

Los patrones de adherencia de *Escherichia coli* patogénica aviar y *E. coli* patogénica de humanos a células epiteliales en cultivo son similares

Luz Elena Vidales Rodríguez¹,
Pilar Miranda Delgado²,
Dirsha De Santiago Franco³,
Sergio Hugo Sánchez Rodríguez⁴,
Rosa María Ramírez Santoyo⁵.

Resumen

Introducción: *Escherichia coli* patogénica de humanos y aves tienen en común algunos determinantes de virulencia y comparten la capacidad para causar enfermedad. Debido a que la adherencia bacteriana es importante para el desarrollo de la mayoría de las enfermedades ocasionadas por *E. coli*, en el presente estudio se analizaron los patrones de adherencia de 21 aislados de *E. coli* patogénica aviar (APEC) a la línea celular MDCK. De los aislados adherentes, nueve (56%) presentaron el patrón de adherencia difusa, cuatro (25%) mostraron el patrón de adherencia agregativo y en los restantes tres (18%) se observó el patrón de adherencia localizado. Estudios futuros deberán determinar si hay correlación de estos patrones de adherencia con la virulencia de APEC.

Palabras clave: *E. coli* patogénica, Adherencia bacteriana, Patrones de adherencia.

- 1 Doctora en Ciencias. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. E-mail: luzelenavr@uaz.edu.mx
- 2 Maestra en Biología Experimental. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. E-mail: mdppilar@hotmail.com
- 3 Médico Veterinario y Zootecnista. Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Zacatecas. E-mail: dirshayaneli@hotmail.com
- 4 Doctor en Ciencias. Laboratorio de Biología Celular y Neurobiología. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. E-mail: smdck@hotmail.com
- 5 Doctora en Ciencias. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. E-mail: rmrs20@hotmail.com

Correspondencia:

✉ rmrs20@hotmail.com

Rosa María Ramírez Santoyo. Rocallosas 206, Fraccionamiento Lomas del Campestre. Zacatecas, Zac. Mex.

Teléfono y Fax (492) 921-13-26.

Adherence patterns of avian pathogenic *Escherichia coli* and human pathogenic *E. coli* to epithelial cells in culture are similar.

Abstract

Introduction: Pathogenic *Escherichia coli* from human and avian hosts have in common some virulence determinants and share the capability to cause disease. Since the adherence is an essential step in most of the diseases caused by *E. coli*, in the present study the adherence patterns of 21 avian pathogenic *E. coli* isolates to MDCK cell line were assayed. Of the adherent isolates, nine (56%) exhibited the diffuse adherence pattern, four (25%) showed an aggregative adherence patterns, and the remaining three (18%) exhibited a localized adherence pattern. Future studies should determine whether these adherence patterns correlate with the virulence of APEC.

Keys words: Pathogenic *E. coli*, Bacterial adherence, Adherence patterns.

Introducción

La interacción entre las bacterias patógenas y los tejidos del hospedero constituye un evento crucial para la adhesión primaria y la colonización tejido-específica, ya que permite el establecimiento y desarrollo de la mayoría de las enfermedades infecciosas. La adherencia bacteriana ocurre entre moléculas de la superficie bacteriana denominadas adhesinas que, de acuerdo a su estructura, pueden ser clasificadas como fimbriales o no fimbriales; y receptores celulares del hospedero, generalmente compuestos por glicolípidos o glicoproteínas [1,2].

El mecanismo de adherencia más estudiado es el mediado por las fimbrias. Las fimbrias son estructuras bacterianas en forma de varilla constituidas por subunidades proteínicas que contienen carbo-

hidratos en su extremo más distal, a través de las cuales se da el reconocimiento de los receptores del hospedero. Los receptores son moléculas transmembranales que fisiológicamente participan como receptores para factores de crecimiento, hormonas u otros ligandos [2].

La adherencia bacteriana es sólo un paso en el proceso infeccioso, y se considera un prerequisite para la colonización ya que las bacterias no adherentes son rápidamente eliminadas por mecanismos inespecíficos de defensa del hospedero, tales como el peristaltismo, el movimiento ciliar y el flujo de líquidos, o por el recambio de células del epitelio y de la capa mucosa [1, 2].

Escherichia coli patógena es el agente etiológico de varias infecciones en humanos y en animales

[3]. En humanos, *E. coli* patogénica puede causar enfermedades intestinales o extraintestinales, las primeras asociadas con diarrea [4] y entre las segundas destaca la meningitis del recién nacido [5] y las infecciones de tracto urinario en mujeres [6]. En aves, *E. coli* patogénica causa la colibacilosis la cual es una enfermedad de importancia económica en la industria avícola por las pérdidas que ocasiona debido a la morbilidad y mortalidad; la colibacilosis aviar puede ocasionar múltiples síndromes [7, 8, 9].

Las cepas de *E. coli* patogénica de diferentes hospederos han mostrado tener factores de virulencia en común, tales como los sistemas de secuestro de hierro (aerobactina y genes *iro*), hemolisinas, cápsula (K1, K5), la proteína IbeA y el autotransportador Tsh, al cual, entre otras funciones, se le atribuye una actividad proteasa para la IgA. Asimismo, estas cepas expresan en común varias adhesinas implicadas en la unión bacteriana a epitelios, entre ellas, la fimbria tipo 1, la fimbria P y la fimbria S y curli [10, 11, 12, 13].

Como se señaló anteriormente, el proceso de adherencia es fundamental en el desarrollo de la mayoría de las infecciones ocasionadas por *E. coli* y las investigaciones encaminadas a analizar este evento incluyen estudios *in vitro* utilizando cultivos de líneas celulares. Inicialmente, en *E. coli* patogénica intestinal de humanos se reportaron tres patrones morfológicos de adherencia *in vitro* a células epiteliales: adherencia localizada, adherencia difusa y adherencia agregativa [4].

La adherencia localizada se caracteriza por la formación de microcolonias bacterianas sobre áreas restringidas de la superficie celular la adherencia difusa se observa como la unión de bacterias sobre toda la superficie de la célula, mientras que el patrón de adherencia agregativa se caracteriza por la unión de las bacterias a las células en una forma apilada. De hecho, esta última se ha descrito como un “apila-

miento de ladrillos”, el cual está dado por la unión de bacterias entre célula-célula [4].

Los diferentes patrones de adherencia de *E. coli* patogénica intestinal de humanos se han relacionado con los procesos patogénicos específicos que ocasionan; por ejemplo, el patrón de adherencia localizada fue detectado inicialmente en *E. coli* enteropatogénica (EPEC), mientras que cepas de *E. coli* que muestran patrones de adherencia difusa (DAEC), han sido aisladas de heces de infantes con diarrea aguda. Por su parte, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) ha sido asociada a brotes o casos esporádicos de diarrea persistente [14, 15]. Además, cada patrón de adherencia se ha correlacionado con ciertas adhesinas; en el caso de cepas de EAEC, la adherencia agregativa es mediada por la fimbria AAF/I y por la fimbria AAF/II [4, 16], mientras que en la adherencia localizada participa la fimbria Bfp y la adherencia difusa es atribuida a fimbrias de las familias Dr y K88 [12, 15].

Más recientemente se han observado estos patrones de adherencia *in vitro* en ensayos con aislados de *E. coli* uropatogénica, siendo la adherencia agregativa la que se presenta más frecuentemente. Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes respecto a las adhesinas asociadas a este tipo morfológico de unión bacteriana ya que los aislados no portan los genes de las fimbrias AAF/I y AAF/II que, como se mencionó anteriormente, se asocian a la adherencia agregativa en *E. coli* patogénica intestinal [17].

En contraparte, existen pocos estudios en relación a los fenotipos de adherencia *in vitro* de *E. coli* patogénica aviar (APEC) que ocasiona la colibacilosis aviar. Dias da Silveira *et al.* [18] reportaron que aislados de APEC se adhirieron a células HeLa y HEp-2, mostrando un patrón difuso, mientras que La Ragione *et al.* [19] observaron este mismo patrón de adherencia en células HEp-2, coincidiendo con lo observado por Stehling *et al.* [20].

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los fenotipos de adherencia de un grupo de aislados de APEC en células epiteliales en cultivo y compararlos con lo reportado para *E. coli* que ocasiona enfermedades en humanos.

Material y métodos

Aislados bacterianos y condiciones de cultivo: se utilizaron 21 aislados de *E. coli* patogénica aviar obtenidos de casos clínicos de colibacilosis aviar. Las bacterias se cultivaron en 1 ml de caldo infusión cerebro corazón (CICC) por 24 h a 37°C. Pasado este tiempo se resembraron 150 µl de este cultivo en 5 ml de CICC fresco y se incubaron a 37°C en agitación continua hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se suspendió en buffer de fosfatos (PBS). El inóculo bacteriano se ajustó a 10⁷ ufc/ml.

Línea celular y condiciones de cultivo: se utilizó la línea celular MDCK (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.08% de insulina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa hasta alcanzar confluencia.

Pases Celulares: células MDCK fueron cultivadas a confluencia en frascos de cultivo de 50 cc, fueron lavadas con solución de Hank, se agregó 3 ml de solución amortiguadora de Earle libre de Ca y Mg y se incubó por 25 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de Earle y se agregaron 2 ml de tripsina-verseno al 0.05%. Se incubó por 10 minutos en las mismas condiciones y se procedió a desprender las células agitando el

frasco de cultivo. Luego se agregó 3 ml de medio DMEM, se centrifugó a 200 g durante 5 minutos en un tubo cónico de 15 ml y se eliminó el sobrenadante. El botón de células se suspendió en 3 ml de medio DMEM y se realizaron pases celulares a cajas de cultivo de 24 pozos que en el fondo contenían cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro previamente esterilizados.

Ensayo de adherencia bacteriana a células epiteliales: las células MDCK fueron sembradas sobre los cubreobjetos de vidrio de 15 mm antes señalados. Los cultivos se ajustaron a una densidad de 10⁵ células/pozo y se incubaron por 18 horas en medio DMEM libre de antibióticos. Pasado este tiempo se eliminó el medio de cultivo de la monocapa, se lavó con solución de Hank, se agregó el inóculo bacteriano conteniendo 10⁷ UFC/ml de cada aislado APEC a analizar y se incubó durante 90 minutos. Luego se eliminó el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS exhaustivamente usando bomba de vacío para eliminar las bacterias que no se unieron. Posteriormente, las monocapas celulares con las bacterias adheridas se fijaron con metanol absoluto por 15 minutos y se lavaron con agua destilada. Finalmente, se realizó una tinción con Giemsa al 10% durante 25 minutos a temperatura de ambiente. Se realizaron cuatro lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y los cubreobjetos se fijaron con resina sobre portaobjetos y fueron observados al microscopio.

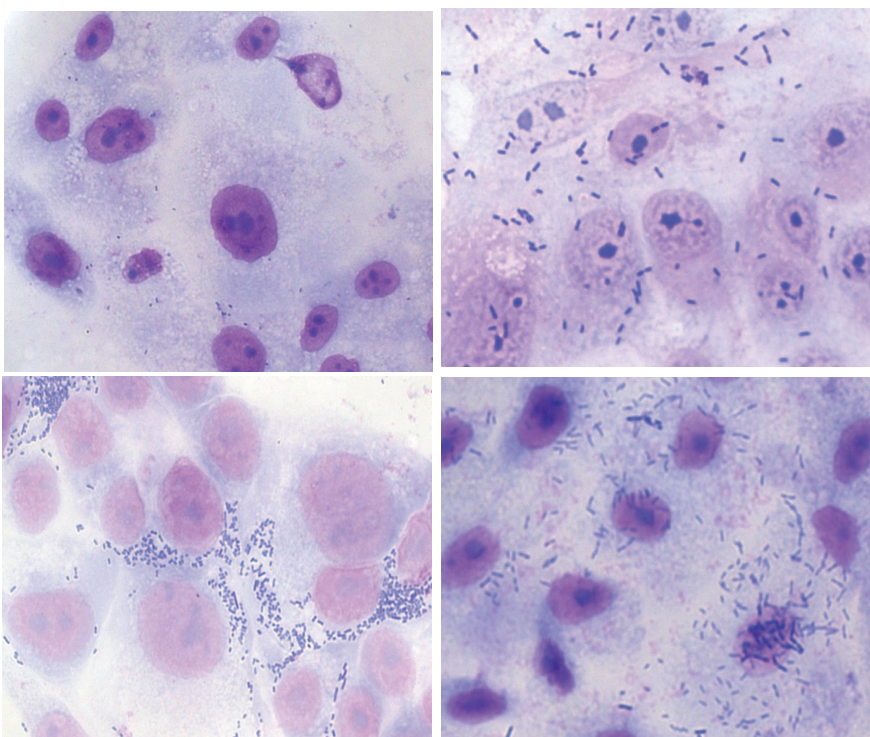
Resultados

De los 21 aislados de APEC analizadas, el 76% (16/21) mostró adherencia a las células MDCK, mientras que el 24% (5/21) no se unió a las células (**Tabla 1**).

En los aislados APEC adherentes se observaron los tres patrones de adherencia descritos previamente

Tabla 1. Capacidad de adherencia de aislados APEC a células MDCK y patrones morfológicos de adherencia.

Aislado APEC	Adherencia Difusa	Adherencia Agregativa	Adherencia Localizada
YA1	-	-	-
YA2	-	-	-
YA4	-	+	-
YA5	-	-	-
YA8	+	-	-
YA9	+	-	-
YA10	-	+	-
YA12	-	-	+
YA14	+	-	-
YA15	+	-	-
YA17	+	-	-
YA18	+	-	-
YA19	+	-	-
YA20	-	-	-
YA21	-	-	+
YA22	-	-	-
YA23	+	-	-
YA35	-	+	-
YA36	-	+	-
3677	+	-	-
EI35	-	-	+

**Figura 1.** Patrones de adherencia *in vitro* de APEC a células MDCK. Monocapas de células MDCK se incubaron con 10^7 ufc/ml de APEC a 37°C por 90 minutos. Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y fueron observadas a una magnificación de 1,000x. a) Adherencia negativa, b) Adherencia con patrón difuso, c) Adherencia con patrón agregativo y d) Adherencia con patrón localizado.

en *E. coli* causantes de diarrea en humanos. Nueve aislados mostraron el típico patrón de adherencia difusa en el que las bacterias se pegan sobre toda la superficie celular. Cuatro aislados APEC mostraron una adherencia agregativa mientras que el patrón de adherencia localizada fue observado en tres aislados APEC (**Figura 1**).

Discusión

La presencia en común de un grupo de genes asociados a la virulencia en APEC y *E. coli* causantes de enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos es indicativo de la relación genética entre las cepas de *E. coli* patogénica de diferentes hospederos [10, 11, 12, 13, 21].

Aun cuando se ha reportado la expresión de diferentes tipos de fimbrias, tanto en *E. coli* patogénica de humanos como en aislados APEC, son pocos los estudios enfocados en la comparación de los tipos morfológicos de adherencia entre cepas de diferente origen. Los resultados de este trabajo demuestran que la mayoría de los aislados APEC tienen la capacidad de unirse *in vitro* a células epiteliales MCDK cuando se incubaron por un lapso de 90 minutos. Algunos investigadores han establecido periodos de incubación bacteriana en monocapas de células epiteliales *in vitro* de hasta 6 h, encontrando resultados diferentes a los observados en periodos más cortos [14]; por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que los aislados de APEC no adherentes en 90 minutos pueden mostrar esta capacidad al aumentar el tiempo de incubación. Sin embargo, también existe la posibilidad de que la falta de adherencia *in vitro* sea una característica de dichos aislados, dada la gran heterogeneidad de factores de virulencia que son expresados entre los aislados de APEC.

En relación a los patrones de unión bacteriana, encontramos que el 56.25% de los aislados APEC adherentes (9/16) mostraron un patrón de adherencia difusa, caracterizado por la unión de bacterias individuales sobre toda la superficie de la célula. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Stehling *et al.* quienes reportan este mismo patrón de adherencia en APEC [20] y por Dias da Sirviera *et al.* quienes observaron que cepas aisladas de aves con colisepticemia, así como las obtenidas de aves con el síndrome de la cabeza hinchada, se unen a células HeLa y HEP-2 mostrando dicho patrón de unión [18]. Puesto que el patrón de adherencia difusa en aislados de APEC se ha asociado con las fimbrias tipo 1 y Stg [9, 18, 22], existe la posibilidad de que otras adhesinas puedan estar involucradas en este tipo de adhesión.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que un 43.75 % (7/16) de los aislados APEC adherentes mostraron patrones de adherencia localizada (3/16) y adherencia agregativa (4/16). Dichos patrones sólo han sido reportados en cepas patogénicas de humanos [4, 23], por lo que este es el primer reporte que muestra la capacidad de algunos aislados de APEC para establecer patrones de adherencia similares a los establecidos por cepas de *E. coli* patogénicas de humanos. Por lo anterior, la búsqueda de estructuras fimbriales involucradas en la adhesión localizada y agregativa de cepas APEC, así como el establecimiento de la relación de estos tipos de adhesión con la virulencia de APEC *in vivo*, constituyen un aspecto importante en el estudio de los eventos iniciales del proceso patogénico de estas cepas.

Conclusiones

En el presente trabajo el uso de cultivos de células MDCK permitió discriminar entre aislados APEC adherentes y no adherentes a estas células. En los aislados adherentes se observaron los tres patrones de adherencia descritos inicialmente en los diferentes patotipos de *E. coli* patogénica intestinal en humanos y más recientemente reportados en *E. coli* uropatogénica. Es importante destacar que en este trabajo se observaron los patrones de la adherencia localizada y de la agregativa, aun cuando la mayoría de los aislados APEC mostraron un patrón de adherencia difuso. Sin duda, un aspecto relevante será dilucidar con mayor claridad qué estructuras bacterianas median esta unión y determinar si este evento de adherencia *in vitro* se correlaciona con la virulencia de APEC.

Referencias

1. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006;124:715-27.
2. Bacterial strategies for evading or surviving host defense systems. In: Wilson B, Salyers A, Whitt D, Winkler M, editors. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2011. p. 193-224.
3. Croxen M, Finley B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:26-38.
4. Nataro J, Deng Y, Maneval D, German A, Martin W, Levine M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun*. 1992;60:2297-304.
5. Johnson J, Oswald E, O'Bryan T, Kuskowski M, Spanjaard L. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis*. 2002;185:774-84.
6. Wiles T, Kulesus R, Mulvey M. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008;85:11-9.
7. Dho-Moulin M, Fairbrother J. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*. 1999;30:299-316.
8. Dziva F, Stevens M. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol*. 2008;37:355-66.
9. La Ragione R, Woodward M. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci*. 2002;73:27-35.
10. Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao M, Bree A, Germon P, et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3484-92.
11. Rodriguez-Siek K, Giddings C, Doetkott C, Johnson T, Fakhr M, Nolan L. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 2005;151:2097-110.
12. Scaletsky I, Michalski J, Torres A, Dulguer M, Kaper J. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2005;73:4753-65.
13. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*. 2009;155:1634-44.
14. Gomes T, Vieira M, Abe C, Rodrigues D, Griffin P, Ramos S. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3609-13.
15. Laarmann S, Schmidt M. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology*. 2003;149:1871-82.
16. Czczulin J, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary M, et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1997;65:4135-45.
17. Toval F, Köhler C, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol*. 2014;52:407-18.
18. Dias da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, Maria de Hollanda L, Pestaña de Castro A, Tatsumi Yamada A, et al. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol*. 2002;85:47-53.
19. La Ragione R, Cooley W, Woodward M. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol*. 2000;49:327-38.
20. Stehling E, Yano T, Brocchi M, Dias da Silveira W. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). *Vet Microbiol*. 2003;95:111-20.

21. Johnson T, Wannemuehler Y, Johnson S, Stell A, Doetkott C, Johnson J, et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:7043-50.
22. Lymberopoulos M, Houle S, Daigle F, Léveillé S, Brée A, Moulin-Schouleur M, et al. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol.* 2006;188:6449-59.
23. Scaletsky I, Silva M, Trabulsi L. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun.* 1984;45:534-36.

Opina sobre este artículo:

<http://medicalia.org.es/>

Los médicos disponen de una red social para intercambiar experiencias clínicas, comentar casos y compartir conocimiento. También proporciona acceso gratuito a numerosas publicaciones. **¡Únase ahora!**

Publish with iMedPub

<http://www.imedpub.com>

- ✓ Es una revista en español de libre acceso.
- ✓ Publica artículos originales, casos clínicos, revisiones e imágenes de interés sobre todas las áreas de medicina.

**Archivos de Medicina
Se hace bilingüe.**

Para la versión en inglés los autores podrán elegir entre publicar en Archives of Medicine:

<http://www.archivesofmedicine.com>

o International Archives of Medicine:
<http://www.intarchmed.com>