

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD DE BLOQUEO DE LA ADHESIÓN DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ECET) K88 AL MUCUS PORCINO POR PARTE DE DIFERENTES INGREDIENTES DIETÉTICOS

González-Ortiz, G., Hermes, R.G., Martín-Orúe, S.M. y Pérez, J.F

Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animal. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona
gemma.gonzalez@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La colibacilosis postdestete del lechón, causada por cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (ECET), es la principal causa de diarrea tras el destete (Fairbrother et al., 2005). En concreto, *E. coli* F4 (serotipo K88) es la principal cepa responsable a nivel mundial de pérdidas económicas en producción porcina (Zhang et al., 2007). El primer requisito en la patogenia de la colibacilosis, es el reconocimiento por parte de la bacteria de receptores intestinales que permitan su adhesión a la mucosa intestinal a través de las fimbrias. Una de las estrategias propuestas para prevenir la colonización digestiva por ECET K88 ha sido la de utilizar en la dieta análogos de los receptores que pudieran bloquear con éxito este tipo de unión. En este sentido diferentes ingredientes han sido propuestos por su capacidad para prevenir el desarrollo de colibacilosis. El salvado de trigo ha demostrado tener un efecto sobre la modulación de la microbiota intestinal, reduciendo las poblaciones de enterobacterias (Hermes et al., 2010). Compuestos con contenido en siálicos presentes en la leche de vaca, como el caseín glicomacropéptido (CGMP) y la sialilactosa han puesto en evidencia la capacidad de bloquear la adhesión de *E. coli* a la mucosa intestinal del cerdo (Molist et al., 2008). Algunos oligosacáridos derivados de microorganismos han demostrado disminuir el crecimiento y actividad de patógenos (Rhoades et al., 2006) con mejoras en el apetito y reducciones en el número de ECET adheridos a la mucosa intestinal en lechones infectados experimentalmente (Kiarie et al., 2010). El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de diferentes posibles ingredientes para unirse a *Escherichia coli* K88 así como para bloquear su unión a la mucosa intestinal mediante un modelo in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en este estudio fue aislada de un brote de colibacilosis en España (FV12048) del serotipo (O149:K91:H10 [K-88]/LT-I/STb) y proporcionada por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC) de la Facultad de Veterinaria de Santiago de Compostela (La Coruña). La bacteria se cultivó a 37°C en Caldo Luria (Sigma, St Louis, USA) haciendo al menos 3 pases seriados cada 24 h. Se testaron cinco ingredientes: salvado de trigo (ST, de un molino local); casein glicomacropéptido (CGMP, Lacprodan®, Arla Foods, Dinamarca); manano-oligosacárido (MOS, Bio-Mos®, Alltech, USA); extracto de algarroba (EA; Sanicarob®, Hermanos Armengol, España) y extracto de fermentación de *Aspergillus oryzae* (AO, Fermacto®, Molimen S.L., España). Para valorar el bloqueo de la adhesión al mucus porcino se utilizó mucus ileal natural de lechones destetados sanos y tratados previamente con antibiótico, el cual se extrajo siguiendo el procedimiento de Fang et al., (2000). El ensayo de adhesión in vitro de los diferentes sustratos (Ensayo 1), y el test de bloqueo de adhesión sobre el mucus (Ensayo 2) se realizó en placas multipocillo de alta adhesión (Microcolon F plate 655 092; Greiner Bio-One BV, Alphen a/d Rijn, The Netherlands) de forma independiente siguiendo la metodología descrita por (Becker et al., 2007). Cada ingrediente fue testado por triplicado. Los ingredientes se resuspendieron en PBS estéril hasta alcanzar una concentración final de 1% (para el ST) o 0,4% para el resto (p/v). Las suspensiones se sonicaron tres veces durante 30 seg. (Unheated Ultrasonic Bath MU series, Clifton, Nickel Electro Ltd, Weston-super Mare, England) y se centrifugaron a 460 x g durante 5 min (Mikro 220R, Hettich Instruments, Germany). En el ensayo 1, el tapizado de las placas se realizó añadiendo 350 µL del sobrenadante de cada sustrato en el fondo de cada pocillo. Para el ensayo 2, se pipetearon 350 µL de mucus en cada pocillo. Posteriormente, las placas se incubaron durante 16h a 4°C. El tapizado de los pocillos con PBS estéril se incluyó como control negativo en el ensayo 1. Tras la incubación, las placas se lavaron con 350 µL de PBS estéril para eliminar tanto el sustrato como el mucus no adherido. El bloqueo de los lugares inespecíficos de adhesión se realizó incorporando 350 µL

de BSA al 1% y 0,5% de azida sódica en PBS (p/v) y dejando incubar durante 1 h a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con PBS estéril. Paralelamente, las bacterias una vez crecidas en Caldo Luria se lavaron y se resuspendieron en PBS a una concentración de $1,20 \times 10^8$ CFU/ml. En el ensayo 1, a cada pocillo se le añadió un volumen total de 300 μ L de suspensión bacteriana. Para el ensayo 2, se realizó una incubación previa de la bacteria y el ingrediente durante 30 min a 37°C. Una vez transferidos 300 μ L de la mezcla en cada pocillo, se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la adhesión de las bacterias al sustrato o al mucus. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con PBS estéril para eliminar las bacterias no adheridas. Finalmente, en cada pocillo se añadieron 300 μ L de Caldo Luria, y se incubaron a 37 °C permitiendo el crecimiento de las bacterias adheridas en un lector de placas (SPECTRAMax 384 Plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA). El crecimiento bacteriano se monitorizó mediante densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 650 nm cada 10 minutos. Los datos de DO se procesaron usando el procedimiento PROC NLIN, para modelos de regresión no lineal, del programa SAS (SAS®, 2002) y los parámetros obtenidos se usaron para calcular el $t_{DO=0.05}$ (tiempo (h) en el que la bacteria alcanza una DO de 0.05 a 650 nm). Finalmente, se realizó un test ANOVA de los valores de $t_{DO=0.05}$ usando el procedimiento GLM de SAS (SAS® 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la interpretación de los resultados es interesante considerar que en el primer ensayo, valores de $t_{DO=0.05}$ inferiores al observado en el control, indican la capacidad del sustrato que tapizaba el fondo del pocillo para adherir E. coli K88. En el segundo ensayo, por el contrario, valores más altos que el control indica que la incubación del sustrato con la bacteria fue capaz de bloquear en cierta medida su adhesión al mucus.

A partir de los resultados obtenidos con el tapizado de los pocillos con diferentes ingredientes (ensayo 1), se demostró que tanto ST, como CGMP y MOS tuvieron capacidad de unirse a E. coli K88 en comparación con el control negativo de PBS (Tabla 1). El tiempo medio en el que alcanzaron una DO de 0,05 fue 0,96, 1,06 y 1,81 h, respectivamente frente a las 2,94 h observadas en el control negativo. No se observaron cambios en los valores de $t_{DO=0.05}$ con EA y de AO.

Por el contrario, y en contraste con los anteriores resultados, la incubación de la bacteria con ST, CGMP, MOS o EA (ensayo 2), no modificó la adhesión de la E. coli K88 al mucus, ya que los valores de $t_{DO=0.05}$ fueron similares al control negativo. La incubación de E. coli K88 con el extracto de AO, resultó en una $t_{DO=0.05}$ significativamente superior a la del resto de ingredientes (2,91 h; $P < 0.0001$).

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que los extractos solubles del salvado de trigo, del casein glicomacropéptido y de los manano-oligosacáridos contienen compuestos con capacidad de adherirse a Escherichia coli K88. Sin embargo el bloqueo de estas adhesinas/lectinas no fue capaz de disminuir la adhesión del E. coli al mucus porcino. En el caso del AO, los mecanismos de adhesión involucrados parecen ser distintos. El extracto de AO es capaz de disminuir la adhesión de E. coli K88 al mucus, probablemente mediante el bloqueo de los receptores intestinales y no de las lectinas bacterianas ya que no fuimos capaces de detectar, para este ingrediente, ninguna capacidad de adhesión de la bacteria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Becker, P. M., Galletti, S., Roubos-van den Hil, P. J., van Wixselaar, P. G. 2007. J Appl Microbiol. 103:2686-2696.
- Fairbrother, J. M., Nadeau, E., Gyles, C. L. 2005. Anim Health Res Rev. 6 (1): 17-39.
- Fang, L., Gan, Z., Marquardt, R. R. 2000. Infect Immun. 68 (2): 564-9.
- Kiarie, E., Bhandari, S., Scott, M., Krause, DO., Nyachoti, C. M. 2010. J. Anim. Sci. 88.
- Molist, F., Virkola, R., Gómez de Segura, A., Pérez, J. F. 2008. Gut Microbiome Conference. Clermont-Ferrand.
- Hermes, R. G., Molist, F., Ywazaki, M., Gómez de Segura., Gasa, J., Torrallardona, D., Pérez, J. F. 2010. Livest. Sci. 133: 225-228.
- Rhoades, J., Gibson, G., Formentin, K., Beer, M., Rastall, R. 2006. Carbohydr. Polym. 64:57-59.
- Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., Francis, D. 2007. Vet. Microbiol. 123:145-152.

Agradecimientos: El presente trabajo forma parte del proyecto AGL2007-60851 financiado con los recursos del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España

Tabla 1. Tiempo de detección ($t_{DO=0.05}$, h) en placas multipocillo del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* K88 como medida de adhesión a diferentes ingredientes (ensayo 1, pocillos tapizados con los ingredientes) o del bloqueo de la adhesión al mucus porcino promovida por los mismos ingredientes (ensayo 2, pocillos tapizados con mucus).

Tratamiento	Tapizado con ingrediente ($t_{DO=0.05}$, h)	Previo tapizado con mucus ($t_{DO=0.05}$, h)
Control negativo – PBS ¹	2,94 ^b	-
Control negativo – MUC ²	-	1,74 ^{bc}
ST (1%) ³	1,09 ^{cd}	1,36 ^c
CG (0,4%) ⁴	0,96 ^d	1,60 ^{bc}
MOS (0,4%) ⁵	1,81 ^c	1,81 ^b
EA (0,4%) ⁶	2,93 ^b	1,67 ^{bc}
AO (0,4%) ⁷	3,73 ^a	2,91 ^a
EEM	0,295	0,193
P valor	<0,0001	<0,0001

¹PBS: Buffer salino fosfato; ²MUC: mucus ileal porcino natural; ³ST: salvado de trigo; ⁴CG: casein glicomacropéptido; ⁵MOS: manano-oligosacáridos; ⁶EA: extracto de algarroba; ⁷AO: extracto de la fermentación de *Aspergillus oryzae*

IN VITRO EVALUATION OF THE ABILITY OF DIFFERENT DIETARY INGREDIENTS TO INHIBIT THE ADHESIÓN OF ENTEROTOXIGENIC *Escherichia coli* (ETEC) K88 TO THE PORCINE MUCUS

ABSTRACT: Two in vitro adhesion tests were done to evaluate the ability of casein glicomacropéptido (CGMP), wheat bran (ST), mannan-oligosaccharides (MOS), locust bean (GF) and *Aspergillus oryzae* extract (AO) to bind ETEC (Trial 1) and block its attachment to porcine ileal mucus (Trial 2). The supernatant of the feedstuffs after sonication (Trial 1) or porcine mucus (Trial 2) were introduced into the plate and incubated at 4°C overnight. After the washing procedure, *E. coli* strains were inoculated, either alone (Trial 1) or combined with the ingredients (Trial 2) for 30-min. The plates were washed with PBS to remove non-attached bacteria, and Luria Broth media was added to promote the growth of the attached bacteria (37°C, 10 h). The optical density (OD, 650 nm) was recorded every 10 minutes in a spectrophotometer. The delay time (h) to reach an OD of 0.05 was registered. CG, ST and MOS were able to bind ETEC. However, they were not able to block its attachment to the intestinal mucus. In contrast, AO blocked the attachment of ETEC to the intestinal mucus. Further studies should be done in order to understand the in vivo implications of these results on the pathogens binding to the intestinal mucosa.

Keywords: *Escherichia coli* K88, prebiotic, in vitro adhesion assay