

- 9) GUTIERREZ MARTIN, C.B.; TASCÓN CABRERO, R.I.; SUAREZ ESTRADA, J. & RODRIGUEZ FERRI, E.F. (1989). Estudio de la pleuroneumonía porcina en la provincia de León. I. Encuesta serológica en poblaciones porcinas con problemas de pleuroneumonía. En prensa.
- 10) HSU, F.S.; HU, H. & RO, L.H. (1982). Pathogenesis of pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*: Pathologic, immunofluorescent and bacteriological studies. *Proc. 7th IPVS Congr.*, México City: 78.
- 11) IBARGOYEN, G.S.; PERFUMO, C.J.; MASSONE, A.R.; GIMENO, E.J. & MARTIN, A.A. (1988). Demonstration of *Haemophilus pleuropneumoniae* in histological sections by immunoperoxidase techniques. *Proc. 10th IPVS Congr.*, Rio de Janeiro, Brazil: 72.
- 12) LARIVIERE, S. (1986). Comunicación personal.
- 13) MACKAY, D.K.J.; BORTHWICK, N.J. & MACKENZIE, N.M. (1988). The interaction of maternal immunity and vaccination in protection against *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Proc. 10th IPVS Congr.*, Rio de Janeiro, Brazil: 84.
- 14) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R. & LARIVIERE, S. (1983). Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 17(5): 787-790.
- 15) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R. & LARIVIERE, S. (1983). Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 18(6): 1.351-1.354.
- 16) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S. & LEBLANC, D. (1984). A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 45(4): 715-719.
- 17) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S. & MARTINEAU, G.P. (1984). Rapid diagnosis and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the lungs by coagglutination and ring precipitation tests. *Proc. 8th IPVS Congr.*, Ghent, Belgium: 101.
- 18) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S. & MARTINEAU, G.P. (1987). Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.*, 120:62-65.
- 19) MORRISON, R.B.; VHDAT, F.; HILLEY, H.D.; PIJOAN, C. & HILL, H.T. (1984). Detección de anticuerpos contra *Haemophilus pleuropneumoniae* por un sistema ELISA utilizando un antígeno tratado por el calor. *Proc. 8th IPVS Congr.*, Ghent, Belgium: 118.
- 20) MULKS, M.H.; HUNTER-SIMON, D.Y.; SPRAGUE, J.W. & THACKER, B.J. (1986). Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Haemophilus pleuropneumoniae* in infected swine. *Proc. 9th IPVS Congr.*, Barcelona, Spain: 266.
- 21) NICOLET, J.; PAROZ, Ph.; KRAWINKLER, M. & BAUMGARTNER, A. (1981). An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 42(12): 2.319-2.142.
- 22) OHISHI, K.; KOEDA, T.; SUZUKI, S. & MURAMATSU, M. (1987). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen by immunoperoxidase staining in pulmonary lesions of pigs inoculated with *A. pleuropneumoniae*. *Ann. Rep. Natl. Vet. Assay Lab.*, 24: 21-26.
- 23) PIJOAN, C. (1984). Etiología, inmunidad y patogenia de las enfermedades respiratorias del cerdo. *Med. Vet.*, 1(11): 517-524.
- 24) PIJOAN, C. (1985). Serology and immunology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. In: Schultz, R.A. *Haemophilus pleuropneumoniae Compendium*. Biotech Corporation SDS. Avoca. Iowa: 23.27.
- 25) RAPP, V.J.; ROSS, R.F. & ZIMMERMANN ERICKSON, B. (1985). Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 46(1): 185-192.
- 26) RO, L.H. (1987). Protective immunogenic efficacy of capsule antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, 13(2): 119-126.
- 27) SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. & CAMBRA ALVAREZ, M. (1987). *Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en Patología Animal y Vegetal*. Publicación del I.N.I.A. Madrid.
- 28) SHOPE, R.E. (1964). Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.*, 119: 357-368.
- 29) UDEZE, F.A. (1987). *Role of virulence determinants of Haemophilus pleuropneumoniae in the pathogenesis of porcine pleuropneumoniae*. Doctoral Thesis. Georgia.

CARACTERIZACION DE LOS PATOVAR DE *ESCHERICHIA COLI* DE ORIGEN PORCINO EN LA PROVINCIA DE SALAMANCA

(CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* PATOVARS FROM PORCINE ORIGIN IN THE PROVINCE OF SALAMANCA)

Por M.A. Jiménez Vicente

Palabras clave: *E. coli*, diarrea porcina, patovar.
Key words: *E. coli*, porcine diarrhea, patovar.

SUMMARY

A study on *E. coli* from piglets diarrhea and healthy sows was performed. The isolation and characterization, serotyping, fimbriae, antibiotics resistance, enterotoxins productions, biovars and plasmid profile show the existence of specific serovar not typable with the classical antisera, which is associated to K88 fimbrial antigen as so 987P pilus together to the ordinary 0147, 0141 and 0149, forming patovars STa associated.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones sanos y diarreicos, así como de reproductoras sanas. El estudio comprende el aislamiento y caracterización, serotipado, fimbriaciones, resistencia a antibióticos, producción de toxinas, determinación del biovar y perfil plasmídico de las mismas.

Los resultados muestran la existencia de un serovar mayoritario no tipificable con los antiseros usuales, que se asocia a fimbrias K88 y/o 987P, seguido en frecuencia de los comunes 0147, 0141 y 0149 dando lugar a patovar productores de STa.

Dpto. de Patología Animal (Sanidad Animal). Unidad de Microbiología e Inmunología. Universidad de León.

An. Fac. Vet. León. 1989, 35, 137-146

INTRODUCCION

La diarrea colibacilar es una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas plantea al sector porcino, tanto por el índice de morbilidad como por el número de bajas que ocasiona.

Producida por cepas de *Escherichia coli*, es necesario que concurren en las mismas, una serie de factores para el desarrollo de la enfermedad, como la presencia en su superficie, de mecanismos que le permitan fijarse a la mucosa intestinal (antígenos fimbriales), de mecanismos que le permitan fijarse a la mucosa intestinal (antígenos fimbriales) contrarrestando así la defensa peristáltica del hospedador y una vez colonizada la mucosa, es necesario un vehículo que provoque la salida de agua y electrolitos a la luz intestinal desencadenándose la diarrea. Este vehículo lo constituyen las enterotoxinas.

Ambos factores, así como algunas de las resistencias a antibióticos se encuentran codificadas en ADN plasmídico.

MATERIAL Y METODOS

Toma de muestras

Fue elegida como centro de estudio una explotación porcina de ciclo cerrado sita en la localidad de Ledesma (Salamanca) en la que se presentaron dos brotes de diarrea colibacilar durante los meses de octubre-noviembre de 1985, no habiendo sido las madres en ningún momento vacunadas (K-88,LT).

La toma de muestras, en número de 20, fue llevada a cabo por escobillado rectal con torundas estériles y mantenidas para su transporte a 4°C en medio de Stewart, tanto en lechones sanos y diarréicos como en reproductoras sanas.

Medios

En la elaboración del presente estudio se utilizaron los siguientes medios: Mc Conkey agar, Eosin Methylen Blue (EMB) agar, Endo agar, Brain Heart Infusion (BHI) y Muller Hinton (Difco, Detroit, MI). Tryptic Soy Broth (TSB), Tryptic Soy agar (TSA), Phenol red broth base y Blood agar base (Bioline, Italy). Luria Broth (LB), medio Minca, medio Stewart, y agar 5% (v/v) sangre de carnero, fueron elaborados en nuestro propio laboratorio.

Aislamiento y Caracterización de *E. coli*

Fueron llevados a cabo siguiendo los métodos y los medios convencionales, así como las galerías API-20E (Montelieu, Bercieu, France).

Caracterización Serológica de *E. coli*

El serovar fue determinado, utilizando sueros anti O:K servidos por el Instituto de la Salud, Bilthoven (Holanda) siguiendo el método descrito por Edwards y Ewing, 1966. Las combinaciones de sueros anti O:K utilizadas fueron: 08:K87, 0138:K81, 0139:K82, 0141:K85ab, 0141:K85ac, 0147:K89 y 0149:K91.

Determinación de antígenos fimbriales

La determinación de los antígenos K88, K99, 987P y F-41, se realizó por aglutinación directa en portaobjetos, utilizando sueros anti monoespecíficos de la misma procedencia que los O:K ya descritos. Se siembran las cepas en medio Minca (para la detección de K88 y K99) y en agar 5% (v/v) sangre de carnero (para 987P y F-41).

Marcadores de las fimbrias

Fermentación de la Rafinosa. Se inoculan las cepas en Phenol Red Broth base con 1% de rafinosa.

Formación de película en medio líquido. Por crecimiento de las cepas en TSB manteniéndolas 72 horas a 37°C, observándose en su caso la formación de una película en la superficie del medio de cultivo.

Hidrofobicidad relativa de la cepa. Fue llevada a cabo por el "Salt Aggregation Test" (SAT) de acuerdo con Honda et al.⁶.

Resistencia a Antibióticos

Fue llevada a cabo siguiendo la técnica de difusión en agar. Inoculadas las cepas en TSB son mantenidas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 a 540 nm. 100 µl de este crecimiento son sembrados en Muller Hinton, donde se depositan los discos de antimicrobianos (Neosensitabs, Dinamarca).

Producción de Toxinas

Hemolisinas (Hly). Determinadas por crecimiento de las cepas en agar 5% (v/v) sangre de carnero.

Toxina termoestable, fracción soluble en metanol (STa). La detección fue llevada a cabo, por inoculación en ratón lactante atendiendo al método descrito por Dean et al.³.

Toxina termolábil (LT). Fue llevada a cabo siguiendo el método GM1-ELISA de acuerdo con Greenberg et al.⁵ Nogareda et al.⁹, y Yolken et al.¹⁷, utilizando suero anti LT conocido, Lab. Hipra (Amer, Gerona).

Perfil fermentativo

Su determinación fue llevada a cabo utilizando las galerías API-50CH.

Contenido plasmídico

Se siguieron tres técnicas diferentes de extracción plasmídica:

Método de extracción alcalina¹.

Método para detección de plásmidos grandes¹⁰.

Método de Kado and Liu⁷.

Los pesos moleculares de los plásmidos, fueron calculados mediante regresiones lineales, tomando como referencia la cepa de *E. coli* V-517.

RESULTADOS

Fueron aisladas e identificadas como *E. coli*, un total de veintiséis cepas; dieciséis procedentes de lechones diarreicos (61,5%), cinco de lechones sanos (19,2%) y cinco de reproductoras sanas (19,2%) de acuerdo con la distribución que refleja la tabla I.

TABLA 1
Cepas y origen

CEPA	EDAD	DESTETADO	DIARREA
3	Reproductora	—	—
4	20 días	NO	NO
5	20 días	NO	NO
6a	30 días	SI	SI
6b	30 días	SI	SI
7a	30 días	SI	SI
7b	30 días	SI	SI
8	Reproductora	—	—
9	8 días	NO	NO
10	8 días	NO	NO
11a	30 días	SI	SI
11b	30 días	SI	SI
11c	30 días	SI	SI
11d	30 días	SI	SI
12	30 días	SI	NO
13	45 días	SI	SI
14a	Reproductora	—	—
14b	Reproductora	—	—
15a	21 días	NO	SI
15b	21 días	NO	SI
16	21 días	NO	SI
17	Reproductora	—	—
18	19 días	NO	SI
19	19 días	NO	SI
20a	18 días	NO	SI
20b	18 días	NO	SI

El serovar mayoritario correspondió a la asociación 0147:K89 expresado por un total de ocho cepas (30,75%), seguido de 0141:K85ab expresado por tres cepas (11,50%), 0149:K91 por dos (7,75%) y 0138:K81 por una cepa (3,80%) tal y como aparece reflejado en la Tabla 2. El resto, fueron consideradas como no tipificables.

Ninguna de las cepas fue portadora de K99 ni de F-41, sin embargo K88 fue expresado por trece cepas, 897P por seis, de las cuales cuatro eran bifimbriadas (K88 y 987P) según muestra la Tabla 2. Los resultados correspondientes a los marcadores de las fimbrias quedan reflejados igualmente en la Tabla 2.

TABLA 2
Serotipos, antígenos fimbriales y marcadores de las fimbrias

NT: No tipificables
(1): Salt Aggregation Test

CEPA	SEROVAR	FIMBRIAS				MARCADORES		
		K88	K99	987O	F-41	Rafinosa	Película	SAT(1)
3	NT	+	—	—	—	+	—	4M
4	0147:K89	—	—	—	—	—	—	2M
5	0149:K91	—	—	—	—	—	—	4M
6a	0147:K89	+	—	—	—	+	—	2M
6b	NT	+	—	—	—	+	—	4M
7a	NT	+	—	—	—	+	—	4M
7b	NT	—	—	—	—	+	—	2M
8	NT	—	—	—	—	—	—	4M
9	0149:K91	—	—	—	—	—	—	2M
10	NT	—	—	—	—	—	—	4M
11a	0141:K85ab	+	—	+	—	+	+	4M
11b	0141:K85ab	+	—	+	—	+	+	0,0625M
11c	0141:K85ab	+	—	—	—	+	—	4M
11d	0138:K81	+	—	+	—	+	+	4M
12	NT	—	—	+	—	—	+	4M
13	NT	—	—	—	—	—	—	4M
14a	NT	—	—	+	—	—	+	4M
14b	Nt	+	—	—	—	+	—	4M
15a	0147:K89	+	—	+	—	+	+	1M
15b	0147:K89	+	—	—	—	+	—	4M
16	NT	—	—	—	—	—	—	4M
17	0147:K89	—	—	—	—	+	—	4M
18	0147:K89	+	—	—	—	+	—	1M
19	0147:K89	—	—	—	—	+	—	4M
20a	NT	—	—	—	—	—	—	4M
20b	0147:K89	+	—	—	—	+	—	0,250M

TABLA 3
Resultados correspondientes al estudio de la resistencia a antibióticos, de algunas de las cepas en estudio

S: Sensible
I: Intermedio
R: Resistente

ANTIBIOTIC/CEPA	4	6a	7b	9	11b	11d	12	15a	15b	17	18	19	20b
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	R	R	R	S	R	R	S	S	I	I	S	R	I
Ampicilina	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
Sulfamidas	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Estreptomina	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	I	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	I	R	S	S	I	S	S	S
Penicilina L.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicilina H.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalosporina	S	S	I	I	S	S	I	R	S	I	S	R	I
Eritromicina	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Espiramicina	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
Novobiocina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Nitrofurantoina	I	I	R	I	I	I	I	I	I	R	R	I	I
Ac. Nalidixico	S	S	I	I	S	S	I	I	S	S	S	S	I

TABLA 4
Perfil fermentativo de las cepas en estudio

SUSTRATO	15a	15b	17	18	19	20b
Glicerol	+	+	+	-	+	+
Eritritol	+	+	+	-	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+
Ribosa	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	-	+	-
Adonitol	-	-	+	+	+	-
B-M-Xilósido	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	+	-
Rhamnosa	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	-	+	+	+
inositol	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
α-Manósido	+	-	-	-	-	-
α-M-Glucósido	+	-	+	-	-	-
N-acetil Glucosamina	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	-	-	+	-	+
Arbunina	+	+	+	+	-	+
Esculina	+	+	+	+	-	+
Salicina	+	+	+	+	-	+
Celobiosa	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	+	-	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
Melecitosa	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	+	+	+	+
Almidón	-	-	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	+	+	-	-	-
B-Gentibidiosa	-	-	+	-	-	+
D-Turanosa	-	-	-	-	-	-
L-lixosa	+	-	-	-	-	-
D-tagatosa	-	-	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	+	+	+	+	+	+
D-Arabitól	-	-	+	+	+	-
L-Arabitól	-	-	+	-	-	-

Obtuvimos una resistencia global del orden del 55% con una media de siete resistencias por cepa, frente a los catorce antimicrobianos utilizados. Los mayores porcentajes de sensibilidad se obtuvieron para el cloranfenicol y la ampicilina con un 85% en ambos casos; seguido de gentamicina (69%), ácido nalidixico (61,5%). El resto manifestaron sensibilidades menores. Tabla 3.

La Tabla 4 nos muestra los diferentes patrones de fermentación establecidos, en el estudio del perfil fermentativo. El resto de las cepas compartieron modelo metabólico con las descritas.

Ninguna de las cepas estudiadas fue productora de toxina termolábil (LT) ni de Hemolisinas (Hly), habiéndose detectado únicamente producción de toxina termoestable (STa). Las inoculaciones a ratón lactante, nos han permitido diferenciar como hiperproductoras de toxina (STa), aquellas cuya relación peso intestino/peso del cuerpo, fue superior a 0,095, como productoras, aquellas cuya relación estuvo comprendida entre 0,080-0,090m considerando el resto como débilmente productoras (0,070-0,080) o no productoras. Tabla 5.

No mostraron contenido plasmídico seis cepas, en el resto el número de plásmidos osciló entre 1 y 7, con pesos moleculares comprendidos entre 87,23 Md. y valores inferiores a 1 Md. Tabla 5.

TABLA 5
Contenido plasmídico, por el método de Kado and Liu y producción de toxina (STa)

(1): Relación peso intestino/peso del cuerpo
* Obtenidas por el método de Portnoy et al.

CEPAS	PLASMIDOS (N.º)	PESO MOLECULAR (Md)	STa(1)
3	(2)	1.03 y 1;	-
4	(3)	2.64;1.50 y 1;	-
5	(1)	58.29;	0.0640
6a	(5)	87.23;62.62;47.0;4.86;2.56;*	0.0705
6b	(0)		-
7a	(0)		-
7b	(7)	58.29;37.13;25.70;5.39;4.03; 2.04;1.33;	0.0710
8	(3)	58.29;4.03;2.37;	-
9	(3)	58.29;37.13;2.64;	0.0770
10	(4)	45.94;37.13;3.78;2.37;	0.0820
11a	(0)		-
11b	(3)	79.94;58.29;44.14;	0.0625
11c	(0)		-
11d	(3)	76.36;48.36;42.28;*	-
12	(3)	58.29;1.95;1.86;	0.1100
13	(1)	2.50;	0.1500
14a	(0)		-
14b	(1)	38.94;	-
15a	(0)	27.46;7.09;4.34;3.69;3.15; 2.66;	0.1110
15b	(3)	67.93;58.30;4.34;	0.0940
16	(3)	50.52;4.34;3.59;	-
17	(2)	38.34;4.80;	0.0760
18	(6)	27.46;5.63;4.80;2.66;1.90; 1.03;	0.0820
19	(3)	34.40;5.05;2.46;	0.0700
20a	(0)		-
20b	(4)	58.29;3.94;3.29;1.84;	0.0680

DISCUSION

El estudio realizado nos ha permitido caracterizar de acuerdo con Staley et al.¹², como Patovar porcinos un total de diecisiete cepas, tal y como refleja la tabla 6 habiéndose puesto de manifiesto la existencia de Serovar asociados a EPEC y/o ETEC, tanto en animales sanos como enfermos e incluso en reproductoras sanas.

TABLA 6
Patovar caracterizados

(R): Reproductora

PATOVAR	AISLAMIENTOS	ORIGEN (N de cepa)
NT: K88+ (STa ⁻)	4	3(R), 6b, 7a y 14b (R)
NT: F ⁻ (STa ⁺)	2	13 y 10;
0147:K89: K88+ (STa ⁺)	2	15b y 18;
0147: K89:K88+ (STa ⁻)	2	20b y 6a;
0141:K85ab:K88+ -987P ⁺ (STa ⁺)	1	15a;
0141:K85ab:K88+(STa ⁻)	1	111c;
0138:K81:K88+ -987P*(STa ⁺)	1	11d;
NT: 987P* (STa ⁺)	1	12;
NT: 987P+ (STa ⁻)	1	14a(R)

En el 46.2% de las cepas estudiadas no hemos podido determinar el Serovar, lo que implica la existencia de cepas indígenas, de serotipos altamente específicos¹⁵. En el resto de las cepas, el Serovar coincidió con lo descrito previamente en nuestro país^{2, 4, 11, 13}.

La expresión bifimbrial se asocia a Serovar que coinciden con los datos previamente por otros autores en nuestro país^{2, 14}. 987P es expresado mayoritariamente por cepas procedentes de lechones ya destetados e incluso de reproductoras sanas, estimando por tanto, y teniendo en cuenta que es una granja exenta de vacunación, que su expresión es un hecho natural, coincidiendo, bien con la aparición en el lechón de la capacidad para elaborar ya su propia respuesta inmune, bien con la aparición en el enterocito de los receptores específicos para la fimbria (Gakecki et al, 1989, Vet. Microbiol., in press).

Queda igualmente manifiesto, la correlación existente entre la expresión de K88 y la utilización de Rafinosa, así como la expresión de 987P y la formación de película en medio líquido, no pudiendo decir lo mismo para la expresión de 987P y la hidrofobicidad relativa de la cepa.

Determinamos, únicamente, producción de toxina termoestable (STa), no detectando toxina termolábil, datos coincidentes con los datos previamente por otros autores en nuestro país^{2, 13}, cuyas muestras procedían de granjas sometidas a vacunación, atribuyendo la presencia de STa, a que su bajo peso molecular le impide comportarse como antígeno completo, no ocurriendo lo mismo con LT, cuya expresión estaría reprimida por presión de anticuerpos. La procedencia de las muestras, en nuestro caso, de granjas exentas de vacunación, nos permite considerar el hecho (ausencia de LT) como un carácter estable dentro de nuestro país, integrando a las cepas ETEC en la clase II de MOON & WIHPP⁸ con fenotipo: LT⁻, STa⁺, Hly⁻.

Se ha comprobado igualmente y de acuerdo con Toranzo et al¹⁶, la necesidad de utilizar más de un método de extracción plasmídica para llevar a cabo un estudio del contenido de ADN extracromosomal de las cepas, así como la importancia que este estudio presenta en la caracterización de cepas patógenas, dada la amplia correlación encontrada entre el número y tamaño de los plásmidos de una cepa y la expresión por parte de ésta, de uno o más caracteres de patogenicidad, si además se tiene en cuenta la posibilidad de cepas cuya expresión fenotípica se encuentra reprimida por presiones ambientales.

El estudio del perfil fermentativo no nos ha permitido establecer un Biovar propio de la granja muestreada, demostrando esa versatilidad metabólica tan característica de las especies enterobacterianas. Si a esta imposibilidad de establecer un Biovar definido añadimos la variabilidad encontrada en el establecimiento de los Patovar, como es el hecho, de que cepas con idéntico Serovar y expresión fimbrial se encuentren caracterizados como Patovar diferentes, nos puede dar una idea de la enorme variabilidad que las cepas EPEC pueden ofertar, dentro de una misma granja y con ello las dificultades con que nos enfrentamos a la hora de establecer controles de la colibacilosis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, se ha podido realizar gracias a la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BIRNBOIN, H.C. and DOLY, J. (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7:13-15.
- 2) BLANCO, J. (1984). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- 3) DEAN, A.G.; CHING, C. Y.; WILLIAMS, R.G. and HARDEN, L.B. (1972). Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice application in a study of diarrhea in Honolulu. *J. Inf. Dis.*, 125: 407-411.
- 4) FERNANDEZ DIEZ, M.; ORDAS ALVAREZ, J.A.; CARMENES DIEZ, P. y RUBIO NISTAL, P. (1984). Tipificación serológica, sensibilidad a los agentes antimicrobianos y patogenicidad para el ratón de cepas de *E. coli* aisladas de cerdos. *An. Fac. Vet. (León)* 30:209-216.
- 5) GREENBERG, H.G.; SACK, R.B.; RODRIGUEZ, W.; SACK, R.B.; WIATT, R.G.; KAICA, A.R.; HORSWOOD, R.L.; CHANNOC, R.M.; and KAPIKIA, A.Z. (1977). Micro-titer solidphase radioimmunoassay for detection of *E. coli* heat labile enterotoxin. *Inf. Immun.* 17:541-545.
- 6) G. HONDA, T.; KHAN, M.M.A.; THAKEDA Y. and MIWATANI, T. (1983). Grouping of enterotoxigenic of *E. coli* by hidrofobicidad and its relation to haemagglutination and enterotoxin production. *FEMMS Microbiol. Lett.*, 17: 273-276.
- 7) KADO, C.I. and LIU, S.T. (1981). Rapid procedure for the detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1377.
- 8) MOON, H.V. and WHIPO, S.C. (1970). Development of resistance with age by swine intestine to effects of enteropathogenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.*, 122:220-223.
- 9) NOGAREDA, M.A.; HORTIGUELA, O.; ESPUÑA, E. y SANCHEZ VIZCAINO, J.M. (1984). Adaptación de la técnica GM-1 ELISA para la detección de la toxina termolábil de cepas enteropatógenas porcinas de *E. coli* y para la identificación de la respuesta inmune frente a la toxina. *Med. Vet.*, 1:49-57.
- 10) PORTNOY, D.A.; MOSELEY, L.A. and FALKOW, S. (1981). Characterization of plasmid and plasmids associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect. Immun.* 31:775-782.

- 11) SERRANO, M. (1985). Tipificación serológica de cepas de *E. coli* patógenas para el cerdo. *Not. Neosan*, 218:101-106.
- 12) STALEY, J.T. and KRIEG, N.P. (1984). Classification of procaryotic organism an overview. In: KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. (Eds). *Bergey s manual of Sistematyic Bacteriology. Vol. I.* The Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1-4.
- 13) SUAREZ, S.; PANIAGUA, C.; ALVAREZ, M. y RUBIO, P. (1985). Biología y fimbriación de cepas enteropatógenas de *E. coli* de origen porcino en Castilla-León. *Med. Vet.* 2(11):567-571.
- 14) SUAREZ, S.; PANIAGUA, C.; ALVAREZ, M. and RUBIO, P. (1987) Features of enterotoxigenic *E. coli* strains from porcine origin that expres K88 and 987P fimbrial antigens. *Vet. Microbiol.*, 13 (1):65-68.
- 15) SUAREZ, S.; PANIAGUA, C.; ORSKOV, I. and ORSKOV, F. (1988). Unusual serotypes of *E. coli* from piglets diarrhea in north Spain. *Vet. Microbiol.* 17:375-377.
- 16) TORANZO, A.E. (1983). Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.*; 39: 184-192.
- 17) YOLKEN, R.H.; GREENBERG, H.B.; MERSON, M.H.; SACK, R.B. and KAPIKIAN, A.Z. (1977). Enzyme linked immunossorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 6:439-444.

ESTUDIO HEMATOLOGICO DE TRUCHAS ARCO IRIS (*SALMO GAIRDNERI* RICHARDSON) DE UNA PISCIFACTORIA DE LEON

(HAEMATOLOGICAL STUDY OF RAINBOW TROUT (*SALMO GAIRDNERI* RICHARDSON) IN A FISHFARM OF LEON (SPAIN)

Por A. Serantes, *
C. Vázquez Díaz, *
A. Bayón del Río **
y M.A. Orden *

Palabras clave: Truchas arco-iris, hematocrito, hemoglobina, recuento eritrocitario, índices de Wintrobe.

Key words: Rainbow trout, packed cell volume, haemoglobin, erythrocyte counts, Wintrobe index.

SUMMARY

This work describes a study on the hamatological parameters (packed cell volume, haemoglobin, erythrocyte counts, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin, mean concentration of corpuscular haemoglobin) of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) in a fishfarm of León (Spain), studying the variations due to the sex, body weight, date and gonadal status.

RESUMEN

En el presente trabajo realizamos un estudio de los parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, recuentos eritrocitarios, volumen corpuscular medio, hemo-

* Departamento de Patología Animal: Medicina Animal. Universidad de León.

** Unidad de Patología General. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

An. Fac. Vet. León. 1989, 35, 147-159