



Artículo original

Klebsiella pneumoniae y *K. oxytoca* aisladas de niños con diarrea:
adherencia y citotoxicidad en líneas celulares

Fanny Martínez*, Solalba Gómez, Peggy Rodríguez, José Páez, Gidalía Urbina, Bredy Ortiz

Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela
Caracas - Venezuela

Recibido 24 de octubre de 2005; aceptado 09 de diciembre de 2005

Resumen: La capacidad de adherencia y citotoxicidad de cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* sobre líneas celulares intestinales HT-29 y CaCo-2, fue medida a partir de cepas aisladas de heces de niños de 0 a 5 años cuyas principales características son la pobreza y desnutrición, los cuales son factores importantes en problemas de salud pública en Venezuela. Cinco de las seis cepas estudiadas son adherentes y citotóxicas para ambas líneas celulares. Estos resultados confirman que las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* presentan dos mecanismos de enteropatogenicidad: uno de adherencia específico y otro de citotoxicidad en líneas celulares intestinales HT-29 y CaCo-2.

Palabras claves: Adherencia, Citotoxicidad, Diarrea Enteropatogenicidad, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, Salud Pública

Klebsiella pneumoniae and *K. oxytoca* isolates from children diarrhea:
Adherence and cytotoxicity in cellular lines

Abstract: The capacity of adherence and cytotoxicity of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* upon cell lines HT/29 and CaCo-2, was tested in diarrheic stools samples from 0-5 years old children whose main characteristics were poverty and malnutrition, which represent two of the most important public health problems in Venezuela. From six strains studied, five were adherent and cytotoxic for both lines. These results confirm that the strains of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* showed two enteropathogenicity mechanisms: one of specific adherence and another of cytotoxicity to the HT-29 and CaCo-2 cell lines.

Keywords: Enteropathogenicity, cytotoxicity, diarrhea, public health, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*

* Correspondencia:
E-mail: juliof@cantv.net

Introducción

En Venezuela las diarreas representan un grave problema de salud pública, en donde la población infantil menor de cinco años de bajos recursos socio económicos es la más afectada, además es la primera enfermedad que se notifica y representa el 60% de las enfermedades que registra el Departamento de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección Sectorial del Ministerio de Salud 1, al igual que en la mayoría de los países en desarrollo donde los niños presentan de tres a cinco veces más episodios de diarrea que en los países desarrollados, constituyendo una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil. A partir de los años setenta se han incrementado los esfuerzos en investigar la etiología de las diarreas, gracias a los

distintos proyectos de investigación que se han llevado a cabo. En los actuales momentos se pueden identificar los agentes causales en más del 80% de los casos, sin embargo estos avances no han logrado disminuir la incidencia de la enfermedad en nuestro país 1.

Además de los patógenos entéricos clásicos, (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatógenas y *Campylobacter*), otros microorganismos como las bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* se encuentran asociadas con cuadros de diarreas infecciosas en niños menores de cinco años. *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* son patógenos oportunistas responsables de infecciones en el tracto urinario (9%), bacteriemias nosocomiales (14%) y con relativa frecuencia en gastroenteritis 2,3. En trabajos sobre la etiología de la diarrea aguda en Venezuela se ha

encontrado un 11,6% de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* en casos de diarrea aguda en niños 4,5, por lo que se ha hecho necesario un estudio más detallado de los mecanismos de patogenicidad asociados a las cepas del género *Klebsiella* aisladas de cuadros de diarrea 5,6,7,8,9. Estudios previos han demostrado la presencia de enterotoxinas, así como la existencia de un patrón de adherencia específico a células Hep-2 y Vero 5,6,10. El presente trabajo evalúa los mecanismos de adherencia y citotoxicidad de cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas de casos de diarrea infantil en líneas celulares intestinales HT-29 y CaCo 2, lo cual sería un aporte más en la definición del género como patógeno responsable de cuadros de diarreas en la población infantil. Sobre todo la de bajos recursos socio económicos de nuestro país 5,6,7,11,12.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron seis cepas del género *Klebsiella*, tres de la especie *K. pneumoniae*: Kpn 112, Kpn 579, Kpn 54-1 y tres de la especie *K. oxytoca*: Koxy 109, Koxy 40, Koxy 33; caracterizadas como adherentes y citotóxicas en cultivo celular Hep-2 y Vero 6. Los aislamientos fueron obtenidos de cuadros de diarrea no inflamatoria, procesados en el Hospital Materno Infantil de Caricuaó 6].

Líneas celulares

Para los ensayos de adherencia y citotoxicidad se utilizaron dos líneas celulares provenientes de adenocarcinoma de colon: CaCo-2 y HT-29.

Ensayo de adherencia a las células HT-29 y CaCo-2

Este ensayo se realizó según el método de Cravioto al cual se le hicieron ciertas modificaciones [13]. Ambas líneas celulares se mantuvieron como una monocapa a una concentración de 2×10^7 células/ml en D-Men alta glucosa con suero fetal bovino al 10%, repartidas en placas para cultivo celular con sus laminillas de 24 pozos cada una, a razón de 1 ml por cada pozo e incubadas a 37°C en atmósfera de CO₂ por 48 horas.

Las cepas se sembraron en Caldo Todd mas D-manosa al 1%, a las 24 horas se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con medio D-Men alta glucosa sin antibióticos mas suero fetal bovino al 10% ajustado hasta lograr una concentración de 10^8 bacterias/ml. De esta suspensión se agregó 1ml a cada pozo de la placa que contiene los cultivos celulares de CaCo-2 y HT29, previamente lavados con PBS [13]. Se permitió que ocurriera la interacción bacteria-célula (CaCo-2 y HT-29) a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ por 1 y 6 horas, posteriormente se procedió a lavar cada pozo tres veces con PBS, las laminillas se fijaron en metanol y se colorearon con Giemsa (proporción colorante

amortiguador 1/25) por 20 minutos; se observaron al microscopio de luz marca Olympus y se fotografiaron con una cámara marca Nikkon. Para definir si una cepa es adherente o no, se utilizó el criterio descrito por Cravioto y col.[13] se contaron 100 células estableciéndose cuantas poseían bacterias adheridas, considerándose el ensayo positivo donde se observara una adherencia mayor o igual al 40% y negativo si la adherencia es menor del 10%.

Ensayo de citotoxicidad directa e indirecta

Para detectar la actividad citotóxica directa e indirecta se emplearon las mismas líneas celulares del ensayo anterior. Un día antes de realizar el ensayo se cultivaron las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en 10 ml de medio Casiminoácidos durante 24 horas; los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante se filtró a través de millipore de 0.45 μ corte. El día del ensayo se añadió 1 ml de cada uno de los filtrados obtenidos de las cepas a estudiar en los pozos de la placa de titulación. Las placas se incubaron a 37°C en 5% de CO₂, examinándose durante dos días consecutivos con un microscopio invertido Zeiss 10X para observar efecto citopático; caracterizado por: redondeamiento celular, vacuolización del citoplasma, picnósis del núcleo y destrucción parcial a total de la monocapa. Al cabo de las 48 horas se detuvo el ensayo lavando los pozos con PBS, las laminillas se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa por 20 minutos. Una vez finalizado el proceso se observó en un microscopio de luz (Olimpus) y se fotografiaron (cámara Nikkon). Para definir si se produjo actividad citotóxica, se contaron 100 células, considerándose positiva el 50% o más de redondeamiento celular [14,15].

Resultados

Adherencia sobre líneas celulares HT29 y CaCo 2

La adherencia de seis cepas: Kpn 112, Kpn 579, Kpn 54-1, Koxy 109, Koxy 40-0 y Koxy 33 fue establecida sobre líneas celulares HT-29 y CaCo-2 a 1 y 6 horas de incubación (Tabla 1).

Los controles negativos utilizados en todos los ensayos fueron monocapas de ambas líneas celulares sin inocular.

Los patrones de adherencia se establecieron en base a la comparación de las imágenes de referencia observados en los controles positivos, (Figuras. 1a, 1b).

En el grupo de cepas ensayadas se observaron los siguientes patrones de adherencia: las cepas Kpn 54-1, Kpn 579 y Koxy 40-0, presentaron un patrón agregativo (Figura 2). La cepa Koxy 109 presentó un patrón difuso (Figura 3) y la cepa Koxy 33 presentó un patrón mixto (adherencia agregativa y adherencia difusa). Estos resultados fueron observados para ambas líneas celulares.

Citotoxicidad Directa: Efecto Picnótico

El efecto picnótico fue establecido en base a la comparación de las monocapas sin infectar, con los cambios morfo-

lógicos producidos por las cepas bacterianas probadas en las líneas celulares a 1 y 6 horas del ensayo (Tabla 2).

Tabla 1. Ensayo de adherencia sobre líneas celulares HT-29 y Caco-2 a 1 hora y 6 horas de incubación.

| Cepa | HT-29 | | | | CACO-2 | | | |
|----------|------------|----|--------|-------|------------|----|--------|-------|
| | Adherencia | | Patron | | Adherencia | | Patron | |
| | 1h | 6h | 1h | 6h | 1h | 6h | 1h | 6h |
| Kpn 112 | + | + | * | * | + | + | * | * |
| Kpn 579 | + | + | AA | AA | - | + | - | AA |
| Kpn 54-1 | + | + | AA | AA | + | + | AA | AA |
| Koxy 109 | + | + | AD | AD | + | + | AD | AD |
| Koxy 400 | + | + | AA | AD | - | - | - | - |
| Koxy 33 | - | + | - | AA/AD | + | + | AA/AD | AA/AD |

AA: Adherencia Agregativa
AD: Adherencia Difusa
* : No se pudo establecer patrón de adherencia

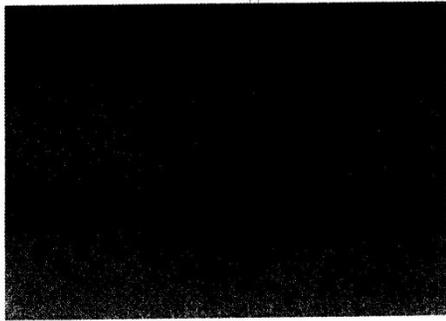


Figura 1a. Patrón de adherencia agregativa de células CaCo2. Control *E. coli* DAC29. Coloración de Giemsa, aumento 100 x.

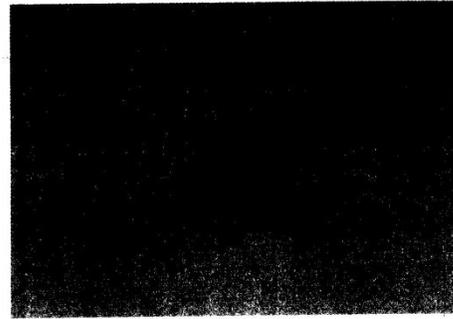


Figura 2. Cepa Kpn 54. Patrón de adherencia agregativa. Células HT-29. Coloración de Giemsa, aumento 100 x.

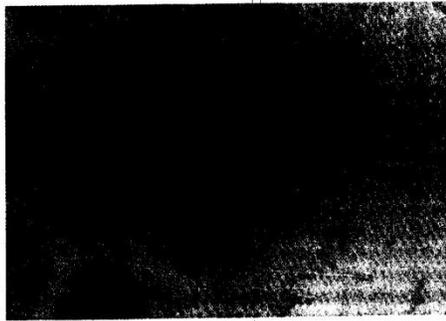


Figura 1b. Patrón de adherencia difusa células CaCo2. Control *E. coli* DAL788. Coloración de Giemsa, aumento 100 x.

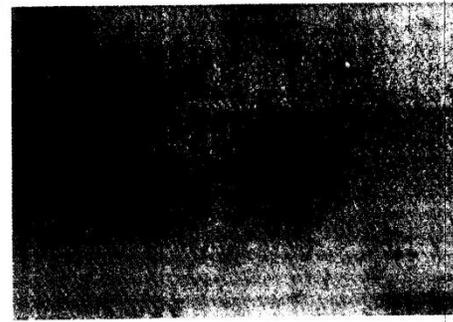


Figura 3. Cepa Ko 109. Patrón de adherencia difusa células CaCo2. Coloración de Giemsa, aumento 100 x.

Tabla 2 Ensayo de citotoxicidad directa: Efecto picnótico sobre líneas celulares HT-29 y CaCo-2 a 1 hora y 6 horas de inoculación.

| CEPA | HT-29 | | CACO-2 | |
|-----------|-------|-----|--------|-----|
| | 1 h | 6 h | 1 h | 6 h |
| Kpn 112 | + | + | + | + |
| Kpn 579 | + | + | - | + |
| Kpn 54-1 | + | + | + | + |
| Koxy 109 | + | + | - | - |
| Koxy 40-0 | + | + | - | - |
| Koxy 33 | - | + | + | + |

Como se puede observar en la tabla 2 la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* empleadas en el ensayo inducen efecto picnótico en ambas líneas celulares, a 1 hora del ensayo y todas lo inducen a las 6 horas, a excepción de la cepa Koxy 40-0 que no presenta dicho efecto sobre la monocapa de células CaCo-2.

Citotoxicidad indirecta: Actividad citotóxica de los filtrados de cultivo de cepas de K. pneumoniae y K. oxytoca sobre líneas celulares HT-29 y CaCo-2 a las 48 horas

La actividad citotóxica se midió observando los cambios morfológicos en las células de las monocapas utilizadas en el ensayo.

Como control positivo se utilizó una cepa de *Shigella dysenteriae* tipo 1 para la observación de dichos cambios morfológicos (Figura 4).

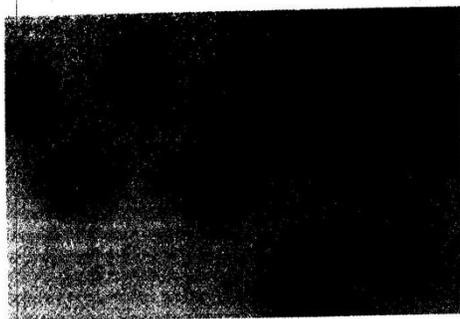


Figura 4. Citotoxicidad indirecta. Control positivo: *S. dysenteriae* Tipo 1. Células CaCo 2. Coloración de Giemsa, aumento 100 x.

De las cepas estudiadas pudimos observar que: la cepa Kpn 112 y Kpn 579 su actividad citotóxica a las 48 horas de incubación se ve reflejada con un 80% de redondeamiento y desprendimiento de la monocapa para ambas líneas celulares. En la cepa Kpn 54-1 se observó: destrucción total de la monocapa con un 100% de redondeamiento para ambas líneas celulares a las 48 horas de incubación.

En la cepa Koxy 109 se visualizó un 90% de redondeamiento celular y vacuolización del citoplasma en células HT-29, mientras que para las células CaCo-2 se observó

destrucción total de la monocapa con un 100% de vacuolización.

Con respecto a la cepa Koxy 40-0 pudimos observar un 80-90% de redondeamiento celular con destrucción parcial de la monocapa de HT-29, mientras que en la monocapa de células CaCo-2 no hubo destrucción pero sí un 50% de redondeamiento celular.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* presentan dos mecanismos de enteropatogenicidad: uno de adherencia específico y otro de citotoxicidad directa e indirecta sobre líneas celulares intestinales HT-29 y CaCo-2. En cultivo de células tisulares se ha ensayado adherencia y citotoxicidad de patógenos entéricos como: *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* entre otros, para establecer los mecanismos por los cuales ellos son capaces de adherirse y producir citotoxicidad [11,13,15,16,17,18].

En el ensayo de adherencia realizado quedó demostrado que el patrón de adherencia establecido para las cepas estudiadas en las dos líneas utilizadas es independiente del pili tipo I [19,20]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sansonetti y col. [17] quien describió para *E. coli* tres patrones de adherencia a las células Hep-2 (agregativo, localizado y difuso) y con los de Páez y col [6] quienes describen un patrón de adherencia agregativo y difuso para cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, aisladas de diarrea infantil. Por otro lado pudimos observar que a las 6 horas de incubación todas las cepas indujeron cambios morfológicos en ambas líneas celulares, a excepción de la cepa Koxy 40-0, la cual produjo solamente alteraciones en la monocapa de HT-29. Estos resultados nos llevan a pensar que la interacción bacteria-célula produce un efecto citotóxico directo; como lo observado en cepas de *E. coli* que presentan patrón de adherencia difuso y producen efecto citotóxico sobre células Hep-2 [21,22,23].

Los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad directa e indirecta en las líneas celulares utilizadas confirman lo reportado por Straus [24] quien reporta actividad citotóxica en seis cepas de *K. pneumoniae* productoras de un complejo toxico extracelular [24], y la actividad citotóxica del sobrenadante del cultivo de tres cepas de *K. oxytoca* sobre células Hep-2, CHO y Hela reportadas por Minami y col. [25]. Es importante señalar que los resultados obtenidos del efecto picnótico caracterizado por: retracción del borde celular, vacuolización del citoplasma, picnosis del núcleo y desintegración celular demuestran que los patrones de adherencia observados para cada una de las cepas de nuestro estudio no está relacionado de forma directa al efecto citotóxico que se produce; hecho que se relaciona con lo obtenido por Páez y col [6].

De nuestra experiencia podemos concluir que existen diferencias entre los mecanismos de adherencia y citotoxicidad de algunas cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas en casos de diarrea infantil sobre líneas celulares intestinales HT-29 y CaCo-2, estableciéndose que algunas de las cepas fueron adherentes, citotóxicas; adherentes y

citotóxicas en ambas y/o en una de las líneas celulares analizadas.

Referencias

- [1] Godoy, O., Diarreas en Venezuela 1993-1997. Vigilancia Epidemiológica de la Dirección Sectorial de Epidemiología del Ministerio de Sanidad. Caracas.
- [2] Prescott M L, Harley J P, Klein D A. Microbiología, 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1999.
- [3] Koneman A, Dowell J, Sommers W. Diagnóstico Microbiológico, 4ª ed. Bogotá: Editorial Panamericana; 1998.
- [4] De la Parte M A, Brito A, Guzmán M, Carmona O. y GVRB. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela. Análisis de una década. Rev Soc Ven Microbiol 2001; 21(2):14-22.
- [5] Rizzo M, Martucci A, Martínez F, Pujol, I. Producción de enterotoxina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas en casos de diarrea infantil. Soc Venez Cien Morfol 1997; 3(1-2):61-6.
- [6] Páez J, Rizzo C, Martínez F, Cavazza, M. Identificación de un mecanismo de adherencia a las células Hep-2 en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de casos de diarrea infantil. Soc Venez Cien Morfol 2000; 6(1-2):30-6.
- [7] Korhonen T, Tarkka E, Rauta E, Haatela K. Type 3 fimbriae of *Klebsiella sp* molecular characterization and role in bacterial adhesion to plants roots. J Bacteriol 1983; 155(2):860-5.
- [8] Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 fimbrial Shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. Infect Immun 2001; 69(9): 5805-12.
- [9] Guerin F, Le Bouguenec C, Gilquin J, Haddad F, Goldstein F W. Bloody diarrhea caused by *Klebsiella pneumoniae*: A new mechanism of bacterial virulence?. Clin Infect Dis 1998; 27:648-9.
- [10] Hornick D, Thommandru J, Smits W, Clegg S. Adherence properties of an MIKD-negative strain of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 1995; 63(5):2006-32.
- [11] González R, Díaz C, Mariño M, Cloralt R, Pequeñe M, Pérez-Schael I. Agl-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuela infants with acute diarrhea. J Clin.Microbiol 1997; 35(5):1103-7.
- [12] Martínez F, Rizzo M, Martucci A, Sánchez F. Ultraestructura del enterocito de rata bajo la acción de cepas adherentes y citotóxicas de *Klebsiella pneumoniae*. Soc Venez Cien Morfol 2000; 6(1-2):46-53.
- [13] Cravioto A, Gross S, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli*. Belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 1979; 3:95-9.
- [14] Guarino A, Guandalini S, Alessio M, et al. Characteristics and mechanism of action of heat-stable enterotoxin produced by *Klebsiella pneumoniae* from infants with secretory diar-rhea. Pediatric Res 1989; 25(5):514-8.
- [15] Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E, Louvard D. Absorptive and mucus-secreting subclones isolates from a minipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. J Cell Biol 1987; 105:345-57.
- [16] Favre-Bonte S, Darfeuille-Michaud A, Forestier C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to Human Intestine-407 Cell. Infect Immun 1995; 63(4):1318-28.
- [17] Sansonetti P, Ryter A, Clerc P, Maurelli A, Mounor J. Multiplication the *Shigella flexneri* within HeLa cell: Lysis of phagocyte vacuola and plasmid mediated control hemolysis. Infect Immun 1986; 51:461-9.
- [18] Minami, J.; Okabe, A.; Zooide, J. Hayashi, H.: Production of a unique cytotoxin by *Klebsiella oxytoca*. Microb. Pathol 1989; 7(3): 203-11.
- [19] Darfeuille-Michaud, A.; Jallat, C.; Aubel, D.; et al. R-Plasmid-encode adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. Infect Immun 1992; 60(1):44-55.
- [20] Duguid, J. P.; Fimbrial and adhesive properties in *Klebsiella* strains. J. Gen. Microb. 1959; 21:271-86.
- [21] Albert, M.J.; Khorshed, A.; Ansaruzzaman, M.; et al. Localized adherence and attaching-effacing properties of non enteropathogenic serotypes of *E. coli*. Infect Immun 1991; 59(5): 1864-8.
- [22] Duncan, H. ; Edberg, S.; Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. Crit Rev Microbiol 1995 21(2): 85-100.
- [23] Scaletsky, I.; Pedroso, M.; Cliva, C.; et al: A localized adherence-like pattern as second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. . Infect Immun 1999; 67(7):3410-5.
- [24] Strauss, D. Production of an extracellular toxic complex by various strains of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 1987; 55(1):44-48.
- [25] Minami, J.; Katayama, S.; Matsushi, O.; Sakamota, H.; Okabe, A enterotoxigenicity of *Klebsiella oxytoca* cytotoxin in rabbit intestinal loops. Infect Immun 1994; 62(1):172-7.