

## ANTICUERPOS "ANTI-PILI" DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGENA EN SUERO, CALOSTRO, LECHE Y HECES DE CERDOS CLINICAMENTE SANOS

Darwins Castillo A. (QF), Miguel Arriagada P. (MV), Gonzalo González R. (MV),  
Marcos García S. (MV), Wolfgang Peralta V. (MV)

### ANTIBODIES "ANTI-PILI" OF ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN SERUM, CALOSTRUM, MILK AND FAECES OF CLINICALLY HEALTHY PIGS

*Pili antigen 987P that adhere bacteria to the intestinal epithelia was isolated from Escherichia coli OC:K87:987P and analyzed by electronic microscopy. Immunoglobulin G and secretory IgA was purified to immunize rabbits in order to obtain hiperimmune serum and alkaline phosphatase conjugates anti-IgG and anti-secretory IgA. The presence of specific IgG antibodies against pili antigen 987P was determined by an enzymeimmunoassay in calostrum, milk and serum of dams and in the serum and depositions of suckling pigs. Similarly specific secretory IgA antibodies were studied in calostrum and milk of dams and depositions of suckling pigs. The results showed a high level of antibodies in clinically normal mothers and suckling pigs. The level of antibodies in suckling pigs is dependent on the degree of immunity of the mothers and is a measure of passive transference of antibodies through calostrum and milk.*

La colibacilosis porcina es una enfermedad infecciosa causada por *Escherichia coli*, que causa grandes pérdidas económicas en las explotaciones porcinas debido a disminución de peso, retraso en el desarrollo, menor conversión alimenticia y muerte en muchos casos.

A esta enfermedad se le atribuyen valores desde un 40 y hasta un 80% de las diarreas porcinas antes del destete (Vanhuyse y Smedt, 1977; Márquez, 1982; Freixes, 1983). Aunque existen valores bastante diferentes en investigaciones nacionales y extranjeras respecto de la presencia de este bacilo en diarreas porcinas, es indiscutible el importante rol que juega la enfermedad en la especie porcina.

La enfermedad se presenta comúnmente como una gastroenteritis aguda, con deshidratación, depresión general y muerte en muchos casos. Los cerditos más afectados son aquéllos de 2 a 3 horas de nacidos y hasta el destete. Después del destete la enfermedad disminuye su incidencia.

Laboratorio de Inmunología. Departamento de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15. Stgo., Chile.  
Sección de Inmunquímica Instituto de Salud Pública de Chile. Avda. Marathon 1000. Santiago.

Proyecto A-2216-8512. DIB. U. de Chile.

La *E. coli* basa su patogenicidad en dos mecanismos ampliamente conocidos: la capacidad para adherirse a las células epiteliales del intestino delgado (colonización) y la producción de enterotoxinas que llevan al intestino delgado a secretar fluidos.

La capacidad del bacilo de adherirse a los enterocitos y luego colonizar el epitelio intestinal, está mediada por estructuras presentes en las cepas enteropatógenas, que protruyen de la superficie bacteriana y se han denominado "pili" o "fimbrias" (Gaastra, 1982).

Los "pili" corresponden a apéndices filamentosos no flagelares, distribuidos en la periferia de la célula bacteriana, y que sólo son visibles al microscopio electrónico. Su largo varía entre 0,2 y 1  $\mu$  y su ancho es de aproximadamente 7 nm. Se distinguen de las flagelas por ser numerosos (entre 100 a 400 por célula), cortos y muy rectos (Duguid y Cols., 1955; Duguid, 1964).

Estos "pili" además de ser importantes elementos de colonización bacteriana, son excelentes inmunógenos. Se sabe que la inmunidad a la infección por *E. coli*, se adquiere primariamente a través de anticuerpos que impiden la multiplicación del bacilo en el intestino y su adhesión a la superficie epitelial, y que neutralizan las enterotoxinas producidas por la bacteria (Wilson, 1981). Por tanto, los anticuerpos que inhiban la adhesión bacteriana pue-

den ser uno de los mecanismos de defensa de mayor relevancia contra la enfermedad (Gaastra, 1982).

Debido a esta capacidad inmunogénica, diversos autores han realizado estudios con el fin de utilizar pili purificado en inmunizaciones de hembras preñadas, de modo que éstas confieran un buen nivel de protección a sus lechones a través del calostro y la leche.

Los tipos de "pili" más estudiados en el cerdo son el 987P y el K88, por ser éstos los que se encuentran con mayor frecuencia asociados a cepas enteropatógenas de *E. coli*, tanto a nivel nacional (Pinochet, 1985) como extranjero (Brinton y Cols., 1983).

Los resultados con el uso de vacunas a base de "pili" han sido muy buenos hasta el momento, confirmando protecciones sobre un 90% en la mayoría de los casos (Nagy y Cols., 1978; Morgan y Cols., 1978; Isaacson y Cols., 1980; Brinton y Cols., 1983; To, 1984).

Con el fin de estimar niveles de anticuerpos anti-pili 987P de una cepa de *E. coli* aislada en la Región Metropolitana, se utilizó una técnica de enzimo-inmunoanálisis para determinar títulos de anticuerpos en el suero, calostro y leche de hembras, y en el suero y fecas de sus lechones, en cerdos clínicamente sanos. Estos niveles de anticuerpos pueden servir para establecer una base inmunológica a considerar en la selección de hembras destinadas a la masa reproductora de un plantel. Además, no puede descartarse la importancia de utilizar vacunas a base de "pili" purificado, para prevenir la presentación de la enfermedad.

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico:

El material biológico se recolectó en un plantel porcino ubicado en la sexta región del país. El muestreo se dividió en dos grupos: doce hembras lactantes y doce lechones, de acuerdo al siguiente esquema:

	Hembras Lactantes			Lechones			
	días post-parto			días de edad			
Suero	2	4	10	Suero	2	10	25
Calostro	2	—	—				
Leche	—	4	10	Heces	2	10	25

Se analizó un total de 72 muestras de hembras (36 de suero, 12 de calostro y 24 de leche) y 72 muestras de lechones (36 de suero y 36 de heces).

El calostro fue descaseinado con ácido acético 1M y reajustado al pH original. Las heces se diluyeron en tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH: 7,2.

A todas las muestras se les agregó azida de sodio 1mg/ml como preservante, luego se separaron en alícuotas y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### Cepa bacteriana:

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* OC: K87: 987P aislada y serotipificada en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile en 1985 (Pinochet, 1985).

### Microscopía electrónica:

La presencia de "pili" en la cepa utilizada se evaluó mediante microscopía electrónica por la técnica de tinción negativa de material fresco y fijado, con acetato de uranilo al 1% y ácido fosfotúngstico al 2%, en un microscopio de transmisión Siemens 1A (Laboratorio de Histología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Católica de Chile).

### Purificación de IgG e IgA secretora de cerdo:

La IgG fue purificada a partir de suero y la IgA secretora a partir de calostro de cerdo. Se utilizaron las técnicas descritas por Yabiki y Cols. (1973), y Haye y Kornegay (1979).

Las soluciones de IgG e IgA secretora obtenidas fueron controladas en su pureza y actividad por electroforesis (Grabar y Burtin, 1968) e inmuno-electroforesis (Ouchterlony, 1968). La concentración proteica fue determinada por la técnica de Biuret (Williams y Chase, 1971). La IgG e IgA secretora purificada se utilizaron para producir en conejos suero hiperinmune anti-IgG y anti-IgA secretora de cerdo. Se utilizó la técnica descrita por Arriagada (1986).

### Producción de conjugados anti-IgG de cerdo fosfatasa alcalina y anti-IgA secretora de cerdo fosfatasa alcalina

Los sueros hiperinmune obtenidos de conejos fueron absorbidos para dejarlos monoespecíficos y se purificaron en su fracción IgG de acuerdo a la técnica de Yabiki y *Cols.* (1973). La IgG de conejo anti-IgG y anti-IgA secretora de cerdo, fue conjugada con la enzima fosfatasa alcalina de acuerdo al procedimiento descrito por Voller y *Cols.* (1976).

### Producción y purificación de antígenos "pili"

La producción y purificación de antígenos "pili" se realizó basándose en la técnica descrita por Salit y Gotschlich (1977), modificada (Arriagada, 1986).

La cepa de *Escherichia coli* utilizada se sembró en medio C.F.A. ("Colonization Factor Antigen") especial para desarrollar "pili", a 37°C durante 24 horas. Luego se repicó al medio Minca Isovitalex y se incubó en un agitador a 200 rpm, a 35°C durante 18 horas. Se centrifugó el cultivo a 10.000 x G a 4°C por 20 minutos y el "pellet" obtenido se suspendió en tampón Tris-HCl 0,05M pH: 7,8. La suspensión se agitó en un homogenizador Sorwall Omnimizer, a 4°C durante 2 minutos. Luego se centrifugó a 10.000 x G, a 4°C por 20 minutos y el sobrenadante fue recentrifugado. El sobrenadante se dializó contra tampón acetato durante 24 horas, observándose un leve precipitado. Nuevamente se centrifugó, pero esta vez a 20.000 x G y el "pellet" obtenido se lavó en tampón acetato, para finalmente centrifugarlo a 20.000 x G. El sedimento se resuspendió en tampón Tris-HCl con agitación magnética lenta a 4°C durante 30 minutos.

A la solución de "pili" purificado evaluada por microscopía electrónica se le determinó la concentración proteica por la técnica de Lowry-Folin Cio-calteau (Williams y Chase, 1971). Como conservante se le agregó azida de sodio mg/ml y se congeló a -20°C hasta su uso.

### Enzimoimmunoanálisis (ELISA) para determinar los niveles de IgG

El enzimoimmunoanálisis se realizó según la técnica descrita por Voller y *Cols.* (1976). Brevemente, se adhirió 5 µg de antígeno "pili" purificado por pozo, diluido en tampón de recubrimiento carbonato 0,05M, pH: 9,6. La placa se dejó a 37°C por una hora y luego a 4°C por 24 horas. A continuación la placa se lavó con PBS-Tween 0,05% pH: 7,4 y se bloquearon los sitios libres con PBS Tween-BSA 1% a temperatura ambiente durante una hora. Luego se lavó con PBS-Tween y se agregó 0,2 ml por pozo de las muestras en diferentes diluciones.

Las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas y luego se lavaron con PBS-Tween-BSA 1%. A continuación se agregó 0,2 ml por pozo del conjugado - fosfatasa alcalina en la dilución correspondiente y se dejó a 4°C durante 12 horas. Luego se lavó con PBS-Tween y se añadió 0,2 ml por pozo de la solución de sustrato ortonotrifetilfosfato disódico a una concentración de 1 mg/ml en tampón dietanamina 10% pH: 9,8 con MgCl<sub>2</sub> 0,01%. Las placas se incubaron a 37°C durante 45 minutos y la reacción se detuvo agregando 0,05 ml de NaOH 3M por pozo.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro digital para placas de microelisa a 405 nm de longitud de onda, midiendo su absorbancia.

### Análisis estadístico:

Para el estudio estadístico se realizó un análisis de varianza modelo tipo I o de efecto fijo, utilizando para ello las medias geométricas (MG) de cada grupo de observaciones obtenidas en los correspondientes períodos post-parto de las hembras o de edad de los lechones.

## RESULTADOS

### Microscopía electrónica:

La cepa de *Escherichia coli* OC: K87: 987P "piliada" utilizada en este estudio (Foto 1) muestra "pili" cortos, rectos y en gran cantidad, en contraste con el escaso número y gran tamaño de los flagelos que posee la bacteria.

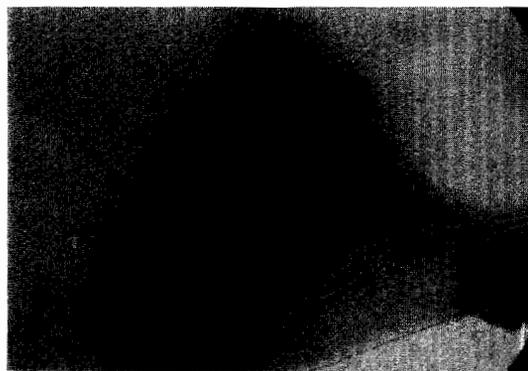


Foto 1. Cepa de *Escherichia coli* OC: K87: 987P "piliada" observada al microscopio electrónico (20.000 X).

La suspensión de "pili" 987P purificado adopta una distribución que asemeja a una red, mostrando un alto grado de pureza (Foto 2).

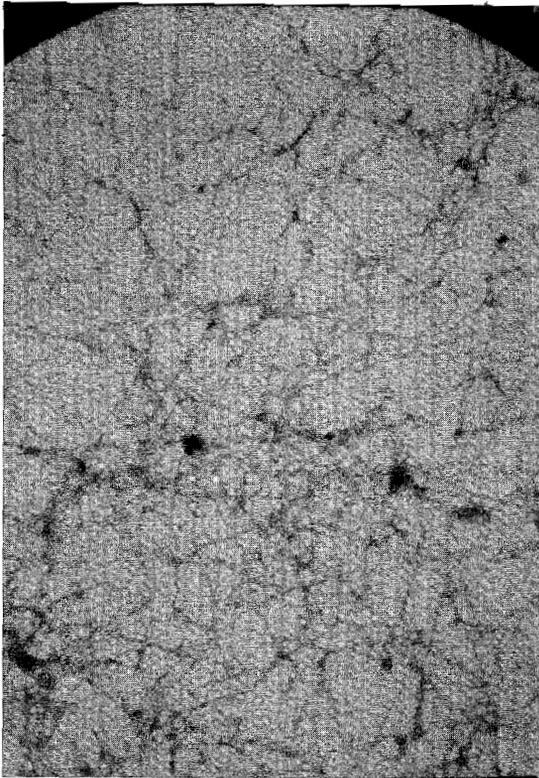


Foto 2: "Pili" 987P purificado observado al microscopio electrónico (aumento 20.000 X).

### Títulos de inmunoglobulina G "anti-pili" 987P de *E. coli*

Los títulos de IgG "anti-pili" 987P de *E. coli* obtenidos en el suero de las hembras en los tres períodos muestreados (2, 4 y 10 días post-parto) revelan que

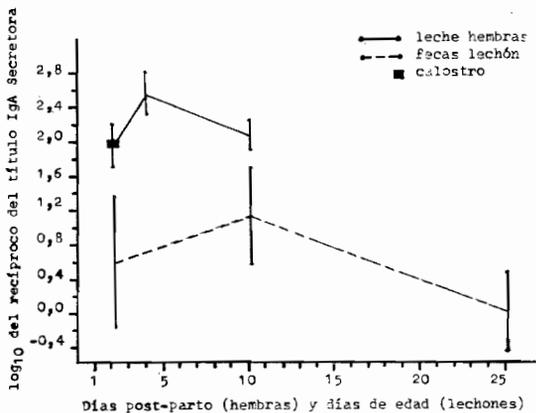


Figura 1: Distribución de los niveles de anticuerpos de clase IgG anti-pili 987P de *E. coli* en suero, calostro, leche de hembras y en suero y heces de lechones, en diferentes períodos post-parto. (Expresado en Mg  $\pm$  SD)

se mantienen constantes a través del tiempo. No hay diferencias significativas entre las medias geométricas de los tres períodos ( $p=0,314$ ) (Figura 1). En cambio en el suero de los lechones, muestreado a los 2, 10 y 25 días de edad, se aprecia un descenso significativo a través del tiempo ( $p = < 0,01$ ) (Figura 1).

Respecto a los títulos de IgG anti-pili 987P de *E. coli* presentes en el calostro (2 días post-parto) y leche de hembras obtenida en dos períodos diferentes (4 y 10 días post-parto) muestran una fuerte disminución en la leche con respecto al calostro ( $p=<0,01$ ) (Figura 1).

Los títulos de inmunoglobulina G anti-pili 987P de *E. coli* en fecas de lechones no mostraron una disminución significativa ( $p=0,067$ ), en los tres períodos muestreados (Figura 1).

### Títulos de inmunoglobulina A secretora anti-pili 987P de *E. coli*

Los títulos de IgA secretora anti-pili 987P de *E. coli* obtenidos en la leche a los 4 y 10 días post-parto con respecto al calostro (2 días post-parto) muestran un aumento estadísticamente significativo ( $p=<0,01$ ) (Figura 2).

En las heces de los lechones se evidenció una alta variabilidad en los tres momentos muestreados, en cuyo caso no se recomienda hacer análisis de varianza, por la poca confiabilidad de los parámetros (Figura 2).

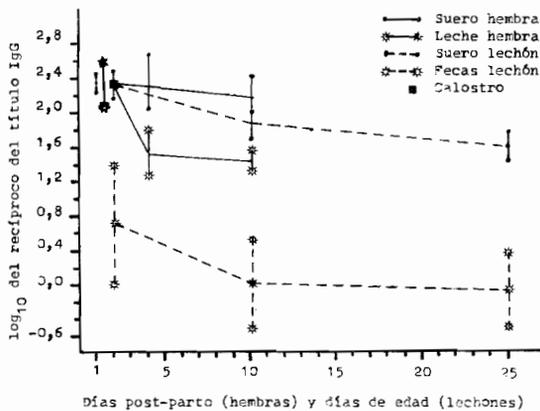


Figura 2: Distribución de los niveles de anticuerpos de clase IgA secretora anti-pili 987P de *E. coli*, en calostro y leche de hembras, y en heces de lechones, en diferentes períodos post-parto. (Expresado en MG  $\pm$  SD)

## DISCUSION

La suspensión de "pili" obtenida de la cepa de *Escherichia coli* OC: K87: 987P mostró por micros-

copía electrónica corresponder a pili, indicando que la técnica de purificación utilizada permite la obtención de pili de una forma simple y de una pureza adecuada. La microscopía electrónica confirma ser una técnica que permite evaluar adecuadamente la presencia de pili en las bacterias.

Los títulos de anticuerpos de clase IgG e IgA secretora anti-pili 987P de *E. coli*, evidenciarían que en las madres y lechones del plantel estudiado podría existir un nivel adecuado de anticuerpos anti-pili de la cepa enteropatógena de *E. coli* aislada en la Región Metropolitana.

Los niveles de inmunoglobulina G anti-pili 987P de *E. coli* presentes en el suero de la madres y lechones son inicialmente similares, pero luego hay una disminución más acentuada en los lechones, lo que es explicado por tratarse de una inmunidad pasiva que siempre posee menor duración en el tiempo que la inmunidad activa de las madres (Banks 1982).

En cuanto a los niveles de IgG anti-pili 987P en calostro y leche de hembras, nuestros resultados son concordantes con otros trabajos publicados anteriormente (Butler, 1973; Norcross, 1982; Opdebeeck, 1982), en el sentido de que el calostro es una fuente más importante de IgG que la leche, ya que esta inmunoglobulina proviene directamente de los niveles séricos maternos, lo que se refleja por una concentración similar en el calostro y suero, que luego disminuye al transcurrir el tiempo.

Diferente es el comportamiento de los títulos de IgA secretora anti-pili 987P en el calostro y leche. Se aprecia que esta inmunoglobulina tiene una distribución totalmente opuesta a la IgG, de tal modo que su mayor concentración se encuentra en la leche y no en el calostro. Al respecto se sabe que existe una síntesis local de IgA secretora, luego que linfocitos sensibilizados en el lumen intestinal migran hasta la glándula mamaria y ello explica el ascenso de esta inmunoglobulina en la leche (Norcross, 1982; Schoneweis y Henry, 1982).

Al revisar los títulos de IgA secretora e IgG anti-pili 987P en las heces, aparentemente hay un predominio de la IgA secretora que experimenta un aumento en el tiempo y que corresponde exactamente con lo que ocurre en la leche, por lo tanto es indiscutible la influencia de los niveles lácteos de IgA secretora en los niveles fecales del lechón. En cambio la presencia de IgG en las heces es prácticamente indetectable, pero experimenta un comportamiento muy similar a los niveles séricos de los lechones.

El alto nivel de anticuerpos de clase IgG e IgA secretora anti-pili 987P *E. coli* encontrado, demuestra que el plantel porcino estudiado tiene un manejo que permite tener un adecuado nivel inmunológico, con títulos de anticuerpos específicos que

aseguran mantener a los cerdos sin indicios clínicos de problemas gastroentéricos debido a este serotipo de *E. coli*.

Esos niveles promedio de anticuerpos específicos detectados pueden servir para éste y otros tipos de pili a futuro, para establecer un nivel inmunológico basal a considerar en la selección de aquellas hembras destinadas a la masa reproductiva o como nodrizas de un plantel. Por otra parte, no debe olvidarse la importancia de obtener "pili" purificado y utilizarlo como vacuna en la profilaxis de esta enfermedad. Indudablemente, ambos aspectos contribuirían en gran medida a controlar la colibacilosis que tantas pérdidas económicas ocasiona a la producción porcina nacional.

## RESUMEN

A partir de la cepa de *Escherichia coli* OC: K87: 987P se purificó el antígeno pili 987P, que media la adherencia del bacilo al epitelio intestinal. La pureza de la solución de pili obtenida se evaluó mediante microscopía electrónica. Además se purificó inmunoglobulinas de clase IgG e IgA secretora de cerdo, con las que se produjo suero hiperinmune en conejos, los que se utilizaron para preparar conjugados anti-IgG de cerdo —fosfatasa alcalina y anti-IgA secretora de cerdo— fosfatasa alcalina.

Se determinó, mediante la técnica de enzimmuno-análisis (ELISA), niveles de anticuerpos de clase IgG anti-pili 987P en suero, calostro y leche de cerdas lactantes, y en suero y heces de lechones; y anticuerpos de clase IgA secretora anti-pili 987P en calostro y leche de hembras lactantes y en heces de lechones.

Los resultados indican un alto nivel de anticuerpos, tanto en madres como en lechones clínicamente sanos, lo que aseguraría una adecuada protección contra las diarreas causadas por esta bacteria. Los niveles de anticuerpos obtenidos en los lechones son un fiel reflejo del nivel inmunológico que presenta la madre y que traspasa pasivamente al lechón a través del calostro y la leche.

## REFERENCIAS

- ARRIAGADA, M. Determinación de anticuerpos antipili de una cepa de *Escherichia coli* enteropatógena en suero, calostro, leche y heces de cerdos clínicamente sanos. Tesis de grado. Santiago. Escuela de Medicina Veterinaria. U. de Chile, 1986.
- BANKS, K.L. Host defense in the newborn animal. *J. Am. Vet. Med. Asoc.* 181: 1053-1056, 1982.
- BRINTON, CH. C., FUSCO, P., WOOD, S. A complete vaccine for neonatal swine colibacillosis and the prevalence of *Escherichia coli* on swine isolates. *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* 78: 962-966, 1983.
- BUTLER, E. Synthesis and distribution of immunoglobulins. *J. Am. Vet. Med. Asoc.* 163: 795-798, 1973.

- DUGUID, J.P., SMITH, I.W., DEMPSTER, G., EDMUNDS, P.N. Non flagellar filamentous appendages (Fimbriae) and haemagglutinating activity in *bacterium coli*. J. Pathol. Bacteriol. 70: 335-348, 1955.
- DUGUID, J.P. Functional anatomy of *Escherichia coli* with special reference to enteropathogenic *E. coli*. Rev. Latinoam. Microbiol. 7 (Supls. 13-14): 1-16, 1964.
- FREIXES, A. Efecto de una vacuna polivalente inactivada de *Escherichia coli* (Porcovac) en la prevención y control de la diarrea colibacilar del lechón porcino. Tesis de grado. Chillán. Escuela de Medicina Veterinaria. U. de Concepción, 1983.
- GASSTRA, W., F.K. DE GRAAF. Host-specific fimbrial adhesins of non invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46: 129-161, 1982.
- GRABAR, P., P. BURTIN. Immunoelectroforesis. Barcelona, Toray Masson, 348 p., 1968.
- HAYES, S.N., E.T. KORNEGAY. Immunoglobulin G, A and M antibody response in sow-reared and artificially reared pigs. J. Anim. Sci. 48: 1116-1122, 1979.
- ISAACSON, R.E., E.A. DEAN, R.L. MORGAN, MOON, H. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* - Induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 or 987P pili: Antibody production in response to vaccination. Infect. Immun. 29: 824-826, 1980.
- MÁRQUEZ, M. Enterotoxigenicosis: su importancia y prevención. Industria Porcina 2: 25-30, 1982.
- MORGAN, R.L., R.E. ISAACSON, H.W., MOON, C.C., BRINTON, C-C. To. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* - Induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987P or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. Infect. Immun. 22: 771-777, 1978.
- NAGY, B., H.W. MOON, R.E. ISAACSON, C-C TO, C.C. BRINTON. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. Infect. Immun. 21: 269-274, 1978.
- NORCROSS, N.L. Secretion and composition of colostrum and milk. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1057-1060, 1982.
- OPDEBEECK, J.P. Mammary gland immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1061-1065, 1982.
- OUCHTERLONY, O. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor, London, Humprey Science publishers, 1968.
- PINOCHET, L. Síndrome diarreico agudo en cerdo lactante. Informe final. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, 183 p., 1985.
- SALIT, I.E., E.C. GOTSCHLICH. Hemmagglutination by purified type 1 *Escherichia coli* pili. J. Exp. Med. 146: 1169-1181, 1977.
- SCHONEWEIS, D.A., S.C. HENRY. Theory and practice of immunoprophylaxis in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1154-1157, 1982.
- TO, S.C.M. Prevention of colibacillosis in neonatal swine with a 4 - pilus *Escherichia coli* bacterin. Mod. Vet. Pract. 65: 39-41, 1984.
- VANHUYSE, C.H., W. SMEDT. Vaccination polyvalente contre la diarrhée colibacillaire neonatale des porcelets. France, Smith Kline Genva. 22 p., 1977.
- VOLLER, A., E. BIDWELL, A. BARLETT. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World. Health Organ. 53: 55-65, 1976.
- WILSON, M.R. Enteric colibacillosis in diseases of swine. 5° Ed. Ames. Iowa state University Press, 1981.
- WILLIAMS, C.A., M.W. CHASE. Methods of immunology and immunochemistry. London, Academic Press. V3, 515 p., 1971.
- YABIKI, T., M. KASHIWAZAKI, S. NAMIOKA. Purifications of immunoglobulins IgG, IgA and IgM from porcine serum and sows colostrum. JPN. J. Vet. Sci. 35: 199-208, 1973.

Recibido agosto 1986; aprobado octubre, 1986.