

## ESTRATEGIAS IN VITRO PARA EVALUAR LA ADHESIÓN BACTERIANA SOBRE EL EPITELIO INTESTINAL EN LECHONES

Molist<sup>1</sup>, F., Gómez de Segura<sup>1</sup>, A., Hermes<sup>1</sup>, R.G., Ywazaki<sup>1</sup>, M., Virkola<sup>2</sup>, R., Korhonen<sup>2</sup>, T., Martín-Orúe<sup>1</sup>, S.M. y Pérez<sup>1</sup>, J.F.

<sup>1</sup>Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animal. Dpt. Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

[francesc.molist@uab.cat](mailto:francesc.molist@uab.cat)

<sup>2</sup>General Microbiology, Faculty of Biosciences P.O.Box 56, FIN-00014 University of Helsinki, Finland.

### INTRODUCCIÓN

La adhesión de bacterias patógenas sobre el epitelio intestinal suele ser un requisito indispensable para que se produzca la infección. El epitelio intestinal es una barrera física, en la que están presentes células especializadas, moco, péptidos antimicrobianos y una microbiota residente que proporciona la primera línea de defensa del hospedador. Determinadas estrategias nutricionales y/o farmacológicas pueden interferir en la colonización del epitelio y actuar, por tanto, en la prevención y/o tratamiento de la infección. Entre los mecanismos de acción por los que un ingrediente puede interferir en la adhesión se encuentran: la unión de éste a los elementos fimbriales bacterianos al mimetizar los receptores intestinales, el bloqueo de los nichos de adhesión impidiendo la adhesión de la bacteria, o la competición por nichos entre bacterias que comparten el mismo *loci* de unión intestinal. Resulta necesario desarrollar sistemas de evaluación del bloqueo de la adhesión *in vitro* que sean rápidos, reproducibles y que permitan una evaluación comparada de ingredientes previa a su posible incorporación en el pienso de los animales. Este estudio se está llevando a cabo inicialmente en lechones recién destetados para estudiar diferentes compuestos o ingredientes que permitan prevenir o disminuir la adhesión de *E.coli* en la mucosa intestinal, y reducir con ello la incidencia de diarreas postdestete.

### MATERIAL Y MÉTODOS

*Estudios de adhesión en porta tras marcaje de las bacterias con FITC:* Se sacrificaron 3 lechones (24 ± 0.77d) tratados con colistina (1g de colistina al 10%/ l de agua) durante 3 días. Se extrajeron segmentos del intestino delgado y del grueso que después de ser lavados se cortaron en fragmentos 2 cm de longitud para ser congelados rápidamente, previo recubrimiento con OCT, en isopentano enfriado en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras fueron almacenadas a -80°C. Para realizar los estudios de adhesión, se cortaron secciones de 5 µm y se fijaron en los portas con paraformaldehído al 3.5%. Se cultivó la *E.coli* K88 en luria agar, se marcaron las bacterias con FITC (10<sup>9</sup> UFC/ml) y se incubaron durante 1 h con los posibles bloqueantes (Edelman et al., 2003). Se testaron fracciones purificadas de leche con alto contenido en siálicos o en caseinglicomacropéptido (0; 0.5; 1.5 and 2.5 mg/ml) o probióticos (*Lactobacillus crispatus* y *L. amylovorus*) empleando una relación lactobacillus:*E. coli* de 0:1; 0.5:1; 1:1 y 5:1. Transcurrido el tiempo se lavaron las muestras y se procedió a la doble tinción del tejido con laminina. El grado de inhibición de la adhesión fue analizado mediante la observación directa en un microscopio de epifluorescencia con filtros específicos.

*Estudios de adhesión en placa multipocillo:* Paralelamente se recogieron muestras de mucus en solución salina de Hanks balanceada (HBSS). Se almacenaron en congelación hasta su utilización. Se ajustó la concentración de la proteína del mucus a 0.1 mg/ml, tapizando los pocillos (Namba et al., 2007). Se procedió a la incubación con la *E. coli* K88 marcada con FITC (5·10<sup>13</sup> UFC/ml) durante 2 h posteriormente se procedió a realizar lavados de los pocillos (200 µl x 3) con 0.1% BSA en PBS y con agua para eliminar las bacterias no adheridas. Se determinó la fluorescencia de cada pocillo (490 nm de excitación / 518 nm de emisión). La puesta a punto de esta técnica permitirá hacer un amplio screening de bloqueantes de adhesión bacteriana sobre el mucus intestinal para su posterior estudio *in vivo* con lechones recién destetados.

*Estudios de adhesión por FISH (fluorescence in situ hybridization):* Se procedió a realizar una infección experimental con *E. coli* enterotoxigénica (K88ac) en lechones de 26 días de edad. Se sacrificaron los animales y se recogieron muestras de íleon siguiendo la misma metodología que los estudios de adhesión en porta. Una vez fijado el tejido con paraformaldehído, se procedió a la hibridación (50°C/4h) con sondas de *E. coli* (EC 1531 marcada con Cy3) y Eubacterias (SD-Bact-0338-a-A-18 marcada con FITC) para la detección directa de la bacteria adherida sobre el epitelio intestinal (Poulsen et al 1994). Se realizó un triple marcado de cada muestra empleando adicionalmente Hoechst. El análisis y la visualización de la imagen se realizaron mediante microscopía confocal. La sonda de Eubacterias se empleó con la finalidad de usarla como un marcador general de bacterias para conocer la carga bacteriana que existe en la sección de tejido estudiada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras evaluar la adhesión de *E. coli* K88 a lo largo de los diferentes tramos del intestino delgado, pudo observarse una mayor adhesión de la bacteria en el íleon. Las bacterias son muy específicas de los receptores intestinales (lectinas) y esta especificidad determina la zona preferencial de infección. Por lo tanto, el íleon fue seleccionado para continuar con los estudios de adhesión.

Es posible disminuir la incidencia de patologías como la colibacilosis post-destete, mediante la utilización de bloqueantes de la adhesión microbiana, prebióticos o probióticos en las dietas. Estas estrategias basan su eficacia en una mejora de los mecanismos naturales de defensa del animal. Como bloqueantes de la adhesión bacteriana se seleccionaron fracciones purificadas de leche con alto contenido en ácido siálicos (SA) o en caseínglicomacropéptido (CGMP), ya que en trabajos previos de otros autores se responsabiliza a estas moléculas como las que confieren la actividad biológica (Mouricout et al., 1990; Korhonen et al., 1985; Brody, 2000). Los resultados inmunohistoquímicos muestran que cuando el inhibidor no está presente en el medio, la bacteria se une en el borde en cepillo de las vellosidades intestinales. En presencia de los inhibidores debido al efecto bloqueante, la adhesión se vuelve no específica, detectándose bacterias en el corte del tejido pero no siguiendo la estructura de la vellosidad intestinal. De forma similar cuando el corte de intestino se incubó en presencia de diferentes relaciones *Lactobacillus:E. coli*, pudo observarse cómo a medida que aumentaba este cociente se producía mayor inhibición de la adhesión del patógeno sobre el epitelio intestinal (Tabla 1).

Actualmente estamos trabajando en la puesta a punto de los procedimientos descritos como adhesión en placa multipocillo y en la evaluación por FISH, con el fin de poder cuantificar la inhibición de la adhesión entre diferentes sustratos. Estos métodos, a diferencia de los que emplean sacos de intestino con posterior cultivo microbiológico (Naughton et al., 2001), permiten el almacenamiento de las muestras a -80°C hasta su procesamiento y el análisis de un mayor número de muestras al mismo tiempo. Sin embargo, también estamos tratando de resolver algunos problemas inherentes a las metodologías que hemos descrito, como la estabilidad de la capa de mucus en los pocillos o la eliminación de la adhesión no específica sobre el mucus en un caso; mientras que en el marcaje con FISH, estamos optimizando las condiciones de hibridación para las diferentes sondas, tratamos de controlar la hibridación no específica y el manejo de las imágenes para poder realizar la cuantificación.

La puesta a punto de estas técnicas *in vitro* nos permitirá la evaluación y comparación de múltiples ingredientes como posibles bloqueantes de adhesión, en un paso previo a su incorporación en el pienso. La técnica de elección sería la de la adhesión en portas multipocillo por su versatilidad, rapidez de análisis y menor coste. En segundo lugar estarían las dos técnicas de análisis por imagen que a pesar de ser más laboriosas permiten obtener imágenes comparativas del grado de la adhesión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brody, E.P. 2000. *Br. J. Nutr.* 84: 39-46.
- Edelman S., Leskela, S., Ron, E., Apajalahti, J., Korhonen, T.K. 2003. *Vet. Microbiol.* 91: 41-56.
- Korhonen, T.K., Valtonen, M.V. Parkkinen,

J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S.B., Mäkelä, P.H. 1985. *Infect. Immun.* 48: 486-491. • Mouricout, M., Petit, J.M., Carias, J.R., Julien, R., (1990) *Infect. Immun.* 58: 98-106 • Namba, A., Mano, N., Hirose, H. 2007. *J. Appl. Microb.* 102: 1307-1317. • Naughton, P.J., Mikkelsen, L.L., Jensen, B.B. 2001. *Appl. Env. Micr.* 67: 3391-3395 • Poulsen, L.K., Fusheng, L., Kristensen, C.S., Hobolth, P., Molin, S., Krogh, K.A. 1994. *Infect. Immun.* 62: 5191-5194

**Tabla 1.-** Resultados test de inhibición por métodos inmunohistoquímicos empleando posibles prebióticos o probióticos

Concentración del inhibidor	0 mg/ml	0.5 mg/ml	1.5 mg/ml	2.5 mg/ml
CGMP	+++	++	++	-
SA	+++	-	-	-
Relación <i>Lactobacillus</i> : <i>E. coli</i>	0:1	0.5:1	1:1	5:1
<i>L. amylovorus</i>	+++	-	-	-
<i>L. crispatus</i>	+++	++	-	-

+++ alto número de bacterias adheridas sobre las vellosidades; ++ moderado número de bacterias adheridas sobre las vellosidades; + bajo número de bacterias adheridas sobre las vellosidades; - no existe adhesión sobre la vellosidad

**Agradecimientos:** Este trabajo está siendo financiado por CICYT (AGL2005-07438-C08-01/GAN) y AGL2007-60851/GAN.

### IN VITRO STRATEGIES TO TEST BACTERIAL ADHESION IN PIGLETS

**ABSTRACT:** Pathogens infect their host tissues through a series of steps that begin with the adhesion and colonization of the mucosal surfaces. The intestinal epithelium is a physical barrier that prevents unwanted bacteria from gaining access to essential organs; it also provides a surface covered by specialized cells producing mucus, antimicrobial peptides and antimicrobial molecules, which together with resident microbiota provide the front line of defense against pathogenic microorganisms. Certain nutritional strategies and/or drugs may interfere with the colonization of the epithelium and may act, thus, in the prevention and/or treatment of the infection. Then, it is necessary to develop *in vitro* strategies to test bacterial adhesion. These techniques should be fast, reproducible and should allow a comparative assessment of ingredients prior to their possible incorporation into the feed. The techniques that are included in this study are the following: Immunohistochemical staining, fluorescence *in situ* hybridization with tissue samples and fluorescence using 96-well microtitre plates in mucus. This study is being conducted initially in newly weaned piglets to study different compounds or ingredients that can prevent or reduce the adhesion of *E. coli* to the intestinal mucosa, and thereby reduce the incidence of postweaning diarrhea.

**Keywords:** *E. coli* K88ac, sialic acid, caseinglycomacropeptide, *Lactobacillus amylovorus*