

AISLAMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROADHESIVA (K99) EN TERNEROS CON SÍNDROME DIARREICO

Pedro Smith S. (MV), Livio Zurita A. (MV, MS), Carlos Núñez P. (MV)

ENTEROADHESIVE K99 *ESCHERICHIA COLI* IN DIARRHOEIC CALVES

The main attachment factor of enteropathogenic Escherichia coli (E. coli) in calves is the K99 antigen. This antigen is codified by means of plasmids which can carry in addition multiple resistance factors to antibiotics. In order to determine the occurrence of the K99 antigen in the country and to study the antibiotic resistance of those strains, 300 E. coli strains were analysed. These were isolated from feces of 77 newborn calves affected with diarrhoea. Three to five E. coli colonies were studied for each calf.

Thirty two strains reacted positively to the agglutination test (10,6% K99+), 34 agglutinated by themselves (11,3% K99?) and 234 proved to be negative (78,1% K99-). 19 calves proved positive with at least one strain of K99 E. coli. Multiple resistance to antibiotics was found in 74,9% of these strains. The efficiency of the method employed in detecting the K99 antigen is discussed as well as the association between the antigen occurrence and multiresistance to antibiotics.

La diarrea del ternero es un síndrome en el cual se describen múltiples factores que inciden directa o indirectamente en su presentación. Sin embargo, en los primeros días de vida del ternero, *Escherichia coli* (*E. coli*) es el principal agente infeccioso involucrado en esta enfermedad (Acres y Cols., 1977; Vallet, 1983). Para actuar como enteropatógeno *E. coli* requiere adherirse al epitelio de la mucosa intestinal para lo cual utiliza un pili o fimbria específica que cumple esta función. En el bovino el principal antígeno de adhesión es el K99, predominando ampliamente sobre otros factores de adherencia (Tzipori, 1981).

La codificación del antígeno K99 es mediada por plásmidos y se encuentra altamente correlacionada con la presencia de cepas enterotoxigénicas, las que presentan además resistencia múltiple a antibióticos. Debido a lo anterior, el antígeno K99 es un excelente marcador de las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas para el bovino (Dobourgier y Cols., 1980; Bywater, 1983).

Recientemente, se han desarrollado vacunas que tienen como principal elemento inmunoprotector

al antígeno K99, ya sea purificado o mediante bacterinas completas (Snodgrass, 1986; Lacheretz y Cols., 1987).

En razón a la importancia que se le asigna a la presencia de cepas poseedoras de fimbria K99 como agente causal de la diarrea neonatal del ternero, el presente trabajo se planteó como objetivo determinar la presencia de este agente en casos de diarrea neonatal de terneros de lecherías del Area Metropolitana y estudiar la sensibilidad a antimicrobianos de estas cepas luego de su identificación.

MATERIAL Y METODOS

Los animales utilizados en la experiencia, correspondieron a 77 terneros de 1 a 10 días de edad provenientes de lecherías de la Región Metropolitana. Para la obtención de muestras se seleccionó a aquellos animales que al momento de ser examinados presentaban signos clínicos de diarrea. Cada animal fue muestreado en una sola oportunidad. Las muestras se obtuvieron mediante tómulas estériles de 15 cm introducidas profundamente en el recto del animal; luego fueron depositadas en el interior de una caja isotérmica a temperatura inferior a 80°C y transportadas al laboratorio dentro de un período de 7 horas.

Departamentos de Medicina Preventiva Animal y Ciencias Clínicas.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

Cada tórula rectal fue suspendida en 1 ml de solución de NaCl al 0,85%. A partir de esta suspensión se sembraron con asa de platino placas con agar sangre y agar Mac Conkey, con el objetivo de aislar *E. coli* y tener una estimación del tipo y cantidad de bacterias presentes en la muestra. Asimismo, se empleó agar Minca/Polyvitex (M/P) para favorecer la expresión del antígeno K99 en las cepas de *E. coli* aisladas. Las placas se incubaron a 37°C por 18 a 24 horas (Guinee y Cols., 1977). Cumplido este lapso, de cada muestra, se tomaron cinco colonias sospechosas de ser *E. coli* desde la placa de agar M/P, cada una de estas colonias fue suspendida en solución de NaCl al 0,85%, sembrándose nuevamente en Agar M/P y en una batería de medios diferenciales e indicadores que incluía agar citrato de Simons, tubos Durham para detección de fermentación de glucosa y lactosa, caldo urea, agar Kligler, agua peptonada y caldo Voges Proskauer; la técnica se realizó en la forma clásica descrita para la familia Enterobacteriaceae (Edwards y Ewing, 1968). Las lecturas de las pruebas relativas a la presencia de ureasa, desarrollo en agar citrato, fermentación de glucosa, lactosa y producción de hidrógeno sulfurado, fueron leídas a las 24 horas de incubación.

Las cepas que según estas pruebas presentaron características bioquímicas de *E. coli* se repicaron desde la placa de M/P y fueron sometidas a una prueba de aglutinación en placa para el diagnóstico del antígeno K99. Las colonias que no presentaron dichas características bioquímicas fueron eliminadas del experimento, al igual que las colonias que en las pruebas de producción de indol, prueba del rojo de metilo y reacción de Voges Proskauer entregaron resultados no compatibles con *E. coli*. Todas las cepas de *E. coli* fueron conservadas en agar común a 4°C, las cepas con resultados dudosos en la prueba de aglutinación (autoaglutinantes o aglutinación débil) fueron posteriormente sembradas, dos veces consecutivas, en caldo M/P y luego pasadas a agar M/P e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, a partir de este último cultivo se realizó una nueva prueba de aglutinación con cada cepa (Guinee y Cols., 1976).

En la prueba de aglutinación se utilizaron antisueros específicos preparados en conejos (Laboratorio Iffa Merieux, Francia). La lectura se realizó a los 4 minutos sobre una caja de fondo oscuro con luz indirecta, con la ayuda de una lupa. Los resultados obtenidos se interpretaron como: positivo, cuando hubo aglutinación sólo con el suero anti K99; negativo, cuando no se observó aglutinación en ninguna de las suspensiones y autoaglutinantes al observarse aglutinación en ambas suspensiones.

Las cepas de *E. coli* que resultaron positivas a la

prueba de aglutinación (K99+), fueron sometidas a un estudio de sensibilidad a antimicrobianos mediante la técnica de difusión en agar Mueller Hinton. Para este objeto se utilizaron discos impregnados de ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, estreptomycin, espiramicina, sulfametoxazol adicionado de trimetoprim y neomicina. La lectura se realizó a las 18 horas de incubación.

RESULTADOS

Las 77 muestras de fecas presentaron desarrollo bacteriano en los tres medios de cultivo; a partir del medio M/P se seleccionaron cinco colonias por cada animal, logrando obtener 385 cepas, de éstas, 300 correspondieron a *E. coli* y 84 a otras enterobacterias. Una cepa fue accidentalmente eliminada.

De las 300 cepas de *E. coli* sometidas a la prueba de aglutinación en placa para la detección del antígeno K99, 32 fueron positivas (K99+, 10,6%), 34 autoaglutinaron (K99?, 11,3%) y 234 resultaron negativas (K99-, 78,1%).

Las 32 cepas de *E. coli* K99+ provenían de 19 (24,7%) animales. Se consideró como positivo un animal que al menos tenía una colonia K99+.

Los resultados de los antibiogramas y presentación de resistencia múltiple de las cepas de *E. coli* K99+ se entregan en los cuadros 1 y 2.

DISCUSION

E. coli K99+ ha sido descrito como agente etiológico de diarrea neonatal del ternero en Europa (Pohl y Cols., 1984; Martel y Perrin, 1981; Renault, 1981); América del Norte (Moon y Cols., 1976; Moon y Cols., 1978). En América del Sur el único reporte corresponde a Barrandeguy y Cols., 1985, quien describe este enteropatógeno en Argentina.

Los diversos resultados obtenidos en trabajos sobre *E. coli* K99+ como agente causal de diarrea en el ternero, varían en un amplio margen de prevalencia, desde un 18,2% descrito por Martel y Perrin (1981) en Francia, al 56% descrito por House (1978) en Estados Unidos de Norteamérica. El presente estudio entrega un 24,7% de positividad a *E. coli* K99+, el cual se ubica en el rango intermedio de las estimaciones de los reportes citados.

La detección del antígeno K99 en cepas de *E. coli* aisladas desde fecas de terneros diarreicos, mediante el cultivo de la bacteria en medios especiales para su expresión como Minca/Polyvitex y la posterior reacción de aglutinación, constituyen el sistema más empleado para el diagnóstico etiológico de las diarreas neonatales del ternero

CUADRO 1
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS
DE 32 CEPAS DE *E. COLI* K99+ AISLADAS
DE TERNEROS DIARREICOS

Quimioterápico	Sensible	Intermedia	Resistente
Gentamicina	32/32	0/32	0/32
Neomicina	26/32	0/32	6/32
Ampicilina	21/32	1/32	10/32
Sulfa/Trim.*	21/32	0/32	11/32
Cloranfenicol	12/32	0/32	20/32
Tetraciclina	4/32	1/32	27/32
Estreptomina	3/32	5/32	24/32
Espiramicina	0/32	7/32	25/32

* Sulfametoxazol + Trimetoprin.

CUADRO 2
FRECUENCIA DE MULTIRRESISTENCIA ANTIMICROBIANOS EN
32 CEPAS DE *E. COLI* K99+ AISLADAS DE TERNEROS DIARREICOS

Grados de multirresistencia	Número de cepas		Porcentajes	
	Parcial	Acum.*	Parcial	Acum.*
Resistencia a 5 antimicrobianos	14	14	43,8	43,8
Resistencia a 4 antimicrobianos	10	24	31,2	75,0
Resistencia a 3 antimicrobianos	4	28	12,5	87,5
Resistencia a 2 antimicrobianos	2	30	6,3	93,8
Resistencia a 1 antimicrobiano	0	30	0,0	93,8
Resistencia a 0 antimicrobiano	2	32	6,3	100,1

* Acumulado.

causadas por este agente (Tzipori, 1981; Pohl y Cols., 1984); sin embargo, es importante considerar que esta técnica no aporta información sobre la presencia del antígeno K99, del tipo glucosa-dependiente ni, obviamente, sobre otros antígenos de adhesión como el F41 y el Att25, entre otros (Pohl y Cols., 1984; Acres, 1985). Además, tiene el inconveniente de la ocurrencia de reacciones de autoaglutinación, que se presentaron en 34 (11,3% de las 300 cepas de *E. coli* estudiadas en este trabajo, lo cual impide concluir un diagnóstico final sobre algunas de las cepas estudiadas (De Rycke y Cols., 1981).

La atribución de la etiología de los casos de diarrea estudiados a las cepas *E. coli*, mediante la determinación del antígeno K99, es una estimación bastante segura, ya que la virulencia de la bacteria se basa en la presencia simultánea de este antígeno y la capacidad enterotoxigénica de las cepas que lo portan, existiendo una estrecha correlación entre ambas características (Tzipori, 1981; Pohl y Cols., 1984; Acres, 1985); sin embargo, no es una estimación definitiva del poder patógeno de la bacteria; para ello se deben combinar las técnicas para la detección del antígeno K99 y la producción de enterotoxinas (Acres, 1985).

Por otra parte, es conocido que la capacidad enterotoxigénica se asocia estrechamente a la antibiorresistencia múltiple (De López y Cols., 1980; De Rycke y Cols., 1981; Guillot y Lafont, 1983), consecuentemente, en este estudio se determinó una alta frecuencia de multirresistencia a quimioterápicos, detectándose que el 75% de las cepas *E. coli* K99+ presentaban resistencia a cuatro o más de los antibióticos empleados.

El antibiotipo descrito por la literatura para las cepas enteropatógenas de *E. coli*, es decir, resistencia a tetraciclina y estreptomina y sensibilidad a gentamicina y neomicina (Guillot y Lafont, 1983; Moulin y Cols., 1983), fue detectado en la mayoría de las cepas de *E. coli* K99+ aisladas. La presentación de multirresistencia es un antecedente de interés en la elección de los antimicrobianos a utilizar en el tratamiento de esta enfermedad en los terneros. Estos resultados originan, además, inquietudes respecto al uso extensivo de antibióticos como medida terapéutica y/o como aditivo en las raciones para animales, ya que mediante este proceso se podría estar seleccionando genéticamente a enteropatógenos altamente resistentes a los antibióticos, lo cual complica la solución clínica y epidemiológica de esta enfermedad.

La descripción realizada en este estudio de infecciones por *E. coli* K99+ asociado a diarrea neonatal en terneros es un aporte de interés al conocimiento del síndrome diarreico en nuestro medio y plantea además un amplio horizonte de investigación, especialmente orientado a determinar la importancia epidemiológica de la enfermedad, características clínicas y las medidas de control y tratamiento de ella.

RESUMEN

El principal factor de adhesión de *Escherichia coli* (*E. coli*) enteropatógena en el ternero es el antígeno K99. Este antígeno es codificado por plásmidos que además pueden portar factores de resistencia múltiple a antibióticos. Con el fin de evidenciar la presencia de antígeno K99 en el país y estudiar la antibiorresistencia de estas cepas, se analizaron 300 cepas de *E. coli* aisladas desde 77 terneros neonatos con diarrea, utilizándose entre 3 a 5 colonias de *E. coli* por cada ternero.

Treinta y dos cepas reaccionaron positivamente a una prueba de aglutinación (10,6%); 34 autoaglutinaron (11,3%) y 234 resultaron negativas (78,1%). Diecinueve terneros resultaron positivos con al menos una cepa de *E. coli* K99. Se encontró resistencia múltiple a los antibióticos en 74,9% de estas cepas. Se discute la eficiencia del método empleado en la detección del antígeno K99 y la asociación entre la presencia de este antígeno y la multirresistencia a antibióticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio Rhodia Merieux por su valioso aporte en materiales y reactivos empleados en este trabajo.

REFERENCIAS

- ACRES, S.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 68: 229-256, 1985.
- ACRES, S.D.; R.J. SAUNDERS, O.M. RADOSTITIS. Acute undifferentiated neonatal calf diarrhea of beef calves, the prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*, reo like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. *Can. Vet. J.* 18: 113-121, 1977.
- BARRANDEGUY, M.E.; E.M. CORNAGLIA, M. GOTTSCHALK, M.I. PASINI, N. FIJTMAN, A. GOMEZ YAFAL, A.A. SCHUDEL. Diarreas neonatales del ternero. Presencia de virus, bacterias y parásitos: Resultados preliminares. In: X Congreso Panamericano de Veterinaria y Zootecnia. Conferencias y Comunicaciones Libres. Bs. Aires, 23-27 septiembre 1985. Abs. 125.
- BYWATER, R.J. Pathophysiologie et traitement de la diarrhée du veau. *Ann. Méd. Vét.* 127: 5-13, 1983.
- DE LOPEZ, A.G.; S. KADES, E.B. SHOTTS. Enterotoxin production and resistance to antimicrobials in porcine and bovine *Escherichia coli*, strains. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1286-1287, 1980.

- DE RYCKE, J.; PH. LE ROUX, N. MELIX, P. RAIMBAULT. Fréquence de *Escherichia coli* entéropathogènes K99+ ST+ et du rotavirus dans les diarrhées néonatales des veaux. Enquete dans une clientele vétérinaire de la Sarthe. *Ann. Rech. Vét.* 12: 403-411, 1981.
- DUBOURGIER, M.L.; M. CONTREPOIS, PH. GUET. Sécrétion et action des entérotoxines. *Bull. G.T.V.* 80-4B-191: 61-72, 1980.
- EDWARDS, P.R.; W.H. EWING. Identification of enterobacteriaceae. 6a. Ed. Minneapolis Minnesota. Burgess Publishing. 1968. pp. 61-91.
- GUILLOT, J.F.; J.P. LAFONT. Antibiorésistance des *Escherichia coli* du veau. *Recl. Méd. Vét. Ec. Alfort.* 159: 314-321, 1983.
- GUINEE, P.A.M.; W.H. JANSEN, C.M. AGTERBERG. Detection of K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolated from calves, and his correlation with enterotoxigenicity. *Infect. Immun.* 13: 1369-1377, 1976.
- GUINEE, P.A.M.; J. VELDKAMP, W.H. JANSEN. Improved minca medium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 15: 676-678, 1977.
- HOUSE, J.A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 573-576, 1978.
- LACHERETZ, A.; J. CHANTAL, P. DESMETTRE. Relation entre le niveau de la gamma-globulinémie du veau nouveau-né et la protection contre la colibacillose a *Escherichia coli* K99+. *Rev. Méd. Vét.* 138: 695-702, 1987.
- MARTEL, J.L.; B. PERRIN. Etiologie infectieuse des diarrhées néonatales du veau. Incidence en France des *Escherichia coli* K99+ et des rotavirus. Méthodes pratiques de diagnostic. *Bull. G.T.V.* 81-4-B. 222: 45-53, 1981.
- MOON, H.W.; A.W. MCCLURKIN, R.E. ISAACSON, J. POHLENTZ, S.M. SKARVEDT, K.G. GILLETTE, A.L. BACTZ. Pathogenic relationship of rotavirus, *Escherichia coli* and other agents in mixed infections in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 577-583, 1978.
- MOON, H.W.; S.C. WHIP, S.M. SKARVEDT. Etiologic diagnosis of diarrheal diseases of calves, frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen production by *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 37: 1025-1029, 1976.
- MOULIN, G.; J.L. MARTEL, J.F. GUILLOT, M. LIBMANN. Mise en évidence de *Escherichia coli* K99 dans les fèces des vaches et de leurs veaux. *Ann. Rech. Vét.* 14: 121-127, 1983.
- POHL, P.; P. LINTERMANS, A. KACKENBEECK, K. VAN MUYLEM, CHR. SCHICKER. Corrélation entre la production de antigène K99 et celle de l'entérotoxine STI chez les colibacilles du veau. *Ann. Méd. Vét.* 128: 119-124, 1984.
- RENAULT, L. Place des virus et des *Escherichia coli* entéropathogènes dans les gastroentérites néonatales des veaux. *Bull. G.T.V.* 80-4-bis- 191: 53-60, 1981.
- SNODGRASS, D.R. Evaluation of a combined rotavirus and enteropathoxigenic *Escherichia coli* vaccine in cattle. *Vet. Rec.* 119: 39-43, 1986.
- TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhea. *Vet. Rec.* 108: 510-514, 1981.
- VALLET, A. Aspects cliniques des entérites diarrhéiques néonatales des veaux. *Recl. Méd. Vét. Ec. Alfort.* 159: 261-267, 1983.

Recibido en abril de 1988, aceptado en junio de 1988.