

Clonación de las subunidades fímbricas K88ab y K99 e identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas aisladas de cerdos enfermos

A. BORROTO,¹ R. BASULTO,¹ M. MORENO,¹ R. SILVA,³ I. WONG,¹ E. BOVER,¹ S. VALDERRAMA,¹ E. GUTIÉRREZ,¹ L. CALZADA,¹ M. JOGLAR,¹ L. HERRERA² y J. DE LA FUENTE²

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 387, Camagüey 1, Cuba

² Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, Habana 6, Cuba

³ Agrupación de Vacunas y Medios de Diagnóstico, CIGB, La Habana, Cuba

Recibido en junio de 1991

Aprobado en marzo de 1992

RESUMEN

Los genes que codifican para las subunidades fímbricas K88ab y K99 se aislaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando ADN total de las cepas de referencia de *E. coli* enterotoxigénicas G7 (08:K87:K88ab) y B44 (09:K30:K99).

Estos genes fueron clonados entre los sitios de restricción ClaI y BamHI del plasmidio pBR322, y usados como sondas de ADN para identificar y clasificar diferentes aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de cerdos neonatos enfermos en la provincia de Camagüey. Como resultado del pesquiasaje, se detectaron cinco cepas portadoras del antígeno K88 y dos del antígeno K99 en muestras de heces fecales. Además, estos resultados fueron confirmados a través del ensayo de hemaglutinación, aglutinación en placas y el sistema inmunoenzimático (ELISA).

SUMMARY

The genes coding for the fimbriae antigenic subunits K88ab and K99 were isolated from genomic DNA of enterotoxigenic *E. coli* reference strains G7 (08:K87:K88ab) and B44 (09:K30:K99) using the Polymerase Chain Reaction (PCR). The genes were cloned in the plasmid pBR322, between the ClaI and BamHI restriction sites, and used as DNA probes to identify and characterize different *E. coli* isolates from a screening performed in the province of Camagüey. As a result, five K88 and two K99 *E. coli* strains were identified from newborn infected

piglets. Moreover, these results were confirmed using the haemoagglutination assay, the plate agglutination test, and the Enzyme Linked Immunoenzimatic Assay (ELISA).

INTRODUCCION

Las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ECET) están reconocidas como uno de los agentes etiológicos más importantes de la diarrea en cerdos neonatos y destetados (Guinee *et al.*, 1981). Estas cepas se caracterizan por poseer en su superficie estructuras fimbriadas que le permiten la adhesión a las células epiteliales del intestino delgado, así como enterotoxinas denominadas LT (termolábiles) y ST (termoestables), las cuales provocan diarrea a causa del desplazamiento de los líquidos de los tejidos hacia el interior del intestino delgado (Jacobs *et al.*, 1985).

Se han reconocido cuatro tipos de adhesinas (K88, K99, 987P y F41) en cepas de ECET de origen porcino (Jones y Rutter, 1972; Moon *et al.*, 1977; Nagy *et al.*, 1977 y Morris *et al.*, 1983) siendo la proteína K88 la más frecuente. Hasta

el presente han sido identificadas tres variantes antigénicas de la proteína K88: K88ab, K88ac y K88ad (Guinee y Jansen, 1979), de las cuales la última solo se ha encontrado esporádicamente.

En la mayoría de las cepas de ECET estudiadas, los genes requeridos para la producción de enterotoxinas y para la expresión de los antígenos fimbriados se encuentran formando parte de ADN plasmídicos de gran talla (megaplasmidios). En el caso de la proteína F41, estos genes se encuentran formando parte del cromosoma bacteriano (Moseley *et al.*, 1986).

En este trabajo se reporta el aislamiento mediante PCR, de los genes que codifican para las subunidades fímbricas K88ab y K99 obtenidos a partir de cepas de referencia, su clonación en vector plasmídico y la utilización de estos como sondas de ADN para la identificación y caracterización de cepas de *E. coli* aisladas en la provincia de Camagüey. En estos aislamientos de cerdos enfermos se comprobó la presencia de los genes K88 y K99 por métodos de hibridación e inmunológicos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas

Para la clonación de las subunidades fímbricas K88ab y K99 se utilizaron las cepas de referencia de *E. coli* enterotoxigénicas G7 (08:K87:K88ab) y B44 (09:K30:K99) respectivamente. El crecimiento de las cepas de ECET se realizó en medio MINCA (1,36 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$; 10,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$; 1 g glucosa/L; 1 g hidrolizado de caseína/L; 10 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$; 1 mg MnCl_2/L ; 0,135 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{L}$; 0,4 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$) como ha sido descrito previamente (Guinee *et al.*, 1976), pero suplementado con un gramo de extracto de levadura (OXOID, England) por litro de medio.

La cepa de *E. coli* K-12 HB101 (F-hsdS20(rB-mB-) leu supE441 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Strr) xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB) (Boyer *et al.*, 1969) se empleó como hospedero para los plasmidios recombinantes pSUFK88 y pSUFK99 (figura 1). Esta cepa fue crecida en medio LB (10 g triptona/L; 5 g extracto de levadura/L; 10 g cloruro de sodio/L, más 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina).

Ensayo bioquímico

El aislamiento e identificación de las colonias de *E. coli* se realizó en medio selectivo MacConkey-agar siguiendo la metodología descrita por Edwards y Edwin (1972).

Hemaglutinación

Este ensayo se realizó utilizando eritrocitos de curiel y caballo, según la técnica establecida por Evans *et al.* (1979).

Clonación de las subunidades fímbricas

Para aislar los genes K88ab (855pb) y K99 (543pb), se utilizaron oligonucleótidos de 24 mer cada uno, diseñados a partir de las secuencias de ADN reportadas previamente para estas subunidades fímbricas (Gaastra *et al.*, 1981; Roosendaal *et al.*, 1984). El ADN genómico de las cepas de *E. coli* se obtuvo según Sambrook *et al.* (1989). La reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Saiki *et al.* (1988), en un volumen de 100 μL conteniendo 1 μg de ADN genómico, 10 μL de solución tampón Taq Pol 10X ($[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 166 mM, TrisHCl 670 mM, MgCl_2 67 mM, EDTA 67 mM, 1,7 mg BSA/mL pH 8), 250 pmoles de cada cebador, tres unidades de enzima Taq polimerasa (Heber Biotec, Cuba), y 0,25 mmoles de cada dNTP.

La reacción se sometió a una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: desnaturalización 1 min a 94°C, hibridación 1 min a 42°C, y extensión 1 min a 72°C. El último ciclo de extensión fue de 5 minutos. Los fragmentos amplificados se extrajeron con fenol a partir de agarosa de bajo punto de fusión y se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y ClaI con el objetivo de garantizar extremos compatibles con el vector preparado a partir de pBR322. La reacción de ligazón se realizó a 16°C durante 14 horas y se transformó en HB101.

Marcación de las sondas e hibridación de colonias

La marcación de las sondas K88ab (pSUFK88) y K99 (pSUFK99) se realizó con [³²P] alfa dATP (Amersham, UK) según Feinberg y Voetstein (1984), empleando cebadores al azar y el fragmento klenow de la ADN polimerasa I. Las colonias fueron transferidas a filtros Whatman 541 e hibridadas con las sondas marcadas según Sambrook *et al.* (1989).

Secuenciación de ADN

La secuencia de ADN de doble cadena se efectuó según lo descrito por Chen y Seeburg (1985), utilizando como cebador un oligo de 15 mer 5'd(GTATCACGAGGCCCT)3', homólogo a la región anterior al sitio ClaI del plasmidio pBR322 y otros dos oligonucleótidos que reconocen regiones internas de los genes K88ab 5'd(GCCGCGTGACTTCACGGTGCGTCT)3' y K99 5'd(GCTGCTAAAGGATACCATATGACT)3'.

Pruebas serológicas

Estas se realizaron sobre placas de vidrio, mezclando las bacterias con los anticuerpos contra K88 y K99 elicitados en conejo (Cubavet, Cuba).

ELISA para cuantificación de antígenos K88 y K99

Se utilizaron soportes sólidos de poliestireno (Nunc Immunoplates, Denmark), recubiertos con anticuerpos obtenidos en carnero contra las proteínas naturales K88 (100 ng/pozo) y K99 (500 ng/pozo) diluidos en solución tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato 0,1 M) pH 9,5. La incubación de las placas para el recubrimiento se realizó durante toda la noche a 4°C y el bloqueo se hizo en leche descremada al 0,5% en solución tampón fosfato salino (PBS) durante 2 h a 4°C. Las muestras y la curva estándar se aplicaron en solución tampón fosfato con 0,5% de leche descremada y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Luego se añadieron 100 µL por pozo, de una dilución de 1/800 de los anticuerpos contra las subunidades fímbricas naturales K88 y K99 obtenidos en conejo, y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los lavados entre cada paso se realizaron con 0,05% de tween-20 en agua destilada. Posteriormente se añadieron 100 µL por pozo, de un anti IgG de conejo en carnero conjugado con peroxidasa (Sigma Chemical, MO), diluido en la misma solución tampón de las muestras. El sustrato

(0,03% H₂O₂ y ortofenildiamina en solución tampón citrato fosfato pH 7,5) se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con 2 M de H₂SO₄. Las muestras fueron leídas a 495 nm en el lector de placas (Titertek, Multiskan MCC, Finland).

RESULTADOS Y DISCUSION

Clonación de las subunidades fímbricas K88ab y K99

La construcción de los plasmidios recombinantes conteniendo los genes de las subunidades fímbricas K88ab y K99, se desarrolló de acuerdo a lo mostrado en la figura 1. Los oligonucleótidos fueron diseñados de manera que los fragmentos amplificados tuvieran el sitio de restricción ClaI en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3'.

En la figura 2 se muestra el resultado de la reacción por PCR, donde se observa la presencia de un fragmento de 543 pb obtenido a partir de la cepa de referencia B44, y uno de 855 pb a partir de la cepa de referencia G7. Los productos del PCR se digirieron con las enzimas correspondientes para garantizar extremos compatibles con el vector. Posteriormente se realizó la reacción de ligamiento con el plasmidio pBR322 (figura 1), y la identificación de los clones positivos de K88 y K99 mediante hibridación de colonias y digestión de los plasmidios con enzimas de restricción.

Se obtuvo la secuencia de 250 bases de los clones positivos y se comprobó que esta correspondía con la reportada por la literatura (Gaastra *et al.*, 1981; Roosendaaf *et al.*, 1984).

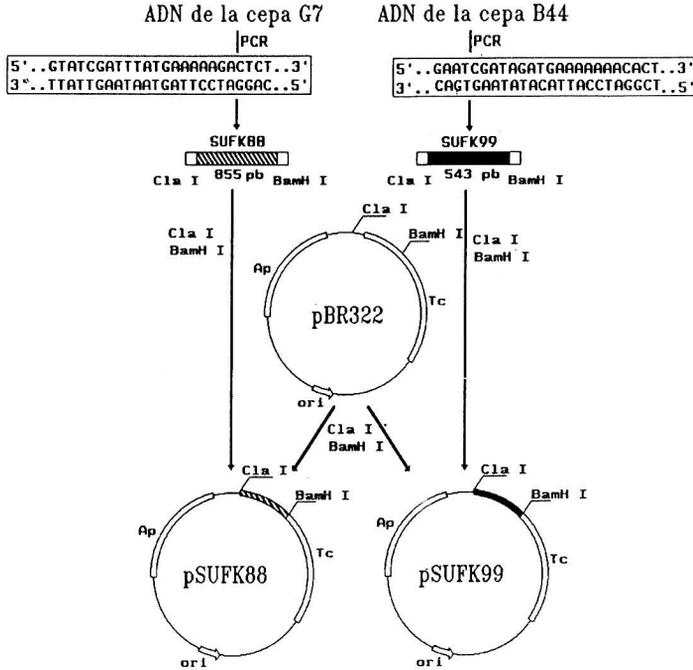


FIG. 1. Estrategia seguida para la clonación de las subunidades fímbricas (SUF) K88ab y K99. Las reacciones del PCR se realizaron con los oligonucleótidos presentados. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se clonaron en el vector pBR322 para generar los plasmidios pSUFK88 y PSUFK99.

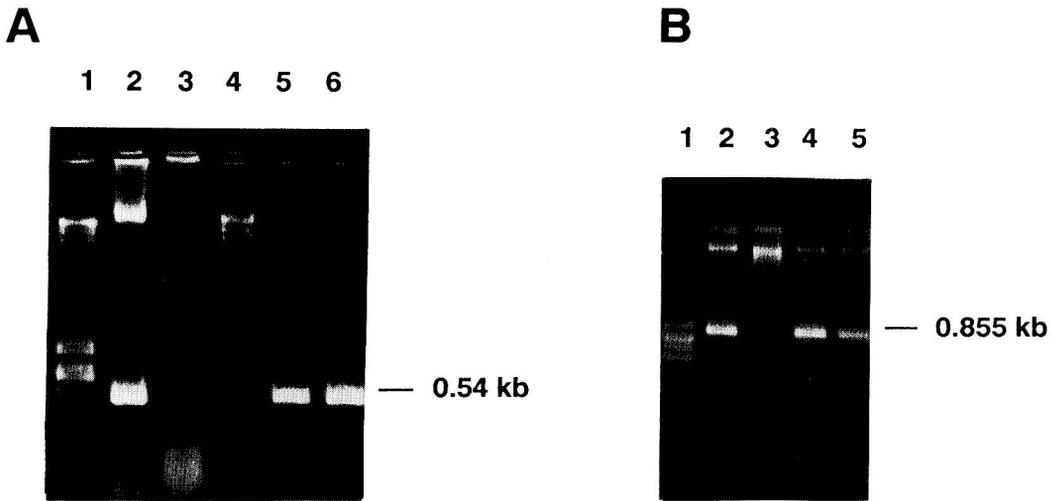


FIG. 2. Reacción de PCR para la amplificación de las subunidades fímbricas K99 (A) y K88 (B). Un décimo del volumen de la reacción de PCR se analizó en gel de agarosa al 1,2%. La talla de los fragmentos amplificados están señalados en kb. Líneas en (A): 1) marcadores de peso molecular lambda-HindIII y pBR322-AluI; 2-3) cepas aisladas CM39-3 y D78-5 respectivamente; 4) lambda-HindIII; 5) CM39-2; 6) cepa de referencia B44. Líneas en (B): 1) pBR322- AluI; 2-4) cepas aisladas VAL2A, DVAL1, y VAL2-1 respectivamente; 5) cepa de referencia G7.

Identificación de las cepas de ECET aisladas de cerdos enfermos

Las cepas aisladas a partir de cerdos neonatos enfermos con cuadro típico de colibacilosis se sometieron al ensayo bioquímico. Para comenzar el trabajo, se

seleccionaron aquellas cepas que utilizaran glucosa, lactosa, produjeran gas y que no utilizaran citrato, urea ni sulfídrico, así como una movilidad variable, rojo metilo positivo y *voges poskauer* negativo, dentro de otros parámetros importantes para su clasificación como una *E. coli*. Los ensayos

Tabla 1
RESULTADOS DEL COMPORTAMIENTO DE LAS DIFERENTES CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO, DE ACUERDO CON LA PRESENCIA DE LOS ANTIGENOS FIMBRIALES K88 Y K99

CEPAS	HEMAGLUTINACION		AGLUTINACION		ELISA		HIBRIDACION	
	K88	K99	K88	K99	K88	K99	K88	K99
Val2A	+	-	++	-	+	-	+	-
MID4-2	+	-	++	-	+	-	+	-
MID-2	-	-	-	-	-	-	-	-
LV45-2	+	-	+	-	+	-	-	-
T111-1	-	+	-	-	-	-	-	-
CL83-4	-	-	-	-	-	-	-	-
CM39-2	-	+	-	+	-	+	-	+
CM39-3	-	+	-	+	-	+	-	+
BVal2	+	-	+	-	-	-	-	-
DVal3	-	-	-	-	-	-	-	-
DVal1	+	-	+	-	+	-	+	-
B11a	-	-	-	-	-	-	-	-
Val2-1	+	-	+	-	+	-	+	-
D78-5	-	+	-	+	-	-	-	-
T108-1	-	-	-	-	-	-	-	-
LV52-2	-	-	-	-	-	-	-	-
K88ac	+	-	-	-	-	-	-	-
K88ad	+	-	+	-	+	-	+	-
G7	+	-	++	-	+	-	+	-
B44	-	+	-	++	-	+	-	+
HB101	-	-	-	-	-	-	-	-
11A	-	-	-	-	-	-	-	-
11B	-	-	-	-	-	-	-	-
11D	-	-	-	-	-	-	-	-
F41	-	-	-	-	-	-	-	-

- (+) positivo
- (++) marcada aglutinación
- (-) negativo

de hemaglutinación se realizaron con el objetivo de poder clasificar las cepas de acuerdo con sus antígenos fimbriales por su comportamiento frente a los eritrocitos de diferentes especies animales considerando posibles K88 aquellas cepas que aglutinaron eritrocitos de curiel y no aglutinaron eritrocitos de caballo y posibles K99 aquellas que tuvieron un comportamiento inverso al descrito anteriormente (Evans *et al.*, 1977) (tabla 1).

La hibridación *in situ* del ADN de las colonias de *E. coli* utilizando las sondas pSUFK88 y pSFUK99 nos permitió identificar la presencia en nuestros aislamientos de cepas que portaban los genes para estos antígenos fimbriales (figuras 3 y 4), verificando la utilidad de esta técnica para la identificación de cepas de ECET asociadas a las diarreas que se presentan en cerdos en los primeros días de nacidos. Además, en algunas cepas este

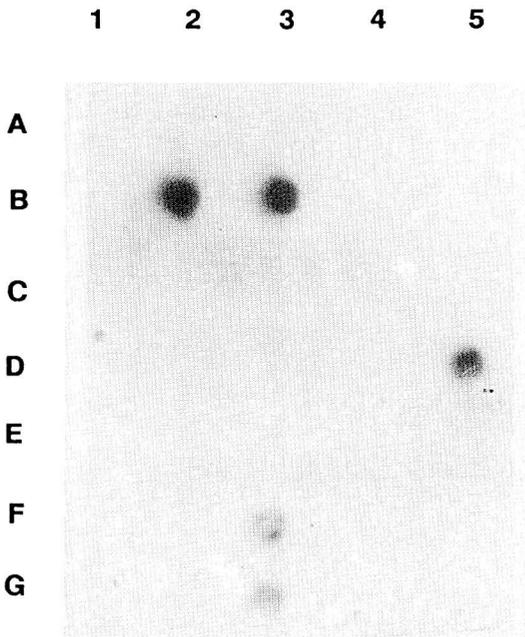


FIG. 3. Hibridación *in situ* de colonias procedentes de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas aisladas en la provincia de Camagüey. La hibridación se realizó empleando como sonda el plasmidio pSUFK99 para la identificación de cepas positivas al antígeno K99. Se emplearon como control positivo, la cepa de referencia B44(F3,G3,D5); como controles negativos se usaron las cepas G7(F1,G1) y HB101(F5,G5). Los aislamientos positivos en la hibridación fueron CM39-2 (B2); CM39-3 (B3).

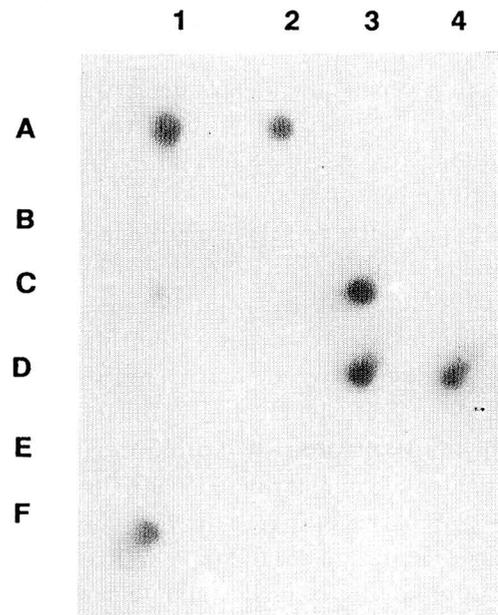


FIG. 4. Hibridación *in situ* de colonias procedentes de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas aisladas en la provincia de Camagüey. La hibridación se realizó empleando como sonda el plasmidio pSUFK88 para la identificación de cepas positivas al antígeno pSUFK88 para la identificación de cepas positivas al antígeno K88. Se emplearon como control positivo la cepa de referencia G7(F1) y como controles negativos, las cepas B44(F3) y HB101(F4). Los aislamientos positivos a la hibridación: Val2-A(A1), MID4-2(A2), DVAL-1(C3), Val2-1(D3), K88ad(D4).

resultado se corroboró mediante PCR (figura 2), en las que se amplificaron los genes que codifican para las subunidades fímbricas K88 y K99.

En la tabla 1 se muestran los resultados del comportamiento de las diferentes cepas en los ensayos realizados. Debemos destacar que todas las cepas positivas en la hibridación de colonias a uno u otro antígeno tuvieron un comportamiento igual en el resto de los ensayos. No obstante, algunas cepas como BVal2, D75-5, T111 y K88ac que fueron positivas en la hemaglutinación y/o a la aglutinación en placa no fueron reconocidas en el ELISA ni en la hibridación de ADN. Existieron algunas cepas que además de ser positivas en las diferentes técnicas mostraron una aglutinación más evidente y rápida que el resto de las cepas en este ensayo.

Finalmente se seleccionaron las cepas aisladas Val2-A(K88) y CM39-3(K99), las cuales fueron positivas en todos los ensayos realizados. Estas cepas se inocularon en cerdos neonatos en las primeras horas inmediatas al nacimiento, reproduciéndose un cuadro típico de colibacilosis que culminó con la muerte de los mismos. Esto permitió el empleo de las cepas en experimentos de desafío para evaluación de un preparado vacunal conjuntamente con las cepas de referencia (Wong *et al.*, 1992).

El objetivo fundamental de nuestro trabajo consistió en poder comprobar mediante diferentes métodos, que las diarreas producidas en animales jóvenes están asociadas a cepas de *E. coli* enterotoxigénicas portadoras de los antígenos fimbriales K88 y K99, los cuales están señalados como los principales agentes causantes de esta enfermedad.

En estos momentos, nuestro trabajo se dirige a la búsqueda de otros antígenos importantes en estas bacterias, así como llegar a realizar un estudio más amplio para poder valorar la incidencia actual en las diferentes regiones de nuestro país y el comportamiento en cuanto a variabilidad interespecífica, lo cual tiene gran importancia para la selección de aquellos antígenos que deben ser incluidos en los preparados vacunales, con vistas a lograr una protección eficiente contra esta enfermedad en las especies susceptibles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Arturo Talavera (CENSA, Cuba) el facilitarnos las cepas de referencia de *E. coli* enterotoxigénicas y los antiseros utilizados en los ensayos de aglutinación, y al Dr. Víctor Jiménez (CIGB, Cuba) por la síntesis de los oligonucleótidos.

REFERENCIAS

- BOYER, H.W y D. ROULLAND-DUSSOIX (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459.
- CHEN, E.Y. y P.H. SEEBURG (1985). Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**: 165-170.
- EDWARDS, P.S. y W.H. EDWING (1972). *Identification of enterobacteriaceae*. Vol. 1 Cap. 13. Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA.
- EVANS, D.G.; D.J. EVANS y W. TJOA (1977). Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *E. coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infection and Immunity* **18**: 330-337.
- FEINBERG, A.P. y B.A. VOGETSTEIN (1984). Technique for radiolabeling Dg DNA restriction endonuclease fragments to high activity. *Addendum. Anal. Biochem.* **137**: 266-267.

- GAASTRA, W.; F.R. MOOI; A.R. STUITJE y F.K. DE GRAAF (1981). The nucleotide sequence of the gene encoding the K88ab protein subunit of porcine enterotoxigenic *E. coli*. *FEMS Microbiol. Letters* **12**: 41-46.
- GUINEE, P.A.M.; W.H. JANSEN y C.M. AGTERBERG (1976). Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *E. coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infect. Immun.* **13**: 1369-1377.
- GUINEE, P.A.M. y W.H. JANSEN (1979). Behaviour of *E. coli* K antigens K88ab, K88ac, K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and haemagglutination. *Infect. Immun.* **23**: 700-705.
- GUINEE, P.A.M.; W.H. JANSEN; T. WADSTRÖM y R. SELLWOOD (1981). *E. coli* associated with neonatal diarrhea in piglets and calves. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. **13**: 126-162.
- JACOBS, A.C. y F.K. DE GRAAF (1985). Production of K88, K99 and F41 fimbriae in relation to growth phase and a rapid procedure for adhesin purification. *FEMS Microbiology Letters* **26**: 15-19.
- JONES, G.W. y J.M. RUTTER (1972). Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhoea caused by *E. coli* in piglets. *Infect. Immun.* **6**: 918-927.
- MOON, H.W.; B. NAGY; R.E. ISAACSON y J. ORSKOV (1977). Occurrence of K99 antigen of *E. coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.* **15**: 614-620.
- MORRIS, J.A.; C.J. THORNS; G.A.W. WELLS y W.J. SOJKOR (1983). The production of F41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *E. coli* that lack K88, K99 and 987P fimbriae. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2753-2759.
- MOSELEY, S.L.; G. DOUGAN; R.A. SCHNEIDER y H.W. MOON (1986). Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of enterotoxigenic *E. coli* and genetic homology between adhesins F41 and K88. *J. Bacteriol.* **167**: 799-804.
- NAGY, B.; H.W. MOON y R.E. ISAACSON (1977). Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *E. coli*: Selection of piliated forms *in vivo*, adhesion of piliated form to epithelial cells *in vitro*, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Immun.* **16**: 344-352.
- ROOSENDAAL, B.; W. GAASTRA y F.K. DE GRAAF (1984). The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *E. coli*. *FEMS Microbiol. Letters* **22**: 253-258.
- SAMBROOK, J.; E.F. FRITSCH y T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition. USA.
- SAIKI, R.K.; D.H. GELFAND; S. STOFFEL; J. SHARP; R. HIGUCHI; G.T. HORN; K.B. MULLIS y H.A. ERLICH (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- WONG, I.; M. MORENO; R. BASULTO; A. BORROTO; E. BOVER; S. VALDERRAMA; R. SILVA; L. CALZADA; M. MOLEIRO; L. HERRERA y J. DE LA FUENTE (1992). Evaluación de una preparación vacunal conteniendo los antígenos fimbriales purificados K88ab y K99 en cerdos. *Biotecnología Aplicada*. Vol. **9**(2): 99-166.