

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE *Bacillus cereus* var. Toyoi PARA MODIFICAR LA INVASIVIDAD DE *Escherichia coli* K88 y *Salmonella* Typhimurium EN CELULAS IPEC-J2

González-Ortiz<sup>1</sup>, G., Cerdà-Cuéllar<sup>2,3</sup>, M., Castillo<sup>4</sup>, M., Solà-Oriol<sup>1</sup>, D. y Martín-Orúe<sup>1</sup>, S.M.  
<sup>1</sup>Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNiBA). Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona. <sup>2</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus UAB, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Rubinum S.A. Av. de la Llana 123, 08191 Rubí, Barcelona. gemma.gonzalez@uab.cat

### INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han demostrado la capacidad de comunicación de las bacterias mediante la producción de señales químicas también conocidas como *autoinductores* (AIs). Los AIs se secretan al medio durante el crecimiento bacteriano y, una vez alcanzado un nivel de concentración crítico, éstos pueden activar o reprimir la expresión de determinados factores de virulencia. Todo este proceso se conoce como *quorum sensing* (QS) (Nealson et al., 1970). Las acil-homoserina lactonas (AHL) son las primeras señales de QS usadas por bacterias gram negativas. Algunas enterobacterias de los géneros *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, no sintetizan AHL pero sí son capaces de reconocer las producidas por otras bacterias mediante la presencia de receptores de membrana (Nesse et al., 2011). Algunos probióticos podrían interferir de forma positiva con estos mecanismos. En este sentido, *Bacillus cereus* var. Toyoi ha demostrado capacidad de degradar las AHL producidas por otras bacterias (Castillo y Cerdà-Cuéllar, 2010). La hipótesis de este trabajo consideraría que la adición de la cepa probiótica *Bacillus cereus* var. Toyoi en la dieta de un lechón sano podría prevenir la expresión de factores de virulencia por parte de *E. coli* K88 y *Salmonella* Typhimurium (dos de los patógenos más relevantes en producción porcina) interfiriendo en los mecanismos de QS. En concreto, el objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad de la digesta procedente de lechones suplementados con *Bacillus cereus* var. Toyoi de modificar la invasividad de *E. coli* K88 y *S. Typhimurium* sobre un cultivo celular de epitelio intestinal porcino (IPEC-J2).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 32 lechones machos destetados (28 días de edad; peso vivo =  $7,4 \pm 0,02$  kg) ([Large White x Landrace] x Duroc) los cuales fueron distribuidos en 16 corrales (2 animales por corral) y asignados a dos grupos experimentales: grupo control (CTR) y grupo probiótico (TOY). Los animales se alimentaron durante dos semanas con una dieta *pre-starter* y durante tres semanas más con una dieta *starter* sin ningún tipo de aditivo. Ambas dietas del grupo TOY, se suplementaron con *Bacillus cereus* var. Toyoi ( $10^9$  UFC/ g). Tras 34 días de consumo, los animales se sacrificaron para la obtención del contenido digestivo ileal. Se combinó el contenido ileal de los dos animales de cada corral y se sometió a dos fases de centrifugación a  $45.000 \times g$  para separar la fracción acuosa del material sólido y mucoso. El sobrenadante obtenido se esterilizó mediante filtración a través de  $0,2 \mu\text{m}$  de diámetro de poro (VWR® Vacuum Filtration Systems, PES Membrane, Sterile).

Se emplearon dos cepas distintas de *E. coli*. La primera fue una cepa fimbrada (*E. coli* K88) aislada a partir 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* de Lugo y la segunda cepa fue aislada de un lechón destetado sano, caracterizada por no poseer fimbras (*E. coli* SF; F4 -, F6 -, F18 -, LT1 -, ST1 -, ST2 +, Stx2e -) cedida por la Dra. Calvo del Departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la UAB; adicionalmente se utilizaron dos cepas de *S. Typhimurium* (7G9 y 9E9) aisladas de cerdo a partir de dos casos clínicos y cedidas por el Dr. Mateu del Departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la UAB. Las dos cepas de *Salmonella* se escogieron a partir de una selección de entre 27 cepas por su respuesta invasiva en nuestro modelo de estudio, siendo la cepa 7G9 la más invasiva y la cepa 9E9 la menos invasiva. Todas las bacterias se cultivaron durante 24 h en Caldo Luria (CL) a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. La ausencia de un posible efecto bactericida de los

sobrenadantes ileales en el crecimiento de de las bacterias se confirmó mediante cultivos puros.

Previamente a las pruebas de invasividad, se realizó una co-incubación a 37°C con agitación con 2 ml de contenido ileal de cada sobrenadante, 2 ml de CL y 4 µl del cultivo bacteriano (*E. coli* o *Salmonella*). A las 24 h, los co-incubados se centrifugaron a 1.700 x g durante 5 min y los *pellets* se resuspendieron con PBS hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 1 ( $\lambda = 650$  nm). Éstos se diluyeron 100 veces para alcanzar una concentración aproximada de 6 log UFC/ml. En el mismo ensayo de co-incubación se incluyeron tres medios como controles en los que en lugar de añadir el filtrado ileal se añadió: CL, PBS, o bien el sobrenadante estéril del cultivo de *Bacillus cereus* var. Toyoi en medio CL (SN Toyo).

Las células epiteliales de intestino porcino (IPEC-J2) (re-suspendidas en medio Dulbecco's modificado) se sembraron ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez confirmada la presencia de la monocapa de células, los pocillos se lavaron con PBS y se añadieron 200 µL de medio CO<sub>2</sub> independiente (GIBCO®). Las placas se mantuvieron a 37°C durante 24 h hasta la realización del test de invasividad.

En las pruebas de invasividad, tras retirar el medio CO<sub>2</sub> independiente de los pocillos, se añadieron 200 µl de la suspensión de bacterias previamente co-incubadas con los contenidos ileales o con los controles. Durante un periodo de 30 minutos a 37°C, las bacterias se dejaron interactuar con el epitelio intestinal y tras lavar una vez los pocillos una vez con PBS estéril se añadieron 200 µl medio CO<sub>2</sub> independiente, incubando las placas a 37 °C para permitir el crecimiento de las bacterias adheridas a las células. El crecimiento bacteriano se monitorizó mediante DO a una longitud de onda de 650 nm cada 20 minutos (SPECTRA max 384 Plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA). 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 las bacterias alcanzan una DO de 0,05 a 650 nm). Finalmente, se realizó un test ANOVA de los valores de  $t_{DO=0,05}$  usando los procedimientos GLM (controles) y MIXED (contenidos ileales) de SAS. Todos los resultados se obtuvieron a partir de dos ensayos independientes con triplicados para cada determinación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

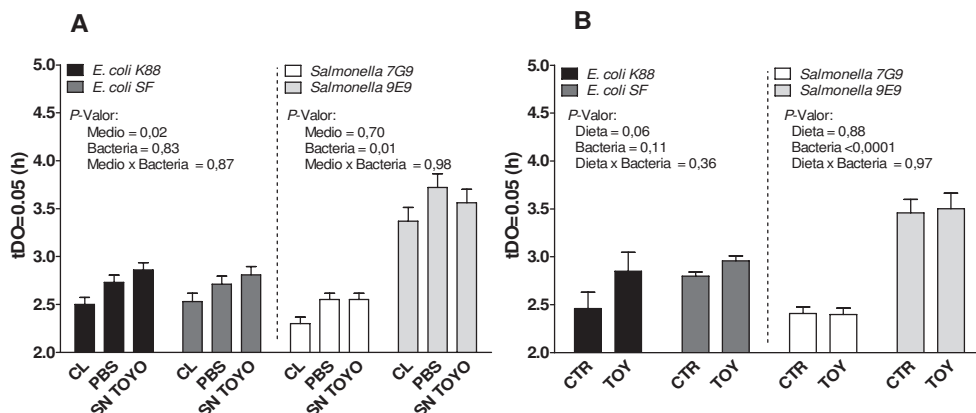
Para la interpretación de los resultados, valores de  $t_{DO=0,05}$  superiores al control indican una atenuación de la capacidad de adhesión e invasión de la bacteria. Considerando las dos cepas de *E. coli* co-incubadas con los controles, se observó un efecto significativo ( $P = 0,01$ ) sobre la respuesta de invasividad. En general, las dos cepas co-incubadas con el sobrenadante estéril de un cultivo de *Bacillus cereus* var. Toyoi (SN Toyo) presentaron una menor capacidad de invasión respecto al CL (2,51 vs. 2,84 h;  $P = 0,005$ ) sin que hubiera diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ambas cepas. La co-incubación de las cepas de *Salmonella* con SN Toyo no modificó la virulencia en comparación con CL (2,83 vs. 3,06;  $P = 0,77$ ). En cuanto a la comparación entre las dos dietas experimentales, se observó una tendencia estadísticamente significativa ( $P = 0,06$ ) sobre la reducción de la invasividad de las cepas de *E. coli* co-incubadas con los contenidos de íleon de los animales que recibieron el probiótico respecto a los controles (2,90 vs. 2,63 h). Es interesante destacar que aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento entre ambas cepas ( $P$  interacción = 0,36), dicha reducción fue de mayor magnitud en *E. coli* K88, en comparación con *E. coli* SF. En el caso de *Salmonella*, a pesar de observar diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas ( $P < 0,0001$ ), que reflejan su diferente comportamiento invasivo, el tratamiento experimental no modificó su capacidad de invasión respecto al grupo CTR ( $P = 0,89$ ).

Estos resultados demuestran la capacidad del sobrenadante ileal, de los animales que recibieron el probiótico, en modular la respuesta de invasión de *E. coli*, sin embargo no se observó ningún efecto sobre la invasión de *Salmonella* en nuestro modelo de estudio. Los

resultados obtenidos sugieren que la suplementación con *Bacillus cereus* var. Toyoi podría ser capaz de reducir la invasividad de *E. coli* al epitelio intestinal mediante la regulación en la expresión de factores de virulencia en el medio digestivo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

●Castillo Gómez, M., Cerdà-Cuellar, M. 2010. ISCPP 2010 Kosice, Slovakia. Proceedings, 83-84. ● Neelson, K. H., Platt, T., Hastings, J.W. 1970. J. Bacteriol. 104:313-322. ● Nesse, L. L., Berg, K., Vestby, L. K., Olsaker, I., Djønne, B. 2011. Acta Vet. Scand. 53:44.



**Figura 1.** Invasión sobre células epiteliales intestinales porcinas (IPEC-J2) por parte de las bacterias previamente co-incubadas con diferentes medios control: CL (caldo luria), PBS (buffer salino fosfato), SN Toyo (sobrenadante estéril de un cultivo de *Bacillus cereus* var. toyoi) [A] y con los sobrenadantes ileales estériles de los grupos experimentales CTR (grupo control) y TOY (grupo probiótico) [B]. Las barras representan el error estándar de cada media. Valores de  $t_{DO=0,05}$  (h) por encima del control CL, indican una menor capacidad invasiva de la bacteria. Se evaluó la invasividad de dos cepas de *E. coli* (con fimbrias (K88) o sin fimbrias (SF)) y dos cepas de *S. Typhimurium* (de alta invasividad (7G9) o baja invasividad (9E9)).

### EVALUATION OF THE ABILITY OF *Bacillus cereus* var. Toyoi TO MODIFY THE INVASIVENESS OF *Escherichia coli* K88 AND *Salmonella* Typhimurium IN IPEC-J2 CELLS

**ABSTRACT:** The potential of the probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi, to modify the intestinal invasiveness of *Escherichia coli* K88 and *Salmonella* Typhimurium was tested on an *in vitro* model with IPEC-J2 cells. For that purpose a total of 32 weaning piglets allocated into 16 pens were fed two experimental diets added or not with *Bacillus cereus* var. Toyoi ( $10^9$  UFC/g). After 34 days consuming the diets, animals were euthanized and ileal content pooled by pen and sterile supernatants obtained by centrifugation and filtration. Co-incubation of different strains of *E. coli* and *S. Typhimurium* with the sterile ileal supernatants showed a significant reduction in the invasiveness of *E. coli* to IPEC-J2 cells ( $P= 0.01$ ) for the animals that received the probiotic, without significant differences between strains. The two strains of *Salmonella* showed differences in their invasiveness to cells ( $P< 0.0001$ ) but no differences related to experimental treatments. These results suggest the ability of *Bacillus cereus* var. Toyoi to interfere with quorum sensing mechanisms of *E. coli* in the ileum of pigs, probably repressing the expression of some virulence factors involved in the adhesion and invasion of epithelial cells.

**Keywords:** *Bacillus cereus* var. Toyoi, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, IPEC-J2