

Criofractura para la obtención de necrotoxinas producidas por *E. coli* necrotizante

Guillermo Barreto Argilagos*, Ana Campal Espinosa**, Raquel Idania Hernández Cisneros*** y Martha Sedrés Cabrera***

* Centro de Estudio para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey

** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey

*** Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología Mártires de Pino 3, Camagüey

Resumen

Se utilizó el método de la criofractura como sustituto del ultrasonido y de medios con mitomicina C para la obtención de los factores necrotizantes citotóxicos (FNC) a partir de 6 cepas de *E. coli* hemolíticas y portadoras de fimbria P (2 aisladas de alimentos y 4 de niños diarreicos menores de 5 años). La diferenciación de las toxinas FNC1 y FNC2 se realizó mediante el ensayo de inoculación en la planta de la pata de ratones. Las 6 cepas pueden considerarse necrotizantes: 5 productoras de FNC2 y la restante de FNC1. Con excepción de una cepa FNC2⁺, todas resultaron letales. Los resultados demuestran la posibilidad de aislar FNC mediante criofractura. Este método constituye una opción para el estudio de *E. coli* necrotizante en medicina veterinaria, teniendo en cuenta el papel de los bovinos y cerdos en el destete como reservorios de esta categoría potencialmente zoonótica.

Abstract

Cryofracture was substituted for mitomycin C to obtain cytotoxic necrotic factors (CNF) out of six hemolytic and P fimbria-carrier *E. coli* strains (two of them isolated from meals and four from diarrheic children under five years old). Differentiation of CNF1 and CNF2 toxins was performed through foot mouse inoculation. The six *E. coli* strains proved their necrotic character: five producing CNF2 and the other, CNF1. Except CNF2⁺ strain, the remaining ones were lethal. Results showed the possibility of isolating CNF necrotoxins through cryofracture. Therefore, this method can be an option to study necrotic *E. coli* in veterinary medicine, taking into account the role played by bovines as a reservoir of this potentially zoonotic category.

Palabras clave: *E. coli*, *E. coli* necrotizante (ECNT), necrotoxinas, factor necrotizante citotóxico (FNC), diarreas

Introducción

Caprioli *et al.* (1983) encontraron una toxina en cepas de *E. coli* hemolíticas aisladas de niños con enteritis que poseía actividad necrotizante en piel de conejo y provocaba la aparición de células gigantes multinucleadas en líneas celulares HeLa, Vero, CHO y otras, (Caprioli *et al.*, 1983; 1984; Ruggeri *et al.*, 1986; Blanco y Blanco, 1993) a la que denominaron factor necrotizante citotóxico (FNC). La excreción de estas toxinas sólo tiene lugar con la lisis de la célula bacteriana. A las cepas de *Escherichia coli* productoras de FNC se les denominó *E. coli* necrotizantes (ECNT) (González y Blanco, 1989).

Han sido identificadas dos tipos de FNC (FNC1 y FNC2). Ambas toxinas causan daños irreversibles a las células por dehidratación de las proteínas de unión al GTP - Rho, provocando, entre otros procesos, la hidrólisis del GTP y la activación permanente de pequeñas GTPasas que regulan la fisiología del citoesqueleto (de Rycke *et al.* 1999, Boquet, 2001). Las toxinas son diferenciables por métodos inmunológicos, citológicos y biológicos. Una eficaz prueba biológica para determinar la letalidad y necrosis de las

toxinas es el ensayo de la planta de las patas de ratón (Mouse Footpad Test, MFPT) (Blanco y Blanco, 1993).

La participación de las ECNT en los procesos entéricos no está bien definida. Su aislamiento en muestras de cerdos diarreicos es un evento raro; mientras que es frecuente en las procedentes de terneros con esta etiología (Blanco *et al.*, 1988). Estas últimas, a diferencia de las humanas y porcinas, no son hemolíticas (Blanco y Blanco, 1993).

Se ha reportado que las cepas FNC2⁺ colonizan los intestinos, causando diarreas de larga duración e invasión extraintestinal, cuando son administradas por vía oral, de forma experimental, a terneros neonatos que no han recibido calostro (Van Bost *et al.*, 2003). Adicionalmente, en un estudio realizado por el mismo autor (Van Bost *et al.*, 2001) con muestras aisladas de terneros con diarreas entre 1958 y 1976, se determinó que el 8 % fue positivo a CNF por hibridación de colonias. La mayoría expresaban FNC2.

Hasta la fecha no existe un estudio epidemiológico extenso que demuestre la asociación entre cepas de *Escherichia coli* productoras de FNC y las enfermedades diarreicas en humanos. Se ha comprobado su presencia en el 5 al 7 % de pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA) y en el 0,9 al 5 % de personas sanas (Blanco y Blanco, 1993, Tavechio *et al.*, 2004). Sin embargo, su participación en las infecciones del tracto urinario (ITU) se acepta unánimemente (Blanco y Blanco, 1993; Rippere-Lampe *et al.*, 2001).

Los animales son el principal reservorio de estas cepas. Un estudio reciente en el que se caracterizaron aislamientos de *Escherichia coli* FNC⁺ de cerdos al destete, demostró que la mayoría de las cepas con ese genotipo, pertenecían a los serogrupos O2, O6, O8 y O54, característicos de ECNT presentes en humanos, las que poseían además los genes para fimbrias P, S o ambas; mientras eran negativas para F4, F17 o F18 (Toth *et al.*, 2000). Ello refuerza la idea de que estos aislamientos pueden tener un importante potencial zoonótico en humanos.

Tomando en cuenta que el MFPT constituye una de las variantes más confiables para la detección y diferenciación de FNC, pero para ello se precisa de los extractos libres de células obtenidos con el auxilio de ultrasonido, o mediante la adición de mitomicina C al medio de cultivo (Blanco y Blanco, 1993) se decidió obtener FNC, potencialmente presente en cepas de *Escherichia coli* hemolíticas y portadoras de fimbria P, a partir del método de la criofractura y verificar si: 1) el método era válido, 2) las cepas seleccionadas eran compatibles con ECNT.

Materiales y métodos

Aislamientos de la cepa: En estudios precedentes (Barreto *et al.*, 2000a) se aislaron 105 cepas de *E. coli* a partir de alimentos diversos y 226 de niños menores de 5 años afectados de EDA (Barreto *et al.*, 2001). Luego de aplicar los esquemas de diferenciación necesarios para identificar a las cepas enteropatógenas (Barreto *et al.*, 1999; 2000b) quedaron 47 cepas (16 procedentes de alimentos y 31 humanas), todas hemolíticas, no clasificadas en esta categoría, las que crecían en los medios agar sangre y agar eritrocitos lavados (Barreto *et al.*, 1999). De éstas, se seleccionaron al azar 9 de las primeras y 16 de las aisladas de niños y se les realizó una seroaglutinación rápida (Blanco y Blanco, 1993) ante un suero monoclonal anti-Pap A (elaborado en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey) para establecer la presencia de fimbrias P. De las cepas positivas a este ensayo se tomaron 2 procedentes de alimen-

tos y 4 de humanos, todo al azar, y se conservaron en caldo Mueller-Hinton con glicerina al 30 % y a una temperatura de 20 °C .

Tratamiento de criofractura: Para establecer la posible presencia de FNC, las cepas conservadas en Mueller-Hinton se sometieron a un tratamiento de criofractura acorde con lo propuesto para la obtención de otras toxinas (Blanco y Blanco, 1993) y con las siguientes modificaciones: Se inocularon las cepas en 12 mL de TSB en tubos de cristal (4 tubos por cepa) y se incubaron a 37 °C , con rotación en agitador circular de tubos (500 rpm), durante 24 horas. Luego de centrifugar a 1000 rpm por 20 minutos a 4 °C se desechó el sobrenadante y se disolvió el pellet en 1 mL de PBS 1x con penicilina rápida (penicilina procaínica más bencilpenicilina de potasio de la firma MEHECO) (100 unidades/mL) y estreptomocina (sulfato de estreptomocina para inyección, de la firma MEHECO) (1 µg/mL).

Para la criofractura, la anterior suspensión se congeló durante 12 horas a -20 °C con descongelación lenta a temperatura ambiente (3 horas). El proceso se repitió una vez más. Con ello se logró el fraccionamiento bacteriano. Las posibles necrotoxinas se separaron de los restos bacterianos mediante centrifugación a 1 000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se guardó a 4 °C durante 3 días.

Ensayo de actividad biológica: Con los extractos obtenidos se comprobó la letalidad y tipo de necrosis de las toxinas mediante el ensayo de inoculación en la pata de la pata del ratón (Mouse Footpad Test; MFPT) (Blanco y Blanco, 1993). Para cada cepa se utilizaron 7 ratones, uno de los cuales actuó como control.

Resultados y Discusión

El ensayo MFPT (tabla) demostró que la totalidad de las cepas investigadas (6) corresponden a la categoría ECNT. De ellas, 3 procedentes de pacientes con EDA y las obtenidas a partir de alimentos resultaron productoras de FNC2 ya que, 24 horas después de inoculadas, provocaron inflamación y necrosis, reacciones que caracterizan a este tipo de toxina (Blanco y Blanco, 1993). En todos los casos la reacción inflamatoria provocó un engrosamiento de alrededor del 85 % del grosor original de la pata.

Una de las cepas de origen humano resultó productora de FNC1 lo que se evidenció por la respuesta inflamatoria observada en los 6 ratones inoculados sin que ninguno mostrara signos de necrosis. Esto se corresponde con lo reportado por investigadores con experiencia en esta temática (Blanco y Blanco, 1993).

Cuatro (80 %) de las cepas ECNT FNC2⁺ causaron letalidad a las 48 horas post inoculación, al morir 23 (95,83 %) de los 24 ratones inoculados. El sobreviviente murió a las 96 horas de iniciado el experimento. La única cepa FNC1⁺ mostró una letalidad del 100 % (tabla). Ambos resultados coinciden con lo reportado por varios autores (de Rycke *et al.*, 1990; Blanco y Blanco, 1993) aunque se han encontrado excepciones en cepas que expresan FNC1 aisladas de terneros diarreicos en España (Blanco y Blanco, 1993; Blanco *et al.*, 1995).

Nuestra investigación confirma la presencia de ECNT a partir de cepas de esta especie con un fenotipo Hly⁺ P⁺, procedentes de alimentos y pacientes de EDA, utilizando el método de criofractura como vía para obtener las toxinas FNC, en lugar de ultrasonido o medios con mitomicina C, y el MFPT como ensayo confirmatorio.

Los resultados sugieren que las ECNT forman parte de la flora normal del intestino de los animales, los que actuarían como reservorio, lo que explica su presencia en alimentos mal manipulados y pudieran constituir enteropatógenos en individuos con pobres

defensas antimicrobianas como los niños pequeños, animales recién nacidos y al destete e individuos inmunodeprimidos. La frecuencia de reportes donde se les da importancia a las ECNT como enteropatógenas se ha incrementado en los últimos años. De manera que la vigilancia epidemiológica sobre este tipo de bacterias debe de incrementarse para evitar brotes diarreicos de envergadura que pudieran provocar casos mortales en individuos inmunocomprometidos, tal y como ocurrió con *E. coli* verotoxigénico (ECVT), que también fueron considerados durante años parte de la microflora intestinal de humanos, terneros y cerdos (de Rycke *et al.*, 1990; Blanco y Blanco, 1993). Sin embargo, como patógenos oportunistas han provocado serias afectaciones a la salud humana, específicamente su variante enterohemorrágica ECEH, debido al consumo de alimentos de origen animal, principalmente bovino y aguas contaminadas, aspectos ampliamente documentados (Blanco y Blanco, 1993; Nataro y Kaper, 1998; Barreto *et al.*, 1998; Barreto y Benítez, 2000).

Resultados del ensayo de MFPT

Cepas	Inflamación	Necrosis	Letalidad
2H y 1A	+	+	+ ^a
1H	+	+	-
1H	+	-	+ ^a
1A	+	+	+ ^b
Controles	-	-	-

Leyenda: H: cepas de origen humano A: cepas de origen animal

a: los 6 ratones murieron en las primeras 24-48 horas

b: 5 ratones murieron en las 24-48 horas iniciales; el sexto lo hizo a las 96 horas

Referencias

BARRETO, G.; O. JIMENEZ Y S. DIAZ: *E. coli* verotoxigénico (VTEC): una nueva variedad, un nuevo riesgo. *Revista de Producción Animal*, 10 (anuario): 5-26, 1997-1998.

BARRETO, G.; M. SEDRÉS, A. ORTIZ Y M. RICARDO: Esquema para el diagnóstico de *E. coli* enterohemorrágico y otras categorías enteropatógenas a partir de alimentos, *Revista de Producción Animal*, 11 (anuario): 39-43, 1999.

BARRETO, G.; M. SEDRÉS, A. ORTIZ Y M. RICARDO: Categorías enteropatógenas de *E. coli* en alimentos, *Rev. prod. anim.*, 12: 87-90, 2000a.

BARRETO, G.; R. I. HERNÁNDEZ, A. ORTIZ, Y Y. SANTIAGO: Esquema para el diagnóstico de ECEH y otras categorías enteropatógenas de *E. coli* a partir de pacientes de EDA, *Archivo Médico de Camagüey*, 5 (1), 2000b. [Publicación electrónica].

BARRETO, G. Y T. BENÍTEZ: *E. coli* enterohemorrágico (ECHE). Algunas consecuencias de su presentación en el humano, *Archivo Médico de Camagüey*, 4 (2), 2000, [Publicación Electrónica].

BARRETO, G.; R. I. HERNÁNDEZ, A. ORTIZ Y Y. SANTIAGO: Presencia de *E. coli* enteropatógenas en pacientes con diarrea aguda, *Archivo Médico de Camagüey*, 5(2): 2001, [Publicación electrónica].

BLANCO, J.; E. A. GONZÁLEZ, S. GARCÍA, M. BLANCO, B. REGUEIRO, E. I. BERNÁZDEZ: Production of Toxins by *E. coli* Strains Isolated from Calves with Diarrhoea in Galicia (North-Western Spain), *Vet. Microbiol.*, 18: 297-311, 1988.

BLANCO, J. Y M. BLANCO: ETEC, NCEC y VTEC de origen humano y bovino, Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico, Servicio de Publicaciones Diputación Provincial San Marcos, pp. 35-48, 71-77; 104-107; 115-120; 173-176; 207-209, 235-239; 306-308; 310-316, Galicia, 1993.

BLANCO, J. E.; M. BLANCO Y J. BLANCO: ETEC, VTEC en alimentos y muestras clínicas. Papel de los animales como reservorios de cepas patógenas para el hombre, *Microbiología SEM* 11:97-110, 1995.

BOQUET, P.: The Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*, *Toxicon*, 39 (11): 1673-1680, 2001

CAPRIOLI, A.; B. FALBO, L. G. RODA, P. M. RUGGERI Y C. ZONA: Partial Purification and Characterization of an *E. coli* Toxic Factor that Induces Morphological Cell Alteration, *Infect. Immun.*, 39: 1300-1306, 1983.

CAPRIOLI, A.; G. DONELLI, B. FALVO, R. POSSETI, L. G. RODA, G. ROSCETI Y P. M. RUGGERI: A Cell-Division Active Protein from *E. coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118: 587-593, 1984.

DE RYCKE, J.; E. A. GONZÁLEZ, J. BLANCO, E. OSWALD, M. BLANCO Y R. BOIVIN: Evidence for Two Types of Cytotoxic Necrotizing Factor in Human and Animal Clinical Isolates of *E. Coli*, *J. Clin. Microbiol.*, 28: 694-699, 1990.

GONZÁLEZ, E. A. Y J. BLANCO: Serotypes and Antibiotic Resistance of Verotoxigenic (VTEC) and Necrotizing (NTEC) *E. Coli* Strains Isolated from Calves with Diarrhoea, *FEMS Microbiol. Lett.*, 60: 31-36, 1989.

NATARO, J. P. Y J. B. KAPER: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, 11 (1): 142-201, 1998.

RIPPERE-LAMPE, K. E.; M. LANG, M. CERI, E. OLSON, H. A. LOCKMAN, Y A. D. O'BRIEN: Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1-Positive *Escherichia coli* Causes Increased Inflammation and Tissue Damage to the Prostate in a Rat Prostatitis Model, *Infect. Immun.*, 10: 6515-6519, 2001.

RUGGERI, P. M.; C. FIORENTINI, A. CAPRIOLI, G. ARANCIA, V. FALBO Y G. DONELLI: Hep-2 Cells Multinucleation Induced by *E. Coli* Cytotoxic Factors. *IRCS Med. Sci.*, 14: 833-834, 1986.

TEVECHIO, A. T.; L. R. MARQUES, C. M. ABE Y T. A. GOMES: Detection of Necrotizing factor types 1 and 2 among Fecal *Escherichia coli* Isolated from Brazilia Children with and without Diarrhea, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99 (1): 81-83, Feb, 2004.

VAN BOST, S.; M.H. BABE, E. JACQUEMIN Y J. MAINIL. Characteristics of Necrotoxi-
genic *Escherichia coli* Isolated from Septicemic and Diarrheic Calves between 1958-
1970, *Vet. Microbiol*, 82 (4): 311-320, 2001.

VAN BOST, S.; S. ROELS, E. OSWALD Y J. MAINIL: Putative Role of the CNF2 and
CDT111 Toxins in Experimental Infections with Necrotoxicogenic *Escherichia coli* Type 2
(NTEC1) Strains in Calves, *Microbes Infect.*, 5 (13): 1189-1193, 2003.