

## Artículos originales completos

### Evaluación de una preparación vacunal que contiene los antígenos fimbriales purificados K88ab y K99, en cerdos

I. WONG,<sup>1</sup> M. MORENO,<sup>1</sup> E. BOVER,<sup>1</sup> R. BASULTO,<sup>1</sup> S. VALDERRAMA,<sup>1</sup> A. BORROTO,<sup>1</sup> L. CALZADA,<sup>1</sup> G. FERNÁNDEZ,<sup>1</sup> M. MOLERIO,<sup>1</sup> L. HERRERA,<sup>2</sup> R. SILVA<sup>3</sup> y J. DE LA FUENTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 387, Camagüey 1, Cuba

<sup>2</sup> Agrupación de Genética de Células de Mamíferos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

<sup>3</sup> Agrupación de vacunas y medios de diagnóstico, CIGB, La Habana, Cuba

Recibido en mayo de 1991

Aprobado en diciembre de 1991

#### RESUMEN

El presente trabajo reporta un estudio comparativo entre la bacterina MILECOL (CUBAVET, Cuba), la vacuna NOBIVAC PORCOLI (INTERVET, Holanda) y nuestro preparado vacunal VACOLI (CIGB, Cuba), compuesto por los antígenos K88ab y K99 purificados de cepas de *E. coli* enterotóxicas y adyuvados en adyuvante oleoso. Se aplicó una primera dosis intramuscular en las cerdas gestantes en la semana ocho de gestación y una reinmunización dos semanas antes del parto. El desafío de los cerdos neonatos se realizó con un número de bacterias viables correspondientes a 2DL<sub>50</sub>, de forma oral, empleándose cepas K88ab y K99 de referencia y cepas aisladas de cerdos enfermos. La respuesta inmunológica de las cerdas fue mayor en las vacunadas con NOBIVAC PORCOLI y con VACOLI, que en las vacunadas con la bacterina MILECOL. La protección de ambas vacunas fue de 100%, aunque el desarrollo con la cepa K99 autóctona provocó un cuadro diarreico severo en los cerditos nacidos de madres vacunadas con NOBIVAC PORCOLI. La vacuna MILECOL alcanzó solamente 29% de protección frente a la cepa K88ab de referencia y 33% frente a la cepa K88 aislada de cerdos enfermos provenientes de la provincia de Camagüey.

#### SUMMARY

This paper reports a comparative study between the bacterine MILECOL (CUBAVET, Cuba), the recombinant vaccine NOBIVAC PORCOLI (INTERVET, Holland), and our vaccine VACOLI

(CIGB, Cuba) composed by the purified enterotoxigenic *E. coli* K88ab and K99 antigens. Pregnant sows were vaccinated in the 8th week of pregnancy and revaccinated two weeks before the piglets were born. Piglets were challenged by oral administration of 2LD<sub>50</sub> of enterotoxigenic bacteria (isolated and reference K88ab and K99 *E. coli* strains). Immunological response was higher in the sows vaccinated with VACOLI and NOBIVAC PORCOLI. A 100% protection was achieved with both preparations.

However, the challenge with the isolated K99 *E. coli* strain caused a severe diarrhea in the piglets born from the NOBIVAC PORCOLI vaccinated sows. With the vaccine MILECOL only 29% and 33% protection were achieved, challenging with the reference and isolated K88ab strain respectively.

#### INTRODUCCION

La *E. coli* no patógena forma parte de la flora intestinal de los mamíferos y participa junto a otras bacterias en el sistema ecológico del intestino, sin embargo la *E. coli* enterotóxica se caracteriza por su proliferación en el intestino delgado y por la producción de enterotoxinas que estimulan la secreción de fluidos por el intestino delgado.

Varios autores han demostrado que la *E. coli* enterotóxica puede provocar graves pérdidas en los lechones durante el período neonatal en la primera semana de nacidos, donde surge una diarrea permanente y en algunos casos acompañada de una alta tasa de mortalidad (Sojka, 1971; Lariviere y Lallier, 1976). En las dos semanas siguientes al posdestete, vuelve a presentarse nuevamente la enfermedad de forma aguda o sobreaguda, causando la muerte antes de observarse la diarrea.

La alta virulencia de las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas se debe, principalmente, a su capacidad para colonizar el intestino delgado. Esto está relacionado con la presencia de protuberancias tipo fimbrias o pilis en su superficie, las que permiten a la bacteria adherirse a los bordes pilosos de las vellosidades intestinales. El peristaltismo normal del intestino no puede eliminar las bacterias adheridas cuya rápida multiplicación puede producir altas concentraciones de enterotoxinas, dando lugar a la diarrea y a la muerte.

Durante mucho tiempo, el antígeno de adherencia K88 con sus variantes *ab* y *ac*, estuvo relacionado con la producción de toxinas y con la diarrea neonatal (Lariviere y Lallier, 1976; Renault *et al.*, 1977; Guinee y Jansen, 1979). Posteriormente se encontraron otros factores de adherencia K99, F41 y 987P (Nagy *et al.*, 1978; Rozemond, 1977; Isaacson *et al.*, 1979; Isaacson y Richter, 1981; Smyth *et al.*, 1981; Graaf y Roorda, 1982; Morris *et al.*, 1982). Varios grupos han encaminado sus esfuerzos hacia el desarrollo de vacunas contra esta enfermedad, las cuales comprenden biopreparados con bacterias atenuadas (Moon, 1981; Avila *et al.*, 1986; Gyimah *et al.*, 1984), extractos semipuri-

ficados de antígenos pertenecientes a las cepas circulantes en una región (Snodgrass *et al.*, 1982) y las desarrolladas por la tecnología del ADN recombinante (Isaacson, 1985).

En este trabajo se estudia comparativamente un preparado vacunal compuesto por los antígenos fimbriales K88ab y K99, purificados a partir de cepas de *E. coli* enterotóxicas (VACOLI, CIGB, Cuba) con la bacterina MILECOL (CUBAVET, Cuba) compuesta por células enteras de los serogrupos 0139, 0147 y 0149, positivos a K88, atenuadas con fenol y ayudadas con hidróxido de aluminio. Además se incluyó en el estudio la vacuna NOBIVAC PORCOLI (INTERVET, Holanda) que contiene los antígenos recombinantes purificados K88ab, K88ac, K99 y 987P.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas de bacterias

Se emplearon las cepas de referencia G7(08K87K88ab) y B44(09K30K99), ambas donadas por el Dr. A. Talavera (CENSA). Cepas portadoras de antígenos K88ab y K99 aisladas en las unidades porcinas de la provincia de Camagüey (Cuba) y empleando como medio selectivo el *MacConkey* Agar. En la caracterización de las cepas se utilizó el método de Edwards y Ewing (1972) para su clasificación como *E. coli*.

### Medio de cultivo

Como medio de cultivo se empleó el MINCA utilizado por Graaf y Roorda (1982). Las condiciones de cultivo para obtener los antígenos purificados fueron evaluados según lo propuesto por Jacobs y Graaf (1985).

### Esquema de inmunización y desafío

El esquema de inmunización que se siguió para el caso de nuestro preparado vacunal VACOLI y para la NOBIVAC PORCOLI, fue el de una primera dosis en la semana 8 de gestación y una

reestimulación en la semana 14, ambas aplicaciones intramuscularmente. En el caso de la bacteria MILECOL, como recomienda el productor, se aplicó una sola dosis subcutánea en la semana 13 de gestación.

Los niveles de anticuerpos presentes en las cerdas al inicio y al final de las inmunizaciones fueron determinados mediante un ELISA tipo *sandwich*, utilizando en el recubrimiento 620 ng/mL de los antígenos purificados (100 µL/pocillo) y en el revelado anti-IgG de cerda en conejo marcado con peroxidasa (E. Bover, resultados sin publicar).

El desafío de los lechones se realizó antes de que ingirieran calostro y durante las primeras 7 h de nacidos. Las cepas utilizadas fueron las K88ab y K99 aisladas y de referencia en el caso de las camadas procedentes de cerdas vacunadas con NOBIVAC PORCOLI o VACOLI. Para las camadas inmunizadas con MILECOL, se realizó el desafío con las cepas K88ab, pues esta bacterina está formada sólo por cepas de este tipo. Tanto a las camadas procedentes de cerdas vacunadas como a las procedentes de cerdas controles (no vacunadas), se les suministró de forma oral el número de células viables correspondientes a 2 DL<sub>50</sub> (tabla 1), calculado para cada cepa. Todas las dosis se aplicaron con sonda gástrica y en un volumen de 10 mL.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Determinación por ELISA de la respuesta inmunológica

De acuerdo con los esquemas de inmunización propuestos para cada una de las vacunas, se determinó la respuesta inmunológica en cada uno de los casos. Las figuras 1 y 2 muestran los niveles de anticuerpos contra K88ab y K99 alcanzados en el suero de las cerdas vacunadas antes del parto.

En la figura 2 se observa un incremento significativo de los niveles de anticuerpos en los sueros de las cerdas vacunadas con NOBIVAC PORCOLI y VACOLI, pues todas alcanzaron un título de hasta 1/3 200, tanto contra K88ab como contra K99, mientras que las cerdas vacunadas con la bacterina MILECOL presentaron niveles de anticuerpo menor contra K88ab (figura 3).

**Tabla 1**  
NUMERO DE CELULAS VIABLES EMPLEADAS EN EL DESAFIO DE LOS CERDOS NEONATOS

Cepas	Dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) células viables	Número de células viables aplicadas en el ensayo
K88 aislada	1,16 x 10 <sup>10</sup>	2,32 x 10 <sup>10</sup>
K99 aislada	1,56 x 10 <sup>10</sup>	3,12 x 10 <sup>10</sup>
Mezcla de ambas cepas aisladas	1,09 x 10 <sup>10</sup>	2,18 x 10 <sup>10</sup>
K88ab de referencia (G-7)	2,69 x 10 <sup>10</sup>	5,38 x 10 <sup>10</sup>
K99 de referencia (B44)	1,30 x 10 <sup>10</sup>	2,60 x 10 <sup>10</sup>

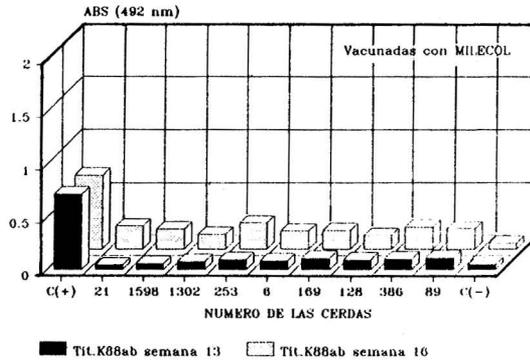
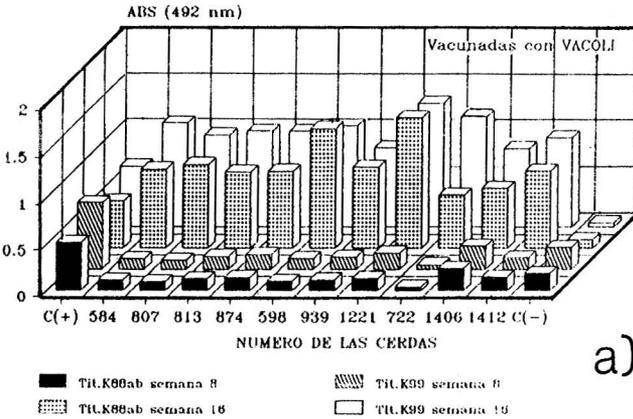
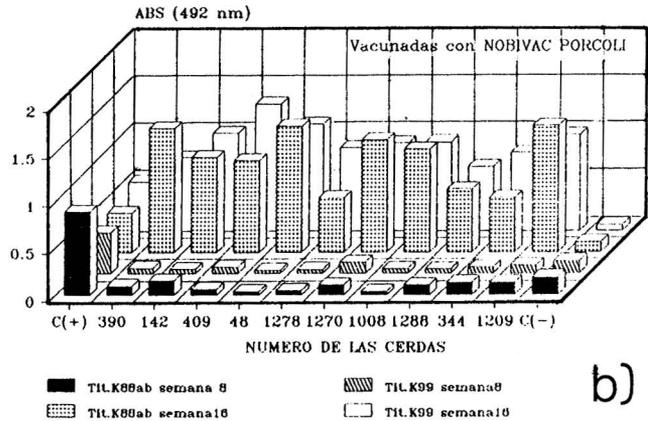


FIG. 1. Título de anticuerpos contra el antígeno K88ab en el suero de cerdas vacunadas con la bacterina MILECOL (CUBAVET, Cuba). El título de anticuerpos se determinó por ELISA a las 13 y 16 semanas de gestación. Como controles positivo (C+) y negativo (C-) se emplearon cerdas vacunadas con 50-100 µg de los antígenos purificados K88ab y K99, y cerdas no vacunadas y sin presencia de anticuerpos contra estos antígenos, respectivamente.



a)



b)

FIG. 2. Título de anticuerpos contra los antígenos K88ab y K99 en el suero de cerdas vacunadas con la vacuna VACOLI (CIGB, Cuba) y NOBIVAC PORCOLI (INTERVET, Holanda). El título de anticuerpos se determinó por ELISA a las 8 y 16 semanas de gestación. Como controles positivo (C+) y negativo (C-) se emplearon los mismos descritos en la figura 1.

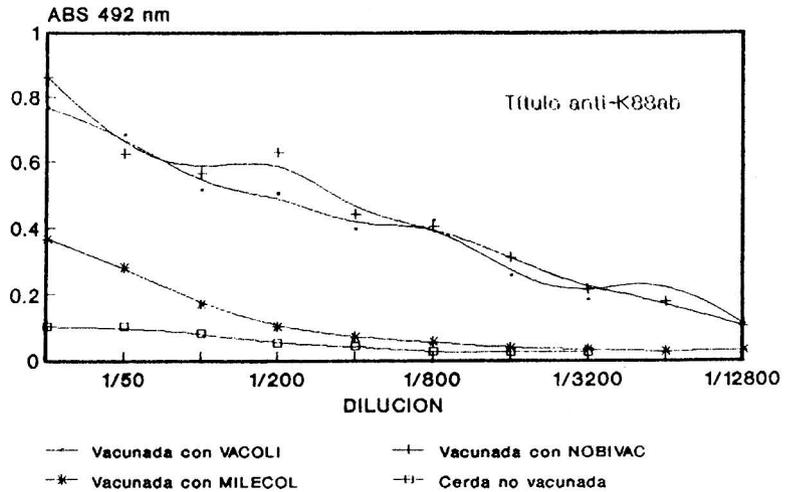
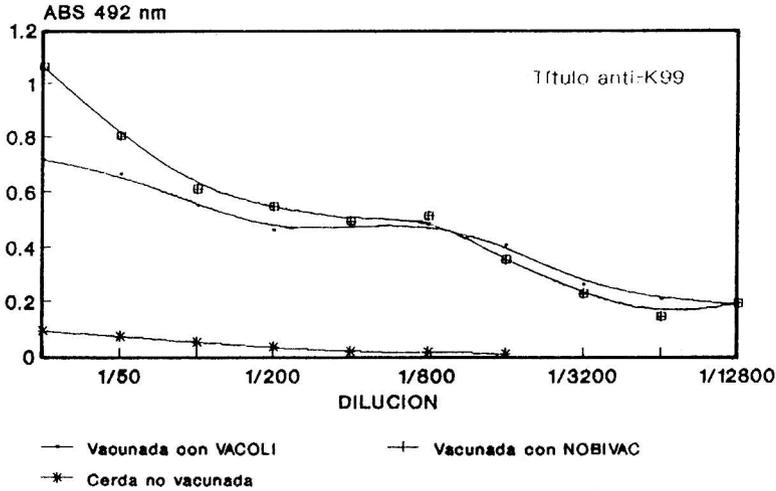


FIG. 3. Título de anticuerpos frente a los antígenos K88ab y K99 alcanzado en el suero de las cerdas vacunadas (según figuras 1 y 2, las cerdas se corresponden con los números: 253, MILECOL; 813, VACOLI; 48, NOBIVAC PORCOLI). El suero fue diluido en 0,5% de leche descremada (Oxoid)/95% PBS y el título de anticuerpos se determinó por ELISA en la semana 16 de la gestación.

De igual forma, las cerdas que presentaron altos títulos de anticuerpos en el suero, presentaron también altos títulos en el calostro. En la figura 4 se muestra el título (1/100) contra K88ab alcanzado en el calostro de las cerdas vacunadas con la bacterina MILECOL, mientras que el alcanzado por las cerdas

vacunadas con VACOLI y con NOBIVAC PORCOLI fue de hasta 1/1 600.

La determinación de anticuerpos contra K99 en el calostro se realizó a las muestras de las cerdas vacunadas con VACOLI y NOBIVAC PORCOLI, obteniéndose un mayor título en el calostro de las cerdas vacunadas con VACOLI (figura 4).

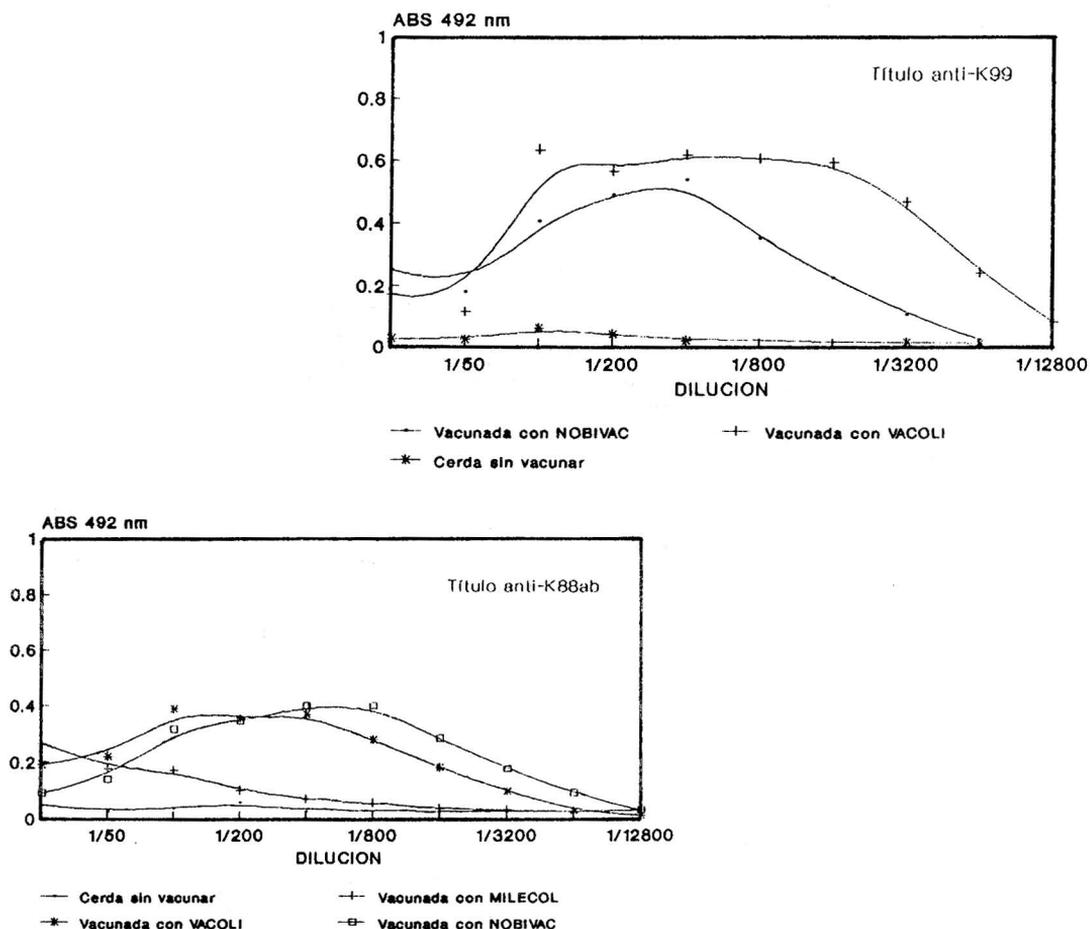


FIG. 4. Título de anticuerpos frente a los antígenos K88ab y K99 alcanzado en el calostro de las cerdas vacunadas (las cerdas son las mismas de la figura 3). El calostro fue diluido en 0,5% de leche descremada (Oxoid)/95% PBS y el título de anticuerpos se determinó por ELISA en las primeras 24 horas después del parto.

### Respuesta de los cerditos frente al desafío con las cepas de *E. coli* enterotóxicas

En las pruebas de desafío se utilizó una camada de cerditos completa para cada una de las cepas de *E. coli*. La tabla 1 muestra el número de células viables de *E. coli* enterotóxicas aplicadas oralmente.

El cuadro clínico de cada cerdito fue evaluado durante los primeros cinco días posteriores al desafío, comprobándose que

la única causa de las diarreas presentes fue la infección por *E. coli*. En las camadas vacunadas con MILECOL se presentó un cuadro diarreico grave en las primeras horas después del desafío, el cual se fue agudizando hasta causar la muerte en algunas crías. Las camadas vacunadas con VACOLI y NOBIVAC PORCOLI, a diferencia de los grupos controles y de las vacunadas con MILECOL, tuvieron una diarrea leve el primer día después del desafío con las cepas K88ab. En pocos

casos esta se extendió hasta el segundo día, tiempo a partir del cual se eliminó totalmente. Posteriormente al desafío, el cuadro diarreico en las camadas vacunadas con VACOLI fue clasificado de leve en el primer día para el grupo desafiado con la cepa de referencia y de diarrea moderada para el grupo desafiado con la cepa aislada. En ambos grupos no se detectaron diarreas al tercer día.

Los grupos provenientes de cerdas vacunadas con NOBIVAC PORCOLI presentaron un cuadro diarreico diferente, ya que frente al desafío con la cepa de referencia K99 se detectaron pocos casos con diarrea leve, mientras que en el desafío frente a la cepa aislada K99 se mantuvo una diarrea grave en casi toda la camada hasta el tercer día después del desafío, la cual comenzó a disminuir a partir del cuarto día. Este resultado parece indicar que el poder neutralizante de los anticuerpos frente a la cepa aislada K99 fue menor en el grupo proveniente de madres vacunadas con VACOLI.

La respuesta al desafío frente a la mezcla de las cepas aisladas K88ab y K99 fue positiva en el grupo de los lechones vacunados con VACOLI, pues no se

presentó diarrea alguna. Sin embargo, en el grupo vacunado con NOBIVAC PORCOLI, el cuadro diarreico se mantuvo agudo hasta el tercer día. Esto puede explicarse por estar incluida en esta mezcla la cepa aislada K99 para la cual no hubo un alto poder neutralizante en el desafío anterior. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de protección alcanzado con las tres vacunas frente a cada una de las cepas utilizadas en el desafío.

## CONCLUSIONES

Las vacunas VACOLI y NOBIVAC PORCOLI produjeron una mayor respuesta inmunológica que la bacterina MILECOL, pues se alcanzaron títulos de 1/3 200 en el suero y 1/1 600 en el calostro de las cerdas vacunadas, tanto contra K88ab como contra K99 a diferencia de la MILECOL que alcanzó títulos de 1/100, en el suero y en el calostro.

La vacuna VACOLI, igual que la NOBIVAC PORCOLI, ofrece un 100% de protección en las crías desafiadas con las cepas K88ab y K99 circulantes en Cuba (provincia de Camagüey).

**Tabla 2**  
**RESULTADOS DEL DESAFIO CON CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. COLI DE CERDOS NEONATOS PROVENIENTES DE MADRES VACUNADAS Y NO VACUNADAS**

Vacunas evaluadas	Cepas utilizadas en el desafío																													
	K88 Aislada Cerdas			K99 Aislada Cerdas			Mezcla de K88 y K99 Cerdas			K88ab (G-7) Cerdas			K99 (B44) Cerdas																	
	vacunadas			control			vacunadas			control			vacunadas			control														
	n	P	M	n	P	M	n	P	M	n	P	M	n	P	M	n	P	M												
MILECOL	6	33	67	7	14	86	-	-	-	-	-	-	7	29	71	8	50	50	-	-	-									
VACOLI	11	100	0	9	0	100	10	100	0	8	12	88	10	100	0	10	0	100	7	100	0	9	55	45	6	100	0	8	0	100
NOBIVAC PORCOLI	7	100	0	7	0	100	9	0	100	9	0	100	8	100	0	8	0	100	6	100	0	9	55	45	6	100	0	8	0	100

En los casos desafiados con la cepa K99 aislada, la vacuna VACOLI mostró una protección más rápida que la vacuna NOBIVAC PORCOLI.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. A. Talavera por las cepas de referencia de *E. coli*. A quienes en la provincia de Camagüey y en el CIGB colaboraron con este trabajo, nuestro mayor agradecimiento.

## REFERENCIA

- AVILA, F.A.; S.H.P. AVILA; R.P. SCHOCKEN ITURRINO y M.A. MARQUES (1986). Evidence of pili K88 and K99 as protecting antigens; enteric colibacillosis immunization against enteric swine colibacillosis by sow vaccination. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop.* **39**: 293-296.
- EDWARDS, P.S. y W.H. EWING (1972). *Identification of Enterobacteriaceae*. Vol. 1, Cap. 13. Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA.
- GRAAF, F.K. e I. ROORDA (1982). Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infection and Immunity* **36**: 751-758.
- GUINEE, P.A.M. y W.H. JANSEN (1979). Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *E. coli* strains of human, porcine and bovine origin; a comparative study. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A* **243**: 245-257.
- GYIMAH, J.E.; B. PANIGRAHY; C.F. HALL y J.D. WILLIAMS (1984). Immunogenicity of an oil-emulsified *Escherichia coli* bacterin against heterologous challenge. *Avian Diseases* **29**: 540-545.
- ISAACSON, R.E.; B. NAGY y H.W. MOON (1979). Colonization of porcine small intestine by *E. coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88. *J. Infect. Dis.* **135**: 531-539.
- ISAACSON, R.E. (1985). Development of Vaccines for Bacterial Diseases using Recombinant DNA Technology. *Avian Diseases* **30**: 28-36.
- ISAACSON, R.E. y P. RICHTER (1981). *E. coli* 987P pilus: Purification and partial characterization. *Journal of Bacteriology* **146**: 784-789.
- JACOBS, A.C. y F.K. DE GRAAF (1985). Production of K88, K99 and F41 fibrillae in relation to growth phase, and a rapid procedure for adhesin purification. *FEMS Microbiology Letters* **26**: 15-19.
- LARIVIERE, S. y R. LALLIER (1976). *E. coli* strains isolated from diarrhetic piglets in the province of Quebec. *Can. J. Comp. Med.* **40**: 190-197.
- MOON, H.W. (1981). Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: evidence of pili as protective antigens. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 173-177.
- MORRIS, J.A.; W.J. SOJKA y G.A.H. WELLS (1982). K99 and 987P adhesins on *E. coli* enteropathogenic strains for piglets. *Vet. Rec.* **111**: 165-166.
- NAGY, L.K.; P.D. WALKER; B.S. BHOGAL y T. MACKENZIE (1978). Evaluation of *E. coli* vaccines against experimental enteric colibacillosis. *Res. Vet. Sci.* **24**: 37-45.
- RENAULT, L.; D. MATHIEU y E. LE BOURHIS (1977). Detecting enteropathogenic *E. coli* strains of porcine origin. Correlations between O and K antigens and the enterotoxins productions in strains isolated from the newborn piglet. *Ann. Rech. Vet.* **8**: 319-325.
- ROZEMOND, H. (1977). Neonatal *E. coli* enterotoxigenesis in pig and calf induced by a K99 strain. *Tijdschr. Diergeneesk.* **102**: 383-385.
- SMYTH, C.J.; E. OLSSON; C. MONCALVO; O. SODERLIND; F. ORSKOV e I. ORSKOV (1981). K99 antigen-positive enterotoxigenic *E. coli* from piglets with diarrhea in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 252-257.
- SNODGRASS, D.R.R.; L.K. NAGY; D. SHERWOOD y CAMPBELL (1982). Passive immunity in calf diarrhea. Vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. *Infection and Immunity* **37**: 586-591.
- SOJKA, W.J. (1971). Enteric diseases in new born piglets, calves and lambs due to *E. coli* infection. *Vet. Bull.* **41**: 509-522.