

El plásmido ColV *iss*⁺ confiere resistencia al complemento en *Escherichia coli* Patogénica Aviar

Miranda Delgado Pilar¹,
Amaya González Diana²,
Vidales Rodríguez Luz
Elena³, López Robles
Eréndira⁴, Sánchez
Rodríguez Sergio Hugo⁵,
Ramírez Santoyo
Rosa María⁶

Resumen

Iss (increase survival serum) es una proteína de membrana externa de *Escherichia coli* que ha sido asociada como molécula de resistencia al sistema del complemento y como factor de virulencia, aunque su modo de acción aún no ha sido bien definido. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación del plásmido ColV *iss*⁺ de cepas de *Escherichia coli* patogénica en la resistencia al complemento para lo cual se realizó la detección fenotípica del plásmido ColV en ocho cepas de *Escherichia coli* patogénica aisladas de pulmón de aves con colisepticemia aviar así como la detección genotípica del gen *iss* en las cepas portadoras del plásmido ColV.

Material y Métodos: La detección del gen *iss* se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento del gen por PCR. El efecto bactericida del suero se analizó mediante ensayos de viabilidad bacteriana de la cepa RS4 (ColV *iss*⁺) y su isogénica curada de plásmidos RS4 (ColV⁻) en presencia de suero complementado, así como de suero descomplementado. Los resultados demostraron que la cepa silvestre RS4 ColV *iss*⁺ mostró mayor resistencia a la acción bactericida del complemento en relación con la isogénica curada RS4 ColV⁻, sugiriendo que dicho efecto es producido por la presencia del plásmido ColV *iss*⁺.

Palabras clave: *Escherichia coli*, patogenicidad, plásmidos de patogenicidad, resistencia al complemento, plásmido ColV *iss*⁺.

- 1 Maestra en Biología Experimental. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- 2 Estudiante Q.F.B. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- 3 Doctora en Ciencias. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- 4 Doctora en Ciencias. Laboratorio de Biología Celular y Neurobiología. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- 5 Doctor en Ciencias. Laboratorio de Biología Celular y Neurobiología. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- 6 Doctora en Ciencias. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas.

Correspondencia:

✉ rMrs20@hotmail.com

Rosa María Ramírez Santoyo

Rocallosas 206, Fraccionamiento Lomas del Campestre. Zacatecas, Zac. Mex.

Tel y Fax (492) 921-13-26.

Laboratorio de Enfermedades Infecciosas.
Unidad Académica de Ciencias Biológicas.
Universidad Autónoma de Zacatecas.

ColV *iss*⁺ plasmid mediates resistance to complement in Avian Pathogenic *Escherichia coli*

Abstract

Iss (increase serum survival) is an outer membrane protein of *Escherichia coli* has been associated molecule resistance as the complement system and as a virulence factor, although its mode of action has not been well defined. in the resistance to complement in pathogenic *Escherichia coli* strains. Phenotypic detection of plasmid ColV was performed in eighth strains of pathogenic *Escherichia coli* isolated of lung of birds with avian colisepticemia and detection of gene *iss* was conducted in *E. coli* strains carrying ColV plasmid.

Material and Methods: Detection of gen *iss* was performed by amplification of a gene fragment by PCR. The bactericidal effect of the serum was analyzed by bacterial viability assays RS4 (ColV *iss*⁺) and its isogenic strain plasmidos cured RS4 (ColV⁻) in the presence of supplemented serum, also decomplemented serum. The results showed that the wild strain *iss*⁺ RS4 ColV showed greater resistance to the bactericidal action of complement regarding RS4 ColV⁻ cured isogenic, suggesting that this effect is caused by the presence of plasmid ColV *iss*⁺.

Keywords: *Escherichia coli*, pathogenicity, pathogenicity plasmids, complement resistance, plasmid ColV *iss*⁺.

Introducción

El sistema del complemento tiene un papel central en la resistencia contra infecciones microbianas participando tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adquirida. La acción de defensa del complemento ocurre a través de diferentes formas, entre las más importantes están la opsonización de los microorganismos facilitando la fagocitosis y la formación de lesiones en el agente blanco a través

del complejo de ataque a la membrana. La excesiva activación del complemento es inhibida por proteínas regulatorias las cuales protegen al huésped del ataque de su propio complemento [1].

Por su parte, las bacterias patógenas tienen capacidad de contrarrestar las defensas inmunes del hospedero y establecer así una infección. En particular los mecanismos de resistencia al complemento se han clasificado en tres amplias clases: a) Factores microbianos que protegen contra la muerte media-

da por el complemento por inactivación enzimática de una o más proteínas componentes del sistema del complemento. b) Producción microbiana de estructuras homólogas a proteínas del hospedero que regulan la actividad del complemento o producción de superficies bacterianas con capacidad de modular este sistema. c) Barreras físicas tales como estructuras bacterianas que ayudan a evadir el sistema inmune previniendo la muerte mediada por el complemento [1].

Escherichia coli patogénica, ocasiona diversas enfermedades en humanos y en animales domésticos, estas enfermedades pueden ser intestinales o extra-intestinales. En las aves *E. coli* ocasiona una enfermedad respiratoria o aerosacultistis que puede complicarse y causar una infección generalizada llamada colisepticemia la cual provoca grandes pérdidas económicas en la industria avícola a nivel mundial debido a la mortalidad y morbilidad [2]. *Escherichia coli* patogénica aviar (APEC por sus siglas en inglés) tiene diferentes factores de virulencia, incluyendo aquellos que confieren capacidad de adherirse al tracto respiratorio, los que permiten la multiplicación bacteriana a través de la expresión de sideróforos de hierro, los relacionados con la actividad anti-fagocítica y los que confieren resistencia al complemento [3, 4].

Diversas estructuras en APEC han sido asociadas a la resistencia a la acción bactericida del suero, entre ellas la cápsula K1, el Lipopolisacárido (LPS) y varias proteínas de membrana externa como OmpA, Trat, Iss [5, 6, 7]. Algunos estudios han asociado la resistencia al suero mediado por Iss con la virulencia [8, 9].

Por otra parte, algunas cepas APEC pueden contener el plásmido ColV, el cual además de codificar para la colicina V, puede portar diferentes genes asociados la patogenicidad, confiriendo virulencia en las cepas que portan este plásmido [10]. Este

plásmido es altamente heterogéneo en tamaño, capacidad conjugativa, patrones de restricción y los genes que posee. Johnson et al. [11] secuenciaron y analizaron el plásmido pAPEC02ColV y encontraron que tiene una isla de virulencia de 93 kDa conteniendo a *iss* entre otros genes. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia del gen *iss* en el plásmido ColV de una cepa APEC y determinar su participación en la resistencia a la acción lítica del complemento.

Material y Métodos

Cepas bacterianas: Se utilizó la cepa de *E. coli* patogénica aviar RS4 (APEC-RS4) aislada de pulmón de un pollo con colisepticemia. En las pruebas de colicinogenia se utilizaron como cepas control *E. coli* K12 711 sensible a todas las colicinas y *E. coli* B188 mutante resistente a la colicina V.

Detección fenotípica del plásmido ColV: APEC-RS4 se sembró en aislamiento en cultivo puro en agar MacConkey, incubando 18 h a 37°C, se seleccionaron colonias aisladas que se clonaron por triplicado, una en agar MacConkey y dos de agar LTC (Extracto de levadura-triptona-calcio) y se incubaron por 18 h a 37°C. Posteriormente, los cultivos de las placas de LTC se inactivaron con vapores de cloroformo durante 15 min y se dejaron airear por 15 min. A cada una de estos se le agregó una capa de 4.5 ml de LTC semisólido licuado conteniendo 0.1 ml de cada una de las cepas indicadoras de colicinogenia respectivamente que fueron crecidas previamente en caldo nutritivo por 18 h. La lectura de los resultados se realizó en base a los halos de inhibición de crecimiento.

Aislamiento de DNA plasmídico: Se utilizó el método de lisis alcalina con algunas modificaciones [12]. Brevemente, APEC-RS4 se inoculó en 7 ml de caldo Luria y se incubó en agitación por 18 h a

37°C, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 10 min y el paquete celular se resuspendió en 200 µL de GTE (50 Mm Glucosa, Tris-HCl 25 Mm pH 8, EDTA 100 Mm) y se dejó reposar 5 min, luego se agregaron 200 µL de NaOH /SDS (NaOH 0.2 N, 1% peso /vol/ SDS) se mezcló y se colocó sobre hielo 5 min, enseguida se le agregaron 200 µL de acetato de potasio 5 M, se mezcló y se centrifugó 10 min a 12000 rpm y se recuperó el sobrenadante a partir del cual se hicieron dos extracciones agregando un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1 vol/vol), luego se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo 1 min y se centrifugó a 12000 rpm 5 min. Se recuperó la fase acuosa y el DNA cromosómico se precipitó con 240 µL de NaCl 5 M manteniendo en hielo durante 2 h, pasado este tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo al cual se agregó 1 ml de etanol absoluto frío incubando a -20 °C por 30 min. Luego se centrifugó a 12000 rpm y el tubo se invirtió sobre papel secante, una vez evaporados los restos de etanol el DNA plasmídico se resuspendió en buffer TE.

Cuantificación de DNA y electroforesis: La concentración y pureza del DNA se midió por densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm. La integridad del DNA plasmídico se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0.9 % en buffer TAE visualizando las bandas obtenidas por tinción con bromuro de etidio.

Detección del gen *iss* en el plásmido ColV: Se realizó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos: Directo: 5' cagcaacccgaaccacttgatg 3' y Reverso: 5' agcattgccagagcggcagaa 3', para la amplificación de un producto de 323 pb del gen *iss*. Se utilizó un kit comercial (Sigma Chemical) con las siguientes mezclas de reacción de 5 µl de buffer PCR 10x, 200 µM de cada DNTP, 0.5 µM de cada uno de los

iniciadores, 50 ng de DNA plasmídico y 0.05 U/µl de DNA Taq polimerasa en un volumen final de 50 µl. Las etapas del proceso de amplificación fueron: 94°C por 4 min, seguida 30 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C por 1min, 72°C por 2 min y la extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Curación de plásmidos: Se utilizó como agente curante el dodecil sulfato de sodio (SDS). APEC-RS4 se sembró en 1ml de caldo nutritivo, se incubó a 37°C durante 18 h. Posteriormente se obtuvieron alícuotas de 50 µl de este cultivo las cuales se inocularon en 5 ml de caldo nutritivo-10% SDS, nuevamente se incubó a 37°C durante 18 h en condiciones estáticas, luego se hicieron diluciones decimales en una solución buffer de fosfatos (PBS), de las cuales se sembraron 100 µl en agar MacConkey y se incubaron bajo las mismas condiciones. A partir de colonias aisladas se realizó la prueba de la colicinogenia para corroborar la pérdida del plásmido ColV.

Obtención de complemento: Se obtuvo a partir de suero de un pollo sano, el cual se separó por centrifugación se hicieron alícuotas de 1 ml que se mantuvieron en congelación hasta su uso.

Ensayos de resistencia al complemento: Se realizó de acuerdo al ensayo descrito por Nishio [13]. Brevemente, las cepas APEC-RS4 (ColV *iss*⁺) y su isogénica curada APEC-RS4 (ColV⁻), se sembraron en 1 ml de caldo LB 18 h a 37°C, y se resembraron 200 µl en 5 ml de medio LB estéril y se incubaron durante 2.5 h en agitación a 37°C, se ajustó a una D.O de 0.3 a 620 nm en medio de cultivo LB, se tomaron 500 µl de cada una de las suspensiones bacterianas y se agregaron 500 µl de suero de pollo, y se incubaron a 37°C durante 0,15 y 30 min, una vez transcurrido cada lapso de tiempo se tomaron 100 µl de la muestra, se hicieron diluciones decimales y

se sembraron agar MacConkey incubando por 18 h a 37°C. Se cuantificaron las UFC/ml. El ensayo se realizó tres veces de manera independiente por duplicado.

Resultados

Curación de Plásmidos y análisis de Colicinogenia: APEC-RS4 produjo la colicina V, indicativo de la presencia del plásmido ColV. Después del proceso de curación de plásmidos se observó la pérdida de la producción de la colicina V (**Fig. 1**).

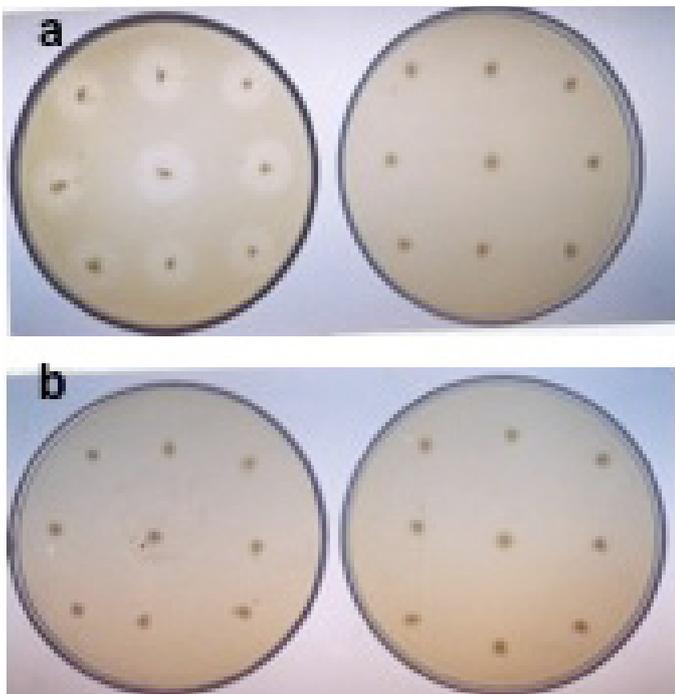


Figura 1. Expresión de la colicina V. **a)** APEC-RS4 silvestre y **b)** APEC-RS4 curada del plásmido ColV. En cada par de placas, las de la izquierda contienen la sobrecapa con la cepa indicadora *E. coli* K12 sensible a todas las colicinas; mientras que las de la derecha contienen la cepa *E. coli* B188 mutante resistente a la colicina V.

Detección del Gen *iss* en APEC-RS4: Al realizar la reacción de PCR para el fragmento del gen *iss* a partir del DNA plasmídico de APEC-RS4 se observó el producto de PCR esperado de 323 pb (**Fig. 2**).

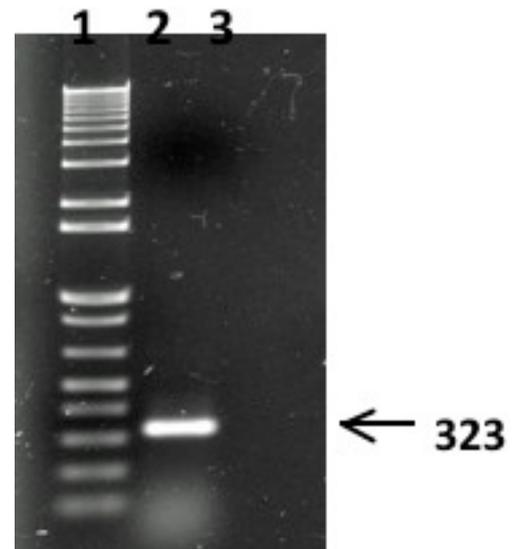


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Producto de PCR del fragmento de 323 pb de *iss* **1)** Marcador de peso molecular de 1 kb, **2)** Amplificado de *iss* de APEC-RS4 silvestre, **3)** Amplificado de APEC-RS4 curada de plásmidos.

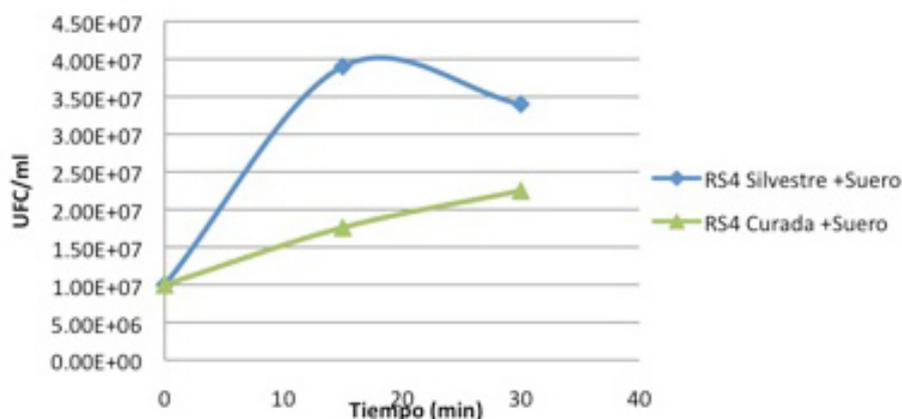
Análisis de Resistencia a la acción bactericida del Complemento

De acuerdo a los ensayos de viabilidad celular APEC-RS4 ColV *iss*⁺ mostró mayor resistencia al suero de pollo que su isogénica curada APEC-RS4 ColV (**Fig. 3**).

Discusión

Las bacterias poseen diversos mecanismos de resistencia a la acción del complemento, en este trabajo se analizó la participación del plásmido ColV que porta el gen *iss* de la cepa silvestre APEC-RS4 en la

Figura 3. Viabilidad bacteriana en presencia de suero de pollo como fuente de complemento de la cepa RS4 ColV-*iss*⁺ y su isogénica curada RS4 ColV⁻. La viabilidad se determinó por cuantificación de UFC/ml.



resistencia a la acción lítica del complemento mediante un ensayo de viabilidad bacteriana, tomando como antecedente los trabajos previos que demuestran la participación de *iss* en este evento [8, 9].

El plásmido ColV está implicado con el aumento de la virulencia y diversos estudios asocian la virulencia con la capacidad de resistencia a la acción bactericida del suero determinada por este plásmido [14]. Se ha reportado en una cepa APEC la presencia de una isla de patogenicidad en particular en el pAPEC-O2-ColV, esta región es fundamental en la virulencia y en ella se han localizado entre otros el gen *iss* [11]. En general, los microorganismos tienen mecanismos para resistir la acción del complemento en los que se incluye la inactivación enzimática de proteínas componentes del sistema del complemento, la producción microbiana de estructuras homólogas a proteínas del huésped que regulan la actividad del complemento y la presencia de estructuras bacterianas que actúan como barreras espaciales y físicas que previenen la muerte mediada por el complemento. En las enfermedades ocasionadas por *Escherichia coli* patogénica aviar, es indiscutible que la bacteria evade los mecanismos de defensa inmune presentes en los diferentes microambientes dentro del huésped para sobrevivir y proliferar.

El hallazgo más importante de este trabajo es que la cepa APEC-RS4 pColV *iss*⁺ mostró ser más resistente a la acción del suero en comparación con la cepa isogénica curada del plásmido ColV de acuerdo a los ensayos de viabilidad celular; lo que sugiere que la resistencia bacteriana al suero es mediada por la presencia del plásmido ColV *iss*⁺ ya que en el análisis comparativo se utilizó la cepa isogénica curada del plásmido ColV (ColV⁻) sin capacidad de sintetizar colicina V. Esto indica un papel fundamental de este plásmido en la resistencia a la acción bactericida del suero.

Será importante en un futuro realizar estudios detallados que nos permitan definir el mecanismo exacto por el cual *iss* media la resistencia al complemento ya que hasta el momento solo se ha sugerido que estas proteínas bloquean las etapas finales del complejo de ataque de membrana preferentemente que su formación [15].

Además la presencia de *iss* y de su producto de expresión podrían utilizarse como marcadores en la detección de cepas patogénicas [16, 17] y en la diferenciación de éstas y de *E. coli* de biota normal, lo que significaría que la técnica de amplificación podría aprovecharse para tal fin.

Conclusiones

El plásmido ColV que contiene el gen *iss* de la cepa APEC-RS4 pColV confirió resistencia a la acción bactericida del suero de pollo, de acuerdo a los análisis de viabilidad bacteriana cuando esta se comparó con la cepa isogénica curada del plásmido ColV.

Referencias

- Pier, GB., Jeffrey, BL., Wetzler, LM. Innata Immunity. Immunology, infection and immunity. Ed. ASM. 2004; pp. 29-32.
- Dho-Moulin, M., Fairbrother, JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res. 1999; 30: 299-316.
- Pluschke, G., Mayden, A., Levine, R. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18: K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. Infect Immun. 1983; 42: 907-913.
- La Regione, R., Woodward, M. Virulence factors of *Escherichia Coli* serotypes associated with avian colisepticemia. Res Vet Sci. 2002; 73: 27-35.
- Chaffer, M., Heller, E., Schwartzberg, B. Relationship between resistance to complement, virulence and outer membrane proteins patterns in pathogenic *Escherichiacoli* O2 isolates. Vet Microbiol. 1999; 64: 323-332.
- MacPeake, S., Smyth, J., Ball, H. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticemia compared to fecal isolates from healthy birds. Vet Microbiol. 2005; 110: 245-253.
- Rodriguez-Siek, K., Giddings, C., Doetkott, C., Jonhson, T., Nolan, L. Characterizing the APEC pathotype. Vet Res. 2005; 36: 241-256.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C., Curtiss III, R., Brown, P., Arne, P., Breee, A., Desaultes, C., Fairbrother, J. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and pathogenicity. Infect Immun. 2003; 71: 536-540.
- Nolan, L., Horne, S., Giddings, C., Foley, S., Johnson, T., Lynne, A., Skyberb, J. Resistance to serum complement, *iss* and virulence of avian *Escherichia coli*. Vet Res. 2003; 27: 101-110.
- Clancy, J., Savage, C. Another colicin V phenotype: in vitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium. Infect Immun. 1981; 32: 343-350.
- Jonshon, J., Siek, E., Jonshon, J., Nolan, K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strain. J Bacteriol. 2006; 188: 745-758.
- Engeonrecht, J., Brent, R., Kaderbhai, M. *Escherichia coli*, plasmid and bacteriophages. Current Protocols in Molecular Biology. Ed John Wiley. New York, 1993.
- Nishio, M., Okada, N., Miki, T., Haneda, T., Hirofumi, D. Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enteric* serovar *cholerae suis*. Microbiol. 2005; 151: 863-873.
- Tivendale, K., Allen, J., Ginns, C., Crabb, B., Browning, G. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh* with plasmid mediates virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2004; 72: 6554-6560.
- Binns, MM., Mayden, J., Levine, RP. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. Infect Immun. 1982; 35: 654-659.
- Johnson, J., Wannemuehler, M., Nolan, L. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2008; 74: 2360-2369.
- Lynne, A., Steven, L., Nolan, L. Immune Response to Recombinant *Escherichia coli* *Iss* Protein in Poultry. Avian Dis. 2006; 50: 273-276.

Opina sobre este artículo:



<http://medicalia.org.es/>

Los médicos disponen de una red social para intercambiar experiencias clínicas, comentar casos y compartir conocimiento. También proporciona acceso gratuito a numerosas publicaciones. **¡Únase ahora!**

Publish with iMedPub

<http://www.imedpub.com>

- ✓ Es una revista en español de libre acceso.
- ✓ Publica artículos originales, casos clínicos, revisiones e imágenes de interés sobre todas las áreas de medicina.

Archivos de Medicina Se hace bilingüe.

Para la versión en inglés los autores podrán elegir entre publicar en Archives of Medicine:

<http://www.archivesofmedicine.com>

o International Archives of Medicine:
<http://www.intarchmed.com>