

Especificidad, antibiosensibilidad y virulencia de las cepas de *Escherichia coli* aislados del ciego del conejo

A. Reynaud y col.

(Cuni Sciences, 1987, 4 : 1-7)

Para conocer la incidencia real de los *Escherichia coli*, capaces de provocar trastornos diarréicos en los conejos, se ha realizado un estudio sistemático durante muchos meses de todos los conejos llegados al laboratorio, refiriéndose el trabajo a la aparición del *E. coli* en los ciegos y la investigación de posibles variedades sobre los serogrupos 0 103 y 0 132.

Han sido realizados antibiogramas de las cepas presumiblemente patógenas para comparar sus antibiosensibilidades con los resultados anteriores.

Este balance ha permitido confirmar la especificidad del serogrupo 0 103 para el conejo. Por otra parte, nosotros hemos constatado la resistencia a las betalactaminas de ciertas cepas, poniendo de manifiesto en ellas de una betalactamasa codificada por genes transportados por un plásmido autotransmisible.

El estudio ha demostrado que la diferencia entre un *E. coli* 0 103 no patógeno o patógeno, se debe fundamentalmente a un factor de virulencia presente únicamente en las estirpes patógenas. Este factor, permite la colonización e invasión del tubo digestivo

por las bacterias que se halla codificado por genes transportados por un plásmido.

Material y método

Estirpes bacterianas. El estudio de la sensibilidad a los antibióticos realizado sobre las diversas cepas de *E. coli* aisladas a partir del ciego de conejos vivos se agruparon en dos apartados:

-47 cepas aisladas de 12 conejas y 35 conejos de engorde remitidos al laboratorio desde el 1.^º de enero al 31 de junio de 1987 en que la mayoría de los animales procedían de granjas racionales.

-41 cepas de colibacilos 0 103, aislados en 1985 y 1986 en tres centros -el Laboratorio del Departamento de Servicios Veterinarios de Puy de Dôme, el Laboratorio de Patología Médica de Animales de corral, de la Escuela de Veterinaria de Toulouse y el Laboratorio de Análisis Biológico Veterinario de Herbiers-. Como complemento al estudio de la especificidad de los grupos 0103 y 0102 se utilizaron 31 variedades a partir de animales y 16 de origen humano.

Tabla 1. Recuento de *E. coli* de 12 conejas procedentes de 9 granjas

Variedad	de 0 a 100.000 UFC/g	más de 100.000 UFC
<i>E. coli</i> aislado aglutinante con serogrupo 0103	0	3
<i>E. coli</i> aislado aglutinante con serogrupo 0132	0	0
<i>E. coli</i> no aglutinantes con 0132 o 0103	9	0

MIXOVAC

vacuna viva heteróloga liofilizada contra la mixomatosis, obtenida en histocultivos

composición

Suspensión del virus vivo de Shope en un medio especial, liofilizado y cerrado al vacío.

dosificación y vía de administración

Vía subcutánea: Una dosis en 0,5 ml.

Vía intradérmica (Dermojet): Una dosis en 0,1 ml.

modo de empleo

Presentación	Disolvente vía subcutánea (completo)	Disolvente Dermojet (la quinta parte)
10 dosis	5 ml	1 ml
40 dosis	20 ml	4 ml

plan vacunal

Reproductores: Cada 4-6 meses.

Reposición: A las 10-12 semanas de vida.

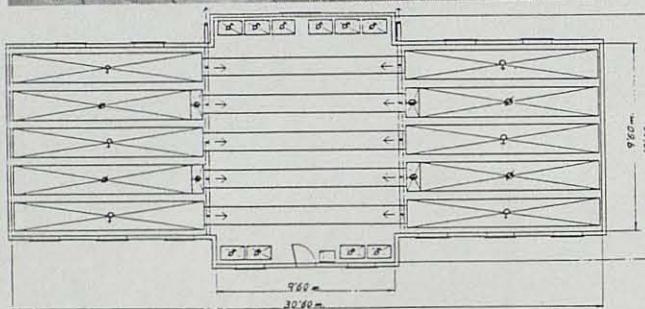
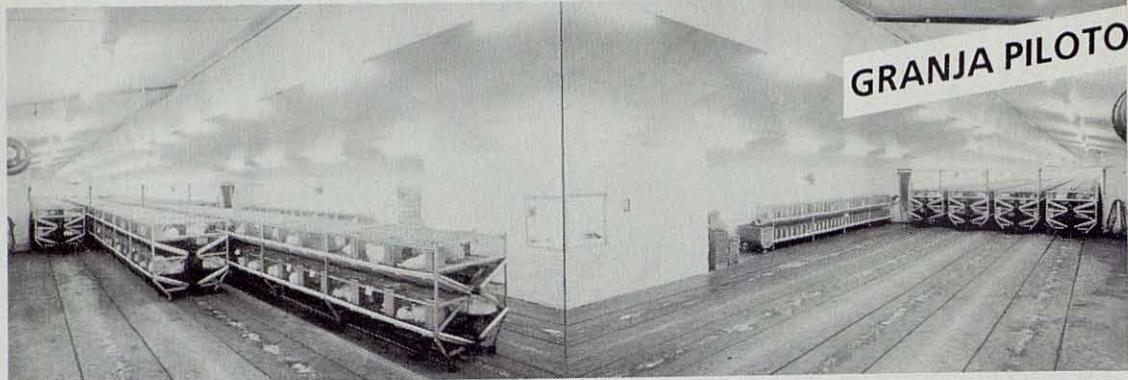
Engorde: Al destete o al mes de vida.

laboratorios sobrino, s.a.

Ctra. Camprodón, s/n. "La Riba". Tel. 29 00 01 (7 líneas)
 Telefax 29 01 02-17813 VALL DE BIANYA (Girona)
 Telex 57.223 SLOT E-Apartado 49-17800 OLOT



can barsalo' s.a.



Ejemplo práctico en una superficie de 322 m².

Planta de distribución para una instalación de 500 conejas reproductoras con sus machos engorde y reposición correspondientes.

Otras posibilidades:

El sistema S.A.T., ofrece la posibilidad del montaje de granjas para, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 conejas.

Aplicable a naves construidas o en servicio, así como las de nueva construcción.

CUNICULTOR AVICULTOR!!

can barsalo' le ofrece el sistema S.A.T. (Sistema de automatización total).

El sistema que le ayudará a rentabilizar su negocio, con una menor inversión. Jaulas de desplazamiento que le permitirán automáticamente realizar una limpieza y suministro de pienso, así como una mayor comodidad de trabajo cómodo y práctico.

Proyectos inmejorable construcción y equipamientos, realizables a corto plazo.

Para una mayor información llámenos o visítenos, y le mostraremos una granja piloto de 900 hembras en producción.



can barsalo' s.a.

Pintor Torres, 164 - Tel. (93) 699 97 26
08224 TERRASSA Barcelona

**AYER ERA INCREIBLE, HOY ES UNA REALIDAD
SISTEMAS S.A.T. EL SISTEMA!!**

Tabla 2. Recuento de *E. coli* de 35 conejos procedentes de 22 granjas

Variedad	de 0 a 100.000 UFC/g	más de 100.000 UFC
<i>E. coli</i> aislado aglutinante con serogrupo 0103	2	6
<i>E. coli</i> aislado aglutinante con serogrupo 0132	0	1
<i>E. coli</i> no aglutinantes con 0132 o 0103	24	2

Aislamiento, numeración e identificación. A partir de cada uno de los conejos utilizados se realizó una extracción de contenido cecal, el cual fue diluido en 10 ml., de solución Ringer. Tras agitarse y filtrarse sobre una gasa estéril, se realizaron diluciones sucesivas a 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} y 10^{-10} , sembrándose 1 ml. de cada dilución en gelatina con lactosa-desoxico-lato y contabilizándose las colonias por gramo del contenido del ciego.

Paralelamente a la numeración, se realizó un aislamiento de contenido cecal en medio de Drigalsky. Las colonias productoras de lactosa se caracterizaron mediante el test API 20 E. La prueba de aglutinación sobre porta permitió señalar los serogrupos 0 103 y 0 132. Las distintas cepas fueron conservadas en un medio adecuado para la conservación de las cepas del Instituto Pasteur y a la temperatura de 4°C.

Estudio de la sensibilidad ante los antibióticos. Para el control se utilizó el método de difusión en gelatina; la determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias se efectuó en un medio sólido para la Amoxicilina y Ticarcilina, según el método de Steers.

El medio utilizado fue la gelatina de Muller-Hinton del Instituto Pasteur, en la que las concentraciones crecientes de antibióticos se incorporaron a 10 microlitros de un cultivo que contenía 10^6 bacterias por ml sobre la superficie de la placa. Las C.M.I. se leyeron después de 24 horas a 37° de temperatura.

Investigación de la presencia de una betalactamasa. Para las cepas resistentes a las betalactaminas, la producción de betalactamasas se puede poner en evidencia utilizando un método de difusión en gelatina: un disco con 25 mcg de amoxicilina y un disco de la asociación amoxicilina (20 mcg) más ácido clavulánico (10 mcg) fueron utilizados para cada cepa. Si la cepa resultaba resistente a la amoxicilina y sensible a la asociación

amoxicilina + ácido clavulánico indicaba que la cepa era productora de una penicilinasa de origen generalmente plasmático.

Estudio del soporte de la betalactamasa y factor de virulencia (colonización del ciego).

Transporte por conjugación:

La primera operación es la obtención de mutantes cromosómicos con respecto a cada antibiótico para cepas de *E. coli* receptoras o donantes.

Se decidió utilizar mutantes resistentes a la rifampicina para las cepas receptoras y obtener mutantes resistentes al ácido nalidíxico para las donantes. Estas características de resistencia permiten realizar fácilmente antibiogramas de diversas cepas transferidas e interpretar fácilmente los resultados.

La obtención de mutantes se ha realizado por siembra en placas de gelatina que contengan 300 mg/litro de rifampicina o 150 mg/litro de ácido nalidíxico.

Además de estos estudios se efectuaron extracciones de ADN plasmídico e infecciones experimentales con variedades portadoras de plásmidos con antibiorresistencia.

Resultados

Los análisis realizados sistemáticamente durante 6 meses en el Laboratorio de los Servicios Veterinarios del Puy-de-Dome, señalaron que el 26% de los animales presentaban en el ciego un mínimo de 10^6 *E. coli* por g -12 cepas-, conforme viene señalado en las tablas 1 y 2. Es de destacar que se detectaron los siguientes hechos:

-9 de cada 11 variedades de *Escherichia coli* 0 103 resultaron estar en situación patógena.

-Sólo 1 *Escherichia coli* 0 132 se halló como patógeno y procedía de un conejar tradicional.

-Los *Escherichia coli* 0103 fueron aislados

más a partir de granjas racionales que de conejares tradicionales.

Especificidad de los serogrupos 0 103 y 0 132 para el conejo. Todos los colibacilos de origen animal aislados durante algunas semanas en 1987, fueron estudiados con los antisueros 0103 y 0132. Los resultados obtenidos, agrupados en la tabla 3 muestran que

pues que los serotipos 0 103 son específicos de los lagomorfos. El serogrupo 0132 se identificó en un criadero industrial de pintadas.

Sensibilidad de las cepas a los antibióticos. El balance de la sensibilidad ante seis antibióticos, de las 12 estirpes de *E. coli* aisladas en 1987, presentan una numeración alta como puede apreciarse en la tabla 4.

Tabla 3. Ensayo de aglutinación de los *E. coli* 0103 y 0132 a partir de aislamientos en animales diversos

Origen de las cepas	N.º de <i>E. coli</i>	0103 positivo	0132 positivo
cordero	6	0	0
ternero	2	0	0
oveja	1	0	0
pollo	10	0	0
pintada	5	0	1
pollito	2	0	0
perro	1	0	0
cobayo	1	0	0
liebre	3	1	0
hombre	16	0	0

el serogrupo 0 103 también fue señalado en una liebre procedente de un cunicultor que también producía animales de este tipo. En el cuadro de nuestra experimentación parece

Si se compara la frecuencia de resistencias a las de 41 cepas procedentes de animales diarréicos, observamos cómo hay una regularidad en los resultados -tabla 5-. Observamos

Tabla 4. Frecuencia de resistencia a algunos antibióticos de 12 cepas de *E. coli* aislados en 1987

Antibiótico ensayado	N.º de cepas resistentes	% de resistencia
Carbenicilina	4	33%
Neomicina	6	50%
Tetraciclinas	12	100%
Trimetoprim-sulfa	2	16%
Colistina	0	0%
Ácido nalidíxico	0	0%

Tabla 5. Frecuencia de resistencia de 41 cepas de *Escherichia coli* 0103 frente a diversos antibióticos

Antibiótico	N.º de cepas resistentes	% de resistencia
Carbenicilina	9	22%
Neomicina	11	27%
Tetraciclinas	29	71%
Trimetoprim + Sulfa	16	39%
Colistina	0	0%
Ácido nalidíxico	0	0%

en particular cómo ciertas cepas son resistentes a la carbenicilina. Estas resistencias se deben a aparición reciente y no puede explicarse por el papel selectivo de la betalactamina, pues dicho antibiótico no había sido utilizado nunca en terapéutica de los conejos.

Estudio de la resistencia a las betalactaminas. Las concentraciones mínimas inhibidoras de la amoxicilina y de la ticarcilina ante las 12 cepas de *Escherichia coli* precedentes y de las 41 cepas de O 103 demuestran que el 74% de las mismas fueron sensibles a la Amoxicilina (CMI <1 mcg/ml) y a la Ticarcilina (CMI < 4 mcg/ml).

Las 13 cepas resistentes a estas betalactaminas presentaron las CMI de 32 a 512 y de 128 a 1.024 respectivamente para la amoxicilina y la ticarcilina debidas sin duda a la presencia de una betalactamasa tipo penicilinasa, pues dichas cepas son sensibles en presencia de betalactamasa.

Búsqueda y localización de los genes que intervienen en la síntesis de las betalactamasas y que permiten una colonización en el contenido cecal. En un primer momento se ha logrado transferir la resistencia a las betalactaminas; la cepa de *E. coli* número 989 multiresistente, aislada en una concentración de 10^{10} gérmenes por gramo de contenido cecal se utilizó como estirpe donante, y la cepa número 568 aislada de un contenido cecal de sólo 10^4 colibacilos y sensible a todos los antibióticos actuó como receptora.

Los transjugantes obtenidos producen betalactamasa, son resistentes a la amoxicilina y ticarcilina, pasando a ser además resistentes a la Neomicina y al cloranfenicol.

Conclusión

El análisis de los resultados señala con respecto a ciertas cepas de *E. coli* aisladas en los conejos que éstas son poseedoras de resistencias múltiples a los antibióticos y de forma muy particular ante las betalactaminas. Sería interesante estudiar el enzima resultante de esta resistencia en todas las variedades para saber si el origen de este fenómeno es idéntico sea cual sea el tipo de granja y su origen geográfico y si esta enzima posee un perfil de actividad tipo penicilinas.

Hay una tendencia a enviar los animales para identificar la presencia de la cepa O 103; nuestra experiencia tiende a mostrar que la virulencia de determinadas cepas no se debe únicamente a la naturaleza o características de la pared bacteriana -antígeno O- sino a factores genéticamente codificados por un plásmido autotransplantado. La cepa 568, no patógena, después de ser transplantada con un plásmido de la cepa patógena número 989 se hizo capaz de colonizar el ciego como lo hacía esta última.

Estudios ulteriores deberían precisar si estos genes codifican la síntesis de proteínas en superficie, permitiendo la adhesividad de las bacterias o la producción de toxinas.

Estas consideraciones harían pues necesario un recuento de los *E. coli* del ciego de forma sistemática, estableciendo el diagnóstico serológico en función de los recuentos superiores a 100.000 colibacilos por gramo de contenido cecal. Este protocolo permitiría supervisar de cerca la persistencia o la aparición de nuevas resistencias antibióticas en las cepas patógenas del conejo.

