coli aisladas de corderos y cabritos en este estudio, aunque las estirpes que expresan este antígeno parecen estar mucho más difundidas en la cabaña ovina (18,5%) que en la caprina (6,28%). La mayoría de las cepas LC168⁺ se aislaron de animales diarreicos y en la segunda semana de vida.

Por el momento desconocemos si el antígeno LC168 juega algún papel en la patogenicidad de las cepas que lo expresan. Este antígeno posee características comunes a la mayoría de los antígenos fimbriales descritos hasta el momento por lo que probablemente se trate de un antígeno fimbrial. Los antígenos fimbriales constituyen factores de patogenicidad esenciales en las cepas de E. coli capaces de originar diarrea. A través de ellos las células bacterianas se unen a receptores específicos de la mucosa intestinal evitando así su eliminación con el flujo intestinal por los movimientos peristálticos y permitiendo la multiplicación de las bacterias en el intestino (Moon, 1990; Blanco et al., 1991). Los antígenos fimbriales también parecen jugar un papel importante en las cepas de E. coli capaces de originar septicemia en los rumiantes. Así, por ejemplo, la expresión del antígeno F165 en cepas septicémicas parece estar relacionada con la capacidad de dichas cepas de sobrevivir y multiplicarse en el torrente circulatorio (Ngeleka et al., 1993). En cualquier caso, son necesarios estudios posteriores que permitan completar la caracterización del antígeno LC168 y determinar su posible papel como factor de patogenicidad. Estos son los objetivos prioritarios de nuestras próximas investigaciones.

5. Características de los procesos estudiados: análisis global de los resultados.

En esta Tesis se ha investigado la participación de los diferentes grupos de estirpes de E. coli descritos hasta el momento en los animales domésticos. No obstante, el estudio se enmarca en un proyecto mucho más amplio sobre la etiología y la epizootiología de los procesos diarreicos de los corderos y cabritos recién nacidos en el que se ha investigado también la participación de otros enteropatógenos como Cryptosporidium spp. y rotavirus.

La infección por Cryptosporidium spp. se detectó en todos los brotes diarreicos estudiados excepto en tres (dos de ganado ovino y uno de caprino), si bien, en estos tres casos únicamente se analizaron una o dos muestras. La prevalencia de la infección por Cryptosporidium spp. en los corderos y cabritos afectados de diarrea en el momento de la toma de muestras fue del 81 y del 74% respectivamente (Troncoso, 1992). Sin embargo, en ninguno de los brotes diarreicos estudiados se detectó la eliminación de rotavirus (Troncoso, 1992).

Ya se indicó anteriormente que, de acuerdo con los resultados de este estudio, la participación de las estirpes de ECET en los brotes diarreicos estudiados fue prácticamente nula. Este hecho no resulta sorprendente teniendo en cuenta que los procesos diarreicos producidos por las estirpes de ECET afectan a los animales hasta los 4-5 días de vida (y especialmente a los menores de 2 días) y que en los brotes estudiados la diarrea solía iniciarse a los 4-5 días de vida y alcanzaba las mayores tasas de morbilidad en la segunda semana de vida de los animales. Pensamos, por lo tanto, que, aunque las estirpes de ECET pueden ser una causa importante de diarrea en los corderos y cabritos menores de 2 días, como se ha indicado también en el ganado bovino (Sherwood *et al.*, 1983), no se asocian a los típicos problemas diarreicos observados en las explotaciones ovinas y caprinas que afectan a los animales entre los 4 y 15 los días de vida.

A lo largo de la discusión se ha insistido en que determinadas estirpes de E. coli no enterotoxigénicas son capaces de originar diarrea y disentería en los animales domésticos tanto en infecciones naturales como experimentales. La producción de citotoxinas y la expresión de determinados factores de adhesión se consideran posibles factores de patogenicidad, sin embargo, los mecanismos patogénicos de las estirpes de E. coli no enterotoxigénicas en los animales domésticos no han sido esclarecidos.

En nuestro estudio se han detectado cepas de E. coli no enterotoxigénicas que presentan algunas de las características consideradas como posibles factores de patogenicidad, como la producción de citotoxinas (VT y CNF) y la expresión del antígeno F17. También se ha detectado la expresión de un antígeno, distinto de los descritos hasta el momento en las cepas aisladas de ruminantes, que parece estar ampliamente difundido entre los aislados ovinos y caprinos y que podría ser un nuevo factor de colonización. Asimismo, una proporción elevada de las cepas en las que no se detectaron los factores de patogenicidad investigados producían colicina V, considerada como un marcador de patogenicidad relacionado con las cepas de E. coli capaces de originan procesos septicémicos.

La posible participación de estas estirpes no enterotoxigénicas, u otras todavía por descubrir, en los procesos diarreicos neonatales de los ovinos y caprinos, bien como agentes

únicos o en combinación con otros enteropatógenos, precisa ser investigada experimentalmente. Pensamos que, en principio, debería darse cierta prioridad a las estirpes de ECAE. Estas cepas, al igual que Cryptosporidiym spp., producen las lesiones típicas en el intestino grueso aunque también puede afectarse el intestino delgado (Wray et al., 1989). Las lesiones intestinales en los animales investigados por nosotros afectaban habitualmente tanto al intestino delgado como al grueso, por lo que es posible que las cepas de ECAE estén implicadas en el síndrome diarreico de los corderos y cabritos. De hecho, en uno de los animales en los que se realizó la necropsis se observó por microscopía electrónica la típica lesión de adhesión y borrado (Troncoso, 1992).

En el diagnóstico etiológico de los procesos diarreicos neonatales de los rumiantes con frecuencia se detectan infecciones múltiples con dos o más enteropatógenos. En los estudios de campo realizados en el ganado bovino, las infecciones mixta generalmente se han asociado con cuadros clínicos más graves y con tasas de mortalidad más altas que cuando se detectaba un sólo agente (Snodgrass et al., 1986, Reynolds et al., 1986). No obstante, en los escasos estudios de campo realizados en los pequeños rumiantes sólo ocasionalmente se han descrito infecciones múltiples en corderos (Anderson, 1982, Ramisse et al., 1984) y cabritos (Nagy et al., 1983, 1984 y 1987, Sanford et al., 1991). Por lo tanto, la importancia y difusión de las infecciones mixtas en estos animales se desconoce.

Por el momento los pocos trabajos experimentales realizados para investigar las posibles interacciones entre diferentes enteropatógenos se han centrado en ECET y rotavirus en los terneros y en ECET, rotavirus y Cryptosporidium spp. en los corderos.

Diferentes infecciones experimentales realizadas en terneros con ECET y rotavirus sugieren la existencia de un efecto sinérgico por el que los rotavirus favorecerían la colonización por ECET sin agravar los síntomas de la enfermedad (Dubourghier et al., 1978, Gouet et al., 1978, Runnels et al., 1980b, Tzipori et al., 1981c). No obstante, en otro estudio llevado a cabo en terneros Hall et al. (1988a) observaron que, más que un efecto sinérgico, la coinfección con varios enteropatógenos originaba un efecto aditivo de las alteraciones producidas en diferentes tramos intestinales que desencadenaban un cuadro de malabsorción.

Las interacciones entre ECET, rotavirus y Cryptosporidium en corderos se han investigado experimentalmente en tres trabajos. Tzipori et al. (1981d) empleando corderos gnotobióticos encontraron que los animales de 4 o más días no desarrollaban sintomatología clínica cuando se infectaban con ECET o con rotavirus por separado ni cuando se infectaban conjuntamente con ambos agentes. Además, los corderos eran receptivos a la diarrea inducida por Cryptosporidium spp. hasta al menos los 6 días de edad, pero la infección conjunta del parásito con ECET o con rotavirus no agravaba la sintomatología clínica ni las lesiones. Por su parte, Wray et al. (1981, 1984) observaron que la coinfección el primer día de vida de corderos privados de calostro con ECET y rotavirus, a las mismas dosis utilizadas en infecciones simples, producía una mortalidad mayor a la inducida por las infecciones simples, aunque no influía en la duración de la diarrea. La discrepancia de estos resultados con los obtenidos por Tzipori et al. (1981d) posiblemente se deba a la diferencia de edad de los animales utilizados.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, y los obtenidos por el equipo de la Dra. Gómez Bautista sobre la prevalencia de la infección con Cryptosporidium spp., consideramos que, entre las posibles infecciones mixtas que pueden presentarse en los brotes diarreicos que afectan típicamente a los corderos y cabritos a partir de los 4-5 días de vida hasta la tercera semana, habría que destacar fundamentalmente la de Cryptosporidium spp. con estirpes de E. coli del grupo heterogeneo de no enterotoxigénicas. Nuestros proximos objetivos contemplan la investigación experimental de esta infección mixta.

VI. CONCLUSIONES

1. Las estirpes de E. coli enterotoxigénicas (ECET) F5⁺ y/o F41⁺STa⁺ parecen tener una participación escasa o nula en los típicos procesos diarreicos que afectan a los corderos y cabritos recién nacidos en la zona centro de España.

2. Un bajo porcentaje (el 0,7%) de las cepas de E. coli aisladas de corderos y cabritos afectados de diarrea producen una toxina termolábil que origina en las células Vero un efecto citopático semejante al inducido por las enterotoxinas termolábiles (LTs) producidas por estirpes de ECET de origen porcino y bovino.

3. Cepas de E. coli que expresan el antígeno fimbrial F17 se aíslan con cierta regularidad de corderos y cabritos afectados de diarrea de edades comprendidas entre los 5 y los 30 días, siendo más frecuente el aislamiento de estas cepas en los cabritos (8,6%) que en los corderos (3,03%).

4. Las cepas de E. coli F17⁺ aisladas de procesos diarreicos de los pequeños rumiantes no pertenecen al grupo de estirpes de ECET. Una elevada proporción produce colicina V (51,51%) y muestra actividad hemoaglutinante manosa-resistente (HAMR) (84,84%).

5. La infección con cepas de E. coli verotoxigénicas (ECVT) y productoras de CNF (ECNT) en los rebaños ovinos y caprinos de la zona centro de España es relativamente infrecuente. La frecuencia de aislamiento de las cepas de ECVT fue del 2,2% en los corderos y del 1,4% en los cabritos, mientras que la de las cepas de ECNT fue del 1,4 y 2,4% respectivamente.

6. La producción de colicinas es una característica frecuente entre las cepas de ECVT (87,5%) aisladas de procesos diarreicos, lo que podría indicar que las cepas de ECVT intervienen en los procesos extraintestinales en los pequeños rumiantes.

7. Las cepas de E. coli aisladas de procesos diarreicos de corderos y cabritos son

sensibles en porcentajes muy elevados a los antimicrobianos de uso infrecuente o de reciente introducción en medicina veterinaria, como la gentamicina, las cefalosporinas y las quinolonas fluoradas mientras que son sensibles en porcentajes relativamente bajos a los antimicrobianos más comunmente utilizados en el tratamiento de estos procesos, como las sulfamidas, las tetraciclinas y la estreptomina.

8. La capacidad hemaglutinante manosa-resistente (HAMR) con eritrocitos humanos y/o de ternera es una característica relativamente frecuente (40,17%) de las cepas de E. coli aisladas de procesos diarreicos de los pequeños rumiantes, siendo dicha actividad independiente de los factores patogénicos que expresan dichas cepas.

9. Una proporción relativamente elevada (15%) de las cepas de E. coli aisladas de los procesos diarreicos estudiados expresan un antígeno superficial, al que hemos denominado LC168, distinto de las fimbrias F5, F41 y F17. Este antígeno se expresa a 37° pero no a 18°C, se extrae por tratamiento térmico suave y se corresponde con una banda proteica de aproximadamente 19.500 Da de peso molecular, características que le asemejan a las fimbrias conocidas.

10. El antígeno LC168 no es hemaglutinante, si bien, un porcentaje relativamente elevado de las cepas que lo expresan si tienen esta capacidad.

VII. BIBLIOGRAFIA

- . ACRESS, S. D. 1985. Enterotoxigenic E. coli infections in newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.* 68: 229-256.
- . ACRES, S. D., BABIUK, L. A. 1978. Studies on rotaviral antibody in bovine serum and lacteal secretions, using radioimmunoassay. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 555-559.
- . ACRES, S. D., ISAACSON, R. E., BABIUK, L. A., KAPITANY, L. A. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterias. *Infection and Immunity.* 25: 121-126.
- . ACRES, S. D., LAING, C. J., SAUNDERS, J. T., RADOSTITS, O. M. 1975. *Acute undifferentiated neonatal diarrhoea in beef calves. I. Occurrence and distribution of infectious agents.* *Can. J. Comp. Med.* 39: 116-132.
- . ACRES, S. D., RADOSTITS, O. M. 1976. The efficacy of a modified live reo-like virus vaccine and E. coli bacterin for prevention of acute undifferentiated neonatal diarrhoea of beef calves. *Can. Vet. J.* 7: 197-212.
- . ACRES, S. K., SAUNDERS, J. R., RADOSTITS, O. M. 1977. Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: the prevalence of enterotoxigenic E. coli, reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. *Can. Vet. J.* 18: 113- 121.
- . ALDERTTE, J. F., ROBERTSON, D. C. 1977. Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxigenic strains of Escherichia coli: Defined medium for production of heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity.* 15: 781-788.
- . ALONSO, M. P., BLANCO, J., BLANCO, M., GONZALEZ, E. A. 1987. Frequent production of toxins by Escherichia coli strains isolated from human urinary tract infections. *FEMS Microbiol. Lett.* 4: 391-396.
- . ANDERSON, B. C. 1982. *Cryptosporidiosis in Idaho lambs: natural and experimental infections.* *J. Am. Vet. Med. Ass.* 181: 151-153.
- . ANDERSON, B. C. 1984. Location of cyptosporidia: a review of the literature and experimental infections in calves. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1474-1477.
- . ANGUS, K. E. , TZIPORI, S., GRAY, E. W. 1982. Intestinal lesions in SPF lambs associated with a Cryptosporidium from calves with diarrhea. *Vet. Pathol.* 19: 67-68.
- . ANSARI, M. M., RENSHAW, H. W., GATES, N. L. 1978. Colibacillosis in neonatal lambs: onset of diarrhoeal disease and isolation and characterization of enterotoxigenic E. coli from enteric and septicaemic forms of the disease. *Am. J. Vet. Res.* 39: 11-14.
- . ARGENZIO, R. A. 1985. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1: 461-469.
- . ARGENCIO, R. A., LIACOS, J. A., LEVY, M., MEUTEN, D. J., LECCE, J. G., POWELL, D. W. 1990. Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology.* 98: 1129-1140.
- . ASKAA, J., BLOCH, B. 1984. Infection in piglets with a porcine rotavirus-like virus. Experimental inoculation and ultrastructural examination. *Arch. Virol.* 80: 291-303.

- . AUBEL, D., DARFEUILLE-MICHAUD, A., JOLY, B. 1991. New adhesive factor (antigen 8786) on a human enterotoxigenic E. coli 0117:H4 strain isolated in Africa. *Infect. Immun.* 59: 1290-1299.
- . BACK, E., MOLLBY, R., KAUJE, B., STINTZING, G., WADSTROM, T., HABTE, D. 1980. Enterotoxigenic E. coli and other gram-negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen, and loss of enterotoxigenicity. *J. Infect. Dis.* 142: 318-327.
- . BALDINI, M. M., KAPER, J. B., LEVINE, M. M., CANDY, D. C. A., MOON, H. W. 1983. Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic E. coli. *J. Pediatric. Gastroenterol.* 2: 534-538.
- . BALODA, S. B., YUK, Y. K., KROVACEK, K., SETHI, S. K., WADSTROM, T. 1987. Detection of Shig-like (SLT) toxins of enteropathogenic E. coli (EPEC) of human, porcine, calf, and lamb origin on Vero and HeLa S3 cell: a comparative study. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 264: 33-40.
- . BARKER, I. K., CARBONELL, P. L. 1974. Cryptosporidium agni sp. n. from lambs, and Cryptosporidium bovis sp. n. from a calf with observations on the oocyst. *A. Parasitmdkd.* 44: 289-298.
- . BARRY, A. L., FUCHS, P. C. 1991. In vitro activities of sparfloxacin, tosufloxacin, ciprofloxacin, and fleroxacin. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 35: 955-960.
- . BELISLE, B. W., TWIDDY, E. M., HOLMES, R. K. 1984a. Characterization of monoclonal antibodies to heat-labile enterotoxin encoded by a plasmid from a clinical isolate of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 43: 1027-1031.
- . BELISLE, B. W., TEIDDY, E. M., HOLMES, R. K. 1984 b. Monoclonal antibodies with an expanded repertoire of specificities and potent neutralizing activity for Escherichia coli heat-labile enterotoxins. *Infect. Immun.* 46: 759-764.
- . BERG, I. E., PETERSON, A. C., FREEMAN, T. P. 1978. Ovine cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 1586-1587.
- . BIJLSMA, I. G. W., FRIK, J. F. 1987. Haemagglutination patterns of the different variants of E. coli K88 antigen with porcine, bovine, guinea pig, chicken, ovine and equine erythrocytes. *Res. Vet. Sci.* 43: 122-123.
- . BINNS, M. M., DAVIES, K. L., HARDY, K. G. 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature.* 279: 778-781.
- . BLANCO, M. 1991. Escherichia coli enterotoxigénicos, necrotizantes y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago.
- . BLANCO, J., ALONSO, M. P., GONZALEZ E. A., BLANCO, M., GARABAL, J. I. 1990. Virulence factor of bacteraemic E. coli with particular reference to cytotoxic necrotizing factor (CNF) production by P-fimbriated strains. *J. Med. Microbio.* 31: 175-183.
- . BLANCO, J., BLANCO, M., ALONSO, M. P., BLANCO, J. E., GONZALEZ, E. A., GARABAL, J. I. 1992a. Characteristics of haemolytic E. coli with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Res. Microbiol.* 143: 869-878.
- . BLANCO, J., BLANCO, M., GARABAL, J. I., GONZALEZ, E. A. 1991. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic E. coli from humans and animals. *Microbiología SEM.* 7: 57-72.
- . BLANCO, F., BLANCO, M., GONZALEZ, E. A., ALONSO, M. P., GARABAL, J. I. 1992b. Comparative evaluation of three tests for the detection of E. coli cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 311-316.

- . BLANCO, M., BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., GARABAL, J., I., BLANCO J. E. 1992 c. E. coli toxigénicos de origen bovino. *Med. Vet.* 9: 199-213.
- . BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., ANADON, R. 1985. Colonization antigens and hemagglutinating patterns of human E. coli. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 316-326.
- . BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., BERNARDEZ, I., REGUEIRO, B. 1983. Modificación del ensayo con ratones lactantes para la detección de la enterotoxina termoestable (ST) Escherichia coli. *Enfermedades Infecciosas.* 1: 107-114.
- . BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., BERNARDEZ, I., REGUEIRO, B. 1983bis. Differentiated biological activity of verocytotoxins (VT) released by human and porcine E. coli strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 167-170.
- . BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., BLANCO, M., ALONSO, M. P., BARBADILLO, M. J. 1988. Toxins and serotypes of faecal non-enterotoxigenic and non-enteropathogenic E. coli strains causing manose-resistant haemagglutination: relation with haemagglutination patterns. *Zentralbl. Bak. Hyg. Abt. A.* 269: 43-55.
- . BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., GARCIA, S., BLANCO, M., REGUEIRO, B., BERNARDEZ, I. 1988. Production of toxins by E. coli strain isolated from calves with diarrhoeas in Galicia (North West) Spain. *Vet. Microbiol.* 18: 297-311.
- . BOHL, E. H., SAIF, L. J., THEIL, K. W., AGNES, A. G., CROSS, R. F. 1982. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 15: 312-319.
- . BORDER, M., FIREHAMMER, B. D., SHOOP, D. S., MYERS, L. L. 1985. Isolation of Bacteroides fragilis from the faeces of diarrhoeic calves and lambs. *J. Clin. Microbiol.* 21: 472-473.
- . BORCZYK, A. A., KARMALI, M. A., LIOR, H., DUNCAN, L. M. C. 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing Escherichia coli 0157:H7. *Lancet* i: 98.
- . BRAUN, V. 1981. E. coli cells containing the ColV plasmid produce the iron ionophore aerobactin. *FEMS Microbiol. Lett.* 11: 225-228.
- . BRIDGER, J. C. 1980. Detection by electron microscope of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoeas. *Vet. Rec.* 107: 532-533.
- . BRIDGER, J. C., POCOCK, D. H. 1986. Variation in virulence of bovine rotaviruses. *J. Hyg.* 96: 257-264.
- . BRILL, B. M., WASILAUSKAS, B. L., RICHARDSON, S. H. 1979. Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 9: 49-55.
- . BRITON, C. C. 1959. Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature.* 183: 482-786.
- . BROES, A., FAIRBROTHER, J. M., JACQUES, M., LARIVIERE, S. 1988. Isolation and characterization of a new fimbrial antigen (CS1541) from a porcine enterotoxigenic Escherichia coli 08:KX105 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 341-348.
- . BROES, A., FAIRBROTHER, J. M., JACQUES, M., LARIVIERE, L. 1989. Requirement for capsular antigen KX105 and fimbrial antigen CS1541 in the pathogenicity of porcine enterotoxigenic Escherichia coli 08:KX105 strains. *Can. J. Vet. Res.* 53: 43-47.
- . BROWN, D. W. G., BEARDS, G. M., GUANG-MU, C., FLEWETT, T. H. 1987. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in human and animals. *J. Clin. Microbiol.* 26: 316-319.

- . BURGESS, M. N., BYWATER, R. J., COWLEY, C. M., MULLAN, N. A., NEWSOME, P. M. 1978. Biological evaluation of a metanol-soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21: 256-531.
- . BURNS, J. W., WAN ELCH, K., NAKAT, S., ESTES, M. K. 1989. Characterization of monoclonal antibodies to human group B rotavirus and their use in an antigen detection enzymelinked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 27: 245-239.
- . BURROWS, M. R., SELLWOOD, R. GIBBONS, R. A. 1976. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.* 96: 269-275.
- . CANTEY, J. R., BLAKE, R. K. 1977. Diarrhea due to E. coli in the rabbit: a novel mechanisms. *J. Infect. Dis.* 151: 766-771.
- . CARD, C. E., PERDRIZET, J. A., GEORGI, M. E., SHIN, S. J. 1987. Cryptosporidiosis associated with bacterial enteritis in a goat kid. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 191: 69-70.
- . CAPRIOLI, A., FALBO, V., RODA, L. G., RUGGERI, F. M., ZONA, C. 1983. Partial purification and characterization of an E. coli toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 39: 1300-1306.
- . CAPRIOLI, A., DONELLI, G., FALBO, V., POSSENTI, R., RODA, L. G., ROSCETTI, G., RUGGERI, F. M. 1984. A cell-division active protein from E. coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 587-593.
- . CAPRIOLI, A., FALBO, V., RUGGERI, F. M., BALDASSARI, L., BISICCHIA, R., IPPOLITO, G., ROMOLI, E., DONELLI, G. 1987. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of E. coli causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* 25: 146-149.
- . CLANCY, J., SAVAGE, D. C. 1981. Another colicin V phenotype: in vitro adhesion of E. coli to mouse intestinal epithelium. *Infect. Immun.* 32: 343-352.
- . CLAVEL, A., FLETA, J., CASTILLO, J., SANCHEZ-ACEBEDO, C. 1989. Incidencia de Cryptosporidium en heces de ovino. Comparación de métodos de identificación. VI Congreso Nacional de Parasitología y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres. P. 252.
- . CLEARY, T. G., MATHEWSON, J. J., FARIS, E., PICKERING, L. K. 1985. Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic E. coli serogroups. *Infect. Immun.* 47: 335-337.
- . CLEMENTS, J. D., FLINT, D. C., KLIPSTEIN, F. A. 1982. Immunological and physicochemical characterization of heat-labile enterotoxins isolated from two strains of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 38: 806-809.
- . CONTREPOIS, M., DOUBOURGUIER, H. C., PARODI, A. L., GIRARDEAU, J. P., OLLIER, J. L. 1986. Septicaemic E. coli and experimental infection of calves. *Vet. Microbiol.* 12: 109-118.
- . CONTREPOIS, M. G., GIRARDEAU, J. P. 1985. Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic E. coli. *Infect. Immun.* 50: 947-949.
- . CONTREPOIS, M., MARTEL, J. L., BORDAS, C., HAYERS, F., MILLET, A., RAMISSE, J., SENDRAL, R. 1985. Fréquence des pili FY et K99 parmi des souches de Escherichia coli isolées de veaux diarrhéiques en France. *Ann. Rech. Vet.* 16: 25-28.
- . CONWAY, P. L., WELIN, A., COHEN, P. S. 1990. The presence of K88-specific receptors in porcine ileal

- mucus is age dependent. *Infect. Immun.* 58: 3178-3182.
- . CRAVIOTO, A., GROSS, R.J., SCOTLAND, S. M. ROWE, B. 1979. An adhesive factor found in strains of E. coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiol.* 3: 95-99.
- . CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S. M., ROWE, B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. *Infect. Immun.* 36: 189-197.
- . CROUCH, C. F., ACRES, S. D. 1984. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. *Can. J. Comp. Med.* 48: 340-342.
- . CHANG, P. P., MOSS, J., TWIDDY, E. M., HOLMES, R. K. 1987. Type II heat-labile enterotoxin of E.coli activates adenylate cyclase in human fibroblast by ADP ribosylation. *Infect. Immun.* 55: 1854-1858.
- . CHANTER, N., HALL, G. A., BLAND, A. P., HAYLE, A. J., PARSONS, K. R. 1986. Dysentery in calves by an atypical strain of E. coli (S102-9). *Vet. Microbiol.* 12: 241-253.
- . CHANTER, N., MORGAN, J. H., BRIDGER, J. C., HALL, G. A., REYNOLDS, D. J. 1984. Dysentery in gnotobiotic calves caused by atypical Escherichia coli. *The Veterinary Record.* 114: 71.
- . CHASEY, D., BANKS, J. 1984. The commonest rotavirus from neonatal lamb diarrhoea in England and Wales have atypical electropherotypes. *Vet. Rec.* 115: 326-327.
- . CHASEY, D., BANKS, J. 1986. Replication of atypical ovine rotavirus in small intestine and cell culture. *J. Gen. Virol.* 67: 567-576.
- . CHASEY, D., DAVIES, P. 1984. Atypical rotaviruses in pigs and cattle. *Vet. Rec.* 114: 16-17.
- . CHENEY, C. P., SCHAD, P. A., FORMAL, S. B., BOEDEKER, E. C. 1980. Species specificity of in vitro E. coli adherence to host intestinal cell membranes and its correlation with in vivo colonization and infectivity. *Infect. Immun.* 28: 1019-1027.
- . CHEREFI, A., CONTREPOIS, M., PICARD, B., GOULLET, DE RYCKE, J., FAIRBROTHER, J., BARNOUIN, J. 1990. Factors and markers of virulence in E. coli from human septicaemia. *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 279-284.
- . DALLAS, W. S., GILL, D. M., FALKOW, S. 1979. Cistrons encoding Escherichia coli heat-labile toxin. *J. Bacteriol.* 139: 850-858.
- . DEA, S., BEGIN, M. E., ARCHAMBAULT, D., ELAZHARY, M. A. S. Y., ROY, R. S. 1985. Distinct rotaviruses isolated from asymptomatic calves. *Cornell Vet.* 75: 307-318.
- . DEAN, A. G., CHING, Y. C., WILLIAMS, R. G., HARDEN, L. B. 1972. Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *Journal of Infectious Diseases.* 125: 407-411.
- . DEAN, E. A., WHIPP, S. C., MOON, H. W. 1989. Age-specific colonization of porcine intestinal epithelium by 987 piliated enterotoxigenic E. coli. *Infect. Immun.* 57: 82-87.
- . DE AVILA, F. A., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., LALLIER, R., FAIRBROTHER, J. M., JACQUES, M. 1988. A new fimbrial antigen on E. coli strains isolated from zebu (Bos indicus) calves with diarrhoea in Brazil. *Vet. Rec.* 123: 80.

- . DE GRAAF, F. K., KLAASEN-BOOR, P., van HEES, J. E. 1980. Purification, characterization and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of Escherichia coli. Infect. Immun. 33: 877-883.
- . DE GRAAF, F. K., ROORDA, I. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic Escherichia coli strain B41M. Infect. Immun. 36: 751-758.
- . DENEKE, C. F., THORNE, G. M., GORBACH, S. L. 1981. Serotypes of attachment pili of enterotoxigenic E. coli isolated from humans. Infect. Immun. 32: 1254-1260.
- . DE RYCKE, J., 1990. Toxic effects for lambs of cytotoxic necrotising factor from E. coli. Res. Vet. Sci. 49: 349-354.
- . DE RYCKE, J., BERNAR, S., LAPORTE, J., NACIRI, M., POPOFF, M. R., RODOLAKIS, A. 1986. Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. Ann. Rech. Vet. 17: 159-168
- . DE RYCKE, J., GONZALEZ, E. A., BLNCO, J., OSWALD, E., BLANCO, M., BOIVIN, R. 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of E. coli. J. Clin. Microbiol. 28: 649-699.
- . DE RYCKE, J., GUILLOT, J. F., BOIVIN, R. 1987. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of E. coli isolated from feces of diarrheic calves. Vet. Microbiol. 15: 137-150.
- . DE RYCKE, J., OSWALD, E., BOIVIN, R. 1989 bis. An in vivo assay for the detection of cytotoxic strains of E. coli. Ann. Rech. Vet. 20: 39-46.
- . DE RYCKE, J. PHAN-THANH, L., BERNARD, S. 1989. Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor of E. coli. J. Clin. Microbiol. 27: 983-988.
- . DER VARTANIAN, M. 1988. Differences in excretion and efficiency of the aerobactin and enterochelin siderophores in a bovine pathogenic strain of E. coli. Infect. Immun. 56: 413-418.
- . DOBRESCU, L. 1983. New biological effect of edema disease principle (Escherichia coli-neurotoxin) and its use as an in vitro assay for this toxin. Am. J. Vet. Res. 44: 31-34.
- . DORN, C. R., SCOTLAND, J. M., SMITH, H. R., WILLSHAW, G. A., ROWE, B. 1989. Properties of verocytotoxin-producing E. coli of human and animal origin belong to serotypes other than 0157:H7. Epidem. Infect. 103: 83-95.
- . DOWNES, F. P., BARRETT, T. J., GREEN, J. H., ALOISIO, C. H., SPIKA, J. S., STOCKBINE, N. A., WACHSMUTH, I. K. 1988. Affinity purification and characterization of shig-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. Infect. Immun. 56: 1926-1933.
- . DOYLE, M. P., SCHONEI, J. L. 1987. Isolation of Escherichia coli 0157:H7 from retail fresh meats and poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2394-2396.
- . DUBOURGUIER, H. C., GOUET, P., MANDARD, O., CONTREPOIS, M., BACHELERIE, C. 1978. Scanning electron microscopy of abomasum and intestine of gnotoxenic calves infected either with rotavirus, coronavirus or enteropathogenic E. coli or with rotavirus and E. coli. Ann. Rech. Vet. 9: 441-451.
- . DUFF, J. P., HUNT, B. W. 1989. Lambs die from porcine E. coli. Vet. Rec. 125: 404.
- . DUGUID, J. P., CLEGG, S., WILSON, M. I. 1979. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of E. coli. J. Med. Microbiol. 12: 213-227.

- . DUGUID, J. P., SMITH, I. W., DEMPSTER, G., EDMUNDS, P. N. 1955. Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in Bacterium coli. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 70: 335-348.
- . DUPONT, H. L., FORMAL, S. B., HORNICK, R. B., SNYDER, M. J., LIBONATI, J. P., SHEAHAN, D. G., LABRECK, E. H., KALAS, J. P. 1971. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285: 1-9.
- . ECHEVARRIA, P. D., CHANG, C. P., SMITH, D., ANDERSON, G. L. 1976. Enterotoxigenicity and invasive capacity of "enteropathogenic" serotypes of E. coli. *J. Pediatric*. 89: 8-10.
- . EDBERG, S. C., TREPETA, R. W. 1983. Rapid and Economical Identification and antimicrobial susceptibility test Methodology for Urinary tract pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 18: 1287-1291.
- . EDWARDS, P. R., EWING, W. H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess, Mineapolis, Minnesota.
- . ERICSON, H. M., SHERRIS, J. C. 1971. Antibiotic sensibility testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbio. Scand. Set. B Suppl.* 217: 1-90.
- . EVANS, D. J., CHENS, L. CL, CURLIN, G. R. EVANS, D. G. 1972. Stimulation of adenylylase by Escherichia coli enterotoxin. *Nature (London)*, 236: 137-138.
- . EVANS, D. J. Jr., EVANS, D. G. 1977. Inhibition of immune hemolysis: serological assay for the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 5: 100-105.
- . EVANS, D. G., EVANS Jr., D. J. 1978 bis. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.* 21: 638-647.
- . EVANS, D. J. Jr., EVANS, G. G., DuPONT, H. L. 1979. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic E. coli determined with human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. Immun.* 23: 336-346.
- . EVANS, D. G., EVANS, D. J., GORBACH, S. L. 1973. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli and serum antitoxin activity by de vascular permeability factor assay. *Infection and Immunity*. 8: 731-735.
- . EVANS, D. G., EVANS, D. J., TJOA, W. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhoea: Correlation with colonization factor. *Infection and Immunity*. 18: 330-337.
- . EVANS, D. G., EVANS Jr., D. J., TJOA, W. S., DuPONT, H. L. 1978. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.* 19: 727-736.
- . EVANS, D. J. Jr., EVANS, D. G., YOUNG, L. S., PITT, J. 1980. hemagglutination typing of E. coli: definition of seven hemagglutination types. *Infect. Immun.* 12: 235-242.
- . EVANS, D. G., SILVER, R. P., EVANS Jr., D. J., CHASE, D. G., GORBACH, L. L. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* 12: 65-667.
- . FAIRBROTHER, J. M., BROES, A., JACQUES, M., LARIVIERE, S. 1989. Pathogenicity of Escherichia coli 0115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1029-1036.
- . FAIRBROTHER, J. M., LALLIER, R., LEBLANC, L., JACQUES, M., LARIVIERE, S. 1988. Production and

- purification of Escherichia coli fimbrial antigen F165. FEMS Microbiol. Lett. 56: 247-252.
- . FAIRBROTHER, J. M., LARIVIERE, S., JOHNSON, W. M. 1988. Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of E. coli isolated from newborn pigs with diarrhoea. Am. J. Vet. Res. 49: 1325-1328.
- . FAIRBROTHER, J. M., LARIVIERE, S., LALLIER, R. 1986. New fimbrial antigen F165 from E. coli serogroup 0115 strains isolated from piglets with diarrhoeas. Infect. Immun. 51: 10-15.
- . FASSI-FEHRI, M. M., JOHNSON, D. W., TAOUDI, A., BERRADA, J. 1988. Epidemiology of diarrhoea due to E. coli and rotavirus in calves and lambs in Morocco. Ann. Res. Vet. 19: 59-64.
- . FERNANDEZ-BERAS, M. E., KISSEL, V., LIOR, H., CABELLO, F. C. 1990. Virulence-related genes in ColV plasmids of E. coli isolated from blood and intestines. J. Clin. Microbiol. 28: 742-746.
- . FIJTMAN, N. L., BARRANDEGUY, E. M., CORNAGLIA, E. M., SCHUDEL, A. A. 1987. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. Arch. Virol. 96: 275-281.
- . FINKELSTEIN, R. A., BURKS, M. F., ZUPAN, A., DALLAS, W. S., JACOB, C. O., LUDWIG, D. S. 1987a. Antigenic determinants of the cholera/coli family of enterotoxins. Rev. Infect. Dis. 9S: 490-502.
- . FINKELSTEIN, R. A., BURKS, M. F., ZUPAN, A., DALLAS, W. S., JACOB, C. O., LUDWIG, D. S. 1987b. Epitopes of the cholera family of enterotoxins. Rev. Infect. Dis. 9S: 544-561.
- . FIREHAMMER, B. D., MYERS, L. L. 1981. Campylobacter fetus subsp. jejuni: its possible significance in enteric disease of calves and lambs. Am. J. Vet. Res. 42: 919-922.
- . FLEWETT, T. H., WOODE, G. N. 1978. The rotaviruse. Arch. Virol. 57: 1-23.
- . FOREYT, E. F. 1990. Coccidiosis and cryptosporidiosis in cheep and goats. Adv. Sheep and Goat Med. 6: 655-670.
- . FRANCIS, D. H., ALLEN, S. D., WHITTE, R. D. 1989. Influence of bovine intestinal fluid on the expression of K99 pili by Escherichia coli. Am. J. Vet. Res. 50: 822-826.
- . FRANTZ, J. C., ROBERTSON, D. C. 1981. Immunological properties of Escherichia coli heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. Infect. Immun. 33: 193-198.
- . FREDERICQ, P. 1964. Colicines et colicinogenic. Ann. Inst. Pasteur. 107: 7-17.
- . GAASTRA, W., DE GRAAF, F. K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic E. coli strains. Microbiol. Rev. 46: 129-161.
- . GATES, N. L. 1977. Observation on lamb mortality at the US Sheep Experimental Station. West Vet. 15: 5-7.
- . GEARY, S. J., MARCHLEWICZ, B. A., FINKELSTEIN, R. A. 1982. Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 36: 215-220.
- . GIANELLA, R. A., 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: characteristics of the model. Infect. Immun. 14: 95-99.
- . GIANELLA, R. A., DRAKE, K. W., LUTTRELL, M. 1981. Development of a radioimmunoassay for

- Escherichia coli heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. *Infect. Immun.* 33: 186-192.
- . GILL, D. M., CLEMENTS, J. D., ROBERTSON, D. C., FINKELSTEIN, R. A. 1971. Subunit number and arrangement in Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 33: 677-682.
- . GILL, D. M., RICHARDSON, S. H. 1980. Adenosine diphosphat-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of E. coli: comparison with cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 141: 64-70.
- . GIRARDEAU, J. P., DUBOURGUIER, H. C., CONTREPOIS, M. 1980. Attachment des E. coli enteropathogenes a la muquese intestinale. *Bull. Group. Tech. VEt.* 80-4-B-190: 49-49.
- . GIRARDEAU, J. P., der VARTANIAN, M., OLLIER, J. L., CONTREPOIS, M. 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicaemic Escherichia coli strain. *Infect. Immun.* 56: 2180-2188.
- . GLANTZ, P. J., KRADEL, D. C. 1967. Escherichia coli serogroups 0115 isolated from animals: isolation and natural cases of disease. *Am. J. Vet. Res.* 28: 1891-1895.
- . GLANTZ, P. J., KRADEL, D. C., HOKANSON, J. F. 1966. E. coli serogroup 0115 isolated from animals: experimental infection of calves. *Am. J. Vet. Res.* 27: 1205-1209.
- . GOLDSCHIMDT, M. C., DUPONT, H. L. 1976. Enteropathogenic E. coli, lack of correlation of serotype with pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 133: 153-156.
- . GOMEZ BAUTISTA, M., ORTEGA MORA, L. M., GASS, A., TRONCOSO, J. M., ROJO VAZQUEZ, F. A. 1989. Epizootología de la criptosporidiosis en rumiantes (terneros, corderos y cabritos). VI Congreso Nacional de Parasitología y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres. P. 253.
- . GONZALEZ, E. A., BLANCO, J. 1985a. Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and non-enteropathogenic Escherichia coli strains of porcine origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 127-130.
- . GONZALEZ, E. A., BLANCO, J. 1985b. Comparative study of inhibition of manose-resistant haemagglutination caused by CFA/I, CFA/II, K88 and K99-positive E. coli strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 115-121.
- . GONZALEZ, E. A., BLANCO, J. 1985c. Comparison between enterotoxic activity and methanol solubility in heat-stable enterotoxins. (STa and STb from E. coli of human, porcine and bovine origins. *Sbl. Bakt. Hyg. A.* 260:115-121.
- . GONZALEZ, E. A., BLANCO, J. 1987. Propiedades de los E. coli causantes de diarrea en seres humanos. E. coli enterotoxigénicos (ECET), enteropatógenos (ECEP) y enteroinvasivos (ECEI). Monografía nº 27 de la Universidad de Santiago de Compostela.
- . GONZALEZ, E. A., BLANCO, J. 1989. Serotypes and antibiotic resistance of verotoxigenic (VTEC) and necrotizing (NTEC) E. coli strains isolated from calves with diarrhoea. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 31-36.
- . GONZALEZ HIDALGO, E., RESPALDIZA CARDEÑOSA, E. 1987. Incidencia de la cryptosporidiosis en ovinos y caprinos. V Congreso Nacional de Parasitología, Salamanca. pp. 393-394.
- . GORBACH, S. L., KHURANA, C. M. 1972. Toxigenic Escherichia coli. A cause of infantile diarrhea in Chicago. *New England Journal of Medicine.* 287: 791-795.

- . GOUET, P., CONTREPOIS, M., DUBOURGUIER, H. C., RIOUS, Y., SCHERRER, R., LAPORTE, J., VAUTHERST, J. F., COHEN, J. L'HARIDON, R. 1978. The experimental production of diarrhoea in colostrum deprived axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic E. coli, rotavirus, coronavirus and in a combined infection of rotavirus and E. coli. *Ann. Rech. Vet.* 9: 433-440.
- . GREEN, B. A., NEILL, R. J., RUYECHAN, W. T., HOLMES, R. K. 1983. Evidence that a new enterotoxin of Escherichia coli which activates adenylate cyclase in eucaryotic target cells is not plasmid mediated. *Infect. Immun.* 41: 383-390.
- . GREENBERG, H. B., SACK, D. A., RODRIGUEZ, W., SACK, R. B., WYATT, R. G., KALICA, A. R., HORSWOOD, R. L., CHANOCK, R. M., KAPIKIAN, A. Z. 1977. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 17: 541-545.
- . GREGORY, D. W., CARDELLA, M. A., MYERS, L. L. 1983. Lamb model in the study of immunity to enteropathogenic E. coli infections. *Am. J. Vet. Res.* 44: 2073-2077.
- . GROSS, R. J., SCOTLAND, S. M., ROWE, B. 1976. Enterotoxin testing of E. coli causing epidemic infantile enteritis in the U.K. *Lancet.* 1: 629-631.
- . GUERRANT, R. L., BRUNTON, L. L., SCHNANITMAN, T. C., REBHUN, L. I., GILMAN, A. G. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibria cholera and Escherichia coli. *Infect. Immun.* 10: 320-327.
- . GUERRANT, R. L., HUGHES, J. M., CHANG, B., ROBERTSON, D. C., MURAD, F. 1980. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: studies of tissue specificity potential receptors and intermediates. *J. Infect. Dis.* 142: 220-228.
- . GUINNE, P. A. M., JANSEN, W. H. 1979. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in Escherichia coli strains of human, porcine, bovine origin: a comparative study. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A.* 243: 245-257.
- . GUINEE, P. A. M., VELDKAMP, J., JANSEN, W. H. 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of Escherichia coli. *Infection and Immunity.* 15: 676-678.
- . GURWITH, M. J., WISERMAN, D. A., CHOW, P. 1977. Clinical and laboratory assessment of the pathogenicity of serotyped enteropathogenic E. coli. *J. Infect. Dis.* 135: 736-743.
- . GUYOT, G. 1908. Ueber die bakterielle hämagglutination (bakterio-haemo-agglutination). *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung Originale.* 47: 640-653.
- . GUTH, B. E. C., PICKETT, C. L., TEIDY, E. M., HOLMES, R. K., GOMES, T. A. T., LIMA, A. A. M., GUERRANT, R. L., FRANCO, B. D. G. B., TRABULSI, L. 1986a. Production of type II heat-labile enterotoxin by Escherichia coli isolated from food and human feces. *Infect. Immun.* 54: 587-589.
- . GUTH, B. E. C., TWIDDY, E. M., TRABULSI, L., HOLMES, R. K. 1986b. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 54: 529-536.
- . HALE, T. L., SANSONETTI, P. J., SCHAD, P. A., AUSTIN, S., FORMAL, S. B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in Shigella flexneri, Shigella sonnei, and Escherichia coli. *Infect. Immun.* 40: 340-350.
- . HALL, G. A., CHANTER, N., BLAND, A. P. 1988a. Comparison in gnotobiotic pigs of lesions caused by

- verotoxigenic and non-verotoxigenic Escherichia coli. *Vet. Pathol.* **25**: 205-210.
- . HALL, G. A., REYNOLDS, D. J., CHANTER, N., MORGAN, J. H., PARSONS, K. R., DEBUEY, T. G., BLAND, A. P., BRIDGER, J. C. 1985. Dysentery caused by E. coli (S102-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet. Pathol.* **22**: 156-163.
- . HALL, G. A., REYNOLDS, D. J., PARSONS, K. R., BLAND, A. P., MORGAN, J. H. 1988b. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. *Res. Vet. Sci.* **45**: 240-250.
- . HAMPSON, D. J., BETTLEHEIM, K. A., WINTER, P. J., MARSHALL, R. BL, WILSON, M. W. 1986. A comparison of serotyping, BRENDA-typing and incompatibility grouping, and toxin testing of haemolytic Escherichia coli isolated from piglets before and after waning. *New Zealand Vet. J.* **34**: 101-103.
- . HANDL, C., RONNBREG, C., NILSSON, B., OLSSON, E., JONSSON, H., FLOCK, J. I. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for E. coli heat-stable enterotoxin type II. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1555-1556.
- . HAREL, J., FORGET, M., NGELEKA, M., JACQUES, M., FAIRBROTHER, J. M. 1992. Isolation of adhesive-defective Tn *phoA* mutants of septicemic E. coli 0115:K-:F165. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2337-2345.
- . HARNET, N. M., GYLES, C. L. 1985. Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic E. coli. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 428-433.
- . HARRIS, J. R., WACHSMUTH, I. K., DAVIS, B. R., COHEN, M. L. 1982. High-molecular-weight plasmid correlates with Escherichia coli enteroinvasiveness. *Infect. Immun.* **37**: 1295-1298.
- . HEAD, S. C., PETRIC, M., RICHARDSON, S. E., ROSCOE, M. E., KARMALI, M. A. 1988. Purification and characterization of Verocytotoxin 2. *FEMS Microbiol. Lett.* **51**: 211-216.
- . HEINE, J., POHLENZ, J. F. L., MOON, H. W., WOODE, G. N. 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with Cryptosporidium species. *J. Infect. Dis.* **150**: 768-775.
- . HEYININGEN, S., van. 1974. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* **183**: 656-657.
- . HIRSH, D. C. 1985. Fimbriae: relation of intestinal bacteria and virulence in animals. *Ad. Vet. Sci. Comp. Med.* **29**: 207-238.
- . HOLLAND, E. R. 1990. Some infectious causes of diarrhoea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews.* **3**: 345-375.
- . HALLIDAY, R., WILLIAMS, M. R. 1976. Passive immunity in the lamb. Effects of a second feed of colostrum on antibody from the first feed. *Res. Vet. Sci.* **21**: 173-175.
- . HONDA, T., TSUJI, T., TAKEDA, Y., MIWATANI, T. 1981. Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **34**: 337-340.
- . HOHMANN, A., WILSON M. R. 1975. Adherence of enteropathogenic Escherichia coli to intestinal epithelium in vivo. *Infect. Immun.* **12**: 866-880.
- . HOLGREM, J. 1985. Toxins affecting intestinal transport processes. *The Virulence of E. coli*. Ed. M. Sussman.
- . HOLGREM, J., SVENNERHOLM, A. M. 1973. Enzyme-linked immunosorbent assays for cholera serology. *Infect. Immun.* **7**: 759-763.

- . HOLMES, R. K., TWIDDY, E. M., PICKET, C. L. 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 53: 464-473.
- . HOLLAND, R. E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 345-375.
- . HONDA, T., ARITA, M., MIWATANI, T. 1984. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic E. coli: a possible new colonization factor. *Infect. Immun.* 43: 959-965.
- . HONDA, T., SAMAKOSES, R., SORNCHAI, C., TAKEDA, Y., MIWATANI, T. 1983. Detection by a staphylococcal soagglutination test of heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 17: 592-595.
- . HOPKINS, F. M., DEAN, D. F., GREEN, W. 1984. Failure of passive transfer in calves: comparison of field diagnostic methods. *Mod. Vet. Pract.* 65: 625-628.
- . HOUSE, J. A. 1978. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 573-576.
- . HUGHES, L. E., HEATH, G. B. S., BARR, M. 1962. Diseases associated with E. coli in lambs. *Vet. Rec.* 74: 350-351.
- . IHARA, T., SAMEJIMA, HT., KUWAHAR, H., TAJIMA, M. 1983. Isolation of new serotypes of bovine rotavirus. *Arch. Virol.* 78: 145-150.
- . INGLIS, J. S. S. 1960. The relationship of husbandry to calf scours: a review. *Vet. Rec.* 72: 1174-1177.
- . IP, S. M., CRICHTON, P. B., OLD, D. C., DUGUID, J. P. 1981. Mannose-resistant and eluting haemagglutinating and fimbriae in E. coli. *J. Med. Microbiol.* 14: 223-226.
- . IRITANI, B., INZANA, T. J. 1988. Evaluation of a rapid tube assay for presumptive identification of Escherichia coli from Veterinary Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 26: 564-566.
- . ISAACSON, R. E. 1977. K99 surface antigen of Escherichia coli: purification and partial characterization. *Infect. Immun.* 15: 272-279.
- . ISAACSON, R. E., MOON, H. W., SCHNEIDER, R. A. 1978. Distribution and virulence of E. coli in the small intestines of calves with and without diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1750-1755.
- . ISAACSON, R. E., TICHTER, P. 1981. E. coli-987P pilus: purification and partial characterization. *J. Bacteriol.* 146: 784-789.
- . ITO, T., KUEAHAR, S., YOKOTA, T. 1983. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 17: 7-12.
- . JACKSON, M. P., NEILL, R. J., O'BRIEN, A. D., HOLMES, R. K., NEWLAND, J. W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from Escherichia coli 922J. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 109-114.
- . JACKSON, M. P., NEWLAND, J. W., HOLMES, R. K., O'BRIEN, A. D. 1987bis. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from Escherichia coli. *Microb. Pathogenesis.* 2: 147-153.

- . JAYAPPA, H. G., GOODNOW, R. A., GEARY, S. J. 1985. Role of E. coli type A pilus in colonization of porcine ileum and its protective nature as a vaccine antigen in controlling colibacillosis. *Infect. Immun.* 48: 350-354.
- . JONES, G. W., RUTTER, J. M. 1974. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of Escherichia coli. *Journal of General Microbiology.* 84: 135-144.
- . JONGSON, W. M., LIOR, H. 1987. Response of Chinese Hamster Ovary cells to a cytolethal distending toxin (CLDT) of E. coli and possible misinterpretation as heat-labile enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 43: 19-23.
- . JONGSON, W. M., LIOR, H. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by E. coli isolated from clinical material. *Microbiol. Pathog.* 4: 103-113.
- . JONHSON, W. M., LIOR, H., BEZANSOM, G. S. 1983. Cytotoxic E. coli 0157:H7 associated with hemorrhagic colitis in Canada. *Lancet.* 1: 76.
- . KARCH, H., HEESEMAN, J., LAUFS, R., O'BRIEN, A. D., TACKET, C. O., LEVINE, M. M. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic E. coli 0157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.* 55: 455-461.
- . KARMALI, M. A. 1989. Infection by Verocytotoxin-producing E. coli. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 15-38.
- . KARMALI, M. A., PETRIC, M., LIM, C., CHEUNG, R., ARBUS, G. S. 1985. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing Escherichia coli in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *Journal of Clinical Microbiology.* 22: 614-619.
- . KARMALI, M. A., PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P. C., ARBUS, G. S., LIOR, H. 1985bis. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 151: 775-782.
- . KARMALI, M. A., STEELE, B. T., PETRIC, M., LIM, C. 1983. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli. *Lancet.* i: 619-620.
- . KASHIWAZAKI, M., OGAWA, T., ISAYAME, Y., AKAIKE, Y., TAMURA, K., SAKAZAKI, R. 1980. Detection of Vero cytotoxic strains of Escherichia coli isolated from diseased animals. *National Ins. Anim. Health Quarterly.* 20: 116-117.
- . KASHIWAZAKI, M., OGAWA, T., NAKAMURA, K., ISAYAME, T., TAMURA, K., SAKAZAKI, R. 1981. Verocytotoxin produced by Escherichia coli strains of animal origin. *National Institute of Animal Health Quarterly.* 21: 68-72.
- . KATER, J. C., DAVIS, E. A., HAUGHEY, K. G., HARTLEY, W. J. 1963. E. coli infection in lambs. *New Zealand Vet. j.* 11: 32-38.
- . KAUFFMAN, F. 1947. The serology of the coli group. *J. Immunol.* 57: 71-100.
- . KENNAN, R. M., MONCKTON, R. P. 1990. Adhesive fimbriae associated with porcine enterotoxigenic Escherichia coli of the 0141 serotype. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2006-2011.
- . KIMBERLING, C. V. 1988. "Diseases of nursing lambs". En: Jensen and Swift's diseased of sheep. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 73-124.
- . KLEMM, P. 1985. Fimbrial adhesins of Escherichia coli. *Rev. Infect. Dis.* 7: 321-340.

- . KONOWALCHUCK, J., SPEIRS, J. I., STAVRIC, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. *Infection and Immunity*. 18: 775-779.
- . KORTH, J. J., SCHNEIDER, R. A., MOSELEY, S. L. 1991. An F41-K88-related genetic determinant of bovine septicemic Escherichia coli mediates expression of CS31A fimbriae and adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 59: 2333-2340.
- . LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680.
- . LARJIVIERE, S., LALLIER, R., MORIN, M. 1979. Evaluation of various methods for the detection of enteropathogenic E. coli in diarrhoeic calves. *Am. J. Vet. Res.* 40: 130-134.
- . LAUX, D. C., McSWEEGAN, E. F., WILLIAMS, T. J., WADOLKOWSKI, E. A., COHEN, P. S. 1986. Identification and characterization of mouse small intestine mucosal receptors for E. coli K-12 (K88 ab). *Infect. Immun.* 52: 18-25.
- . LEE, C. H., MOSELEY, S. L., MOON, H. W., WHIPP, S. C., GYLES, C. L., SO, M. 1983. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic E. coli heat-stable toxin II producers. *Infect. Immun.* 42: 264-268.
- . LEVINE, M. M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389.
- . LEVINE, M. M., BERGWUIST, E. J., NALIN, D. R., WATERMAN, E. H., HORNICK, R. B., YOUNG, C. R., SCOTMAN, S., ROWE, B. 1978. E. coli strains that causes diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*. 1: 1119-1122.
- . LEVINE, M. M., EDELMAN, R. 1984. Enteropathogenic E. coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* 6: 31-51.
- . LEVINE, M. M., WU, J., KAPER, J. B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WACHSMUTH, I. K. 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic Escherichia coli of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 156: 175-182.
- . LEVINE, M. M., KAPER, J. B., BLACK, R. E., CLEMENTS, M. L. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47: 510-550.
- . LEVINE, M. M., RENNELS, M. B., DAYA, V., HUGHES, T. P. 1980. Hemagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic E. coli that cause diarrhea. *J. Infect. Dis.* 141: 733-737.
- . LEVINE, M. M., RISTAINO, P., MARLEY, G., SMYTH, C., KNUTTON, S., BOEDEKER, E., BLACK, R., YOUNG, C., CLEMENTS, M. L., CHENEY, C., PATNAIK, R. 1984. Coli surface antigen 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic E. coli: morphology, purification, and immune response in humans. *Infect. Immun.* 44: 409-420.
- . LINGOOD, C. A., LAW, H., RICHARDSON, S. E., PETRIC, M., BRUNTON, J. L., GRANDIS, S., KARMALI, M. 1987. Glycolipid binding of natural and recombinant Escherichia coli produced Berotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* 262: 8834-8839.
- . LINTERMANS, P. F., POHL, P., BERTELS, A., CHARLIER, G., VANDEKERCKHOVE, J., VAN DAMME, J., SCHOUPE, J., SCHLICKER, C., KORHONEN, T., de GREEVE, H., VAN MONTAGU, M. 1988. Characterization and purification of the F17 adhesin of the surface of bovine enteropathogenic and septicemic

- E. coli*. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1794-1799.
- . LOCKWOOD, D. E., ROBERTSON, D. C. 1984. Development of a competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for *E. coli* heat-stable enterotoxin (STa). *J. Immunol. Med.* 75: 295-307.
- . LOOSMORE, R. M. 1964. Symposium on calf diseases: epidemiology. *Vet. Rec.* 76: 1335-1348.
- . LOPEZ-ALVAREZ, Y., GYLES, C. L. 1980. Occurrence of the Vir plasmid among animal and human strains of invasive *E. coli*. *Am. J. Vet. Res.* 41: 769-774.
- . MAINIL, J. G., MOSELEY, S. L., SCHNEIDER, R. A., SUTCH, K., CASEY, T. A., MOON, H. W. 1986. Hybridization of bovine *e. coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STaP, STaH, STb, LT) and one adhesion factor (K99). *Am. J. Vet. Res.* 47: 1145-1148.
- . MAINIL, J. G., BEX, F., JACQUEMIN, E., POHL, P., COUTERIE, M., KAECKENBEECK, A. 1990. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesins subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *E. coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51: 187-190.
- . MAINIL, J. G., DUCHESNES, C. J., WHIPP, S. C., MARQUES, L. R. M., O'BRIEN, A. D., CASEY, T. A., MOON, H. W. 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *E. coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 48: 743-748.
- . MARQUES, L. R. M., MOORE, M. A., WELLS, J. G., WACHSMUTH, I. K., O'BRIEN, A. D. 1986. Production of Shiga-like toxin by *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 154: 338-341.
- . MARQUES, L. R. M., PEIRIS, J. S. M., CRYZ, S. J., O'BRIEN, A. D. 1987. *E. coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 33-38.
- . MARSH, H., TUNNICLIFF, E. A. 1938. Dysentery of newborn lambs. *Bull. Month. Agr. Exp.* 683-684.
- . MARTEL, J. L., CONTREPOIS, M., DUBOURGUIER, H. C., GIRARDEAU, J. P., GOUET, P., BORDAS, C., HAYERS, F., QUILLERJET-ELIEZ, A., RAMISSE, J., SENDRAL, R. 1981. Fréquence de l'antigène K99 et antibiorésistance chez *E. coli* d'origine bovine en France. *Ann. Recn. Vet.* 12: 253-257.
- . MASON, R. W., MARTLEY, W. J., TILT, L. 1981. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. *Aust. Vet. J.* 57: 386-388.
- . MATOVELO, J. A., LANDSVEK, T., AMAYA POSADA, G. 1984. Cryptosporidiosis in tanzanian goat kid scanning and transmission electron microscopic observations. *Acta Vet. Scand.* 25: 322-326.
- . MEBUS, C. A., URDERDAHL, R. N., RHODES, M. D., TWIEHAUS, M. J., 1969. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Nebr. Res. Bull.* 233: 2-15.
- . McCONNELL, M. M., CHART, H., FIELD, A. M., HIBBERD, M., ROWE, B. 1989. Characterization of a putative colonization factor (PCF0166) of enterotoxigenic *E. coli* of serogroup O166. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1135-1144.
- . McCONNELL, M. M., SMITH, H. R., WILLSHAW, G. A., FIELD, A. M. and ROWE, B. 1981. Plasmids coding for Colonization Factor Antigen I and heat-stable enterotoxin production isolates from enterotoxigenic *E. coli*: Comparison of their properties. *Infection and immunity.* 32: 927-936.
- . McCONNELL, M. M., THOMAS, L. V., DAY, N. P., ROWE, B. 1985. Enzymelinked immunosorbent assay for the detection of adhesion factor antigens of enterotoxigenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 152: 1120-1127.

- . McLEOD, D. L., GYLES, C. L. 1990. Purification and characterization of an Escherichia coli Shiga-like toxin II variant. *Infect. Immun.* 58: 1231-1239.
- . McNULTY, M. S., ALLAN, G. M., PEARSON, G. R., McFERRAN, J. B., CURRAN, W. L., McCRACKEN, R. M. 1976. Rotavirus-like agent (rotavirus from lamb. *Infect. Immun.* 14: 1332-1338.
- . McNULTY, M. S., LOGAN, E. F. 1983. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. *Vet. Rec.* 113: 333-335.
- . MEBUS, C. A., WYATT, R. G., KAPIKIAN, A. Z. 1977. Intestinal lesions induced in gnotobiotic calves by the virus of human infantile gastroenteritis. *Vet. Pathol.* 14: 273-282.
- . MEUTEN, D. F., VAN KRUININGUEN, H. J., LEIN, D. H. 1974. Cryptosporidiosis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 165: 914-917.
- . MOHAMMAD, A., PEIRIS, J. S. M., WIJEWANTA, E. A., MAHALINGAM, S., GUNASEKARA, G. 1985. Role of verocytotoxigenic Escherichia coli in cattle and buffalo calf diarrhoea. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 281-283.
- . MOHAMMAD, A., PEIRIS, J. S. M., WIJEWANTA, E. A. 1986. Serotypes of verocytotoxigenic E. coli isolated from cattle and buffalo calf diarrhoeas. *FEMS Microbiol. Lett.* 35: 261-265.
- . MOOI, F. R., de GRAAF, F. K. 1979. Isolation and characterization of K88 antigens. *FEMS Microbiol. Lett.* 5: 17-20.
- . MOON, H. W. 1978. Mechanism in the pathogenesis of diarrhoea: A review. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 172: 443-448.
- . MOON, H. W. 1990. Colonization factor antigens of enterotoxigenic E. coli in animals. *Current topics in Microbiology and Immunology.* 151: 147-165.
- . MOON, H. W., ISAACSON, R. E., POHLENZ, J. 1979. Mechanisms of association of enteropathogenic E. coli with intestinal epithelium. *Am. J. Vet. Med. Assoc.* 172: 119-127.
- . MOON, H. W., NAGY, B., ISAACSON, R. E., ORSKOV, I. 1977. Occurrence of K99 antigen on E. coli isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99⁺ enterotoxigenic E. coli from calves and pigs. *Infect. Immun.* 15: 614-620.
- . MOON, H. W., McCLURKIN, A. W., ISAACSON, R. E., POHLENZ, J., SKARTVEDT, S. M., GILLETTE, K. G., BAETS, A. L. 1978. Pathogenic relationship of rotavirus, Escherichia coli, and other agents in mixed infections in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 577-583.
- . MOON, H. W., WHIPP, S. C., ENGSTROM, G. W., BAETZ, A. L. 1970. Response of the rabbit ileal loop to cell-free products from Escherichia coli enteropathogenic for swine. *J. Infect. Dis.* 121: 182-187.
- . MOON, H. W., WHIPP, S. C., SKARTVEDT, S. M. 1976. Etiologic diagnosis of diarrheal disease of calves: frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen production by Escherichia coli. *Am. J. Vet. Res.* 37: 1025-1029.
- . MORIN, M. S., LARIVIERE, S., LALLIER, R. 1976. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* 40: 228-240.
- . MORRIS, J. A., CHANTER, N., SHERWOOD, D. 1987. Occurrence and properties of FY (Att-25)⁺

- Escherichia coli associated with diarrhoea in calves. *Vet. Rec.* 121: 189-1991.
- . MORRIS, J. A., SOJKA, W. J. 1985. E. coli as a pathogen in animals. En *The Virulence of E. coli*. Ed. M. Sussman. Society for Gen. Microbiol. Academic Press.
- . MORRIS, J. A., SOJKA, W. J., READY, R. A. 1985 bis. Serological comparison of the Escherichia coli prototype strains for the F(Y) and Att-25 adhesins implicated in neonatal diarrhoea in calves. *Res. Vet. Sci.* 38: 246-247.
- . MORRIS, J. A., STEVENS, A. E., SOJKA, W. J. 1977. Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from Escherichia coli B41. *J. Gen. Microbiol.* 99: 353-357.
- . MORRIS, J. A., STEVENS, A. E., SOJKA, W. J. 1978. Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting hemagglutinating properties. *Infect. Immun.* 19: 1097-1098.
- . MORRIS, J. A., STEVENS, A. E., SOJKA, W. J. 1978bis. Anionic and cationic components of the K99 surface antigen from Escherichia coli B41. *J. Gen. Microbiol.* 107: 173-175.
- . MORRIS, J. A., THORNS, C. J., BOARER, C. 1985. Evaluation of a monoclonal antibody to the K99 fimbrial adhesin produced by Escherichia coli enterotoxigenic for calves, lambs and piglets. *Res. Vet. Sci.* 39: 75-79.
- . MORRIS, J. A., THORNS, C., SCOTT, A. C., SOJKA, W. J., WELL, G. A. 1982. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by K99-mutant of the reference strain E. coli B41. *Infect. Immun.* 36: 1146-1153.
- . MORRIS, J. A., THORNS, C. J., SOJKA, W. J. 1980. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain E. coli B41. *J. Gen. Microbiol.* 118: 107-113.
- . MORRIS, J. A., THORNS, C. J., WELLS, G. A. H., SCOTT, A. C., SOJKA, W. J. 1983. The Production of F41 fimbriae by piglets strains of enterotoxigenic Escherichia coli that lack K88, K99 and 987P fimbriae. *Journal of General Microbiology.* 129: 2753-2759.
- . MORRIS, J. A., WELLS, G. A., SCOTT, A. C., SOJKA, W. J. 1983b. Colonization of the small intestine of lambs by enterotoxigenic E. coli producing F41 fimbriae. *Vet. Rec.* 113: 471.
- . MORRIS, J. A., WRAY, C., SOJKA, W. J. 1980b. Passive protection of lambs against enteropathogenic E. coli: role of antibodies in serum and colostrum of dams, vaccinated with K99 antigen. *J. Med. Microbiol.* 13: 265-271.
- . MOSELEY, S. L., SAMADPOUR-MOTALEBI, M., FALKOW, S. 1983. Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in Escherichia coli H10407. *J. Bacteriol.* 156: 441-443.
- . MOSELEY, S. L., DOUGAN, G., SCHNEIDER, R. A., MOON, H.W. 1986. Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of enterotoxigenic Escherichia coli and genetic homology between adhesins F41 and K88. *J. Bacteriol.* 167: 799-804.
- . MOSELEY, S. L., GARDY, J. W., HUQ, M. I., ECHEVARRIA, P., FALKOW, S. 1983bis. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 39: 1167-1174.
- . MOSS, J., GARRISON, S., FISHMAN, P. H., RICHARDSON, S. H. 1979. Gangliosides sensitize unresponsive fibroblast to E. coli heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Invest.* 64: 381-384.

- . MOSS, J., RICHARDSON, S. H. 1978. Activation of adenylate cyclase by heat-labile Escherichia coli enterotoxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity similar to that of cholera toxin. *J. Clin. Invest.* 62: 281-285.
- . MOXLEY, R. A., FRANCIS, D. H. 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of E. coli in calves. *Infect. Immun.* 53: 339-346.
- . MULLANY, P., FIELD, A. M., McCONNELL, M. M., SCOTLAND, S. M., SMITH, H. R., ROWE, B. 1983. Expression of plasmids coding for colonization factor antigen II (CFA/II) and enterotoxin production in E. coli. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3591-3601.
- . MUÑOZ, M. 1992. Sobre la etiología, la epidemiología y la clínica de las gastroenteritis neonatales en ovinos y caprinos. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- . MYERS, L. L. 1976. Vaccination of cows with an E. coli bacterin for prevention of naturally occurring diarrhoeal disease in their calves. *Am. J. Vet. Res.* 37: 831-834.
- . MYERS, L. L., GIREHAMMER, B. D., BORDER, M. M., SHOOP, D. S. 1984. Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1544-1548.
- . MYERS, L. L., GUINEE, P. A. M. 1976. Occurrence and characteristics of enterotoxigenic E. coli isolated from calves with diarrhoea. *Infect. Immun.* 13: 1117-1119.
- . MYERS, L. L., NEWMAN, F. S., WILSON, R. A., CATLIN, J. E. 1973. Passive immunization of calves against experimentally induced enteric colibacillosis by vaccination of dams. *Am. J. Vet. Res.* 34: 29-33.
- . MYERS, L. L., SHOOP, D. S. 1987. Antigenic characteristics of enterotoxigenic and non enterotoxigenic isolates of Bacteroides fragilis. *Am. J. Vet. Res.* 48: 643-645.
- . NAGY, B., BOZSO, M., PALFI, V., NAGY, Gy., SAHIBY, M. A. 1984. Studies on cryptosporidial infection of goats kids. *Les maladies de la chevre, Niort (France) INRA publi.*, pp. 443-351.
- . NAGY, B., MOON, H. W., ISAACSON, R. E. 1976. Colonization of porcine intestine by Escherichia coli: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. *Infect. Immun.* 13: 1214-1220.
- . NAGY, B., MOON, H. W., ISAACSON, R. E. 1977. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic E. coli: selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic E. coli. *Infect. Immun.* 16: 344-352.
- . NAGY, B., MOON, G. W., ISAACSON, R. E., TO, C. C., BRINTON, C. C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic E. coli infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.* 21: 269-274.
- . NAGY, B., NAGY, G., PALFI, V., BOZSO, M. 1983. Occurrence of Cryptosporidiosis, rotaviruses, coronavirus-like particles and K99 E. coli in goat kids and lambs. *Proc. IIIrd Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diagn.* Ames, Iowa, USA. pp. 525-531.
- . NAGY, B., PALFI, W., NAGY, G., HAJTOS, E., MERENYI, L. 1987. Infectious gastrointestinal diseases of young goats. *Proc. IVth Int. Conf. on Goats. Brasilia, Brasil.* pp. 373-388.
- . NATARO, J. P., SCALETSKY, I. C. A., KAPER, J. B., LEVINE, M. M., TRABULSI, L. R. 1985. plasmid-mediated factor conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic E. coli. *Infect. Immun.* 48: 378-383.

- . NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory standards. 1990. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard no. M7-A2. Villanova, Pa.
- . NETER, E., WESTPHAL, O., LUDERITZ, O., NEEDELL, M. H. 1955. Demonstration of antibodies against enteropathogenic Escherichia coli in sera of children of various ages. *Pediatrics*, 16: 801-808.
- . NEWMAN, F. S., MYERS, L. L., FIREHAMMER, B. D., CATLIN, J. E. 1973. Prevention of experimentally induced enteric colibacillosis in newborn calves. *Infect. Immun.* 8: 540-543.
- . NGELEKA, M., JACQUE, M., MARTINEAU-DOIZE, B., DAIGLE, F., HASEL, J., FAIRBROTHER, J. M. 1993. Pathogenicity of an E. coli 0115:K"V165" mutant negative for F165, fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 61: 836-843.
- . NORCROSS, N. L. 1982. Secretion and composition of colostrum and milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 1057-1060.
- . NOWIKI, B., LABIGNE, A., BOSELEY, S., HULL, R., HULL, S., MOULDS, J. 1990. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated E. coli belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. 58: 279-281.
- . O'BRIEN, A. D., HOLMES, R. K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
- . O'BRIEN, A. D., La VECK, G. D. 1983. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. *Infect. Immun.* 30: 170-179.
- . O'BRIEN, A. D., La VECK, G. D., THOMPSON, M. R., FORMAL S. B. 1982. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by E. coli. *J. Infect. Dis.* 146: 763-769.
- . ODA, S., SATOH, H., SUGAWARA, T., MATSUNAGA, N., KUHARA, T., KATOH, K., SHOJI, Y., NIHEL, A., OHTA, M., SASAKI, Y. 1989. Insulin-like growth factor-1, GH, insulin and glucagon concentrations in bovine colostrum and in plasma of dairy cows and neonatal calves around parturition. *Comp. Biochem. Physiol.* 94a: 805-808.
- . OKERMAN, L. 1987. Enteric infections caused by non-enterotoxigenic E. coli in animals: occurrence and pathogenicity mechanisms. A review. *Veterinary Microbiology.* 14: 33-46.
- . ORSKOV, I., ORSKOV, F. 1977. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic E. coli strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (colonization factor) antigen and of hemagglutinin abilities. *Med. Microbiol. Immunol.* 163: 99-110.
- . ORSKOV, I., ORSKOV, F., JANN, B., JANN, K. 1977bis. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. *Bacteriological Reviews.* 41: 667-610
- . ORSKOV, I., ORSKOV, F., SMITH, H. W., SOJKA, W. J. 1975. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible Escherichia coli K antigen previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica.* B83: 31-36.
- . ORSKOV, I., ORSKOV, F., SOJKA, W. J., LEACH, J. M. 1961. Simultaneous occurrence of E. coli B and L antigens in strains from diseased swine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 53: 404-422.
- . ORSKOV, I., ORSKOV, F., SOJKA, W. J., WITTINF, W. 1964. K antigens K88ab (L) and K88ac (L) in E. coli. A new O antigen 0147 and a new K antigen: K89(B). *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* 62: 439-447.

- . ORSKOV, F., ORSKOV, I., VILLAR, J. A. 1987. Cattle as reservoir of verotoxin-producing Escherichia coli 0157:H7. *Lancet* ii: 276.
- . OSWALD, E. DE RYCKE, J. 1990. A single protein of 110 kilodaltons is associated with the production of the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of E. coli. *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 279-284.
- . OSWALD, E., DE RYCKE, J., GUILLOT, J. F., BOIVIN, R. 1989. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cells cultures associated with the Vir plasmid in E. coli strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 95-100.
- . OSWALD, E., DE RYCKE, J. GUILLOT, J. F. BOIVIN, R. 1989. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cells cultures associated with the presence of Vir plasmid in E. coli. *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 95-100.
- . PADHYE, V. V., BEERY, J. T., KITTELL, F. B., DOYLE, M. P. 1987. Colonic hemorrhage produced in mice by a unique Vero cell cytotoxin from an Escherichia coli strain that causes hemorrhagic colitis. *J. Infect. Dis.* 155: 1249-1253.
- . PADHYE, V. V., KITTELL, F. B., DOYLE, M. P. 1986. Purification and physicochemical properties of a unique Vero cell cytotoxin from Escherichia coli 0157:H7. *Biophys. Res. Commun.* 139: 424-430.
- . PAI, C. H., GORDON, R., SIMS, H. V., BRYAN, L. E., 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with Escherichia coli 0157:H7. *Ann. Intern. Med.* 101: 738-742.
- . PANCIERA, R. F., THOMAS, R. W., GARNER, F. M. 1971. Cryptosporidial infection in calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-484.
- . PARRY, S. H., ROOKE, D. M. 1985. Adhesins and colonization factors of Escherichia coli. *The Virulence of E.coli*. Ed. M. Sussman.
- . PASS, D. A., PENHALE, W. J., WILCOX, G. E., BATEY, R. G. 1982. Intestinal coronavirus-like particles in sheep with diarrhea. *Vet. Rec.* 111: 106-107.
- . PEARSON, G. R., LOGAN, E. F. 1983. The pathology of neonatal enteritis in calves with observations on E. coli, rotavirus and Cryptosporidium. *Ann. Rech. Vet.* 14: 422-426.
- . PEARSON, G. R., WATSON, C. A., HALL, G. A., WRAY, C. 1989. Natural infection with an attaching and effacing E. coli in the small and large intestines of a calf with diarrhoea. *Vet. Rec.* 124: 297-299.
- . PEDLEY, S., BRIDGER, J. C., CHASEY, D., McCRAE, M. A. 1986. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 67: 131-137.
- . PENHALE, V. J., LOGAN, E. F., SHELMAN, I. E., FISHER, E. W., McEWEN, A. D. 1973. Observations on the absorption of colostral immunoglobulins by the neonate calf and their significance in colibacillosis. *Ann. Rech. Vet.* 1: 223-233.
- . PICKET, C. L., TWIDDY, E. M., BELISLE, B. W., HOLMES, R. K. 1986. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of E. coli. *J. Bacteriol.* 165: 348-352.
- . POHL, P., LINTERMANS, P., KAECKENBEECK, A., De MOL, P., Van MYLEM, K., SCHOTTE, M. 1983. Existence de differents types d'Escherichia coli pathogènes pour l'intestine du veau. *Ann. Méd. Vét.* 127: 37-41.
- . POHL, P., LINTERMANS, P., MAINIL, J., KAECKENBEECK, A., BERTELS, A. 1987. Etude des phénotypes et des facteurs de virulence des E. coli Att-25. *Ann. Med. Vet.* 131: 429-439.

- . POHL, P., LINTERMANS, P., MOURY, J., van MUYLEM, K., MARIN, M. 1986. Facteurs de virulence chez les Escherichia coli septicémiques et saprophytes du veau. *Ann. Méd. Vét.* 130: 515-520.
- . POHL, P., LINTERMANS, P., van MUYLEN, K. 1984. Fréquence des adhésines K99 et Att25 chez les Escherichia coli du veau. *Ann. Med. Vet.* 128: 55-558.
- . POHL, P., LINTEMANS, P., van MUYLEN, K., SCHOTTE, M. 1982. Colibacilles entérotoxigènes du veau possédant un antigène d'attachement différent de l'antigène K99. *Ann. Med. Vet.* 126: 569-571.
- . POHL, P., VERLINDEN, M., LINTERMANS, P., van ROBAEYS, G., SOTCKMANS, F. 1991. Antibiogrammes des entérobactéries pathogènes pour les animaux d'élevage et les pigeons, isolées en Belgique de 1986 à 1990. *Ann. Med. Vet.* 135: 101-108.
- . POHLENZ, J. F. L., BEMRICK, W. J., MOON, H. W., CHEVILLE, N. F. 1978a. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Vet. Pathol.* 15: 417-427.
- . POHLENZ, J. F. L., MOON, H. W., CHEVILLE, N. F., BEMRICK, W. J. 1978b. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 172: 452-457.
- . POLOTSKY, Y. U. E., DRAGUNSKAYA, E. M., SELIVERSTOVA, V. G., AUDEEVA, T. A., CHAKHONTINSKAYA, M. G., KETYI, I., VERTENYI, A., RALOVICH, B., EMODY, L., MALOVIKS, I., SAFONOVA, N. V., SNIGIREUSKAYA, E. S., KARYGINA, E. I. 1977. Pathogenic effect of enterotoxigenic E. coli and E. coli causing infantile diarrhoea. *Acta Microbiol. Hung.* 24: 221-236.
- . PRESCOTT, J. F., MUNROE, D. L. 1982. Campylobacter jejuni enteritis in man and domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 1524-1530.
- . QUAKENBUSH, R. L., FALKOW, S. 1979. Relationship between colicin V activity and virulence in E. coli. *Infect. Immun.* 24: 562-564.
- . RADOSTITS, O. M., ACRES, S. D. 1983. The control of acute undifferentiated diarrhea of newborn beef calves. *Vet. Clin. North Am.* 5: 143-155.
- . RAMISSE, J., LEPAREUR, F., POUDELET, M., BREBION, M., MOINET, E. 1984. Mise en évidence de rotavirus et de cryptosporidies dans les diarrhées des jeunes agneaux. *Le Point Veterinaire.* 16: 73-75.
- . RENAULT, L., MATHIEU, D., LE BOUHIS, E. 1978. Detecting enteropathogenic Escherichia coli strains of porcine origin. II. Correlations between O and K antigens and the enterotoxin production in strains isolated from the piglet after weaning. *Ann. Rech. Vet.* 9: 427-432.
- . REYNOLDS, D. J., MORGAN, J. H., CHANTER, N., JONES, P. W., BRIDGER, J. C., DEBNEY, T. G., BUNCH, K. J. 1986. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* 119: 34-39.
- . RICHARD, K. L., DOUGLAS, S. D. 1978. Pathophysiological effects of Vibrio cholera and enterotoxigenic E. coli and their enterotoxins on eucariotic cells. *Microbiol. Rev.* 42: 592-613.
- . RICHARDSON, S. E., KARMALI, M. A., BECKER, L. E., SMITH, C. R. 1987. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing E. coli infections. *Hum. Pathol.* 19: 1102-1108.
- . RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B., WELLS, J. G., DAVIS, B. R., HERBERT, R. J., OLCOTT, E. S., JOHNSON, L. M., HARGRETT, N. T., BLAKE, P. A., COHEN, M. L.

1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *New Engl. J. Med.* 308: 681-685.
- . ROBERTS, D. S. 1957. E. coli infection in lambs. *Aust. Vet. J.* 33: 43-45.
- . ROJO VAZQUEZ, F. A., GASS, A., ALUNDA, J. M. 1985. Denuncia en España de la cryptosporidiosis ovina. IV Congreso Nacional de Parasitología, Tenerife. p. 166.
- . ROJO VAZQUEZ, F. A., GASS, A., IZQUIERDO, M., ORTIZ MENENDEZ, J. C. 1987. Estudios sobre la cryptosporidiosis en los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) en España. *Med. Vet.* 4: 263-270.
- . RONNBERG, B., CARLSSON, J., WADSTROM, T. 1984. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of E. coli heat-stable enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 23: 275-279.
- . ROSSANGIO, E. G., GIALLETTI, L., GRELLONI, VL, FLORONI, A., RIVERO, V. B. 1987. Diagnosi di cryptosporidiosi in alcuni allevamenti dell'Italia Centrale. *Riv. Zoot. Vet.*15: 9-15.
- . RUNNELS, P. L., MOON, H. W., SCHNEIDER, R. A. 1980. Development of resistance with age to adhesion of K99⁺ Escherichia coli to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 28: 298-300.
- . RUNNELS, P. L., MOON, H. W., WHIPP, S. C., MATHEWS, P. J., WOOD, G. N. 1980b. Interaction of rotavirus and enterotoxigenic E. coli (ETEC) in gnotobiotic calves, p. 343-360. In Proceedings of the Third International Symposium on Neonatal Diarrhoea. VIDO. Saskatoon, Canada.
- . SACK, R. B., GORBACH, S. L., BANWELL, J. G., JACOBS, B., CHATTERJEE, B. D., MITRA, R. C. 1971. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.* 123: 378-385.
- . SACK, R. B., HIRSCHHORN, N., BROWNLEE, I., CASH, R. A., WOODWARD, W. E., SACK, D. A. 1975. Enterotoxigenic E. coli-associated diarrheal disease in Apache children. *N. Engl. J. Med.* 292: 1041-1045.
- . SACK, D. A., SACK, R. B. 1975. Test for enterotoxigenic Escherichia coli using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.* 11: 334-336.
- . SAID, A. M. W., CONTREPOIS, M. G., VARTANIAN, M. D., GIRARDEAU, J. P. 1988. Virulence factors and markers in E. coli from calves with bacteremia. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1657-1660.
- . SAIF, L. J., BOHL, E. H., THEIL, K. W., CROSS, R. F., HOUSE, J. A. 1980. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23 nm virus-like particles associated with diarrhea in young pig. *J. Clin. Microbiol.* 12: 105-111.
- . SANFORD, S. E., JOSEPHSON, G. K. A.M REHMTULLA, A. J., BAKER, K. C. 1991. Cryptosporidiosis, rotaviral and combined cryptosporidial and rotaviral infections in goat kids. *Can. Vet. J.* 38: 17-28.
- . SAWYER, M., WILLADSEN, C. H., OSBURN, B. L., MCGUIRE, T. C. 1977. Passive transfer of colostral immunoglobulins from ewe to lamb and its influence on neonatal lamb mortality. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1255-1259.
- . SCOTLAND, S. M., DAY, N. P., ROWE, B. 1980. Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of Escherichia coli belonging to traditional enteropathogenic serogroups. *FEMS Microbiology Letters.* 7:15-17.
- . SCOTLAND, S. M., SMITH, H. R., ROWE, B. 1985. Two distinct oxins active on Vero cells from E. coli 0157. *Lancet* 2: 885-886.
- . SCOTT, A. L., LUDDINGTON, J., LUCAS, M., GILBERT, F. R. 1978. Rotavirus in goats. *Vet. Rec.* 103:

145.

. SCHOONDERWOERD, M., CLARKE, R.C., VAN DERUMEL, A. A., RAWLUK, S. A. 1988. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of E. coli 0111:NM. Can. J. Vet. Res. 52: 484-487.

. SEKIZAKI, T., AKASJI, H., TERAKADO, N. 1985. Nucleotide sequences of the genes for Escherichia coli heat-stable enterotoxin I of bovine, avian and porcine origins. Am. J. Vet. Res. 46: 909-912.

. SELMAN, I. E. 1973. The absorption of colostral globulins by newborn calves. Ann. Rech. Vet. 4: 213-221.

. SERAFIM, M. B., de CASTRO, A. F. P., LEONARDO, M. B., MONTEIR, A. R. 1981. Single radial immune hemolysis test for detection of Escherichia coli thermolabile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 14: 473-478.

. SERIWATANA, J., ECHEVARRIA, P., TAYLOR, D. N., RASRINAUL, L., BROWN, J. E., PEIRIS, R. S. M., CLAYTON, C. L. 1988. Type II heat-labile enterotoxin-producing Escherichia coli isolated from animals and humans. Infect. Immun. 56: 1158-1161.

. SHAH, D. B., KAUFFMAN, P. E., BOUTIN, B. K., JOHNSON, C. H. 1982. Detection of heat-labile-enterotoxin -producing colonies of Escherichia coli and Vibrio cholerae by solid-phase sandwich radioimmunoassays. J. clin. Microbiol. 16: 504-508.

. SHERWOOD, D., SNODGRASS, D. R., LAWSON, G. H. K. 1983. Prevalence of enterotoxigenic E. coli in calves in Scotland and northern England. Vet. Rec. 113: 208-212.

. SHERWOOD, D., SNODGRASS, D. R., O'BRIEN, A. D. 1985. Shiga-like toxin production from Escherichia coli associated with calf diarrhoea. Vet. Rec. 116: 217-218.

. SHIMIZU, M., SAKANO, T., YAMAMOTO, J., KITAJIMA, K. 1987. Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of E. coli isolates from calves with diarrhoea in Japan. Microbiol. Immunol. 31: 417-426.

. SIXMA, T. K., PRONK, S. E., KALK, K. H., WARTNA, E. S., van ZANTEN, B. A. M., WITHOLT, E., HOL, W.G. J. 1991. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from E. coli. Nature (London) 351: 371-377.

. SMITH, H. W. 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of E. coli: the discovery of a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical with colicin V. J. Gen. Microbiol. 83: 95-111.

. SMITH, H. W. 1978. Transmissible pathogenic characteristic invasive strains of E. coli. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173: 601-607.

. SMITH, H. W., GREEN P., PARSELL, Z. 1983. Vero cell toxins in E. coli and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. J. Gen. Microbiol. 129: 3121-3137.

. SMITH, H. W., HALLS, S. 1967a. Observation by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on E. coli infection in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Path. 93: 499-529.

. SMITH, H. W., HALLS, S. 1967. Studies on Escherichia coli enterotoxin. Journal of Pathology and Bacteriology. 93: 531-543.

. SMITH, H. W., HUGGINS, M. B. 1978. The influence of plasmid determined and other characteristics of

- enteropathogenic E. coli on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. *J. Med. Microbiol.* **11**: 471-492.
- . SMITH, H.W., LINGGOOD, M. A. 1972. Further observations on E. coli enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.* **5**: 243-250.
- . SMITH, H. R., SCOTLAND, S. M. 1988. Verocytotoxin producing strains of Escherichia coli. *J. Med. Microbiol.* **26**: 77-85.
- . SMITH, H. R., SCOTLAND, S. M., EILLSHAW, G. A., WRAY, C., McLAREN, I. M., CHEASTY, T., ROWE, B. 1988. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in Escherichia coli strains of animal origin. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 829-834.
- . SMYTH, C. J. 1982. Two manose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic Escherichia coli of serotype 06:K15:H16 or H-isolated from travellers and infantile diarrhoea. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2081-2096.
- . SMYTH, C. J., KAUJZER, B., BACK, E., FARIS, A., MOLBY, R., SODERLIND, O., STINTZIN, G., WADSTRO, T., HABTE, D. 1979. Occurrence of adhesins causing mannose-resistant haemagglutination of bovine erythrocytes in enterotoxigenic E. coli. *FEMS Microbiol. Lett.* **5**: 85-90.
- . SNODGRASS, D. R., ANGUS, K. W., GRAY, E. W. 1977. Rotavirus infection in lambs: pathogenesis and pathology. *Arch. Virol.* **55**: 263-274.
- . SNODGRASS, D. R., ANGUS, K. W., GRAY, E. W., KEIR, W. A. 1980. Cryptosporidia associated with rotavirus and E. coli in an outbreak of calf scour. *Vet. Rec.*, **106**: 458-459.
- . SNODGRASS, D. R., GRAY, E. W., 1977. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. *Arch. Virol.* **55**: 287-291.
- . SNODGRASS, D. R., HERRING, J. A., GRAY, E. W. 1976. Experimental rotavirus infection in lambs. *J. Comp. Pathol.* **86**: 637-642.
- . SNODGRASS, D. R., HERRING, J. A., REID, H. E., SCOTT, F. M. M., GRAY, E. W. 1980b. Virus infections in cattle and sheep in Scotland 1985-1978. *Vet. Rec.* **106**: 193-195.
- . SNODGRASS, D. R., MADELEY, C. R., WELLS, P. W., ANGUS, K. W. 1977b. Human rotavirus in lambs: infection and passive protection. *Infect. Immun.* **16**: 268-270.
- . SNODGRASS, D. R., SMITH, W., GRAY, E. W., HERRING, J. 1976. A rotavirus in lambs with diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* **20**: 113-114.
- . SNODGRASS, D. R., TERZOLO, H. R., SHERWOOD, D., CAMPBELL, I., MENZIES, J. D., SYNGE, B. A. 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.* **119**: 31-34.
- . SO, M., DALLAS, W. S., FALKOW, S. 1978. Characterization of Escherichia coli plasma encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant. *Infect. Immun.* **21**: 405-411.
- . SODERLIND, O., OLSSON, E., SMYTH, C. J., MOLLBY, R. 1982. Effect of parenteral vaccination of dams on intestinal E. coli in piglets with diarrhoea. *Infect. Immun.* **36**: 900-906.
- . SODERLIND, O., THAFVELIN, B., MOLLBY, R. 1988. Virulence factors in E. coli strains isolated from

- Swedish piglets with diarrhoea. *J. Clin. Microbiol.* 26: 879-884.
- . SOJKA, W. J. 1965. Escherichia coli in Domestic Animals and Poultry. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- . SOJKA, W. J. 1971. Enteric disease in newborn piglets, calves and lambs due to Escherichia coli. *Vet. Bull.* 41: 509-522.
- . SOJKA, W. J., MORRIS, J. A., WRAY, C. 1979. Enteric colibacillosis in lambs with special reference to passive protection of lambs against experimental infection by colostral transfer of antibodies from ewes vaccinated with K99. *Forstschritte der Veterinarmedizin.* 29: 52-63.
- . 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.
- . SPANGLER, B. D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related E. coli heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56: 622-647.
- . SPEIRS, J. Y., STAVRIC, S., KONOWALCHUCK, J. 1977. Assay of E. coli heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infection and Immunity.* 16: 617-622.
- . SRIRANGANATHAN, N., BURGER, D. 1987. Heat-stable (STa) enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli: binding of the enterotoxin to coagulated milk and casein. *Veterinary Microbiology.* 13: 167-178.
- . STEERS, B. G., FOLTZ, L., GRAVES, S. 1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* 9: 307-311.
- . STIRM, S., ORSKOV, F., ORSKOV, I., MANSA, B. 1967. Episome-carried surface antigen K88 of Escherichia coli.- II. Isolation and chemical analysis. *Journal of Bacteriology.* 93: 731-739.
- . STOCKBINE, N. A., JACKSON, M. P., SUNG, L. M., HOLMES, R. K., O'BRIEN, A. D. 1988. Cloning and sequencing of the genes of Shiga toxin from Shigella dysenteriae type 1. *J. Bacteriol.* 170: 1116-1122.
- . STOCKBINE, N. A., MARQUES, L. R. M., NEWLAND, J. W., SMITH, H. W., HOLMES, R. K., O'BRIEN, A. D. 1986. Two toxin-converting phages from Escherichia coli 0157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.* 53: 135-140.
- . STUART, S. J., GREENWOOD, K. T., LUKE, R. K. J. 1980. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by Col V plasmid. *J. Bacteriol.* 143: 35-42.
- . SVENNERHOLM, A. M., HOLMGREM, J. 1978. Identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* 1: 19-23.
- . SVENNERHOLM, A. M., LINDBLAD, M., 1985. GM1 ELISA method for demonstration of E. coli heat-stable enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 30: 1-6.
- . SVENNERHOLM, A. M., WIKLIND, G. 1983. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 17: 596-600.
- . TABOURET, M., DE RYCKE, J. 1990. Detection of cytotoxic necrotizing factor (CNF) in crude extracts of E. coli by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Microbiol.* 32: 73-81.
- . TENEBERG, S., WILLEMSEM P., GRAAF, F. K., KARLSSON, K. A. 1990. Receptor-active glycolipids of

- epithelial cells of the small intestine of young and adult pigs to susceptibility to infection with E. coli. FEBS Letters, 263: 10-14.
- . TERLECKI, S., SHAW, W. B. 1959. E. coli infection in lambas. Vet. Rec. 71: 181-182.
- . THEIL, K. H., McCLOSKEY, C. M. 1989. Molecular epidemiology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with dairy and beef calves. J. Clin. Microbiol. 27: 126-131.
- . THOMAS, L. V., CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S. M., ROWE, B. 1982. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a new colonization factor in enterotoxigenic E. coli in humans. Infect. Immun. 35: 1119-1124.
- . THOMPSON, J. S., HODGE, D. S., BORCZYK, A. A. 1990. Rapid Biochemical test to identify Verocytotoxin-Positive Strains of Escherichia coli serotype 0157. Journal of Clinical Microbiology. 28: 2165-2168.
- . TIZARD, I. 1987. Veterinary Immunology: an introduction. 3^a ed. The W. B. Saunders Co. Philadelphia. 171-184.
- . TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 4350-4354.
- . THORNE, G. M., DENEKE, C. F., GORBACH, S. L. 1979. Hemagglutination and adhesiveness of toxigenic E. coli isolated from humans. Infect. Immun. 23: 690-699.
- . THORNS, C.J., ROEDER, P. L. 1988. Use of a monoclonal antibody to detect the F41 fimbrial adhesin of enterotoxigenic Escherichia coli. Res. Vet. Sci. 44: 394-395.
- . THORNS, C. J., SOJKA, M. G., ROEDER, P. L. 1989. Detection of fimbrial adhesins of ETEC using monoclonal antibody-based latex reagents. The Veterinay Record. 125: 91-92.
- . TIXIER, G., GOUET, P. 1975. Mise en évidence d'une structure agglutinant les hématies de cheval en présence de mannose et spécifique des souches d'E. coli entérottoxiques d'origine bovine. C.R. Acad. Sci. Paris. 281: 1641-1644.
- . TORRES-MEDINA, A., SCHLAFER, D. H., MEBUS, C. A. 1985. Rotaviral and coronaviral diarrhea. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1: 471-493.
- . TOWIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354.
- . TRONCOSO, J. M. 1992. Cryptosporidium parvum en la diarrea neonatal en pequeños rumiantes y algunos aspectos epizootiologicos de cryptosporidiosis en corderos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- . TSUNEMITSU, H., SHIMIZU, M., HIRAI, T., YHONEMICHI, H., KUDO, T., MORI, K., ONOE, S. 1989. Protection against bovine rotaviruses in newborn calves by continuous feeding of immune colostrum. Jpn. J. Vet. Sci. 51: 300-308.
- . TZIPORI, S. 1985. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. Adv. Vet. Sci. and Comp. Med. 29: 103-206.
- . TZIPORI, S. 1988. Cryptosporidiosis in perspective. Adv. Parasitol. 27: 63-129.
- . TZIPORI, S., ANGUS, K. W., CAMPBELL, I. 1982. Experimental infection of lambas with Cryptosporidium isolated from a human patient with diarrhoea. Gut 23: 71-74.

- . TZIPORI, S., ANGUS, K. W., CAPBELL, I., CLERIHEW, L. 1981. Diarrhea due to Cryptosporidium infection in artificially reared lambs. *J. Clin. Microbiol.* 14: 100-105.
- . TZIPORI, S., ANGUS, K. W., GRAY, E. W., CAMPBELL, I., ALLAN, F. 1981d. Diarrhea in lambs experimentally infected with Cryptosporidium isolated from calves. *Am. J. Vet. Res.* 2: 1400-1404.
- . TZIPORI, S., CAMPBELL, I., SHERWOOD, D., SNODGRASS, D. R. 1980. An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *Vet. Rec.* 107: 579-580
- . TZIPORI, S., KARCH, H., WACHSMUTH, I. K., ROBINS-BROWNE, R. M., O'BRIEN, A. D., LIOR, H., COHEN, M. L., SMITHERS, J., LEVINE, M. M. 1987. The role of a 60 megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic E. coli 0157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 55: 3117-3125.
- . TZIPORI, S., LARSEN, J., SMITH, M. LUEFL, R. 1982. Diarrhea in goat kids attributed to Cryptosporidium infection. *Vet. Rec.* 111: 35-36.
- . TZIPORI, S., MAKIN, T. J., SMITH, M. L. 1980. The clinical response of gnotobiotic calves, pigs and lambs to inoculation with human, calf, pig and foal rotavirus isolates. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58: 309-318.
- . TZIPORI, S., MAKIN, J. T., SMITH, M. L., FKRAUTL, F. L. 1981c. Clinical manifestation of diarrhea in calves infected with rotavirus and enterotoxigenic E. coli. *J. Clin. Microbiol.* 13: 1011-1016.
- . TZIPORI, S., SHERWOOD, D., ANGUS, K. W., CAMPBELL, I., GORDON, M. 1981a. Diarrhoea in lambs: experimental infections with enterotoxigenic E. coli, Rotavirus and Cryptosporidium sp. *Infect. Immun.* 33: 401-406.
- . TZIPORI, S., SMITH, M., HALPIN, C., ANGUS, K. W., SHERWOOD, D., CAMPBELL, I. 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Vet. Rec.* 112: 116-120.
- . TZIPORI, S., SMITH, M., MAKIN, T., McCAUGHAN, C. 1978. Enteric coronavirus-like particles in shepp. *Aust. Vet. J.* 54: 320-321.
- . TZIPORI, S., WACHSMUTH, I. K., CHAMPMAN, C., BIRNER, R., BRITTINGHAM, J., JACKSON, C., HOGG, J. 1986. Pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by E. coli 0157:H7 in gnotobiotic piglets. *J. Infect. Dis.* 154: 712-716.
- . VARGA, J. 1991. Characterization of a new fimbrial antigen present in E. coli strains isolated from calves. *J. Vet. Med. B.* 38: 689-700.
- . VARGA, J., FARID, A. F. 1975. Vaccination experiments on prevention of E. coli diarrhoea in suckling calves. *Acta. Vet. Hung.* 25: 153-161-
- . VIAL, P.A., ROBINS-BROWN, R., LIOR, H., PRADO, V., KAPER, J. B., NATARO, J. P., MANEVAL, D., ELSAYED, A., LEVINE, M. M. 1988. Characterization of enteroadherent-agregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* 158: 70-79.
- . VILLACORTA, M. I., PEREZ del MOLINO, M. L., ARES, M. E., BAJO, M. T., FANDIÑO, M. L. 1987. Epidemiología de la cryptosporidiosis humana y animal en Galicia. V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca. pp. 157-158.
- . VISSER, M. R., ROZENBERG-ARSKA, M., BEUMER, H., HOPELMAN, I. M., VERHOEF, J. 1991.

Comparative *in vitro* antibacterial activity of sparfloxacin (AT-4140; RP 64206), a new quinolone. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 35: 858-868.

- . VOLKOVA, A. A. 1940. Bacterium coli infection in lambs. *Vet. Bull.* 10: 578.
- . WADDELL, T., HEAD, S., PETRIC, M., COHEN, A., LINGWOOD, C. 1988. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the Escherichia coli verocytotoxin 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 674-679.
- . WALTNER-TOEWS, D. S., MARTIN, S. W., MEEK, A. H. 1986. An epidemiological study of selected calf pathogens on Holstein dairy farms in southwestern Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 50: 307-313.
- . WARNER, PL F., WILLIAMS, P. H., BINDEREIF, A., NEILAND, J. B. 1981. ColV plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains of E. coli. *Infect. Immun.* 33: 540-545.
- . WATERS, V. L., CROSA, J. H. 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* 55: 437-450.
- . WELLS, J. G., CHIPMAN, L. D., GREENE, K. D., SOWERS, E. G., GREEN, F. H., CAMERON, D. N., DOWNES, F. P., MANTIN, M. L. GRIFFIN, P. M., OSTROFF, S. M., POTTER, M. E., TAUXE, R. V., WACHSMUTH, I. K. 1991. Isolation of E. coli serotype 0157:H7 and other shiga-like toxin producing E. coli from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29: 985-989.
- . WILLIAMS, P. H. 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of E. coli. *Infect. Immun.* 26: 925-932.
- . WILLIAMS, P. H., KNUTTON, S., BROWN, M G. M., CANDY, D. C. A., McNEISH, A. S. 1984. Characterization of nonfimbrial manose-resistant protein hemagglutinins of two E. coli strains isolated from infants with enteritis. *Infect. Immun.* 44: 592-698.
- . WILLIAMS, P. H., WARNER, PLJ. 1980. Col V plasmid-mediated, colicin W-independent iron uptake system of invasive strains of E. coli. *Infect. Immun.* 29: 411-416.
- . WILSON, R. A., JUTILA, J. W. 1975a. Experimentally neonatal colibacillosis in cows. I. Serological studies. *Infect. Immun.* 13: 92-99.
- . WILSON, R. A., JUTILA, J. W. 1975b. Experimental neonatal colibacillosis in cows. II. Immunoglobulin classes involved in protection. *Infect. Immun.* 13: 100-107.
- . WOODE, G. N., CROUCH, C. F. 1978. Naturally occurring and experimentally induced rotaviral infections of domestic and laboratory animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 522-526.
- . WOODE, G. N., JONES, J., BRIDGER, J. 1975. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 97: 148-149.
- . WOODE, C. N., SMITH, C., DENNIS, M. J. 1978. Intestinal damage in rotavirus infected calves assessed by D-xylose malabsorption. *Vet. Rec.* 102: 340-341.
- . WOODWARD, M. J., CARROLL, P. J., WRAY, C. 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in E. coli from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31: 251-261.
- . WOODWARD, M. J., WRAY, C. 1990. Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in Escherichia coli isolated from diarrhoeal disease in animals. *Vet. Microbiol.* 25: 55-65.
- . WRAY, C., DAWSON, M., AFSHAR, A., LUCAS, M. 1981. Experimental E. coli and rotavirus infection in

lambs. Res. Vet. Sci. 30: 379-381.

. WRAY, C., DAWSON, M., AFSHAR, A., SOJKA, W. J. 1984. Experimental diarrhoea in lambs. Zbl. Vet. Med. B. 31: 381-390.

. WRAY, C., McLAREN, I., PEARSON, C. R. 1989. Occurrence of "attaching-effacing" lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verocytotoxic E. coli. Vet. Rec. 125: 365-368.

. WRAY, C., PIERCY, D.W.T., CARROLL, P. J., GOHNSON, C. T., HIGGINS, R. J. 1992. Bovine haemorrhagic colitis associated with CNF⁺ and F6⁺ (986P) E. coli. Vet. Rec. 131: 220.

. WRAY, C., MORRIS, J. A. 1985. Aspects of colibacillosis in farm animals. J. Hyg. Camb. 95: 577-593.

. WRAY, C., THOMLINSON, J. R. 1975. Factors influencing occurrence of colibacillosis in calves. Vet. Rec. 96: 52-56.

. YANO, T., LEITE, D. S., CAMARGO, I. J. B., PESTAÑA de CASTRO, A. F. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs. Microbiol. Immunol. 30: 495-508.

. YANO, T., GARCIA, M., LEITE, D. S., DE CAMARGO, I. J. B., DE CASTRO, A. F. P. 1988. Fimbria-like adhesive factor (EAF 44) from verocytotoxigenic E. coli of bovine origin. Res. Vet. Sci. 45: 418-419.

. YVORE, P., ESNault, A., NACINI, M., LECLERC, C., BIND, J. L., CONTREPOIS, M., LEVIEUX, D., LAPORTE, J. 1984. Enquete epidemiologique sur les diarrhees neonatales des cheureaux dans les elevages de Touraine. Les maladies de la chevre, colloque international, Niort, France. pp. 437-442.

RESUMEN.

Las diarreas de los recién nacidos es uno de los procesos más frecuentes y la causa de mayores pérdidas económicas en las explotaciones ovinas y caprinas. Entre los múltiples agentes infecciosos implicados en su etiología se encuentran determinadas estirpes de E. coli.

En este estudio hemos aislado cepas de E. coli de brotes diarreicos en explotaciones ovinas y caprinas de la zona centro de España durante el período comprendido entre enero de 1989 y diciembre de 1991 y hemos estudiado algunas de las características más relevantes relacionadas con la capacidad de E. coli de originar diarrea.

En total se aislaron 702 cepas (495 de origen ovino y 207 caprino) de 51 brotes diarreicos (38 ovinos y 13 caprinos). No se detectó la expresión de los antígenos fimbriales F5 y F41 ni la producción de enterotoxina termoestable (STa), características de las cepas de ECET de rumiantes, en ninguna de las cepas estudiadas y tan solo el 0,71% de las cepas producían un toxina termolábil que origina en cultivo celular el efecto citopático característicos de las enterotoxinas termolábiles (LTs) producidas por determinadas estirpes de ECET. Por lo tanto, la participación de la estirpes de ECET parece ser escasa en los típicos procesos diarreicos que afectan a los corderos y cabritos de 5 a 15 días de edad.

En nuestro estudio hemos detectado la expresión de la fimbria F17 en un porcentaje relativamente elevado de las cepas de E. coli aisladas: el 3,03% de las cepas de origen ovino y el 8,69% de las de origen caprino. Las cepas F17⁺ se aislaron todas ellas de animales diarreicos de 5 a 30 días de edad. Estas cepas son no enterotoxigénicas, una elevada proporción produce colicina V (51,51%) y la mayoría de ellas (84,84%) tienen actividad hemaglutinante en presencia de D-manosa (HAMR).

De las cepas de E. coli aisladas por nosotros el 2,2% de las de origen ovino y el 2,4% de las de origen caprino produjeron VT. La producción CNF se detectó en el 1,4 de las ovinas y el 2,4% de las caprinas. Las cepas toxigénicas se aislaron tanto de animales diarreicos como sanos desde las primeras horas hasta la 4ª semana de vida.

La capacidad hemaglutinante en presencia de D-manosa (HAMR) parece ser una característica frecuente entre los aislados de origen ovino y caprino. Nosotros hemos detectado en cepas de E. coli de origen ovino y caprino aisladas de los procesos diarreicos estudiados la expresión de un antígeno superficial, distinto de las fimbrias F5, F41 y F17, que se corresponde con una banda proteica de peso molecular aproximado de 19.500 daltons y que denominamos LC168. Este antígeno parece estar ampliamente difundido entre la cabaña ovina (18,5%) y caprina (6,28%).

En los estudios de sensibilidad a diferentes antimicrobianos una elevada proporción de cepas resultaron ser sensibles a los antimicrobianos de uso menos frecuente como son las cefalosporinas (62-100%), las quinolonas fluoradas (100%) y la gentamicina (80%), mientras que los porcentajes de cepas sensibles a los antimicrobianos más utilizados fueron relativamente bajos (<10% a las sulfamidas y <30% a las tetraciclinas y a la estreptomycinina).