Papel de la toxina LT de *Escherichia coli* en la colibacilosis neonatal

ORIOL BOIX.
DVM, MSc., Corporate Product Manager Hipra.

IRENE GALÉ.
DVM, MSc., Corporate Brand Manager Hipra..

La infección por *Escherichia coli* (*E. coli*) es una causa frecuente de diarrea neonatal en lechones de todo el mundo, y es una enfermedad importante y devastadora para los productores de cerdos. Además, es responsable de un impacto económico sustancial en las granjas debido a altas tasas de morbimortalidad y a la pérdida de crecimiento que causa[1]. En algunos estudios realizados en Europa, se calcula que la diarrea es responsable de entre el 5 y el 24% de la mortalidad general en lactación y de una disminución de la ganancia diaria media (*Average Daily Gain*, AVG) de entre 8 y 14 g[2,3]. Sobre la base de estos efectos, se ha estimado que el coste de la diarrea neonatal es de 134 € por cerda adulta al año[4].

Actualmente, para diferenciar las cepas de *E. coli* utilizamos el término "patotipo". Esto significa que *E. coli* se puede distinguir de sus homólogos no patógenos por la presencia de diferentes genes de virulencia, que codifican fimbrias o toxinas y determinarán la patogenicidad y desarrollo de la enfermedad en el futuro (*Imagen 1*).

El conocimiento del mecanismo de acción de la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y su evolución a diarrea constituye un aspecto clave de la prevención de la enfermedad.

VIRULENCIA EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD EN LAS INFECCIONES POR ETEC?

1. Fimbrias

Se trata de apéndices de proteínas que surgen de la membrana citoplásmica de la bacteria y actúan como un mecanismo de adhesión a otras bacterias y a la superficie de los enterocitos. Representan características esenciales para los procesos de infección y colonización del intestino del lechón.

La ETEC contiene muchos tipos diferentes de fimbrias, siendo las principales F4, F5, F6, F41 y F18. Es importante destacar el hecho de que la función que desempeñan las diferentes fimbrias en la patogenia de la enfermedad varía en cada caso y que no todas están asociadas a diarrea neonatal. Por ejemplo, varios autores coinciden en que las fimbrias F4 son las más prevalentes en los brotes clínicos de diarrea

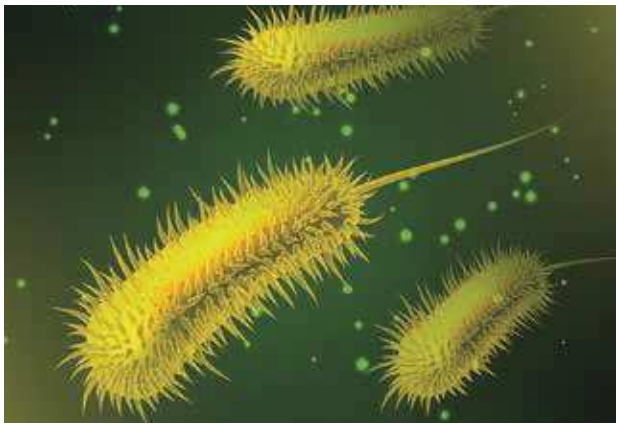

IMAGEN 1 *E. coli* es un bacilo Gram negativo cuya membrana celular está recubierta de finos filamentos llamado fimbrias.

¿CUÁLES SON LOS PRINCIPALES FACTORES DE

PATOTIPO	FIMBRIAS	TOXINAS	ENFERMEDAD
ETEC Enterotoxigénica	F4, F5, F6, F18, F41	LT, STa, STb, EAST1	COLOBACILOSIS NEONATAL DIARREA POSDESTETE
VTEC Verotoxigénica	F4, F18	Vt2e, EAST1	ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS
EPEC Enteropatógena	Eae o intimina		DIARREA POSDESTETE
ExPEC Extraintestinal		CITOSINAS HEMOSILINAS	ARTRITIS, MENINGITIS...

TABLA 1 Resumen de los patotipos de *E. coli* más importantes.

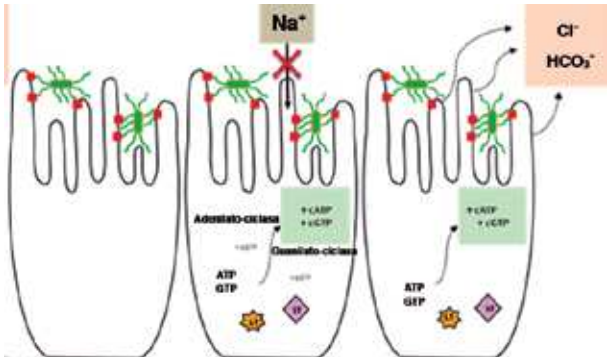

FIGURA 1 Unión de *Escherichia coli* enterotoxigénica a la superficie epitelial, secreción de toxinas (LT, ST) y liberación de iones de sodio (Na^+) y cloro (Cl^-) y agua en el lumen intestinal.

neonatal[5,6]; mientras que los casos causados por F5 y F6 disminuyen después de los primeros días de vida debido a la pérdida de receptores activos en el epitelio digestivo[7]. En relación con F41, queda por identificar el receptor intestinal y se necesitan más estudios para determinar su función en los brotes de colibacilosis neonatal[8].

2. Enterotoxinas

Se trata de proteínas que son el resultado del metabolismo bacteriano con un carácter tóxico debido a su capacidad para alterar la permeabilidad de las paredes de los enterocitos del intestino delgado. En el caso de la ETEC, se pueden distinguir cuatro tipos de toxinas: las toxinas termolábiles (LT), las toxinas termoestables (ST), la verotoxina 2e (Vt2e) y la toxina termolábil enteroagregativa (EAST1)[9].

- **Toxina LT:** esta toxina parece estar asociada de manera predominante a cepas de ETEC que también sintetizan F4 y STb[6]. Recientemente, diferentes estudios han demostrado que, más allá de su función en la patogenia, se han descrito nuevas funciones que veremos a continuación.
- **Toxina ST:** las toxinas termoestables son moléculas peptídicas de menos de 50 aminoácidos, por lo que, a pesar de intervenir en el desarrollo de la patogenia, no tienen capacidad inmunogénica[7] y ninguna de las vacunas comerciales incluye las siguientes toxinas en su composición:
  - La STa ejerce su actividad tóxica a través de la activación de una cascada de señalización intracelular que, en última instancia, provoca diarrea acuosa.
  - La STb estimula una proteína reguladora de unión al GTP (trifosfato de guanosina), lo que da lugar a un aumento del nivel de calcio^{2+} (Ca^{2+}) en el interior de la célula y al final desemboca en la inactivación de la captación de sodio$^+$ (Na^+).
- **Toxina EAST1:** hay poca información disponible sobre esta toxina. Parece que no es suficiente para provocar diarrea en cerdos gnotobióticos de 5 días de edad, lo que permite suponer que la EAST1 probablemente no tiene una virulencia determinante en la diarrea asociada a ETEC[8].

Después de la secreción de las toxinas ST y LT en el intestino, aumenta la concentración osmótica y, con ella, la cantidad de agua, lo que deriva en un flujo de agua hacia el lumen intestinal induciendo diarrea, deshidratación del lechón, un proceso de acidosis metabólica y finalmente la muerte[7] *(Figura 1)*.

3. Toxina LT, el factor toxigénico desconocido

3.1 Aumento de la colonización intestinal[11]

La toxina LT es una poderosa enterotoxina bien caracterizada y producida por la ETEC. También se ha descrito que la LT está implicada en otras actividades además de su función en la enterotoxicidad. Estudios recientes apuntan a que la toxina LT aumenta la adherencia de patógenos entéricos y la posterior colonización intestinal para acabar en un cuadro clínico más grave de diarrea neonatal. Este fenómeno se observó cuando las cepas mutantes de ETEC incapaces de producir LT (cepa LT-) mostraron una drástica reducción en la colonización del yeyuno y del íleon en comparación con el tipo natural (cepa LT+). Los resultados del estudio se presentan en la *tabla 2*, en la que se detallan las puntuaciones medias de colonización bacteriana (mm^2).

Estos resultados son complementarios a los obtenidos por Zang et al.[12], en los que un análisis histológico de diferentes secciones del intestino delgado de cerdos expuestas a diferentes cepas de *E. coli* demostró que la colonización bacteriana era mayor en los lechones expuestos a la cepa LT+ [C] que en aquellos expuestos a una cepa que solo expresa *F4 ([A] valor de p = 0,004)* o F4 y Stb *([B] valor de p = 0,001) (Figura 2)*.

ZONA DEL INTESTINO	Cepa LT-	Cepa LT+
Duodeno	0,35 ± 2,02	7,83 ± 3,50
Yeyuno -1	0,51 ± 1,39*	9,00 ± 2,41
Yeyuno -2	0,67 ± 2,32*	21,24 ± 4,02
Yeyuno -3	0,73 ± 3,97	15,83 ± 6,87
Íleon	10,76 ± 12,92*	87,12 ± 22,38

**Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (valor de p <0,05) entre la cepa mutante LT MUN285 y la cepa original LT_ Nalr WAM2317.*

TABLA 2 Puntuaciones medias de colonización bacteriana en el intestino delgado.

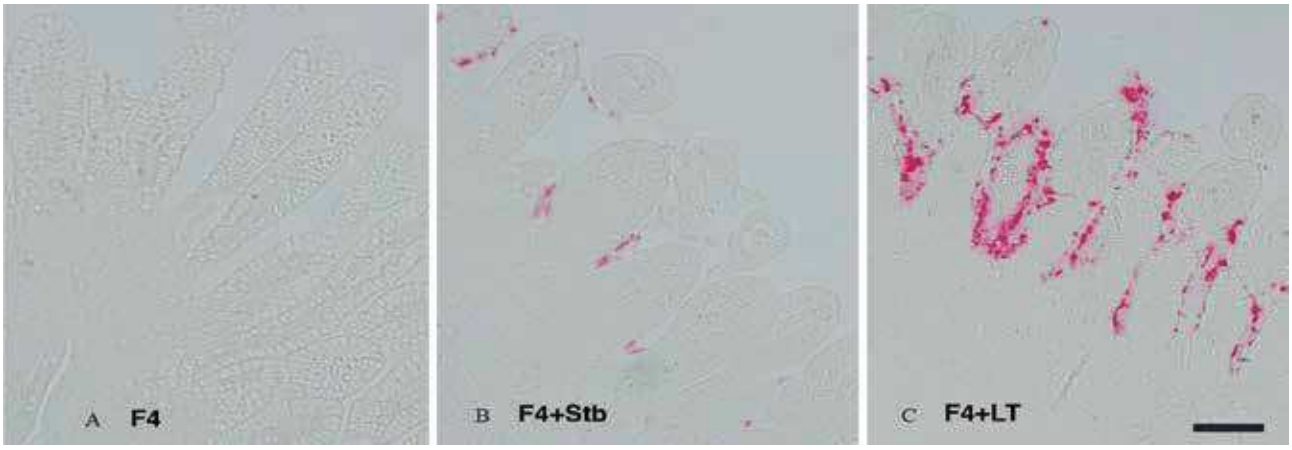

FIGURA 2 Secciones histológicas del íleon de cerdos gnotobióticos expuestos. *Fuente: Zang et al. 2006.*

3.2. Aumento de la capacidad de adhesión de otras bacterias debido a la alteración de la capa mucosa.

La capa mucosa es una de las partes más importantes del mecanismo de defensa innato del lechón recién nacido frente a invasiones o infecciones. Se segrega en las células caliciformes y su función se basa en la protección de la mucosa de las secreciones digestivas, los patógenos y los daños químicos.

Se ha descrito que la toxina LT favorece la adherencia bacteriana a la pared intestinal[13]. Esto se ha descrito en diferentes estudios y puede correlacionarse con la alteración de la continuidad de la cobertura mucosa causada por la toxina LT. Esta pérdida de mucosa intestinal se debe a la secreción de líquidos que elimina la capa mucosa o hidrata. La pérdida de mucosa representa la pérdida de la primera y una de las barreras de protección más importantes para los lechones recién nacidos.

Verbrugghe *et al.* publicaron que los lechones recién nacidos, tras una inyección intraintestinal de LT, mostraron una cobertura mucosa de solo el 71% y el 72%, mientras que el grupo de control (al que se le inoculó solución salina amortiguada con fosfato mostró una cobertura del 92% y el 90% (*Figura 3*). Por último, las interrupciones de la continuidad de la cobertura de mucina y/o una alteración de la composición de la mucina podrían, por tanto, provocar una alteración de la sensibilidad de las células epiteliales intestinales a la invasión por otros patógenos como la *Salmonella*.

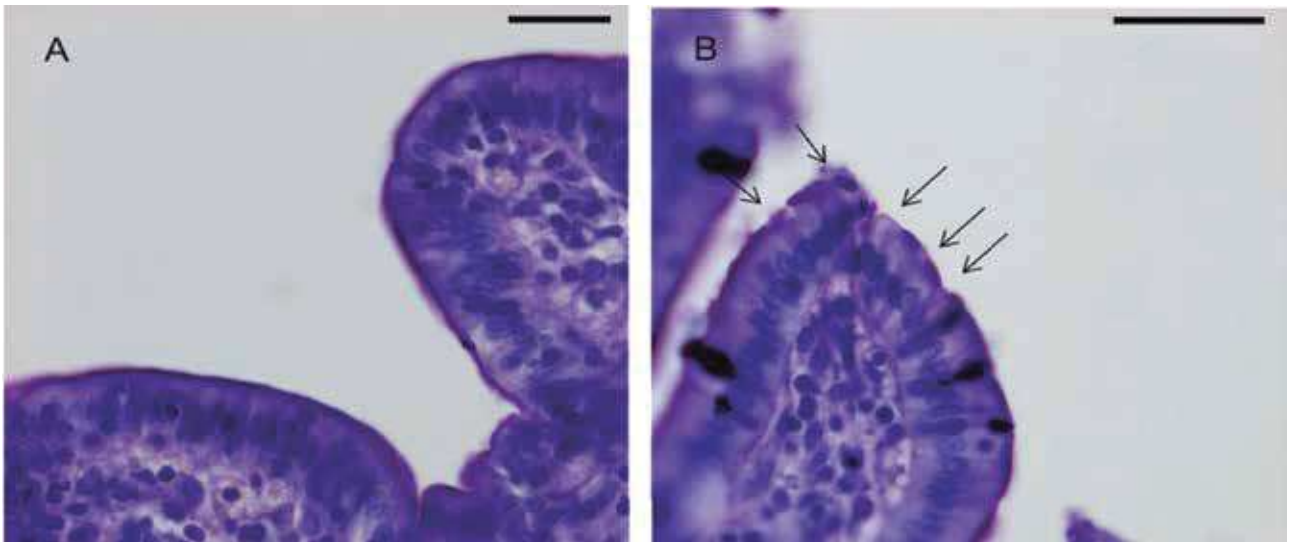

FIGURA 3 Secciones histoquímicas de secciones del yeyuno. (A) Lechones de control y (B) lechones tratados con LT. Las flechas indican interrupciones de la continuidad de la cobertura mucosa. *Fuente: Verbrugghe et al, 2015.*

3.3. ¿Cómo podemos detectar la presencia de toxina LT en nuestras granjas?

Los signos clínicos, los antecedentes epidemiológicos y las características patológicas permiten un buen diagnóstico de la colibacilosis, pero la obtención de muestras para la detección de genes que codifican factores de virulencia como toxinas y fimbrias mediante PCR, se considera una técnica adecuada para detectar la ETEC patógena.

Para facilitar el diagnóstico, se han desarrollado nuevas tecnologías basadas en una toma de muestras con una tarjeta FTA. Las tarjetas de elución *Whatman FTA®* son un sistema de almacenamiento de ADN a largo plazo que nos permite enviar muestras a temperatura ambiente al laboratorio. Esto se debe a que, una vez inoculada, la tarjeta *FTA* inactiva rápidamente los microorganismos, pero mantiene intacto el material genético de las bacterias diana. Una vez en el laboratorio, podemos extraer el ADN presente en la tarjeta y realizar la PCR para detectar los principales factores de virulencia de *Escherichia coli*: F4, F5, F6 y toxina LT.

¿Qué animales debemos muestrear?

Los lechones de unos 3-7 días de edad que muestren signos clínicos son el objetivo ideal para obtener un diagnóstico óptimo. Una vez que detectemos a un lechón con diarrea, debemos sostener el hisopo firmemente con una mano y con la otra presionar con suavidad el flanco del animal. El mismo hisopo puede utilizarse para recoger heces de al menos otros tres animales de la misma camada. A continuación, las muestras están listas para transferirse a la tarjeta *FTA* y enviarse al laboratorio por correo ordinario.

CONCLUSIONES

Como hemos visto, la ETEC muestra diferentes factores de virulencia responsables de la aparición de signos clínicos en lechones recién nacidos, pero algunas fimbrias y toxinas tienen una función más relevante que otras. Un claro ejemplo es la toxina LT, que, además de desempeñar una función importante en la patogenia, también es responsable de la capacidad de colonización bacteriana y de una mayor tasa de adhesión de *E. coli* y por consiguiente, de otros patógenos secundarios.

Una estrategia multidisciplinar con un diagnóstico óptimo, estrategias de alimentación, evaluación ambiental y vacunación son aspectos esenciales para minimizar el riesgo de los brotes de diarrea neonatal en lechones recién nacidos. ■

BIBLIOGRAFÍA

1 Shi D, et al. Frequency of virulence factors in Escherichia coli isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *The veterinary journal.* 2014;199:286-9.

2 Westin R, et al. Post-mortem findings and piglet mortality in relation to strategic use of straw at farrowing. *Preventive Veterinary Medicine.* 2015;119(3-4):141-52.

3 Kongsted H, et al. The effect of New Neonatal Porcine Diarrhoea Syndrome (NNPDS) on average daily gain and mortality in 4 Danish pig herds. BMC *Veterinary Research.* 2014;10(1):90.

4 Sjolund M, et al. Financial impact of disease on pig production. Part III. Gastrointestinal disorders. *Proceedings of 6th ESPHM,* Sorrento, Italy. 2014;189.

5 Westerman RB, Mills KW, Phillips RM, Fortner GW, Greenwood JM. Predominance of the ac variant in K88-positive Escherichia coli isolates from swine. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:149–50.

6 Bernal I, Camprodon A, Jordà, R. Detection of different pathogenicity factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* type c in Europe. ESPHM 2017.

7 Fairbrother JM, Gyles CL. Colibacillosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. Disease of Swine. 10th ed. UK: Wiley-Blackwell; 2012. p. 723–47.

8 EcoSal Plus 2016; doi:10.1128/ ecosalplus. ESP-0006-2016.

9 Wilson RA, Francis DH. Fimbriae and enterotoxins associated with *E coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. *Am J Vet Res.* 1986;47:213–17.

10 Qiangde Duan. Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli. Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 292.

11 Berberov et al, 2004. Relative Importance of Heat-Labile Enterotoxin in the Causation of Severe Diarrheal Disease in the Gnotobiotic Piglet Model by a Strain of Enterotoxigenic *Escherichia coli* That Produces Multiple Enterotoxins.

12 Zhang, et al 2006. Significance of Heat-Stable and Heat-Labile Enterotoxins in Porcine Colibacillosis in an Additive Model for Pathogenicity Studies.

13 Heat-labile Enterotoxin of *Escherichia Coli* Promotes Intestinal Colonization of *Salmonella Enterica.*

FIGURA 4 Toma de muestra. Transferencia a tarjeta FTA y envío al laboratorio.