

## Efectos de extractos de *Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora* sobre la viabilidad y expresión fimbrial (K88 y CFA/I) de *E. coli* enterotoxigénica

Guillermo Barreto Argilagos\* y Ana Campal Espinosa\*\*

\*Centro de Desarrollo de Producción Animal (CEDEPA), Universidad de Camagüey

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

### RESUMEN

El trabajo analiza las causas que motivaron los resultados contradictorios precedentes en cuanto a la expresión fimbrial de K88 y la viabilidad de *E. coli* G7 frente a extractos de *Eucalyptus*. En la experiencia se utilizaron 8 cepas entéricas (7 de referencia K88+ y una cepa salvaje CFA/I +). Se ensayaron 10 extractos (5 decocciones, 3 infusiones y 2 extractos acuosos) de *Eucalyptus citriodora* y *Eucalyptus saligna* elaborados a diferentes concentraciones. Se pudo comprobar que el efecto sobre la viabilidad depende de la especie de *Eucalyptus*, la concentración del extracto y la cepa bacteriana tratada. Ninguno de los extractos de *E. citriodora* tuvo acción sobre la viabilidad bacteriana. En los elaborados a partir de *E. saligna* este efecto fue proporcional a la concentración. El efecto inhibitorio de los extractos sobre K88 está relacionado con la especie de *Eucalyptus* y la concentración de los extractos. Todos los extractos que inhibieron K88 tuvieron un comportamiento semejante sobre CFA/I. El trabajo propone un modelo para el estudio de extractos de plantas que afecten la expresión fimbrial en el que los fenómenos de autoaglutinación no interfieren y no es imprescindible la utilización de técnicas de microscopía electrónica.

### ABSTRACT

Causes provoking contradictory results concerning *Eucalyptus* extracts effects upon K88 fimbrial expression and viability in *E. coli* G7 are discussed. Eight enteric strains (seven from K88<sup>+</sup> and one wild trait CFA/I<sup>+</sup>) were studied. Ten extracts (five decoctions, three infusions, and two aqueous extracts) from *E. citriodora* and *E. saligna* prepared at different concentrations were analyzed. It was confirmed that extract effect upon viability depended on *Eucalyptus* species, extract concentration values, and bacterial strain under treatment. No *E. citriodora* extracts affected bacterial viability. *E. saligna* extract effect depended on concentration values. Extract inhibitory effect upon K88 depended on *Eucalyptus* species and extract concentration values. All extracts inhibiting K88 showed a similar effect upon CFA/I. A model to study plant extracts affecting fimbrial expression is suggested. This model does away with self-agglutination phenomena interferences and the use of electronic microscope techniques.

**PALABRAS CLAVES:** *E. coli*, *E. coli* enterotoxigénica, *Eucalyptus*, diarrea, fimbrias

### INTRODUCCIÓN

Las diarreas constituyen un serio problema para la salud humana y animal. En las debidas a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) la colonización del intestino delgado constituye un paso previo imprescindible en el que es necesaria la adhesión de las bacterias a células específicas del epitelio intestinal del huésped. La especificidad de esta unión se debe a la existencia de estructuras bacterianas a las que se denominan factores de colonización (Ørskov y Ørskov, 1983) destacándose entre ellas las fimbrias (Padilla *et al.*, 1988)

En los últimos años diversas experiencias han tenido como objetivo el bloqueo de la adhesión mediante la elaboración de vacunas antifimbriales (Levine, 1990; Idania Wong *et al.*, 1992, 1995, 1996, Moon y Bunn, 1993) y el empleo de productos que afecten la expresión fimbrial, como es el caso de determinados antibióticos en concentraciones subletales (Barreto *et al.*, 1994), entre otros (Isaacson, 1980).

El Eucabev es un medicamento elaborado a partir de corteza de *Eucalyptus* que se ha utilizado con éxito en el tratamiento de diversas especies animales, y el hombre, afectados de enfermedad diarreica aguda (EDA) (Berta Velásquez *et al.*, 1991). Los reportes sobre la acción antimicrobiana de esta planta son muy contra-

ditorios (Roig, 1974; Dellacassa *et al.*, 1989; Niurka Sónora *et al.*, 1992; Misleidi Martín *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 1993b). En estudios realizados a partir de decocciones de corteza se comprobó que las mismas carecían de acción bactericida y/o bacteriostática, al menos en concentraciones semejantes a las empleadas en el Eucabev (Niurka Sónora *et al.*, 1992; Misleidi Martín *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 1995a). Estos resultados conllevaron a pensar que la acción de este medicamento estuviera relacionada con un bloqueo de la adhesión fimbrial, aspecto que se demostró en un ensayo que involucró a las cepas de referencia G7 (08K87, K88<sub>ab</sub>) y B44 (portadora de la fimbria K99) (Barreto *et al.*, 1993a). Sin embargo, en trabajos posteriores, se obtuvieron resultados contradictorios en lo relativo a la adhesina K88 (Niurka Sónora *et al.*, 1992; Misleidi Martín *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 1995a).

El factor de colonización K88, además de prevalecer en las ECET que afectan a cerdos neonatos y postdestetados (Idania Wong *et al.*, 1995, 1996) se ha caracterizado por mostrar una mayor estabilidad que las restantes estructuras de adhesión estudiadas en *Escherichia coli* (Barreto *et al.*, 1993a) en tanto que la adhesina CFA/I es la más frecuente en cepas de ECET aisladas en pacientes de enfermedad diarreica aguda (EDA)

(Blanco y Blanco, 1993; Barreto, 1996). Esta entidad es la principal causa de EDA en los países en vías de desarrollo y se ha asociado a brotes de importancia en países desarrollados (Blanco *et al.*, 1996; Roels, 1998; Mitsuda *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 1998)

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, este trabajo ha tenido como objetivos:

Determinar las causas que han motivado un comportamiento contradictorio en la expresión de K88 y la viabilidad bacteriana de *E. coli* frente a extractos de corteza de *Eucalyptus*.

Efectuar un estudio preliminar sobre la acción de estos extractos en la expresión de la fimbria CFA/I

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

En la tabla 1 se recogen las principales características de las cepas utilizadas en la investigación.

### Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: caldo Müeller Hinton y agar Müeller Hinton (OXOID, Gran Bretaña). En los ensayos en que se evaluó la acción inhibitoria de los extractos sobre la expresión de las fimbrias K88 y CFA/I se prepararon con el 50% del agua requerida, en el caso de los extractos 1; 2; 4; 6; 7 y 8, y con el 85% para los extractos 3; 5; 9 y 10. Luego de la esterilización se completó el volumen faltante con los extractos correspondientes, después de ser filtrados cada uno a través de filtros de Policarbonato Sartorius (SM 16508 B) para garantizar su esterilidad.

### Inmunosueros

En las experiencias para determinar la acción inhibitoria de los extractos sobre la fimbria K88 se utilizó un inmunosuero anti-K88 de conejo policlonal mono-específico. En el test de ELISA utilizado para investigar las variantes autoaglutinantes se emplearon, además del anterior, el anticuerpo monoclonal 11/70 antiK88<sub>ab</sub> y un conjugado anti-IgG de conejo en carnero.

### Hematías

Se utilizó sangre humana A en suspensión salina bufferada (PBS) en proporción 1:4 y a pH 7,2 para los ensayos de hemoaglutinación manosa-resistente (Blanco y Blanco, 1993).

### Extractos

El material vegetal fue secado en estufa con recirculación de aire a 40 °C durante 7 días. Luego fue reducido a polvo utilizando un molino con refrigeración por aire.

Las decocciones se prepararon hirviendo el material vegetal en agua durante diez minutos. Pasado ese tiempo se dejó enfriar y se separó el material vegetal del líquido mediante filtración.

Para las infusiones, se añadió el agua hirviendo sobre el material vegetal, se dejó reposar durante quince minutos, se enfrió y se separó el material vegetal de la infusión por filtración.

En ambos casos, al final, se restituyó el volumen inicial mediante adición de agua destilada estéril.

Los extractos acuosos fueron preparados por adición de agua destilada estéril al material vegetal, se maceró durante 24 horas, a 30 °C y pasado ese tiempo se filtró para separar el material vegetal del extracto obtenido.

Las características de los extractos obtenidos por los métodos anteriormente descritos se recogen en la tabla 2.

A cada extracto se le asignó un número, y con esa designación se utilizaron en la investigación sin que se conocieran sus particularidades.

### Efecto de los extractos de *Eucalyptus* sobre la viabilidad bacteriana

Se utilizaron 8 cepas (todas caracterizadas en la tabla 1). El ensayo se realizó en placas Petri de 100 mm de diámetro a las que se adicionó 20 mL de agar Müeller-Hinton en la siguiente forma: una primera capa (10 mL) con una concentración de agar-agar al 1,7%, a la que se agregó, una vez solidificada ésta, una segunda capa (10 mL) con agar-agar al 1%. Cada placa se sembró por hisopaje a partir de las suspensiones bacterianas en agua destilada estéril, según lo establecido por Kirby y Bauer (Bio-Merieux, 1984). Con perforador se efectuaron, asépticamente, diez excavaciones en la capa superior de cada placa y con el auxilio de una pipeta Eppendorf se adicionó 25 µl de cada extracto en la excavación correspondiente. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La experiencia constó de 3 réplicas.

Se realizó un ensayo preliminar para determinar los extractos que inhibían la expresión de K88 en *E. coli* G7. Una vez establecidos los mismos, se repitió el ensayo con *E. coli* G7 y *E. coli* 158. Tanto en la experiencia preliminar como en la segunda se procedió de acuerdo con Barreto *et al.* (1993). El ensayo segundo contó con 5 réplicas en las experiencias realizadas con la cepa G7.

### Confirmación de K88 en las variantes autoaglutinantes

A una parte de las variantes autoaglutinantes de *E. coli* G7 se le investigó la presencia de K88 mediante un test de ELISA tipo Sandwich (Ana Campal *et al.*, 1992).

### Procesamiento Estadístico

A los resultados que se entendió pertinente se les aplicó el método de comparación de proporciones.

## RESULTADOS

La infusión 9 y la decocción 10 de *E. saligna* (140 mg/mL y 70 mg/mL, respectivamente) aparentemente fueron las de mayor efecto inhibitorio en la viabilidad de las cepas estudiadas (Tabla 3). Sin embargo, el análisis estadístico efectuado, puso de manifiesto que los extractos 3 (decocción, 140 mg/mL) y 5 (extracto acuoso, 140 mg/mL) de *E. saligna* tienen un efecto similar (Tabla 4).

En el ensayo preliminar, efectuado para establecer la acción inhibitoria de los extractos sobre la expresión del factor de colonización fibrilar K88, se constató un resultado positivo en 1; 4; 6; 7 y 8; dudoso para 2 y 10, por la aparición de cepas autoaglutinantes; y negativo para 3; 5 y 9 (Tabla 5).

El ensayo definitivo, realizado con los extractos que tenían acción bloqueadora positiva (y dudosa) sobre la expresión de K88, demostró un mayor efecto de la decocción (6; 17,5 mg/mL) e infusión (7; 8,75 mg/mL) de *E. saligna*, seguidos de la decocción de *E. citriodora* (1, 70 mg/mL). La presencia de variantes autoaglutinantes enmascaró los restantes resultados (Tabla 6).

Todos los extractos inhibidores de K88, también lo fueron del factor CFA/I que además, resultó inhibido por el extracto 10, a diferencia de K88 (Tabla 6). En las experiencias efectuadas con la cepa portadora de CFA/I, no se observaron variantes autoaglutinantes.

Los ensayos de ELISA, efectuados con las variantes autoaglutinantes, demostraron la ausencia total de K88 en la variantes tratadas con el extracto acuoso de *E. citriodora* (4). En los restantes casos los resultados no son concluyentes, dada la imposibilidad de realizar este ensayo a todas las variantes autoaglutinantes (Tabla 7).

Las principales acciones de los extractos sobre *E. coli* G7 se resumen en las Tablas 8 y 9.

## DISCUSIÓN

En la investigación realizada sólo algunos extractos elaborados a partir de *E. saligna* afectaron la viabilidad de las cepas tratadas (Tabla 3). Su efecto inhibitorio estuvo proporcionalmente relacionado con la concentración (Tabla 4). Este es un resultado que ha sido muy contradictorio en trabajos precedentes. Roig (1974) refiere la acción antimicrobiana del *Eucalyptus*. Sus resultados se concretan a experiencias efectuadas a partir de hojas de esta planta. Dellacassa *et al.* (1989) efectuaron un estudio que abarcó 17 especies de *Eucalyptus*. En el mismo constataron una acción diferencial sobre la viabilidad bacteriana que estaba condicionada tanto por la especie de *Eucalyptus*, como de las bacterias estudiadas. Esta investigación se limitó también a los aceites esenciales obtenidos de hojas de *Eucalyptus*. Barreto *et al.* (1995b) demostraron la acción bactericida *in vitro* de tinturas elaboradas de corteza *Eucalyptus* sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* polirresistentes en las que la acción bactericida no era debida al alcohol presente en los extractos y sí a su capacidad de extracción de los metabolitos (o metabolito) responsables del efecto bactericida. Los estudios relativos a la acción antibacteriana de decocciones, infusiones y extractos acuosos de la corteza de esta planta son muy escasos y no coincidentes. Bertha Velázquez *et al.* (1989) por primera vez, establecieron la acción de decocciones de cortezas de *Eucalyptus* en el tratamiento de diarreas agudas debidas a ECET. Este colectivo

no encontró efectos bactericidas en las decocciones utilizadas. Posteriormente, Barreto *et al.* (1993a), establecieron la acción inhibitoria de estos extractos en la expresión de los factores fibrilares de colonización K88 y K99, sin que se afectara la viabilidad bacteriana. Resultados similares, en lo referente a la no afectación del crecimiento bacteriano, reportaron Barreto *et al.* (1993b). En estos trabajos no se identificó la especie de *Eucalyptus* utilizada. Más adelante se pudo precisar que se trataba de hibridaciones en que no participaban *E. saligna* y *E. citriodora* (Misleidi Martín *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 1995a). Los resultados del presente estudio, ponen de manifiesto la participación de 3 factores en el fenómeno analizado: a) especie de *Eucalyptus*, b) concentración del extracto y c) cepa bacteriana. El método de extracción, en las condiciones de esta investigación, no influyó (Tablas 3 y 4).

En los tamizajes fitoquímicos efectuados a *E. saligna* (Yadila Gómez *et al.*, 1994) y *E. citriodora* (Mayra Castells *et al.*, 1994) se ha constatado la presencia de taninos, flavonoides y quinonas, tanto en las decocciones como en los macerados acuosos. Estos metabolitos, teniendo en cuenta lo reportado por Cuellar (1983) pueden estar vinculados con los efectos sobre viabilidad anteriormente analizados.

La acción de los extractos sobre la expresión del factor de colonización K88, en la experiencia preliminar, demostró un efecto inhibitorio ante la decocción (1) y el extracto acuoso (4) de *E. citriodora*, y las decocciones (6 y 7) e infusión (8) de *E. saligna*. Los restantes extractos promovieron autoaglutinaciones o, simplemente, no inhibieron la expresión de K88 (Tabla 5).

Tanto en esta experiencia preliminar como en la definitiva (Tablas 5 y 6) se pudo comprobar que todos los extractos elaborados a partir de *E. citriodora* inhibían la expresión de la fimbria K88. Con los extractos de *E. saligna* sólo se logró este efecto en los de concentraciones inferiores a 21 mg/mL, siendo máximo en la decocción (6) e infusión (7) (Tabla 6). Este aspecto se analizará más adelante.

Todos los extractos con acción inhibitoria sobre K88, también bloquearon la expresión de CFA/I, además del 10, que sólo reprimió a este último pues, debido a las autoaglutinaciones su resultado sobre K88, hasta este momento de la investigación, se toma como negativo (Tabla 6).

El factor de colonización I (CFA/I) es de los más frecuentes en ECET que afectan al humano. Posee un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos que le confieren a la bacteria una elevada hidrofobicidad superficial. Blanco y Blanco (1993) describen esta fimbria con un patrón de hemoaglutinación manosa resistente frente a hematíes humanos, de terneros y de pollos; de allí, la elección de los primeros para evaluar la posible acción inhibitoria de los extractos en su expresión. Como se trata de una cepa salvaje, no de referencia, su estudio es

sólo preliminar. Por ello, no se realizaron réplicas, como en las investigaciones en que estuvo involucrada la cepa G7 que, además de ser una cepa de referencia, ha estado involucrada en los estudios anteriores sobre esta temática.

La inhibición de los factores de colonización, ha sido una opción investigada en *E. coli* asociadas a infecciones del tracto urinario (UTIEC). Al respecto, se han utilizado concentraciones subletales de antibióticos (Padilla *et al.*, 1988; Padilla, 1991). Prieto *et al.* (1995) inhibieron la expresión de la fimbria P con extractos de *Lepidium virginicum*. Barreto *et al.* (1998) lograron efectos similares con tinturas de *Achirantes aspera*. En *P. aeruginosa* también se han obtenido resultados semejantes mediante la utilización de quinolonas en concentraciones subletales (Nobile *et al.*, 1992). Barreto *et al.* (1994) lograron la inhibición de la expresión de la fimbria K88 de *E. coli* G7 mediante el uso de amino-glucósidos en concentraciones subletales. Concentraciones de sodio, a partir de 40 g/L, estimulan la formación de unaseudocápsula en cepas de *E. coli* uropatógenas que recubre sus fimbrias, inhibiendo así su contacto con los receptores de eritrocitos y células uroepiteliales (Padilla, 1989).

Misleidi Martín *et al.* (1993) concluyeron que los extractos de *E. saligna* no inhibían la expresión de K88. Este colectivo utilizó extracto acuoso e infusión, ambos con una concentración de 70 mg/mL. En el presente trabajo se constató que, aún a concentraciones de 21 mg/mL, tampoco se produce este efecto que, en el caso de las infusiones, tiene lugar a concentraciones menores o iguales a 17,5 mg/mL (Tablas 8 y 9). Niurka Sónora *et al.* (1992), no lograron inhibir la expresión de esta adhesina utilizando decocciones de *Eucalyptus*, en tanto que Barreto *et al.* (1993) sí. En ambos casos no se precisa la especie de *Eucalyptus* utilizada.

Barreto *et al.* (1993a) reportaron inhibiciones de la fimbria K88 de *E. coli* G7 frente a extractos de *Achirantes aspera*. Este colectivo (1995) había obtenido efectos similares con extractos de *E. citriodora*, no así con los efectuados a partir de *E. saligna*.

En todas estas experiencias estuvo presente la cepa *E. coli* G7. Los resultados obtenidos posibilitan establecer que en la inhibición de K88 influyen: a) la especie de *Eucalyptus* y b) la concentración de extractos. No existen elementos para asegurar que el método de extracción tenga influencia.

La aparición de variables autoaglutinantes, inducidas por el tratamiento con los extractos, constituyó un elemento enmascarador de los resultados de experiencias precedentes (Misleidi Martín *et al.*, 1993; Barreto *et al.* 1995a), así como de ésta. La imposibilidad de utilizar técnicas de microscopía electrónica, obligó a una confrontación de las variantes autoaglutinantes frente a un ELISA tipo Sandwich. Los resultados obtenidos evidenciaron la pérdida de K88 en todas las variantes

autoaglutinantes ensayadas (Tabla 7). Estos resultados, tienen un valor comparable al logrado con la microscopía electrónica ya que el AcM 11/70 detecta la subunidad FaeG, que constituye el componente principal de la fimbria K88 y, al mismo tiempo, comprende su elemento de adhesión (Kusters y Gaastra, 1994; Mol y Oudega, 1996).

El bloqueo de la expresión de la fimbria K88 puede deberse a una infinidad de causas que van, desde la represión del operón fae, hasta el bloqueo de los distintos sistemas enzimáticos vinculados con la transportación y ensamblaje de las subunidades que conforman la fimbria K88. En tal sentido, al igual que ocurre con los antibióticos bloqueadores de la síntesis proteica utilizados en concentraciones subletales, en los extractos analizados, deben estar presentes metabolitos que actúen de forma similar. Este es un aspecto por dilucidar en investigaciones posteriores; los flavonoides, quinonas y taninos, detectados en los tamizajes fitoquímicos realizados a las cortezas de estas plantas, constituyen opciones a valorar.

La autoaglutinación es un fenómeno que, en bacterias gramnegativas, ocurre cuando se pierden las unidades repetidoras de monosacáridos de la envoltura externa (Tayot *et al.*, 1981). Los flavonoides tienden a combinarse con diversos monosacáridos (Cuéllar, 1983) por ello, y teniendo en cuenta que están presentes en la corteza de las especies investigadas (Mayra Castells *et al.*, 1994; Yadila Gómez *et al.*, 1994) se puede inferir, como hipótesis, su participación en la formación de variantes autoaglutinantes.

Existe otra causa de autoaglutinación. La aglutinación se lleva a cabo en un medio salino en el que la concentración óptima de electrolitos es 0,15 mol. Concentraciones mayores pueden neutralizar las cargas superficiales, que las bacterias y otros antígenos particulados poseen en su superficie a un pH neutro, y provocar aglutinación espontánea no específica (Margni, 1982). Bertha Velázquez *et al.* (1989) establecieron que, una de las ventajas de los extractos de *Eucalyptus* usados como antidiarreicos, era su capacidad de restituir electrolitos perdidos en este síndrome multifactorial, por lo que, no se puede descartar su influencia en la aparición frecuente de cepas autoaglutinantes luego de su contacto con estos extractos. Este colectivo estableció la presencia de iones sodio y potasio en decocciones de corteza de esta planta. Se ha podido comprobar que el ion potasio estimula la adhesión bacteriana a sus receptores celulares (Vaca *et al.*, 1989) en tanto que el sodio, como ya se mencionó, en altas concentraciones, induce la formación deseudocápsulas (Padilla, 1989). Es preciso profundizar en cuanto a la acción de estos dos iones a diferentes concentraciones para poder definir su verdadero rol en el fenómeno analizado aunque, en el caso del sodio, nunca estaría en

una concentración tan elevada que propiciara la producción de pseudocápsulas.

La Tabla 8 recoge las principales acciones de los extractos investigados sobre la viabilidad y expresión de K88 en la cepa *E. coli* G7. En la misma se hacen correcciones a los valores del efecto inhibitorio de K88 de extractos acuosos de *E. citriodora*, afectados por las autoaglutinaciones (Tabla 7). Esta tabla y la 9 constituyen una integración resumida de los resultados obtenidos en el presente trabajo, y brindan los elementos esenciales que han motivado las contradicciones en cuanto al efecto de extractos de *Eucalyptus* sobre la viabilidad y la expresión de K88 en *E. coli* G7 en los trabajos precedentes. Al mismo tiempo, señalan los aspectos aún pendientes de estudio.

Los resultados obtenidos en esta investigación, establecen las bases para la terapia de EDA debidas a ECET portadoras del factor de colonización K88 mediante 2 opciones:

La forma convencional, que se sustenta en la acción de aquellos extractos que afectan la viabilidad de ECET.

La inhibición del factor de colonización fibrilar K88, bloqueando así el primer paso en el desencadenamiento de esta etiología.

El estudio preliminar efectuado con la cepa *E. coli* 158 portadora de CFA/I, ofrece perspectivas semejantes, aunque es preciso estudiarla con el mismo rigor. Finalmente, dada la similitud existente entre ECET y *V. cholerae*, en cuanto a mecanismo de infección (Jones y Freter, 1976) y sus toxinas termolábiles (Tayot *et al.*, 1981), así como el notable efecto de varios de los extractos sobre la viabilidad de esta especie bacteriana (datos no contemplados en este estudio) convierten a los mismos en opciones a considerar en el tratamiento del cólera, enfermedad que en las postrimerías del siglo XX regresó con nuevos bríos a cobrar vidas humanas.

## CONCLUSIONES

- El estudio efectuado con diversos extractos a partir de *E. citriodora* y *E. saligna*, permiten concluir lo siguiente:
- Su efecto sobre la viabilidad bacteriana depende de la especie de *Eucalyptus*, la concentración de los extractos y la especie o variedad bacteriana de que se trate.
- El efecto inhibitorio sobre el factor fibrilar K88 depende de: la especie de *Eucalyptus* y la concentración de los extractos.
- Todos los extractos que afectaron la expresión de K88 también inhibieron a CFA/I.
- En las variantes autoaglutinantes analizadas no estaba presente la fimbria K88.

## RECOMENDACIONES

- Hacer extensivo este estudio a otras especies de *Eucalyptus*.
- Determinar la participación de flavonoides, taninos y quinonas, en los efectos sobre la viabilidad e inhibición de K88 constatados.
- Determinar la presencia de iones inorgánicos en los extractos evaluados con acción sobre K88. Evaluar la acción del ion sodio en este efecto.
- Establecer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la viabilidad y la expresión de K88 de los extractos investigados, *in vitro* e *in vivo*.

## REFERENCIAS

- BARRETO, G.; YOANKA LEZCANO, ODALYS RAMOS, BERTHA VELÁZQUEZ, M. MORENO Y G. PARDO: Efecto de un medicamento a base de *Eucalyptus* (*Eucabev*) sobre la producción de los factores de colonización F4 y F5 de *E. coli* enterotoxigénica. Rev. prod. anim. 7(1 y 2): 73-76, 1993a.
- BARRETO, G.; YOANKA LEZCANO, ODALYS RAMOS, BERTHA VELÁZQUEZ, M. MORENO Y G. PARDO: Efecto bactericida o bacteriostático de un medicamento a base de *Eucalyptus* (*Eucabev*). Rev. prod. anim. 7 (1y 2): 69-71, 1993b.
- BARRETO, G.; M. PAZOS, M. MARTÍN, Y G. PARDO: Efecto de concentraciones subletales de antibióticos en la expresión del factor de colonización F4. Rev. prod. anim. 8 (1): 61-63, 1994.
- BARRETO G.; M. PAZOS, G. PARDO, M. MARTÍN, S. DÍAZ, Y B. VELÁZQUEZ: Acción de extractos de *E. saligna* y *E. citriodora* sobre el factor de colonización F4. Revista de Producción Animal. 9: 68-79, 1995a.
- BARRETO, G.; B. VELÁZQUEZ, Y G. PARDO: Efecto bactericida *in vitro* de extractos de *Eucalyptus* sobre *P. aeruginosa*. Rev. prod. anim. 9: 99-101, 1995b.
- BARRETO, G.: Un reto tras 111 años de estudio. Revista Referativa Electrónica El archivo Médico de Camagüey. 3(1), 1996.
- BARRETO G.; K. ALONSO, M. ESTÉVEZ Y O. JIMÉNEZ: Efectos de los extractos de *Achyranthes aspera* sobre *E. coli*. Revista Referativa Electrónica Archivo Médico de Camagüey. 2 (3), 1998.
- BIO-MERIUX. Bacteriología. Productos y reactivos para laboratorios. Lyon, Francia, 1984; p.p. 63-69, 1984.
- BLANCO, J. Y M. BLANCO: *E. coli* enterotoxigénico, necrotoxigénico y verotoxigénico de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico, p.p. 7-8, Servicio de Publicaciones Diputación Provincial. Galicia. España, 1993.

- BLANCO, J. E.; M. BLANCO, J. BLANCO, Y M. P. ALONSO: *E. coli* toxigénicos en alimentos y muestras clínicas de origen humano y animal. Patogénesis y Epidemiología. Med. Vet. 13: 207-222, 1996.
- CAMPAL, ANA; A. MIRANDA, J. JUNCO, MARÍA CASTRO, S. CASAS, G. FERNÁNDEZ, D. SÁNCHEZ, C. GARCÍA, G. FONTIRROCHE, Y L. CALZADA: Use of monoclonal antibody against the K88<sub>ab</sub> fimbriae antigen in ELISA and dye-based dipstick for the diagnosis of porcine colibacillosis. Avances en Biotecnología Moderna. Libro de reportes cortos del congreso. 1: 11-19, 1992.
- CASTELL, MAYRA; ANA J. VIAMONTES Y G. BARRETO: Estudio farmacognóstico preliminar de la corteza de *E. citriodora* Hook y evaluación de su actividad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa*. Trabajo de Diploma. Facultad de Química-Farmacia. Universidad de Camagüey, 1994.
- CUÉLLAR, A.: Química de los fármacos naturales p.p. 2-7; 11-24. Universidad de La Habana. La Habana, 1983.
- DELLACASSA, E.; F. MENÉNDEZ, P. CERDEIRAS Y P. MOYNA: Antimicrobial activity of *Eucalyptus* essential oils. Fitoterapia. LX (6): 544-54, 1989.
- GÓMEZ, YADILA, ANA VIAMONTES Y BERTHA VELÁZQUEZ: Estudio comparativo de la composición química de dos especies de *Eucalyptus*. Evaluación de su actividad farmacológica. Trabajo de Diploma. Facultad de Química-Farmacia. Universidad de Camagüey, 1994.
- ISAACSON, R. E.: Factors affecting expression of the *E. coli* K99 pilus. Infection and Immunity. 28(1): 190-194, 1980.
- JONES, G. W. Y R. FRETER: Adhesive properties of *V. cholerae*: nature of interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. Infect. Immun. 14: 240, 1976.
- KUSTERS, J. G. Y W. GAASTRA: Fimbrial operons and evolution. Capítulo 13, en: Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines. p. p. 179-196, editado por Per Klemm, Ph.D., D.Sc. Department of Microbiology. Technical University of Denmark. Lyngby, Denmark, 1994.
- LEVINE, M. M.: Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections, in New Generation Vaccines, Woodrow, C. G. and Levine M. M., Eds., Marcel Dekker, New York. 649, 1990.
- MARGNI, R.: Inmunología e inmunoquímica, 3ra edición en español, p. p. 252-257, Ed. Revolucionaria. La Habana, 1982.
- MARTÍN, MISLEIDI; G. BARRETO, M. PAZOS Y G. PARDO: Efecto de concentraciones subletales de antibióticos y de extractos de *E. saligna* y *E. citriodora* en la expresión del factor de colonización F4. Trabajo de Diploma. Facultad de Veterinaria. Universidad de Camagüey, 1993.
- MITSUDA, T.; T. MUTO, M. YAMADA, N. KOBAYASHI, M. TOBA, Y. AIHARA, A. ITO Y S. YOKOAMA: Epidemiological study of a foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* 0:25:NM by pulsed field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 36(3): 652-656, 1998.
- MOL, O. Y B. OUDEGA: Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 19: 25-52, 1996.
- MOON, H. W. Y T. O. BUNN: Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. Vaccine. 11: 213, 1993.
- NISHIKAWA, Y.; A. HELANDER, J. OGASAWARA, N. P. MOYER, M. HANAOKA, A. HASE Y A. YASUKAWA: Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *E. coli* serotype 0169:h41. Epidemiol. Infect. 121(1): 31-42, 1988.
- NOBILE, C.; M. J. PUERTA, M. NOBILE Y B. T. NOBILE: Efecto de concentraciones subletales de ciprofloxacina sobre la adherencia de *P. aeruginosa*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 34(3): 175-178, 1992.
- ØRSKOV, I. Y F. ØRSKOV: Serology of *Escherichia coli* fimbriae. Prog. Allergy. 33: 80-1, 1983.
- PADILLA, C., P. BREVIS, R. ZEMELMAN Y E. VIVALDI: Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la adherencia de *E. coli* fimbriada a células epiteliales. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30: 5-9, 1988.
- PADILLA, C.; M. VÁZQUEZ Y O. FAÚNDEZ: Effects of minimum inhibitory concentrations of three antimicrobials on the growth cell and fimbriation of uropathogenic *E. coli*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 33: 105-108, 1991.
- PADILLA, C.: Efecto de algunos factores físicos sobre la adherencia de *E. coli* uropatógenas. Rev. Lat-amer. Microbiol. 31(4): 311-315, 1989.
- PRIETO M.; O. JIMÉNEZ, G. BARRETO, M. PAZOS Y G. PARDO: Estudio de cepas uropatógenas: comportamiento fisiológico, efecto de extractos de *Lepidium virginicum* L. Trabajo de Diploma. Universidad de Camagüey, 1995.
- ROELS, T.; M. PROCTOR, L. ROBINSON, K. HULBERT, C. BOPP Y J. DAVIS: Clinical features of infections due to *E. coli* producing-heat stable toxin during outbreak in Wisconsin: a rarely suspected cause of diarrhea in the United States. Clin. Infect. Dis. 26(4): 898-902, 1998.
- ROIG, J.T. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba, p. p. 365-368, Ed. Ciencia y Técnica, La Habana, 1974.
- SÓÑORA, NIURKA; L. VÁZQUEZ, G. BARRETO Y BERTHA VELÁZQUEZ: Colibacillosis. antibiotesistencia y factores de virulencia en cepas de *E. coli*.

- Tratamiento con medicina verde. Trabajo de Diploma. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Camagüey, 1992.
- TAYOT, J. L.; J. HOLMGREN, I. SVENNERHOLM, M. LINDBLAD Y M. TARDY: Receptor-specific large-scale purification of cholera toxin on silica beads derivatized with lyso-Gm ganglioside. *Eur. J. Biochem.* 113: 249-258, 1981.
- VACA, S.; F. ARGUELLO, D. ARENAS, R. MORENO Y GUADALUPE MARTÍNEZ: Potassium ions stimulate the adhesion of *P. aeruginosa* to human buccal epithelial cells. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 31(4): 305-309, 1989.
- VELÁZQUEZ, BERTHA; G. BARRETO Y J. GONZÁLEZ: Utilización del *Eucalyptus* en el tratamiento del síndrome diarreico agudo en humanos y en animales. 3er Activo Nacional Juan Tomás Roing. Topes de Collantes, Cuba, 1989.
- WONG, IDANIA; E. BOWER, M. RAMOS, N. GONZÁLEZ, M. EXPOSITO, R. SEGURA, R., E. SALAZAR, A. AGRAZ, I. JIMÉNEZ, L. HERRERA Y J. DE LA FUENTE: Eficacia en condiciones de campo de una vacuna recombinante contra la colibacilosis porcina. *Biotechnología Aplicada.* 13: 16-19, 1996.
- WONG, IDANIA; M. MORENO, E. BOVER, R. BASULTO, R. VALDERRAMA, A. BORROTO, G. FERNÁNDEZ, M. MOLEIRO, R. HERRERA, R. SILVA Y J. DE LA FUENTE: Evaluación de un preparado vacunal que contiene los antígenos fimbriales purificados K88ab y K99 en cerdos. *Biotechnología Aplicada.* 9(2): 113-120, 1992.
- WONG, IDANIA; M. MORENO, M. MOLEIRO, J. VALDERRAMA, M. JOGLER, M. HERRERA, E. BOVER, A. BORROTO, R. BASULTO, L. CALZADO, R. HERNÁNDEZ, L. HERRERA, R. SILVA, Y J. DE LA FUENTE: Immunity and protection elicited by recombinant vaccine against ECET. *Biotechnología Aplicada.* 12(1): 9-15, 1995.

**Tabla 1. Principales características de las cepas utilizadas**

Denominación	Características antigénicas	Categoría	Origen	Procedencia
G7	08K87, K88 <sub>ab</sub>	ECET	Porcino	CIGB
158*	? CFA/I	ECET	Humano	CPHEM
G108E	014:K85 <sub>ac</sub> , K88 <sub>ab</sub>	ECET	Porcino	Animal Disease Center
G253	0147:K89, K88 <sub>ac</sub>	ECET	Porcino	Animal Disease Center
P214	0100:K100, K88 <sub>ab</sub>	ECET	Porcino	Animal Disease Center
E681	0141:K85 <sub>ab</sub> , K88 <sub>ab</sub>	ECET	Porcino	Animal Disease Center
A66	0149:K91, K88 <sub>ac</sub>	ECET	Porcino	Animal Disease Center
G4166	045:K65, K88 <sub>ac</sub>	ECET	Porcino	Animal Disease Center

\*Cepa aislada de un niño menor de un año, paciente de EDA y negativo a todas las investigaciones efectuadas para detectar otros enteropatógenos. Su carácter enterotoxigénico se estableció mediante HAMR acorde a lo sugerido por Blanco y Blanco (1993) previo a esta investigación.

**Tabla2: Características de los extractos investigados**

Designación del extracto	Material vegetal (g)	Volumen de agua (mL)	Especie	Método de extracción
1	28	200	<i>E. citriodora</i>	Decocción
2	14	200	<i>E. citriodora</i>	Decocción
3	28	200	<i>E. saligna</i>	Decocción
4	14	200	<i>E. citriodora</i>	Extracto acuoso
5	28	200	<i>E. saligna</i>	Extracto acuoso
6	17,5	500	<i>E. saligna</i>	Decocción
7	8,75	500	<i>E. saligna</i>	Infusión
8	17,5	500	<i>E. saligna</i>	Infusión
9	70	500	<i>E. saligna</i>	Infusión
10	35	500	<i>E. saligna</i>	Decocción

Determinación *in vitro* de la acción de los extractos sobre la expresión de K88 y CFA/I.

**Tabla 3: Efecto de los extractos sobre la viabilidad de las cepas investigadas**

CEPAS	Extractos					
	3	5	8	9	10	*
G7	+	+	-	+	+	-
158	+	+	-	+	+	-
G1108E	+	+	+	+	+	-
G253	-	+	-	+	+	-
A66	+	+	+	+	+	-
G4166	+	-	-	+	+	-
**	-	-	-	-	-	-

+: afectan viabilidad; -: no afectan viabilidad; \*: extractos 1, 2, 4, 6, 7;  
 \*\*: cepas P214 y E681

**Tabla 4: Efecto bactericida de los extractos**

Extractos	Efecto bactericida (%)
9	75,0 <sup>a</sup>
10	75,0 <sup>a</sup>
3	62,5 <sup>a</sup>
5	62,5 <sup>a</sup>
8	25,0 <sup>b</sup>
*	0 <sup>c</sup>

\*: Extractos 1, 2, 4, 6 y 7

**Tabla 5: Acción inhibitoria de los extractos sobre K88 (experiencia preliminar)**

	Extractos					
	1, 4, 6, 7, 8		2, 10		3, 5, 9	
	I. Suero	S. salina	I. suero	S. salina	I. suero	S. salina
Presencia de K88	-	-	+	+	+	-

+: aglutinación; -: ausencia de aglutinación

**Tabla 6: Acción inhibitoria de los extractos sobre K88 y CFA/I**

		Extractos													
		1		2		4		6		7		8		10	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
K88	I. suero	1	4	3	2	2	3	0	5	0	5	3	2	5	0
	S. salina	1	4	3	2	2	3	0	5	0	5	3	2	5	0
CFA/I	Sangre A	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	S. salina	NEGATIVO													

**Tabla 7 Presencia de K88 en las cepas autoaglutinantes**

Indicador	1 (una cepa)		4 (dos cepas)		2 (una cepa)		10 (una cepa)	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Presencia de K88	0	1	0	2	0	1	0	1



**Tabla 8. Resumen del efecto de los extractos sobre *E. coli* G7**

Extracto	Forma de extracción	Especies	Acción sobre K88		Acción sobre el crecimiento (viabilidad)	
			Concentración (mg**/mL)	Efecto (%)	Concentración (mg**/mL)	Efecto
1	Decocción	<i>E. citriodora</i>	70	100	140	0 <sup>c</sup>
2	Decocción	<i>E. citriodora</i>	35	60*	70	0 <sup>c</sup>
4	Extracto acuoso	<i>E. citriodora</i>	35	100	70	0 <sup>c</sup>
3	Decocción	<i>E. saligna</i>	21	0	140	62,5 <sup>a</sup>
10	Decocción	<i>E. saligna</i>	10,5	20*	70	75,0 <sup>a</sup>
6	Decocción	<i>E. saligna</i>	17,5	100	35	0 <sup>c</sup>
9	Infusión	<i>E. saligna</i>	21	0	140	75,0 <sup>a</sup>
8	Infusión	<i>E. saligna</i>	17,5	40*	35	25,0 <sup>b</sup>
7	Infusión	<i>E. saligna</i>	8,75	100	17,5	0 <sup>c</sup>
5	Extracto acuoso	<i>E. saligna</i>	21	0	140	62,5 <sup>a</sup>

\*: Estos valores pueden ser mayores pero, están enmascarados por autoaglutinaciones.  
mg\*\*: mg de droga seca

**Tabla 9. Acción inhibitoria de los extractos de *Eucalyptus* (mg/mL) sobre *E. coli* G7**

Forma de extracción	Especie	Acción inhibitoria			
		K88		Crecimiento	
		+	-	+	-
Decocción	<i>E. saligna</i>	10,5-17,5	21	70-140	35
Infusión	<i>E. saligna</i>	8,75-17,5	21	/35-140	17,5
Extracto acuoso	<i>E. saligna</i>	N.D	21-70*	140	N.D
Decocción	<i>E. citriodora</i>	35-70	N.D	N.D	70-140
Infusión	<i>E. citriodora</i>	N.D	N.D	N.D	N.D
Extracto acuoso	<i>E. citriodora</i>	35	N.D	N.D	70

N.D.: No determinado; \*: Datos reportados por Barreto *et al.* (1995); +: Poseen acción inhibitoria; -: No poseen acción inhibitoria.