



Archivos de Medicina Veterinaria

ISSN: 0301-732X

archmv@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

Zamora, J.; Reinhardt, G.; Polette, M.; Macías, P.
Detección rápida en el diagnóstico de Escherichia coli toxigénica productora de LT y VT
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 32, núm. 1, 2000
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013741010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org





redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

-  Como citar este artículo
-  Agregar a favoritos
-  Enviar a e-mail
-  Imprimir HTML

Arch. med. vet. v.32 n.1 Valdivia 2000

Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y VT¹

Rapid detection in diagnosis of toxigenic *Escherichia coli* strains LT and VT producing

J. Zamora, M. V., G. Reinhardt, M. V., Dr. med. vet., M. Polette, T. M.; P. Macías, T. M.

Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 167, Valdivia, Chile.

E-mail: jzamora@uach.cl

SUMMARY

Due to the great convenience of diagnosing the severity of the infections caused by LT and VT toxin producing *E. coli* strains, a work was planned for this purpose using the technique described by Parreira and others (1994).

A total 231 *E. coli* strains isolated from diarrheic suckling piglets under 40 days of age were used. These strains were tested for the capacity to produce toxins. To determine the production of LT and VT agar-overlay method with Vero cells was used which allowed to detect 15 (6.4%) positive strains to LT production and 16 (6.9%) to the VT synthesis. The technique was simple, economic and rapid for the diagnostic of the LTEC and VTEC strains.

Palabras claves: *E. coli*, enterotoxina termolábil, verotoxina, detección LT/VT.

Key words: *E. coli*, heat-labile enterotoxin, verotoxin, LT/VT detection

INTRODUCCION

Escherichia coli es un importante comensal de la microbiota intestinal del hombre y los animales; no obstante, algunas cepas son de gran relevancia en diversas patologías intestinales y extraintestinales, destacándose entre las primeras aquéllas que sintetizan distintas toxinas, tales como las toxinas termoestable (ST) y termolábil (LT) por las cepas enterotóxicas (ETEC); también se describen las que producen alteraciones letales en células Vero, denominándose, por este hecho, verotoxina (VT), también conocida como "Shiga-like toxin" por estar relacionada en estructura y función con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* (Gyles, 1993).

Se ha detectado *E. coli* productora de LT (LTEC) en graves cuadros humanos y también en porcinos. Esta enterotoxina interactúa con el sistema de adenilato ciclasa en el interior de las células intestinales lo que conlleva a un incremento del AMPc y la consecuente eliminación de iones Na⁺ y Cl⁻, removiendo el agua celular (Blanco y col., 1992; Gyles, 1993).

Las cepas de *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) pueden sintetizar VT1, VT2 o ambas citotoxinas que inhiben la síntesis proteica (Takeda, 1995). Son liberadas en el intestino, pasan a la sangre, lesionan el endotelio, provocan coagulación intravascular local, acumulación de fibrina en el SNC, en el tubo digestivo y en los riñones (Karmali, 1989; Blanco y col., 1993; Takeda, 1995).

En consideración a que cepas ETEC y VTEC juegan un importante papel en las patologías entéricas de los lechones, el presente trabajo tiene por objetivo emplear un método de diagnóstico rápido en la pesquisa de *E. coli* productoras de LT y VT, mediante líneas celulares Vero cubiertas con agar.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 231 cepas de *E. coli* aisladas de igual número de cerditos diarreicos menores de 40 días, provenientes de diversos planteles porcinos.

Para la detección de cepas ETEC y VTEC se procedió según Parreira y col (1994). Con este objeto, se utilizaron células Vero cultivadas en Medio Esencial Mínimo Earle (MEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%, empleando microplacas de 24 pocillos en los que se inocularon 0,5 ml de cultivo celular por pocillo, a una concentración de 2×10^5 células/ml. La incubación de la microplaca se realizó a 37° C en atmósfera al 5% de CO₂ por 24 48 h hasta la formación de la monocapa celular. A continuación se removió el medio de crecimiento y se lavó la línea celular usando MEM por una vez. Luego se cubrió la monocapa con 0,8 ml de una solución compuesta por MEM, suero fetal bovino al 10% y agar purificado al 1% p/v. Este paso se realizó a una temperatura de 44 45° C. Una vez solidificada y enfriada la capa de agar a temperatura ambiente, se sembró en cada pocillo un colonia de *E. coli* e incubó a 37° C con 5% de CO₂ durante 96 h. Como controles positivos se emplearon cepas aisladas anteriormente productoras de LT y VT y, como negativo, se usó una cepa *E. coli* K12 C600. Finalizado el período de incubación, se observaron con microscopio invertido para determinar la presencia de lesiones en las células Vero por LT y VT de acuerdo a las alteraciones características descritas (Konowalchuk y col., 1977; Speirs y col., 1977; Kashiwazaki y col., 1980, y Karmali, 1989). Así, las alteraciones por LT se caracterizan por un efecto citotónico, las células están aumentadas de tamaño, engrosadas, refráctiles y se pueden observar prolongaciones filamentosas. En cambio, la VT tiene efecto citotóxico, las células se redondean con notables y extensivos cambios destructivos de la monocapa que se acentúan progresivamente con el

tiempo de incubación, produciendo la muerte celular.

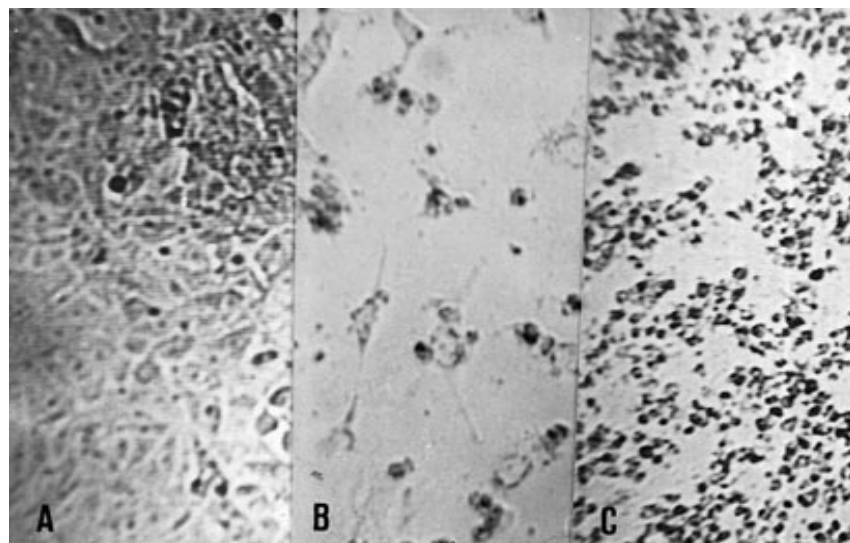
RESULTADOS Y DISCUSION

De las 231 cepas de *E. coli*, 31 (13,4%) sintetizaron LT o VT, tal como se resume en el [cuadro 1](#) y se demuestran los efectos citopáticos en la [microfotografía 1](#), lesiones del todo coincidente con las descritas por diversos investigadores ([Konowalchuk y col., 1977](#); [Speirs y col., 1977](#); [Kashiwazaki y col., 1980](#); [Karmali, 1989](#)).

CUADRO 1. Efecto de LT y VT en línea celular Vero del total de cepas de *E. coli* examinadas.

Effect of LT and VT in Vero cell line of the total *E. coli* strains examined.

EFECTO TOXICO	CANTIDAD CEPAS	TIPO TOXINA
CITOTONICO	15 (6,5%)	LT VT NEGATIVO
CITOTOXICO	16 (6,9%)	
SIN EFECTO	200 (86,6%)	
TOTAL	231 (100%)	15 LT + 16 VT= 31(13,4%)



Microfotografía 1. A) Control de células Vero. B) Citotoxicidad de las células Vero por LT y C) Citotoxicidad de las células Vero por VT.

(A) Vero cells control. B) LT cytotoxicity in Vero cells. C) VT cytotoxicity in Vero cells).

atrófica porcina sobre cultivo de células pulmonares embrionarias de cerdos. Posteriormente, [Chanter y col. \(1986\)](#) comprueban este efecto tóxico sobre esas células embrionarias, pero cubiertas con agar. Basados en estas investigaciones, [Parreira y col \(1994\)](#) demuestran que las cepas de *E. coli* productoras de LT y VT que son citopáticas para las líneas celulares Vero y HeLa, también mantienen este efecto si las células son cubiertas con agar y sobre él se siembra la enterobacteria.

Teniendo presente estos estudios realizamos la presente investigación con excelentes resultados ([Microfotografía 1](#)). La técnica clásica, consistente en la inoculación de extractos bacterianos en monocapas de líneas celulares es tediosa, se necesita bastante tiempo y equipos especiales de laboratorio (agitador orbital, centrífuga, filtro, ultrasonido, entre otros). Se requiere, también, el empleo de antibióticos que permitan una mayor permeabilidad de la membrana celular de *E. coli* o en su defecto se debe lisar la cepa con ultrasonido; junto a lo anterior es imprescindible esterilizar el extracto por filtración. Además de estos problemas, es conveniente y necesario tener presente que, en algunas ocasiones, la síntesis de la toxina de la bacteria en los medios de cultivos líquidos puede ser baja y podría ser insuficiente para lesionar a las células.

En cambio, la técnica empleada en el presente trabajo resultó ser más económica, rápida y sencilla, aunque es posible que la nitidez en la observación microscópica de las células sea inferior a la que se logra con los medios de cultivos líquidos. Permite, también, examinar fácilmente una gran cantidad de muestras y, naturalmente, no es necesario extraer la toxina de los cultivos bacterianos. Además, de acuerdo con [Parreira y col. \(1994\)](#), con este método es posible detectar más cepas toxigénicas que con los extractos bacterianos, lo que se puede deber, entre otras causas, a la técnica de extracción de toxinas que se utilice, a la necesaria filtración a que se debe someter el extracto, al hecho que el ensayo se haga en el mismo día de la extracción o se conserve a 20° C hasta su uso, por lo que concluyen que estos procedimientos pueden conducir a una pérdida o disminución de la concentración de la actividad tóxica de algunos filtrados.

Las ventajas de la técnica, que utiliza línea celular cubierta con agar, enumeradas precedentemente, hacen aconsejable su empleo para detectar rápidamente cepas productoras de LT y VT, lo que se justifica más aún en los diagnósticos de rutina, aunque, por carecer de experiencia, no se pudiere diferenciar si las alteraciones celulares corresponden a LT o VT, pues de todos modos significaría que se trata de cepas toxigénicas.

En un estudio anterior realizado con extracto tóxico de *E. coli* se pesquió un 6,9% de cerditos positivos a LT y 4,5% a VT ([Zamora y col., 1999](#)), porcentaje prácticamente coincidente para la toxina termolábil y levemente inferior para VT al encontrado en esta oportunidad ([cuadro 1](#)). Lamentablemente, la prevalencia de estas infecciones neonatales de los cerditos en Chile no se conoce del todo, no sólo por los escasos trabajos sobre el particular, sino que también por los distintos métodos empleados en su diagnóstico, como es la inoculación experimental en el asa intestinal ligada de cerditos ([Pinochet y col., 1989](#)), por lo que no es posible establecer comparaciones ni obtener datos confiables sobre la prevalencia de colibacilosis provocadas por una determinada toxina. De ahí que, utilizando un método rápido y confiable como el descrito se obtendrían, por una parte, mayores datos de importancia epidemiológica y, por otra, se efectuarían, en forma precoz el diagnóstico de notable importancia para la atención médico veterinario en los planteles porcinos.

RESUMEN

En atención a que es de alta conveniencia diagnosticar rápida y efectivamente las infecciones por cepas de *E. coli* productoras de toxinas LT y VT, se planificó un trabajo con la técnica descrita por [Parreira y col. \(1994\)](#).

Para este efecto, se utilizaron 231 cepas de *E. coli* aisladas de igual número de cerditos diarreicos

menores de 40 días, provenientes de diversos planteles porcinos, las que se probaron para determinar su capacidad de sintetizar toxinas. Para determinar la producción de LT y VT se empleó el método de capa de agar sobre líneas celulares Vero, lo que permitió detectar 15 cepas (6,4%) positivas a la producción de LT y 16 (6,9%) a la síntesis de VT. La técnica fue sencilla, económica y permitió un diagnóstico precoz de las cepas LTEC y VTEC.

Aceptado: 23.05.2000.

¹ Proyecto FONDECYT 1951150.

BIBLIOGRAFIA

BLANCO, M., J. BLANCO, J. E. BLANCO, J. RAMOS. 1992. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *E. coli* isolated from cattle in Spain. *J. Med. Microbiol.* 54: 1446 1450.

BLANCO, J., M. BLANCO, J. E. BLANCO, M. P. ALONSO, A. ESCRIBANO. 1993. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *E. coli* enterohemorrágicas productoras de verotoxinas. *Enfermed. Infec. Microbiol. Clín.* 11: 324 334.

CHANTER, N., J. M. RUTTER, P. D. LUTHER. 1986. Rapid detection of toxigenic *Pasteurella multocida* by agar overlay method. *Vet. Record.* 119: 629 630.

GYLES, C. L. 1993. *Escherichia coli*. In: C. L. Gyles & Ch. O. Thoen, (eds.). "Pathogenesis of bacterial infections in animals" pp 164 187. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, USA.

KARMALI, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 15 38.

KASHIWAZAKI, M., T. OGAWA, Y. ISAYAMA, Y. AKAIKE, K. TAMURA, R. SAKAZAKI. 1980. Detection of vero cytotoxic strains of *Echerichia coli* isolated from disease animals. *Natl. Inst. Anim. Health. Q. (Jpn.)*. 20: 116 117.

KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS, S. STAVRIC. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 775 779.

PARREIRA, V. R., C. W. ARNS, T. YANO. 1994. An agar-overlay method for detection of toxins produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 303 306.

PINOCHET, L., P. AVALOS, A. MORGADO, L. CUEVAS, P. SMITH, R. PIZARRO. 1989. Aislamiento y serotipificación de *Escherichia coli* enterotoxigénica desde casos de diarrea de cerdos lactantes. *Arch. Med. Vet.* 21: 117 122.

RUTTER, J. M., P. D. LUTHER. 1984. Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rinitis of pigs. *Vet. Rec.* 114: 393 396.

SPEIRS, J.I., S. STAVRIC, J. KONOWALCHUK. 1977. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infect. Immun.* 16: 617 622.

TAKEDA, Y. 1995. Shiga and Shiga-like (Vero) toxins. En: J. Moss, B. Iglewski, M. Vaughan, and A. T. Tu (eds.). "Bacterial toxins and virulence factors in disease, Handbook of natural toxins. pp. 313 326. Marcel

Dekker, Inc. New York, USA.

ZAMORA, J., R. REINHARDT, M. POLETTE, P. MACÍAS. 1999. Diarrea neonatal porcina. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* toxigénicas productoras de STa, LT y VT. *Arch. Med. Vet.* 31: 237-242.