

BUSQUEDA DE FACTORES DE PATOGENICIDAD EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

LACTOSA NEGATIVAS, AISLADAS DE LECHONES CON DIARREA

M. Heredia¹; J. Flores²; G. Suárez³; M. Puó⁴; M. Vivas⁵; L. Mendoza⁶; I. UADY.

INTRODUCCION: Los microorganismos presentes en el intestino, especialmente algunas variantes de *Escherichia coli*, han sido asociados estrechamente con la presencia de diarreas en los lechones. El papel de las enterotoxinas en la patogénesis de las enfermedades diarreicas varía ampliamente, y a menudo resulta difícil establecer su importancia relativa como factor de virulencia a menos que la toxina sea la causa primaria de la enfermedad (5). Caprioli y colaboradores describieron una categoría de cepas de *Escherichia coli* cuyos extractos estériles eran capaces de provocar grandes células multinucleadas en cultivos de tejidos y necrosis en la piel del conejo. Ambos efectos fueron atribuidos a una toxina proteica de 115,000 daltones llamada Factor Citotóxico Necrotizante (CNF) (3).

OBJETIVO: El objetivo del presente trabajo fue detectar diferentes factores de patogenicidad en cepas de *Escherichia coli* lactosa negativas aisladas de lechones con diarrea.

MATERIAL Y METODOS: Se estudiaron 174 cepas de *E. coli* no fermentadoras de lactosa aisladas de cerdos neonatales a las cuales se les realizó: Pruebas de actividad hemolítica, Detección de invasividad, Detección de toxina termoestable STa, Detección de Factor Citotóxico Necrotizante (CNF)

PRUEBA DE ACTIVIDAD HEMOLITICA: Se tomó una alícuota de cada cultivo y se inocularó mediante estria cruzada en cajas de agar soya tripticaseína (TSA) adicionado de eritrocitos de certero al 5% que se incubaron 18 hrs a 37°C. La actividad de las colonias se detectó mediante la observación de la hemólisis que producen (3).

DETECCION DE INVASIVIDAD: Se utilizó la prueba de Sereny y la unión a rojo congo. Se inoculó una suspensión de *E. coli* en el saco conjuntival de un conejo (1-2 gotas). 2. Unión a rojo Congo: Las cepas de *E. coli* a probar se sembraron en cajas con agar de soya tripticaseína conteniendo rojo Congo (Fisher Scientific Co., Fair Lawn N.J.). Se incubaron a 37°C por 18 hrs para observar la posible presencia de colonias pigmentadas (Pcr+).

PRODUCCION Y DETECCION DE TOXINA TERMO-ESTABLE: Las cepas de *E. coli* lactosa negativas se inocularon en caldo Evans y se incubaron a 37°C en agitación (120 rpm) durante 24 hrs. Seguidamente se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se filtraron con filtro bacteriológico de 0.45 micras de poro. Se utilizó el preparado comercial COLI-ST-EIA (Denka Seiken Co. Ltd., Tokio, Japon).

DETECCION DEL FACTOR CITOTOXICO NECROTIZANTE: Las cepas de *E. coli* se incubaron 24 hrs a 37°C en TSB, se concentraron por centrifugación, se sonicaron por 10 minutos a 4°C, se centrifugaron durante 30 minutos a 4,000 rpm y se filtraron. Se utilizó la inoculación intracutánea de 100µl del lisado celular en la piel de la espalda de un conejo (3).

PRUEBA DE LETALIDAD: Se utilizaron ratones de 5-7 semanas de edad, a los cuales se inoculó 0.1 ml del lisado celular por vía intravenosa.

RESULTADOS: Se estudiaron 174 cepas de *Escherichia coli* lactosa negativas aisladas de lechones con diarrea, para la búsqueda de los siguientes factores de patogenicidad: producción de hemólisis (Hly), producción de la toxina STa, invasividad (Inv) y Factor Citotóxico Necrotizante (CNF).

De las 174 cepas estudiadas, 58 (33.3%) fueron positivas a hemólisis (Hly+), y 116 (66.7%) fueron negativas. Las cepas productoras de STa fueron 41 (23.6%), y 133 (76.4%) negativas. No se encontró ninguna cepa positiva a invasividad tanto con la prueba de Sereny como con la prueba de unión a rojo Congo. No se encontraron cepas positivas a la producción de Factor Citotóxico Necrotizante (CNF) en ensayos de toxicidad y letalidad in vivo.

De las 58 (100%) cepas positivas a hemólisis (Hly+), 13 (22.4%) fueron además Sta positivas y 45 (77.6%) no.

DISCUSION: En 1993 Blanco y colaboradores estudiaron la producción del Factor Citotóxico Necrotizante y alfa-hemólisis en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigenica K99+. A 34 cepas aisladas de bovinos y cerdos con diarrea se les investigó la producción de enterotoxinas LT y STa, verotoxinas (VT1 y VT2) y Factor Citotóxico Necrotizante (CNF1 y CNF2), alfa-hemolisis (Hly) y enterohemolisis (EntHly). Cincuenta y una (94%) cepas fueron Sta+, 2 (4%) fueron Sta+CNF1+Hly+ y sólo una (2%) no fue toxigénica (1).

Estos mismos autores estudiaron quince cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, buscando factores de patogenicidad como: producción de LT, ST, SLT y CNF pero ninguna cepa fue positiva (2). Comparando nuestros resultados con el estudio de Blanco y colaboradores (1), que trabajaron 54 cepas de *Escherichia coli*, vemos que parece existir cierta relación entre la producción de Hly y la producción de Sta aunque el número de cepas que ellos trabajaron fue menor al nuestro y no especifican si son lactosa negativas. A diferencia de ellos nosotros no detectamos CNF.

Nuestro propósito al estudiar cepas de *Escherichia coli* lactosa negativas, (que es una característica de las cepas de tipo invasivo) fue buscar factores de patogenicidad que se podrían asociar a ellas. Sin embargo en el estudio que realizaron Blanco y colaboradores (2) con quince cepas de *E. coli* enteroinvasivas, no detectaron enterotoxinas (LT y ST), Factor Citotóxico Necrotizante (CNF) y Toxina Shiga-like (SLT). Nosotros encontramos un 22.4% de cepas productoras de Hly+/STa+, pero no detectamos la invasividad.

Ha sido difícil comparar nuestros resultados con otros estudios pues no existen datos o resultados de trabajos de *E. coli* lactosa negativas en cerdos; y los resultados que nos pudieran servir, aunque son realizados en *E. coli* (Caprioli y col. 1987, De Rycke y col. 1990, Wray y col. 1993 y Blanco y col. 1993 Abril), no especifican su reacción bioquímica a la lactosa.

BIBLIOGRAFIA.

- 1- Blanco M., Blanco J.E., Blanco J. 1993. Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99+, serotype O8 K25, produces cytotoxic necrotizing factor CNF1 and alpha-hemolysin. *Microbiologia*. 9(1): 72-76.
- 2- Blanco M., Blanco J.E., Blanco J. 1993. Toxic properties of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbiologia*. 9(2): 149-152.
- 3- Caprioli A., Falbo V., Franco M., Baldassarri L., Biscicchia R., Ippolito G., Romoli E., and Donelli G. 1987. Cytotoxic Necrotizing Factor Production by Haemolytic Strains of *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. *J Clin Microbiol*. 25(1): 146-149.
- 4- De Rycke J., González U., Blanco J., Oswald E., Blanco M. and Boivin R. 1990. Evidence for two types of Cytotoxic Necrotizing Factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin Microbiol*.
- 5- Ocampo L., Sumano H. 1985. Fisiología de la diarrea. En: *Avances en enfermedades del cerdo*. Editado por la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos. México. D. F. : 323-326.