# ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ALGUNOS INGREDIENTES PARA REDUCIR LA ADHESIÓN DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC) K88 A CELULAS EPITELIALES PORCINAS

Zhu, Y., González-Ortiz, G., Solà-Oriol, D. y Martín-Orúe, S.M.
Servicio de Nutrición y Bienestar Animal, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.
zyn4266@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) K88 es uno de los principales agentes responsables de la diarrea post-destete en los lechones. La colonización intestinal está mediada por el reconocimiento los receptores intestinales por parte de las adhesinas fimbrales K88 (Fairbrother *et al*., 2005, Kiarie *et al*., 2010). La interferencia de esta unión por moléculas exógenas, presentes naturalmente en ciertos ingredientes, se ha demostrado capaz de prevenir la colonización gastrointestinal y se ha propuesto como alternativa al uso de antibióticos (Hermes *et al*., 2011). El casein-glicomacropéptido (CGMP) obtenido a partir del suero de leche y el salvado de trigo, han demostrado ser capaces de reducir la adhesión de ETEC K88 al moco intestinal y a las células intestinales porcinas IPEC-J2 (González-Ortiz *et al*., 2013; Hermes *et al*., 2013). En el presente estudio, se evaluó el potencial de otros ingredientes de uso común en las dietas y de diversos salvados de cereales, para unirse específicamente a ETEC K88 (Test de adhesión, TA) o interferir en la unión de ETEC K88 a IPEC-J2 (Test de bloqueo, TB).

## MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa ETEC K88 fue cedida por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* de la Facultad de Veterinaria de Santiago de Compostela (Lugo) (O149: K91, H10 (K-88) / LT-I / STb). La variedad no fimbriada (NF) de *E. coli* (F4-, F6-, F18-, LT1-, ST2 +, Stx2e-) fue donada por el Departamento de Sanitat i d'Anatomia Animales de la Universitat Autònoma de Barcelona. El cultivo de las cepas se realizó de acuerdo con González-Ortiz *et al*. (2013).

En el estudio se incluyeron diferentes ingredientes habituales en la dieta del lechón como cereales (trigo, avena, centeno y maíz), fuentes proteícas de orígen vegetal (soja extrusionada; harina de soja y harina de colza) y de orígen animal (leche en polvo y harina de pescado). Además, se evaluaron muestras de salvado de cereales incluyendo trigo, espelta, kamut, centeno, avena y arroz. Todos los ingredientes se molturaron finamente, se resuspendieron en tampon fosfato (PBS) (1:10 (p/v)), se vortearon y se sonicaron tres veces durante 30 segundos. El sobrenadante, como extracto soluble, se mantuvo a -20ºC hasta su uso en los ensayos.

La línea de células epiteliales intestinales porcinas (IPEC-J2) fue amablemente donada por el Dr. Antony Blikslager de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Las condiciones de cultivo se describen en González-Ortiz *et al*. (2013).

Ambos test, TA y TB, son un sistema *in vitro* miniaturizado basado en placas de microtitulación de poliestireno de alta adhesion. Los principios y detalles del método se encuentran descritos en González-Ortiz *et al*. (2013, 2014). Todas las muestras se evaluaron en dos ensayos independientes con tres repeticiones por ensayo.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando R v.3.3. Los valores se presentan como medias ± desviación estándar. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante el ajuste de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el TA, el extracto soluble de todos los cereales mostró capacidad de adherir ETEC K88 ($P < 0.05$) (Figura 1A). Respecto a las fuentes de proteína vegetal, la colza no mostró capacidad para unirse a ETEC K88 pero sí la soja extrusionada y la harina de soja. La leche en polvo fue la única proteína de origen animal que se mostró capaz de adherir ETEC K88,

mientras que la harina de pescado no mostró diferencias con el PBS. Todos los salvados de cereales evaluados fueron capaces de adherir el patógeno (Figura 1B).

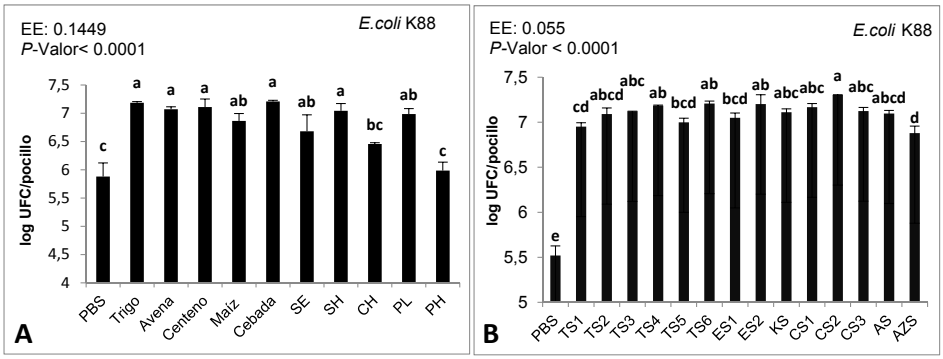



***Figura 1.*** *Test de adhesión (TA): Número de bacterias (log UFC/pocillo) que se unen a los pocillos tapizados con los extractos solubles de los diferentes ingredientes. Los valores medios ± desviación estándar se obtuvieron a partir de tres repeticiones en dos ensayos independientes. Diferentes letras significan P<0,05. Los extractos equivalen a un 1% p/v del ingrediente. PBS (abreviatura) es el control negativo; SE: soja extrusionada; SH: harina de soja; CH: harina de colza; PL: leche en polvo; PH: harina de pescado; TS1-TS6: salvado de trigo de seis proveedores diferentes; ES1-ES2: salvado de espelta de dos proveedores; KS: salvado de kamut; CS1-CS3: salvado de centeno de tres proveedores; AS: salvado de avena; AZS: salvado de arroz.*

En el TB (Figura 2A), los extractos de centeno y de avena redujeron la unión de ETEC K88 a las células IPEC-J2 (P <0,01) y el trigo mostró una tendencia (P = 0,05). El CGMP como control positivo, mostró la mayor inhibición de la unión de ETEC K88 a IPEC-J2 (P <0,001). Todas los salvados de cereal (Figura 2B), con la excepción del salvado de arroz, redujeron la adhesión del patógeno a IPEC-J2 (P <0,001).

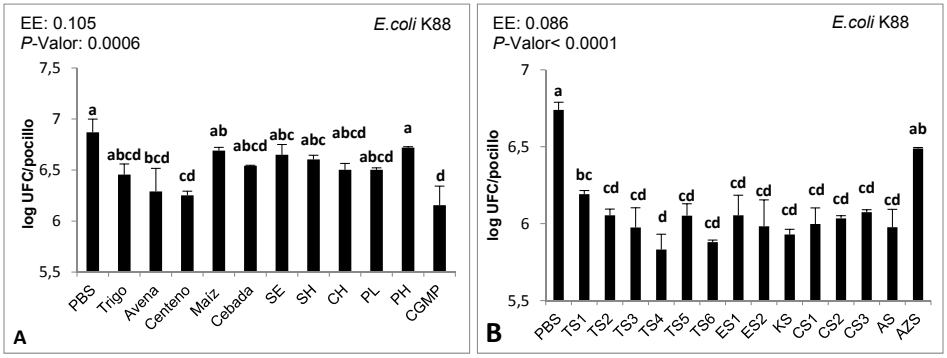



***Figura 2.*** *Test de bloqueo (TB): Número de bacterias (log UFC/pocillo) que se unen a los pocillos tapizados con IPEC-J2 tras su co-incubación con el extracto soluble de diferentes ingredientes. Los valores medios ± desviación estándar se obtuvieron a partir de tres repeticiones en dos ensayos independientes. Diferentes letras significan P<0,05. Los extractos equivalen a un 1% p/v del ingrediente. PBS (abreviatura) es el control negativo y caseína-glicomacropéptido (CGMP) es el control positivo; SE: soja extrusionada; SH: harina de soja; CH: harina de colza; PL: leche en polvo; PH: harina de pescado; TS1-TS6: salvado de trigo de seis proveedores diferentes; ES1-ES2: salvado de espelta de dos proveedores; KS: salvado de kamut; CS1-CS3: salvado de centeno de tres proveedores; AS: salvado de avena; AZS: salvado de arroz.*

El salvado de trigo del proveedor 4 mostró la mayor capacidad de bloqueo (P <0,001). Los resultados de TA y TB utilizando la cepa NF de *E. coli* no mostraron ninguna diferencia entre los ingredientes testados y el PBS (datos no mostrados) sugiriendo que los efectos de adhesión y bloqueo observados con ETEC K88 fueron mediados por la fimbria.

Muchos compuestos solubles de los cereales podrían estar implicados en el reconocimiento de la fimbria. Se ha descrito que algunos oligosacáridos compiten con los receptores intestinales por la unión a los patógenos, reduciendo así su adhesión al epitelio y la colonización intestinal (Shoaf-Sweeney *et al*., 2009). Sin embargo, otros compuestos como proteínas o carbohidratos complejos podrían estar también implicados en la interferencia observada en la adhesión bacteriana. Los resultados de este trabajo sugieren que cereales, como el centeno, la avena, el trigo y, en particular, su salvado, podrían ser contemplados en la formulación de los piensos como ingredientes útiles para prevenir la diarrea inducida por ETEC K88.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


• Fairbrother, J.M., Nadeau, E., Gyles, C.L. 2005. Anim Health Res Rev. 6:17-39. • González-Ortiz, G, Hermes, R.G, Jiménez-Díaz, R, Pérez, J.F, Martín-Orúe, S.M. 2013. Vet Microbiol. 167:494-499. • González-Ortiz, G., Pérez, J.F., Hermes, R.G., Molist, F., Jiménez-Díaz, R., Martín-Orúe, S.M. 2014. Br J Nutr. 111,633-642. • Hermes, R.G., Manzanilla, E.G., Martín-Orúe S.M., Pérez, J.F., Klasing, K.C. 2011.Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 34:479-488. • Hermes, R.G., Molist, F, Pérez, J.F., Gómez de Segura, A., Ywazaki, M., Davin, R., Nofrarías, M., Korhonen, T.K., Virkola, R., Martín-Orúe, S.M. 2013. Br J Nutr.109:1001-1012. • Kiarie, E.G., Slominski, B.A., Nyachoti, C.M. 2010. Anim Sci J. 81, 63-71. • Shoaf-Sweeney, K.D., Hutkins, R.W. 2009. Adv Food Nutr Res. 55:101-161.



**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (proyecto AGL 2009-0732).


## SCREENING FOR THE ABILITY OF COMMON FEED INGREDIENTS TO REDUCE THE ATTACHMENT OF ENTEROTOXIGENIC *Escherichia coli* (ETEC) K88 TO PORCINE EPITHELIAL CELLS


**ABSTRACT:** The purpose of this study was to evaluate the ability of different common ingredients in the formulation of pig diets, and particularly different kinds of cereal brans, to attach ETEC K88 (adhesion test, AT) and to block its attachment to IPEC-J2 cells (blocking test, BT) *in vitro*. For the feed ingredients tested wheat, corn, oat, barley, rye, soybean meal, extruded soybean as well as milk powder had the ability to attach specifically ETEC K88 ($P$ <0.05). Suggesting another mechanism of action, rye and oat interfered the attachment of ETEC K88 to IPEC-J2 ($P$ < 0.01), while wheat soluble extract showed a trend to reduce the number of ETEC K88 bound to cells ($P$ = 0.05). All brans evaluated had the ability to attach specifically ETEC K88 ($P$ <0.05) even all of them were able to inhibit ETEC K88 attachment to IPEC-J2 cells ($P$ <0.001) with the exception of rice bran. These results suggest that cereal, such as rye, oat, and wheat and particular their bran, should be further evaluated as potential ingredients in the formulation of feed for weaning piglets as natural biological strategies to prevent ETEC K88-induced diarrhea.



***Keywords:*** *ETEC K88, cereal, bran, piglet, IPEC-J2*.