

16
2ij

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE
 MEMBRANA EXTERNA DE DIFERENTES CEPAS DE

Salmonella typhi

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

FRANCISCO JAVIER FAVELA EBERGENYI

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	pág.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y METODOS	
1.- MATERIALES Y SOLUCIONES.....	16
2.- METODOS	21
2.1.- Crecimiento de las cepas	21
2.2.- Rompimiento de las células	21
2.3.- Aislamiento de proteínas de membrana externa.....	21
2.4.- Cuantificación de proteína	22
2.5.- Determinación de lipopolisacárido.....	22
2.6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
2.7.- Electrotransferencia.....	24
2.8.- Obtención de antisueros.....	27
2.9.- Doble inmunodifusión	27
RESULTADOS	28
DISCUSION	42
CONCLUSIONES.....	45
RESUMEN.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47

I N T R O D U C C I O N

La tinción de Gram, permite clasificar a las bacterias en gram-positivas y gram-negativas, merced a diferencias en la composición de sus envolturas celulares. Las bacterias gram-positivas tienen una envoltura celular uniforme y densa formada por una membrana citoplasmática y una peptidoglicana que le confiere rigidez y constituye del 10 al 25% de su peso seco (1). La peptidoglicana está formada por cadenas paralelas de polisacáridos que contienen ácido murámico y N-acetilglucosamina, el ácido murámico está unido a alanina y ésta a su vez a otros aminoácidos, originando un péptido lateral que permite unir covalentemente entre sí las cadenas polisacáridicas. En la superficie celular se localizan macromoléculas específicas como ácidos teicoicos y lipoteicoicos (polímeros de alcoholes polihídricos, usualmente ribitol o glicerol) unidos covalentemente con la peptidoglicana (1). Las bacterias gram-negativas poseen una envoltura celular más compleja, ya que además de la membrana citoplasmática y la peptidoglicana, presentan una membrana externa la cual, actúa como barrera entre el medio ambiente y ella misma. Dentro de las funciones de esta membrana, están las de permitir la entrada de nutrientes e impedir a su vez la entrada de sustancias tóxicas, tales como factores propios del huésped (lisozima, betalisisina y protefnas leucocitarias), sales biliares y enzimas digestivas, así como un número importante de antibióticos (1,2,3,4) . Los estudios sobre la composición estructural de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, se inició a finales de la década de los sesentas con la descripción por Miura y Mizushima (5,6) de un método que permitió aislar la membrana externa de Escherichia coli; el procedimiento consistió en preparar membranas vesiculadas a partir de esferoplastos y en la separación de la membrana vesiculada externa, de la citoplasmática mediante un gradiente de densidad; posteriormente Schnaitman describió otro método en el cual se evita tanto la formación de esferoplastos como el gradiente de densidad; este nuevo método se basó en la obtención de un complejo membrana externa-peptidoglicana; para ello, las bacterias se rompen con una prensa francesa y la membrana citoplasmática es solubilizada

con un detergente no iónico (Tritón X-100) en presencia de magnesio (7).

Los componentes principales de la membrana externa al igual que --- otras membranas biológicas, son fosfolípidos y proteínas; un tercer componente es el lipopolisacárido, que se encuentra en gran proporción constituyendo él solo el 45% de la superficie. Las proteínas de membrana externa, se caracterizaron inicialmente por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Su identificación como bandas ocasionó gran confusión ya que de acuerdo al método como se obtenían y al sistema de geles empleado para identificarlas, variaban en su corrimiento electroforético.

Así Schnaitman encontró inicialmente una proteína de 45 kilodaltons (KD) de peso molecular, que representaba el 70% de las proteínas totales de la membrana externa de Escherichia coli, por lo que la denominó proteína mayor o principal (8). Posteriormente, él y otros investigadores - encontraron que la proteína mayor en realidad estaba constituida por cuatro proteínas (9); una quinta proteína mayor de E. coli fue reportada -- por Schmitges y Henning en 1976. La identificación de los genes que codifican las proteínas de membrana externa ha permitido conocer el número real de ellas, con lo cual su vez ha sido posible tener una nomenclatura internacional aceptada por todos los investigadores. Actualmente las proteínas de membrana externa (PME) de acuerdo a la cantidad que de ellas se expresen, se clasifican en mayores y menores; las primeras representan el 80% del total, mientras que las segundas el 20%. En E. coli se -- han identificado de 10 a 20 proteínas menores, algunas de éstas participan en la incorporación de nutrientes tales como vitamina B₁₂, He, maltosa y otros (4,10), mientras que otras actúan como receptores de fagos y colicinas, sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce tanto su función como los genes responsables de su producción.

Las proteínas mayores se subclasifican en :

- 1) Proteínas matrices o porinas
- 2) Proteína modificable por el calor (OmpA)
- 3) Lipoproteína de Braun (4,10).

Las porinas son un grupo de proteínas cuyos pesos moleculares van - de 30kD a 42 KD, algunas de ellas son constitutivas mientras que otras - se expresan sólo bajo ciertas condiciones de crecimiento, o bien son -

codificadas por un fago o por un plásmido (11). En el caso de *E. coli* encontramos tres porinas bien definidas OmpF, OmpC y phoE; sin embargo no son las únicas, aunque sí las que se encuentran en mayor cantidad en la membrana externa y están asociadas de manera no covalente a la peptidoglicana. En los cuadros I y II se resumen las características bioquímicas de las porinas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (11).

Nakae y Nikaído han demostrado que las porinas son principalmente -- las proteínas de la membrana externa responsables de la capacidad que tienen las bacterias gram-negativas de permitir la entrada de nutrientes y la salida de producto de desecho (12,13), para que lo anterior se lleve a cabo tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium* es necesaria la asociación de la misma porina para formar un trímero (unidad funcional de tres canales) que al atravesar la membrana externa se fusione para formar un sólo canal (14, 15, 16).

A continuación se enumeran algunas de las características funcionales de estos canales de difusión:

1) Son tamices moleculares no específicos, al través de los cuales difunden solutos hidrofílicos.

2) El tamaño límite de los solutos en el caso de los oligosacáridos es de 600 daltons (13, 14).

3) La difusión de los solutos está influenciada por factores tales como el tamaño, la carga y la hidrofobicidad de éstos, por lo que encontramos grandes diferencias en los coeficientes de permeabilidad de cada soluto (17).

4) Se requiere de la interacción porina y lipopolisacárido para que el canal formado sea funcional (11).

5) En bacterias que tienen más de un tipo de poro, la pérdida o ausencia de uno de ellos, no modifica la actividad de los restantes (18,19)

6) Existen algunas evidencias que demuestran cierta especificidad de los canales de difusión. Por ejemplo, la ausencia de OmpF resulta en una reducción de nucleótidos, y el poro formado por pho E es particularmente eficiente en la incorporación de fosfato inorgánico y de compuestos -- fosforilados (4,20).

Cuadro I. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS DE E. coli k12 Y E. coli B .

CARACTERISTICAS	Omp F	Omp C	pho E
Peso molecular	37.2 kD	36 kD	36.73 kD
No de copias por célula	Mayor de 10^5	Mayor de 10^5	Mayor de 10^5
Receptor para fagos o bacterinas.	Tu1a, T2, TP1 TP2, TP5, K20+ Col A	TP2, TP5, PA-2 TP6, Tu1b, T4 Me1	TC23, TC45
Gene estructural	Omp F minuto 20.7	Omp C minuto 46	pho E minuto 5.9
Punto isoelectrico	5.9-6.2	4.41	N.D.
Forma oligomérica	Trímero	Trímero	Trímero
Diámetro del poro	1.4 nm	1.3 nm	1.2 nm
Otras características	Su síntesis se reprime en alta osmolaridad	Se expresa en condiciones de alta osmolaridad	Su síntesis se reprime en condiciones limitadas de fósforo, la sobreproducción es letal

N.D.= No determinado.

kD = kilo daltones.

Tomado de (11).

CUADRO II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PORINAS DE
S. typhimurium

CARACTERÍSTICA	OmpF	OmpC	OmpD
Peso molecular	35 kD	36 kD	34 kD
Número de copias por célula	Mayor de 10^5	Mayor de 10^5	Mayor de 10^5
Receptor para fagos o bacterinas	N.D.	PH42, PH105 PH221	PH42, PH 31 PH51
Gene estructural.	OmpF minuto 21	OmpC minuto 46	OmpD minuto 28
Punto Isoeléctrico	4.77	4.78	N.D.
Forma Oligomérica	Trímero	Trímero	Trímero
Diámetro del poro	1.4 nm	1.4 nm	1.4 nm

N.D. no determinado

KD kilodaltones

Tomado de (11).

La estructura primaria de OmpF de E. coli fue establecida directamente mientras que la de OmpC y phoE se obtuvo indirectamente a partir de la secuencia de nucleótidos de sus genes.

La estructura primaria de OmpF, OmpC y phoE revela una homología de un 65% (4). En los tres casos, las regiones más largas de aminoácidos hidrofóbicos son de once, por lo que se infiere que la región transmembranal no está formada por una simple secuencia de estos aminoácidos. El establecimiento de la estructura secundaria por medio de diroismo circular y espectrofotometría infrarroja, confirmó la ausencia de regiones de alfa-hélice y demostró la inesperada estructura en beta-plegada; estos hallazgos -- han hecho difícil explicar como se insertan las proteínas de la membrana externa para construir los poros de difusión (2).

La proteína OmpA está presente en cerca de 10^5 copias por célula su corrimiento en geles de poliacrilamida se modifica según la temperatura que se emplee para solubilizarla; así cuando se solubiliza a 100°C tiene un peso molecular de 35kD y de 28 kD si se solubiliza a 37°C (4,21, 7). -- La proteína OmpA tiene un alto contenido de estructura beta-plegada y la estructura primaria para la misma E. coli K-12, está constituida por 325 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 35,159 D (23). Entre los residuos 176-187 la secuencia de aminoácidos es similar a la región de la bisagra de la inmunoglobulina, esta región es sensible a proteasas, parece dividir a la proteína en dos grandes dominios, el NH₂ terminal se inserta en la membrana externa y el COOH-terminal aparentemente está expuesto hacia el interior de la membrana. La OmpA sirve como receptor de fagos y colicinas, participa en procesos de conjugación genética, se asocia con la lipoproteína de Braun para mantener la integridad estructural de la membrana y la forma de la misma (22,24) y al igual que las porinas requiere de la presencia del lipopolisacárido para llevar a cabo las funciones antes mencionadas.

La lipoproteína de Braun fue la primera proteína de la membrana externa que se purificó (11), tiene un peso molecular de 7.2 kD y está constituida por 58 aminoácidos, con una secuencia muy repetitiva; en el grupo aminoterminal presenta una cisteína a la que se une por medio de un enlace tioéster un diglicérido, así como ácidos grasos mediante un enlace amida ;

La región I, Antígeno O consiste en un complejo polisacárido de repetición que está formado por 40 o más unidades, constituidas éstas por tres a seis monosacáridos específicos, entre los que se incluyen azúcares neutros, azúcares aminados y ácidos urónicos .

La estructura de las unidades de repetición muestra gran diversidad incluso dentro de una misma especie bacteriana, propiedad que ha sido empleada para diferenciar cepas de una misma especie.

La región II core o núcleo basal, es una estructura común para las enterobacterias y es muy similar entre las gram-negativas; se trata de un complejo polisacárido que puede ser dividido en dos secciones:

1) región interna que se encuentra unida al lípido A y está formada por dos azúcares específicos del lipopolisacárido; el ácido 2-ceto-3-desoxioctulónico (KDO), más correctamente 3-desoxi-diamino-octulónico y un L- glicero-D-manoheptosa;

2) región externa, la cual se forma por glucosa, galactosa y N-acetil D-glucosamina (25). (Figura 2).

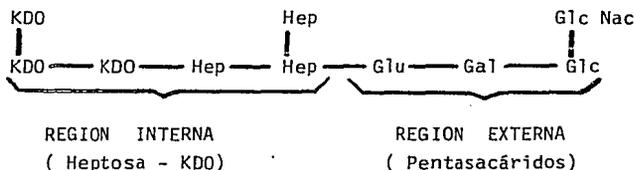


Figura 2. REGION DEL NUCLEO BASAL DE *S. typhimurium*. (25)

La región III o del lípido A, se inserta en la bicapa de fosfolípidos y es la parte del lipopolisacárido que contiene la actividad de endotoxina y es común para las Enterobacterias, formado por un disacárido de glucosaminas en unión beta (1-6) teniendo fosfatos o pirofosfatos en las posiciones 1,4 así como 6 ácidos grasos, dos de los cuales se unen por medio de = enlaces amidas. Los ácidos grasos más abundantes son los beta-hidroxi-saturados y algunos de éstos se unen al grupo hidroxilo de otros ácidos grasos, hay además moléculas con carga negativa (etanolamina, cationes divalentes) que se unen de manera no covalente (25). (Figura 3).

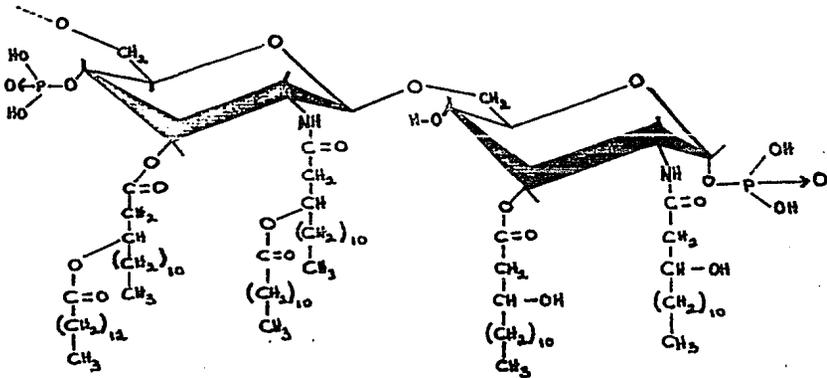


Figura 3. ESTRUCTURA DEL LIPIDO A DE S. typhimurium (2).

La organización molecular de la membrana externa implica que los componentes de la misma van a tener una localización específica y por ello -topografía determinada, lo que hace que se establezcan asociaciones o interacciones entre moléculas de diferente naturaleza química así como entre las moléculas iguales. Una esquematización de este hecho puede observarse en las figuras 4 y 5.

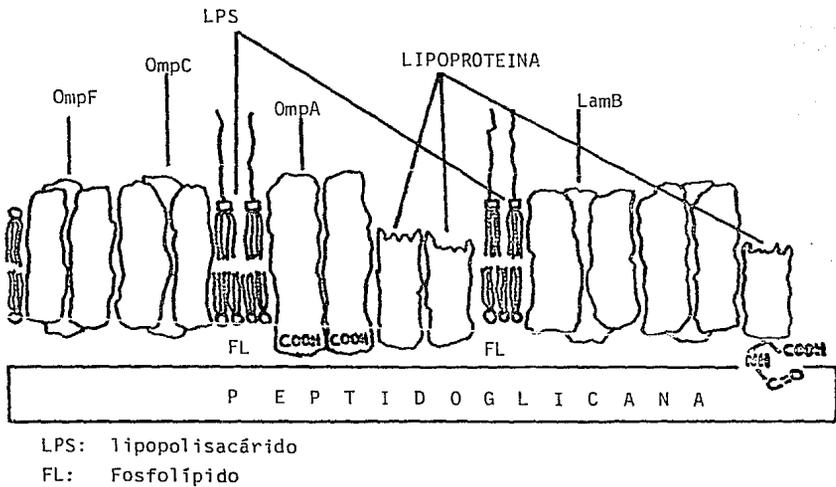
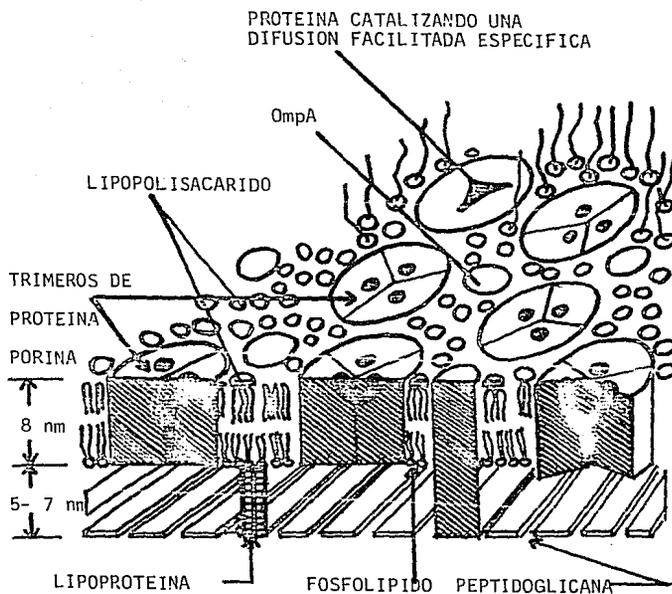


Figura 4. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ORGANIZACION MOLECULAR DE LAS PROTEINAS MAYORES EN LA MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM--NEGATIVAS. (4)

Figura 5. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MEMBRANA EXTERNA DE E. coli y S. typhimurium.



Tomado de (2).

Dentro de las diferentes interacciones que pueden establecerse existen lagunas de mayor trascendencia como son:

- Interacciones proteína-proteína; interacciones proteína-peptidoglicana o e interacciones proteína-lipopolisacárido. Así tenemos que la lipoproteína de Braun en su forma libre interactúa entre sí, originando principalmente dímeros (26), en su forma ligada (unida a la peptidoglicana) interacciona con las proteínas formadoras de poros (27). La proteína OmpA -- puede encontrarse formando unidades oligoméricas o bien dímeros heterólogos con la lipoproteína libre, puede estar unida a la peptidoglicana o al lipopolisacárido (LPS) formando complejos proteína-LPS que funcionan como receptores para fagos (K3 y Tu II) y para células donadoras en el factor F de la conjugación. Las proteínas OmpC, OmpD, OmpF y pho E pueden estar unidas químicamente entre sí formando cada una por separado dímeros, trímeros o hexámeros (siendo la forma de trímero la biológicamente activa); se unen de manera fuerte no covalente a la peptidoglicana, formando complejos con el LPS e *in vitro* su actividad como poros y como receptores de fagos depende de la presencia de éste (28). Lo anterior sugiere que para conservar la conformación nativa de las proteínas porinas es necesaria la presencia del LPS (29). Por su parte el lipopolisacárido también puede tener interacciones LPS-LPS.

Otras estructuras importantes y bien definidas que se encuentran presentes en la membrana externa, de las bacterias gram-negativas, son el flagelo (antígeno H) y la cápsula (antígeno Vi, en el caso de *S. typhi*).

El flagelo o antígeno H es termolábil y se inactiva tanto por el alcohol como por los ácidos. Este antígeno aglutina formando masas esponjosas en presencia de su antisuero homólogo. El flagelo está constituido por una proteína denominada flagelina (1, 30).

La cápsula o antígeno Vi, son antígenos especializados que se encuentran en la parte externa periférica de la bacteria; son carbohidratos simples con unidades repetitivas de N-acetil galactosaminurónico. El antígeno Vi se destruye por calentamiento a 60°C durante una hora, por los ácidos y por el fenol. Las cepas que poseen antígenos Vi son más virulentas (1,30).

Las bacterias gram-negativas, tienen en su membrana externa, además de los antígenos clásicos ya descritos, otras estructuras que pueden jugar

un papel antigénico importante; en los últimos años las proteínas de membrana externa (PME) de estas bacterias han cobrado gran relevancia y diversos investigadores han enfocado su estudio hacia el papel que desempeñan estas proteínas en la relación huésped-parásito; esto es debido a que se localizan en la superficie celular y se considera que son elementos clave tanto en la patogenicidad como en la inducción de protección contra enfermedades producidas por estas bacterias. Frash y col., junto con Buchanan, demostraron que proteínas de membrana externa de Neisseria meningitidis y N. gonorrhoeae inducen protección en infecciones causadas por estas mismas (31); Kussi demostró que proteínas (porinas) de S. typhimurium así como suero antiporinas protegen contra la salmonelosis murina (32).

Las proteínas de membrana externa de Salmonella typhi han sido empleadas para inducir un efecto protector y los resultados obtenidos indican que protegen al ratón de un reto de hasta 100 veces la DL_{50} contra la misma bacteria y un suero de conejo anti-PME protege al ratón de un reto de hasta 20 veces la DL_{50} (33). Por otro lado, recientemente se han identificado los genes que codifican para las porinas OmpF, OmpC, así como OmpA de S. typhi 9,12 d Vi (34). También se ha podido observar que pacientes con fiebre tifoidea presentan anticuerpos de la clase IgM e IgG contra proteínas de membrana externa, principalmente contra las porinas.

La fiebre tifoidea es una enfermedad aguda que se presenta únicamente en el hombre y se caracteriza por fiebre elevada y continua, cefaleas, anorexia, esplenomegalia y leucopenia con un balance nitrogenado negativo. Esta enfermedad es producida por S. typhi y continúa siendo un problema endémico en los países en vías de desarrollo (35).

La Salmonella typhi es un bacilo móvil perteneciente a la tribu Salmonella a la familia Enterobacteriaceae; no esporulado, es de longitud variable (2-3 μ m), flagelado, citófilo y aerobio (también anaerobio facultativo); crece en medios de cultivo ordinarios como agar nutritivo y BHI, así como en agar sangre, formando colonias grandes brillantes y grisáceas (35). Tiene una serie de características bioquímicas (cuadro III) que lo pueden diferenciar de otros organismos similares, sin embargo, la identificación definitiva se realiza mediante pruebas serológicas de aglutinación en base a los antígenos de superficie O. Dentro de la estructura antigéni-

ca de Salmonella typhi se considera que los de mayor importancia son: los antígenos O, los antígenos H y los antígenos Vi, además de estos tres se encuentran las proteínas de membrana externa (33).

Para la protección contra la fiebre tifoidea se cuenta con una vacuna parenteral reconocida oficialmente por la O.M.S. que emplea la bacteria -- completa inactivada por el calor; la inmunidad que se induce con esta vacuna es de corta duración por lo que se requiere de reinmunizaciones cada 2 o 3 años, no se puede aplicar a niños y presenta algunos efectos colaterales como fiebre, adenopatías, malestar general, etc. (36,37).

Recientemente se ha descrito una vacuna oral elaborada con una mutante de S. typhi (UPD-galactosa-epimerasa-deficiente) denominada Ty21a, la cual induce una protección más prolongada que la que otorga la vacuna parenteral, además de eliminar los efectos adversos, sin embargo también requiere de --- reinmunizaciones, así como de la neutralización de la acidez gástrica previa a su administración.

Es importante hacer notar que a la fecha se desconoce el papel exacto de las PME de S. typhi en la inducción de la protección contra la fiebre -- tifoidea.

CUADRO III . CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS PRINCIPALES DE S. typhi y E. coli (1,30,38).

P R U E B A	<u>S. typhi</u>	<u>E. coli</u>
INDOL	-	+
ROJO DE METILO	+	+
MOTILIDAD	+	(±)
GLUCOSA	+ ácido	+ ácido y gas
LACTOSA	-	+ ácido y gas
SACAROSA	-	(±)
MANITOL	+	+ ácido y gas
PRODUCCION DE H ₂ S	+	-
TRIPLE AZUCAR HIERRO	Pared alcalina, fondo ácido	Pared alcalina fondo ácido
LISIN-descarboxilasa	+	(±)
ORNITIN-descarboxilasa	-	(±)

El presente trabajo describe la comparación bioquímica e inmunológica de las proteínas de membrana externa de las cepas de S. typhi: Ty2 y Ty21a (empleadas en la elaboración de vacunas), 9, 12 dVi (aislada de paciente - con fiebre tifoidea), "0" 901 (carente de antígeno Vi) y como testigos las PME de S. typhimurium y E. coli K12 (además de E. coli Hb y 358) que se han descrito ampliamente en la literatura.

Tomando en cuenta lo antes dicho se plantearon los siguientes objetivos:

O B J E T I V O S

- 1) Aislar proteínas de membrana externa de las cepas antes mencionadas por el método de Schnaitman descrito en 1970.
- 2) Caracterizar los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida - de todas las cepas estudiadas.
- 3) Obtener suero de conejo anti-proteínas de membrana externa de S. typhi 9,12 d Vi, S. typhi "0" 901, S. typhi Ty21a y S. typhimurium para estudiar su reacción antígeno-anticuerpo con las PME de las cepas trabajadas.
- 4) Estudiar las reacciones cruzadas entre las diferentes cepas por precipitación en gel de agarosa (doble inmunodifusión) e Inmunoelctrotransferencia empleando para ello sueros de pacientes con fiebre tifoidea y sueros - de conejo anti-PME.

MATERIALES Y METODOS

1.- MATERIALES Y SOLUCIONES

a) Cepas

se trabajaron las siguientes cepas : S. typhi 9,12 d Vi (aislada de paciente con fiebre tifoidea), S. typhi "0" 901, S. typhi Ty2, S. typhi -- Ty21a y S. typhimurium donadas por el Instituto Nacional de Higiene; E. coli K12, E. coli Hb y E. coli 358, donadas por el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología UNAM de Cuernavaca , Morelos.

b) Cultivo

Medio de cultivo

Medio mínimo A. Composición:

Fosfato de potasio dibásico (Baker)	7.0 g/l
Fosfato de potasio monobásico (Baker)	3.0 g/l
Citrato de sodio (Baker)	0.5 g/l
Sulfato de amonio (Baker)	1.0 g/l
Sulfato de magnesio (Baker)	0.1 g/l

El medio se esterilizó a 15 lb de presión, 15 min a 120°C. posteriormente se adicionaron 5 g de glucosa (Merck), 20 mg de leucina (Sigma) y 10 g de levadura (Bioxon), previamente esterilizados a 10 lb de presión por 10 min.

Solución de lavado

Hepes 10 mM pH 7.4

Hepes (Sigma)	2.6 g/l
Agua destilada	1 l

c) Soluciones utilizadas para el aislamiento de proteínas de membrana externa

Hepes 10 mM pH 7.4 , Tritón X-100 al 2%.

Hepes (Sigma)	2.60 g/l
Tritón X-100 (Sigma)	20.0 g
Agua destilada	1000 ml
Tris 50 mM, E.D.T.A. 5 mM pH 7.8, Tritón X-100 al 2%.	
Tris (Sigma)	6.05 g
E.D.T.A. (Sigma)	1.861 g
Tritón X-100 (Sigma)	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

d) Cuantificación de proteína

Solución patrón de proteína

Albúmina sérica bovina (Sigma)	25.0 mg
Agua destilada	25 ml
Conservar a 4°C.	

e) Determinación de lipopolisacárido (como KDO).

Solución patrón de 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO).

KDO (Sigma) 10 mg/ml	0.1 ml
Agua destilada	0.9 ml

f) Soluciones utilizadas para la electroforesis

Acrilamida

Acrilamida (Biorat)	30.0 g
N,N bismetilen acrilamida (Biorat)	0.80 g

Se afora a 100 ml con agua destilada y desionizada, se filtra en papel Whatman no. 41 y se mantiene a 4 °C en un frasco color ámbar.

Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Trizma base (Sigma)	6.0 g
---------------------	-------

Ajustar a pH con HCl 2 N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.

Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6,8

Trizma base (Sigma)	6.0 g
---------------------	-------

Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.

Amortiguador de muestra

Amortiguador Tris-HCl pH 6.8	25	ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma)	2.0	ml
Azul de bromofenol al 1% (Sigma)	0.1	ml
Glicerol (Baker)	10.0	ml
2-mercaptoetanol (Sigma)	5.0	ml
Amortiguador de corrimiento. Glicina 0,192 M, Tris 0.025, pH 8.3.		
Trizma base	3.0	g
Glicina(Sigma)	14.4	g
SDS	1.0	g

Aforar a 1000 ml con agua destilada y desionizada.

Solución fijadora

Metanol (Merck)	400	ml
Acido acético (Baker)	70	ml
Agua destilada	530	ml

Solución colorante de proteínas

Metanol al 50%	454	ml
Acido acético	46	ml
Azul de Coomassie (Sigma)	1.2	g

Se agita una hora y se filtra en papel Whatman no. 41.

Solución decolorante para azul de Coomassie

Metanol	50	ml
Acido acético	25	ml
Agua destilada	925	ml

g) Soluciones utilizadas para la electrotransferencia a papel de nitrocelulosa y revelado con antisuero.

Amortiguador de transferencia . Glicina 0.192N, Trizma base 0.025 M.

Trizma base	18.15	g
Glicina	86.40	g
Metanol	1200	ml
Agua destilada	4800	ml

PBS 0.15 M pH 7.2

Fosfato de potasio	2.0	g
Cloruro de sodio	8.0	g
Cloruro de potasio	0.2	g

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Solución de lavado

PBS 0.15 M	1	l
Tween 20(Baker)	1.0	ml

Solución de bloqueo

E.D.T.A. (Na ₄)	2.8	g
Gelatina bacteriológica (Difco)	2.5	g
Tween 20 (Sigma)	1.0	ml

Ajustar a 1000 ml con PBS 0.15 M.

Tinta china para tinción

Tinta china (comercial)	0.25	ml
PBS Tween al 1%	250.0	ml

Sustrato para el conjugado

4-cloro-alfa-naftol (Sigma)	30.0	mg
Metanol	10.0	ml
Peróxido de hidrógeno al 30% (Merck)	0.05	ml

Llevar a 50 ml con PBS 0.15 M.

h) Doble inmunodifusión

Agarosa al 1.2%		
Agarosa (Sigma)	1.2	g
Azida de sodio (Sigma)	0.1	g
Solución salina al 0.85%	100	ml

Solución colorante

Azul de Coomassie brillante (Sigma)	2.0	g
Etanol (Baker)	180	ml
Acido acético	40	ml
Agua destilada	180	ml

Solución decolorante para azul de Coomassie brillante

Etanol	180	ml
Acido acético	40	ml
Agua destilada	180	ml

2. METODOS

2.1. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS

Las cepas se crecieron en agar BHI, de cada una se tomó una asada bacteriológica y se depositó en un matraz de 125 ml que contenía 50 ml de medio mínimo A (inóculo). El inóculo se incubó 18 horas a 37°C, una vez transcurrido este tiempo el inóculo se dividió en dos partes iguales, pasando cada parte a una botella de cultivo de 4 l que contenía 1.5 l del medio mínimo A. Estas botellas se incubaron a 37°C con agitación en un Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc.) a 200 r.p.m. durante 8 horas, obteniéndose una densidad óptica aproximada de 180 unidades Klett.

Las células se cosecharon por centrifugación a 1650xg, 15 minutos en una centrífuga Sorvall RC5C (Sorvall Instruments Dupon), las células se resuspendieron en Hepes 10 mM pH 7.4, se lavaron una vez y finalmente se resuspendieron en Hepes 10 mM pH 7.4 y se congelaron a -20°C, hasta el momento que se procesaron.

2.2. ROMPIMIENTO DE LAS CELULAS (SONICACION)

Las células resuspendidas en Hepes 10 mM pH 7.4 se diluyeron hasta obtener una absorbancia a 660 nm de 1.2 de D.O. (Espectrofotómetro Beckman DU-7) teniendo finalmente un volumen de entre 1.5 y 2 l para cada una de las cepas; una vez hecho esto, las bacterias se rompieron por ultrasonido, en baño de hielo por periodos de dos minutos a 180 watts (190 decibeles), añadiéndose a la suspensión bacteriana 25 mg de DNasa y RNasa (Sigma) así como dos gotas de $MgCl_2$ 1 M por ml de cultivo. Las cepas se rompieron en un sonicador (Lab-Line-Ultratip Labsonic System) hasta que la densidad óptica a 660 nm fue de 0.4-0.5.

El sonicado obtenido se centrifugó a 1650xg por cinco minutos, dos veces para eliminar células completas y trozos gruesos, el sobrenadante se congeló para su conservación a -20°C.

2.3. AISLAMIENTO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

El sonicado obtenido de cada cepa se centrifugó a 100,000 xg por 45 minutos a 5°C con el objeto de sedimentar la envoltura celular, esto se hizo en una ultracentrífuga (Beckman L8-M). Las pastillas obtenidas se resus

pendieron en Hepes 10 mM pH 7.4, con la ayuda de un homogenizador manual - para su posterior centrifugación a 100,000 xg por 45 minutos a 5°C, con el fin de lavar las membranas.

Las envolturas celulares ya lavadas se resuspendieron en una solución de Hepes 10 mM pH 7.4 conteniendo Tritón X-100 al 2% con el objeto de solubilizar la membrana citoplasmática, posteriormente se centrifugaron a 100,000 xg por 45 min. a 5°C. La pastilla así obtenida se empleó para extraer las proteínas de membrana externa.

La pastilla obtenida en el paso anterior se resuspendió en Tris 50 mM conteniendo E.D.T.A. 5 mM y Tritón X-100 al 2% con ayuda de un homogenizador manual, una vez resuspendido se incubó a 37°C durante 15 min, después se centrifugó a 100,000 xg por 45 min. a 37°C. El sobrenadante obtenido después de la ultracentrifugación se guardó como la fracción soluble en Tris-EDTA-Tritón X-100, la cual contiene las proteínas de membrana externa (en su mayor parte), el sedimento se resuspendió en Hepes 10 mM por medio de un homogenizador manual y se guardó como la fracción insoluble (peptidoglicana). Del sobrenadante se hicieron alícuotas de 20 ml en frascos viales, y se guardaron a -70°C hasta el momento de su uso.

2.4 . CUANTIFICACION DE PROTEINA

La cuantificación de las proteínas de membrana externa (PME) en el sobrenadante se hizo mediante el método de Lowry (39), el cual se basa en la determinación del contenido de tirosina y triptofano de las proteínas; se utilizó una curva patrón de referencia con albúmina sérica bovina (Sigma) .

2.5. DETERMINACION DE LIPOPOLISACARIDO (como KDO).

La determinación de lipopolisacárido presente en las proteínas de membrana externa se hizo en base a la cantidad de KDO (2-ceto-3-desoxioctonato) existente en las mismas, utilizando para ello la técnica descrita por Zelther, J.Y.; Jackson y col. (40). Para la curva patrón de referencia se empleó KDO (Sigma) 1 mg/ml.

2.6. ELECTROFORESIS

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida), en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras para las muestras y un sistema amortiguador discontinuo. Para ello se empleó un aparato de electroforesis vertical en placas de 16 x 14 cm (LKB 2001).

2.6.1. Montaje y preparación de las placas.

Se lavaron con detergente todos los implementos del sistema LKB 2001 de electroforesis y se enjuagaron con agua, las placas de vidrio se lavaron con metanol, posteriormente se montaron en su base con una goma en el fondo para lograr el ajuste hermético al apretar los tornillos, después se llenan con la solución de acrilamida que formará el gel separador, evitando la formación de burbujas. El gel separador tenía 11.5% de acrilamida, y estaba formado de la siguiente manera: solución de acrilamida 11.5 ml, ---amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 7.5 ml, agua desionizada 10.55 ml, SDS al 10% 0.6 ml, TEMED (N,N, N-tetrametiletildiamino, Sigma) 0.01 ml y --persulfato de amonio (Biorat) al 10% 0.05 ml. La parte superior del gel se protege del aire con un poco de agua. Una vez polimerizado el gel separador se colocó el peine formador de los canales para las muestras, poste---riormente se adicionó el gel introductor que contenía lo siguiente" solu---ción de acrilamida 2.5 ml, amortiguador Tris HCl 0.5 M pH 6.8 3.75 ml, ---agua desionizada 8.55 ml, SDS al 10% 0.15 ml, TEMED 0.015 ml y persulfato de amonio al 10% 0.05 ml. El gel introductor se dejó polimerizar por una - hora.

2.6.2. Preparación de las muestras

Un ml del sobrenadante que contenía las proteínas de membrana externa de cada cepa en una cantidad aproximada de 1 mg/ml se precipitó con 6 ml --de acetona fría (-20°C) toda la noche, después se centrifugó a 420 xg du---rante 30 minutos en una centrífuga Beckman TJ-6, se eliminó la acetona y el precipitado se resuspendió en 1 ml de amortiguador de muestra, luego se colocaron de 40 a 70 µl de ella en los canales del gel introductor y se sometieron a electroforesis. Se emplearon patrones de peso molecular que con---sistieron en albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, anhidrasa carbónica

y lisozima (Sigma) de 66, 45, 29 y 14 kD respectivamente, solubilizados - también en el amortiguador de la muestra.

2.6.3. Corrimiento de las placas electroforéticas

Las placas se corrieron con corriente constante de 20 a 25 miliamperes por placa y a voltaje variable, durante 6 horas (hasta que el colorante de las muestras se encuentra a un cm del final de la placa). La temperatura se mantuvo a 10°C con la unidad refrigerante del equipo.

2.6.4. Tinción de los geles de poliacrilamida.

Inmediatamente después de finalizada la electroforesis los geles se - colocaron en un recipiente que contenía solución colorante en un volumen -- suficiente para cubrir el gel completamente, la tinción tardó de 1 a 1.5 hr Posteriormente, el exceso de colorante se eliminó con la solución decolo--- rante, hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas.

2.7. ELECTROTRANSFERENCIA

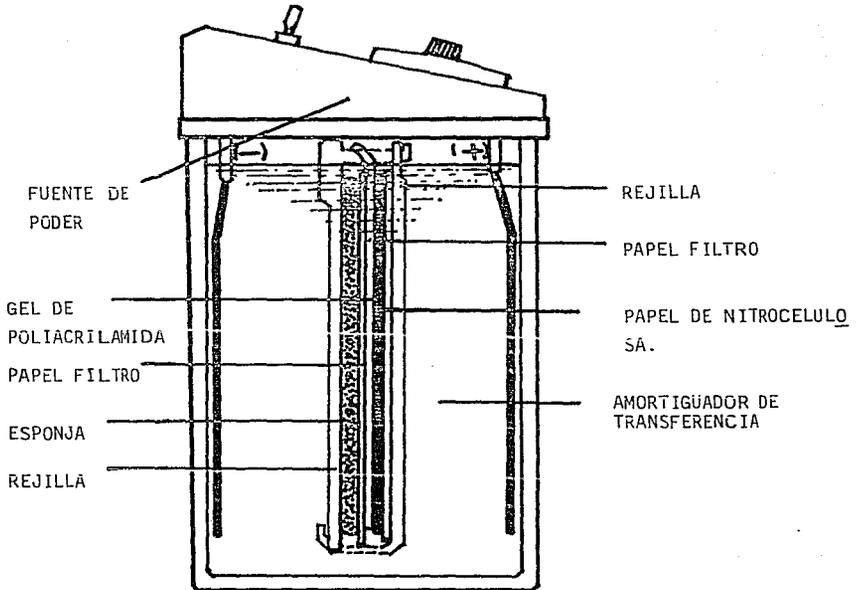
Después de que se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacri- lamida, éstos se sometieron a electrotransferencia según lo descrito por -- Towbin (41).

2.7.1. Colocación del gel y del papel de nitrocelulosa para la electrotrans- ferencia.

Para la electrotransferencia se utilizó un aparato LKB Transphorelec-- troblotting unit. Una vez equilibrado el gel y el papel de nitrocelulosa en el amortiguador de transferencia, el primero se depositó sobre uno de los - papeles filtro humedecido, que estaba a su vez sobre la esponja. Sobre el gel humedecido con el mismo amortiguador se deposita el papel de nitroce- lulosa, evitándose la formación de burbujas de aire entre ambos, después -- con un lápiz común se marcó el frente electroforético del gel y los límites del mismo (superior e inferior), así como también el tipo de muestras (ce- pas) que llevaba; sobre ambos se coloca otro papel filtro y esta unidad que da encerrada entre dos rejillas parte del equipo a manera de emparedado, y que logra mantener en contacto estrecho el gel y el papel sin perder nunca

de vista de que lado quedó el gel y de que lado el papel de nitrocelulosa (figura 6).

Figura 6. ELECTROTRANSFERENCIA



2.7.2. Corrimiento de la electrotransferencia

La unidad formada por el papel de nitrocelulosa y el gel entre las -- dos rejillas se introduce en la cuba que contiene el amortiguador de transferencia y la unidad refrigerante que forma parte del equipo; después se colocó la fuente de poder a manera de tapa de la cuba cuidando que el polo positivo quede del lado del papel y el polo negativo del lado del gel. La electrotransferencia se realizó a 250 miliamperes y 25 volts. El proceso se llevó un mínimo de 16 horas y un máximo de 18 horas. Después de ---- transcurrido este tiempo se saca la unidad formada por el gel y el papel , donde el gel se deja teñiendo en solución colorante para electroforesis durante una hora y el papel de nitrocelulosa se corta en dos partes una de las cuales se deja en solución de bloqueo durante al menos 2 horas; la parte restante se deja lavando en solución de PBS- Tween, para después teñirla con tinta china.

2.7.3. Revelado del papel de nitrocelulosa con antisuero

Para comprobar que la electrotransferencia se ha llevado a cabo la tira de papel de nitrocelulosa, que se encuentra en PBS-tween se somete a tres lavados más con la misma solución, para después aplicarle la tinción con tinta china durante 2 a 4 horas.

Después de que la parte de papel de nitrocelulosa que se encontraba en la solución de bloqueo, permaneció allí al menos 2 horas, se somete a incubación con el antisuero durante tres horas a temperatura ambiente o toda la noche a 5°C, corriéndose controles adecuados. Transcurrido el tiempo se hacen 4 lavados de 10 minutos, con la solución de lavado, posterior a este paso se adiciona el conjugado anti-gama globulina humana o de conejo unida a peroxidasa y diluida 1:1000 en la solución de bloqueo, esto durante una hora y media, pasado este tiempo se hacen 4 lavados con agitación de 10 minutos cada uno, los dos primeros con solución de lavado y los dos últimos con PBS pH 7.2. Finalmente se añade el sustrato que permanece en contacto con el papel durante 20 minutos, para después eliminarse con agua destilada.

2.8. OBTENCION DE ANTISUEROS

Se utilizaron 8 conejos Nueva Zelanda machos de 3 a 5 kg cada uno para llevar a cabo un esquema de inmunización ; previo a este esquema se sangraron todos los conejos (10 ml cada uno) por la vena marginal de la oreja para la obtención de suero preinmune.

Esquema de inmunización

-Día cero. Se inocularon 1 mg de proteínas de membrana externa (PME) en 1 ml de adyuvante completo de Freund (ACF) por la vía subcutánea, en 2 conejos por cada una de las siguientes cepas: S. typhi 9,12 d Vi, S. typhi Ty21a (germanier), S. typhi "0"901 y S. typhimurium.

-Día 7 y 14. Se repitió el mismo esquema del día cero.

-Día 21. Se inocularon 100 microgramos de PME en 0.1 ml de solución salina fisiológica estéril de cada cepa trabajada, por duplicado (en dos conejos) por la vena marginal de la oreja.

-Día 28. Se sangraron los conejos (20 ml) por la vena marginal de la oreja para la obtención de sueros inmunes anti-PME.

2.9. DOBLE INMUNODIFUSION

Se colocaron 5 ml de agarosa al 1.2% sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Después de solidificar se hicieron perforaciones : un pozo central y 6 pozos periféricos equidistantes del central 0.4 cm, en el pozo central se colocó en una placa el suero inmune y en la otra el suero preinmune respectivo, en los pozos periféricos de ambas placas se colocaron las PME de las siguientes cepas:

S. typhi 9,12 d Vi, S. typhi Ty2, S. typhi Ty21a, S. typhi "0" 901 y S. typhimurium.

Las placas permanecieron a temperatura ambiente durante 24 horas posteriormente se lavaron con solución salina fisiológica durante dos días y un día más con agua destilada. Después de los lavados las placas se secan y se tiñeron con azul de Coomassie Brillante, durante 3 a 5 minutos. Finalmente las placas se decoloraron con la solución decolorante hasta la aparición de las bandas de precipitación.

RESULTADOS

1) AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

En el cuadro IV se muestran los resultados del contenido de proteína y de lipopolisacárido presente en las preparaciones de proteínas de membrana externa de cada una de las cepas estudiadas.

Cuadro IV . CONTENIDO DE PROTEINA Y LIPOPOLISACARIDO (como KDO).

CEPA	PROTEINA mg/ml *	ml totales	KDO mg/ml **	% KDO/prot.
<u>S. typhi Ty2</u>	1.02	86	0.012	1.0
<u>S. typhi 9,12 d Vi</u>	1.0	86	0.012	1.0
<u>S. typhi "0"901</u>	1.48	86	0.012	0.85
<u>S. typhi Ty21a</u>	1.16	86	0.04	3.0
<u>S. typhimurium</u>	1.24	86	0.06	5.4
<u>E. coli Hb</u>	0.56	66	0.002	0.3
<u>E. coli 358</u>	1.0	86	0.004	0.6
<u>E. coli K12</u>	1.04	86	0.015	1.4

* Determinado por el método de Lowry (39).

** Determinado por el método de KDO (40).

2) ELECTROFORESIS VERTICAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las figuras 7 y 8 muestran los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida de las proteínas de membrana externa de cada una de las cepas estudiadas; se observa que sus pesos moleculares en todos los casos -- van desde 17 kD a 70 kD y de acuerdo a la intensidad de las bandas en el -- gel distinguimos tanto proteínas mayores como proteínas menores. Entre las cepas de *Salmonella* estudiadas hay similitudes, principalmente entre las -- proteínas mayores con pesos moleculares de 36 kD a 41 kD, de 23 a 28 kD y -- de alrededor de 17 kD (figuras 7 y 8, carriles 2 al 6), en cambio entre las cepas de *E. coli* estudiadas solamente existe similitud en una proteína de 36-37 kD y otra de 17 kD (figuras 7 y 8 carriles 8 al 10). En el cua-- dro V se muestran los pesos moleculares de las proteínas mayores de cada -- una de las cepas.

Figura 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

- Carril no. 1.- Marcadores de peso molecular (albúmina sérica bovina 66kD, albúmina de huevo 45 kD, anhidrasa carbónica , 29 kD y lisozima 14 kD)
- no 2.- S. typhi 9,12 d Vi
- no 3.- S. typhi "0" 901
- no 4.- S. typhi Tyž
- no 5.- S. typhi Ty2ia
- no 6.- S. typhimurium
- no 7.- Marcadores de peso molecular
- no 8.- E. coli Hb
- no 9.- E. coli 358
- no 10.- E. coli K12

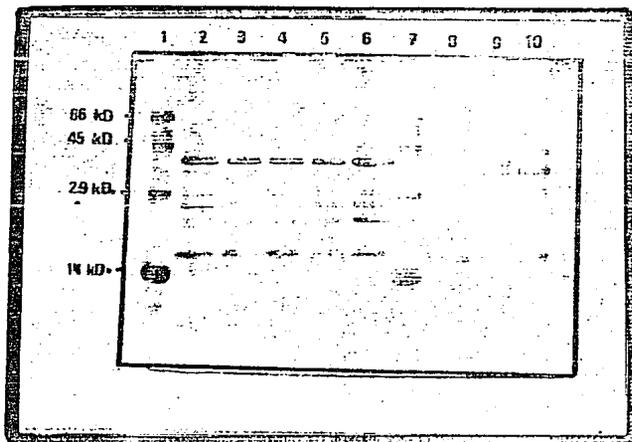
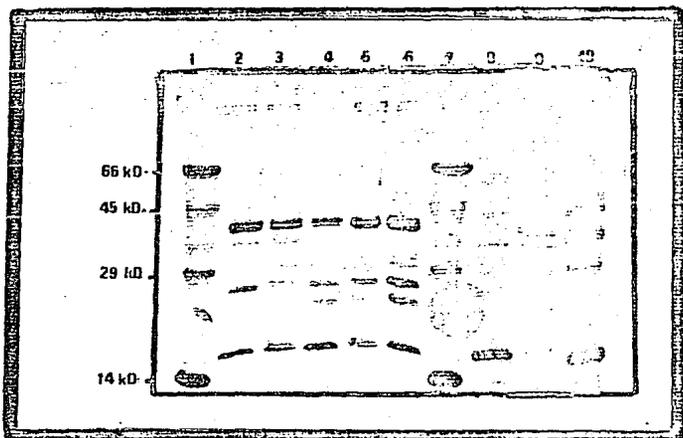


Figura 8. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

- Carril no 1.- Marcadores de peso molecular
 no 2.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 3.- S. typhi "0" 901
 no 4.- S. typhi Ty2
 no 5.- S. typhi Ty21a
 no 6.- S. typhimurium
 no 7.- Marcadores de peso molecular
 no 8.- E. coli Hb
 no 9.- E. coli 358
 no 10.- E. coli K12



Cuadro V. PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS MAYORES DE LAS CEPAS TRABAJADAS DE ACUERDO A SU CORRIMIENTO ELECTROFORETICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA

CEPA	<u>S. typhi</u> 9,12 d Vi	<u>S. typhi</u> "0" 901	<u>S. typhi</u> Ty2	<u>S. typhi</u> Ty21a	<u>S. typhimurium</u>
No. de bandas proteicas principales	7	6	5	7	7
Pesos mol. aproximados de mayor a menor en kD	41.5 40.0 36.7 28.2 27.2 22.0 17.0	41.5 40.0 36.7 28.2 27.0 17.0	41.5 40.0 29.2 23.2 17.0	41.5 40.0 30.6 28.5 23.0 22.1 17.0	41.5 40.0 31.0 29.5 28.0 23.5 17.0

CEPA	<u>E. coli Hb</u>	<u>E. coli 358</u>	<u>E. coli K12</u>
No de bandas proteicas principales	2	4	4
Pesos mol. aproximados de mayor a menor en kD	36.7 17.0	40.0 37.0 23.5 17.0	45.0 37.7 31.0 17.0

3) DOBLE INMUNODIFUSION

La figura 9-I (parte superior) muestra los resultados de la reacción entre el suero anti-proteínas de membrana externa de S. typhi 9,12 d Vi y las proteínas de membrana externa (PME) de las diferentes muestras de ---- Salmonella; se destaca la banda de precipitación de identidad total con -- las PME de S. typhi "O" 901, S. typhi Ty21a y S. typhimurium y de identidad parcial con S. typhi Ty2, mientras que el suero anti-PME de S. typhi"O"901 presenta identidad total con todas las cepas de Salmonella estudiadas (figura 9-II); resultados similares se obtuvieron con sueros anti-PME de ---- S. typhi Ty21a y anti-PME de S. typhimurium (figura 10-III y IV); los sueros preinmunes en todos los casos fueron negativos (figuras 9-I, 9-II, 10-III y 10-IV en su parte inferior).

El cuadro VI resume las observaciones de estos resultados por doble inmunodifusión.

Figura 9 (partes I y II). DOBLE INMUNODIFUSION DE LAS PME DE LAS CEPAS DE SALMONELLA ESTUDIADAS Y LOS SUEROS DE CONEJO INMUNES Y PREINMUNES CONTRA PME DE S. typhi 9,12 d Vi y S. typhi "0" 901.

Placa I (parte superior) Pozo no 1.- PME de S. typhi 9,12 d Vi

2.- PME de S. typhi "0" 901

3.- PME de S. typhi Ty2

4.- PME de S. typhi Ty2ia

5.- PME de S. typhimurium

6.- Solución salina fisiológica

Pozo central: Suero anti-PME S. typhi 9,12

Placa I (parte inferior). Pozos del 1 al 6 igual que la placa I sup.

Pozo central : suero preimmune

Placa II (parte superior) Pozos del 1 al 6 igual que la placa I sup.

Pozo central: Suero anti-PME S. typhi "0"901

Placa II (parte inferior) Pozos del 1 al 6 igual que placa I superior

Pozo central: suero preimmune.

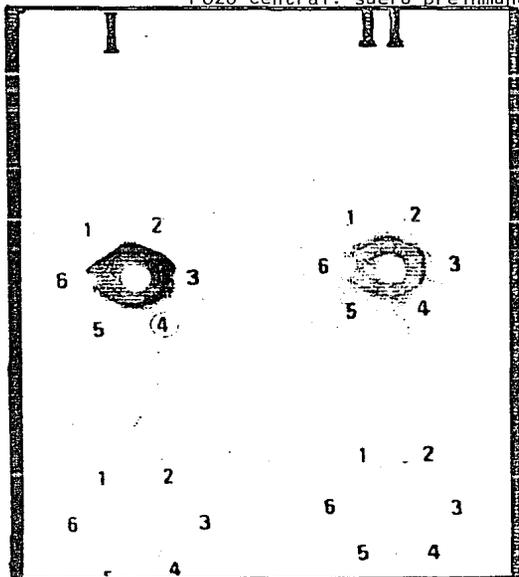


Figura 10 (parte III y IV). DOBLE INMUNODIFUSION DE LAS PME DE LAS CEPAS DE SALMONELLA ESTUDIADAS Y LOS SUEROS DE CONEJO INMUNES Y PREINMUNES CONTRA PME DE S. typhi Ty21a y S. typhimurium.

Placa III (parte superior) Pozo no 1.- PME de S. typhi 9,12 d Vi

Pozo no 2.- PME de S. typhi "0" 901

Pozo no 3.- PME de S. typhi Ty2

Pozo no 4.- PME de S. typhi Ty21a

Pozo no 5.- PME de S. typhimurium

Pozo no 6.- Solución salina fisiológica.

Pozo central: suero anti-PME S. typhi Ty21a

Placa III (parte inferior) Pozos del 1 al 6 igual que la placa III sup.

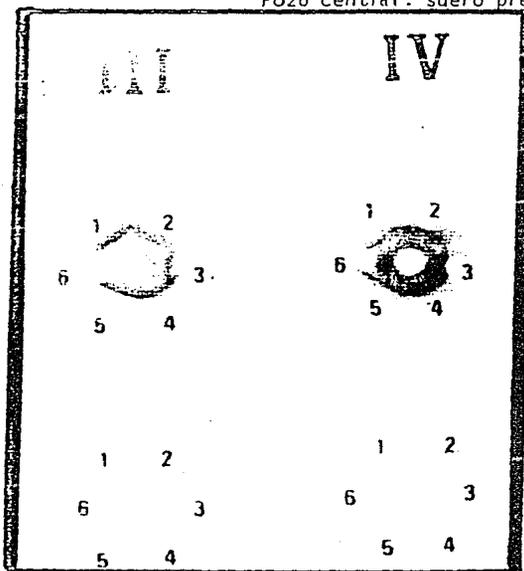
Pozo central: suero preinmune

Placa IV (parte superior) Pozos del 1 al 6 igual que la placa III sup.

Pozo central: suero anti-PME S. typhimurium

Placa IV (parte inferior) Pozos del 1 al 6 igual que placa III superior

Pozo central: suero preinmune.



CUADRO VI. REACCIONES DE PRECIPITACION EN GEL DE AGAROSA ENTRE LAS PME DE LAS CEPAS DE Salmonella ESTUDIADAS Y LOS SUEROS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS CONTRA LAS MISMAS.

ANTISUEROS	PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA				
	<u>S. typhi</u> 9,12 d Vi	<u>S. typhi</u> "0" 901	<u>S. typhi</u> Ty2	<u>S. typhi</u> Ty21a	<u>S. typhi</u> murium
<u>S. typhi</u> 9,12 d Vi	IT	IT	IP	IT	IT
<u>S. typhi</u> "0" 901	IT	IT	IT	IT	IT
<u>S. typhi</u> Ty21a	IT	IT	IP	IT	IT
<u>S. typhimurium</u>	IT	IT	IT	IT	IT

IT = Identidad total

IP = Identidad parcial

4) INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Sueros de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea, reconocen principalmente proteínas de membrana externa con pesos moleculares de 36 a 41 kD y de 17 kD en las cinco cepas de Salmonella (figura 11) y prácticamente no reconocen ninguna de las PME de las E. coli estudiadas (figura 12), por otra parte, los sueros de conejo anti-proteínas de membrana externa de S. typhi 9,12 d Vi , S. typhi "0" 901 y S. typhimurium , reconocen en los tres casos, principalmente a las PME de 36 a 41 kD , así como a la de 17 kD (figuras 13 y 14), tampoco se reconocieron las PME de las cepas de E. coli estudiadas y transferidas a papel de nitrocelulosa.

Figura 11. ELECTROTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA DE LAS PME DE LAS CEPAS DE SALMONELLA ESTUDIADAS, REVELADAS CON SUEROS DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE FIEBRE TIFOIDEA.

Carril no 1.- S. typhimurium

no 2.- S. typhi Ty21a

no 3.- S. typhi Ty2

no 4.- S. typhi "O" 901

no 5.- S. typhi 9,12 d Vi

no 6.- 10: Las mismas cepas que están en los carriles del 1 al 5.

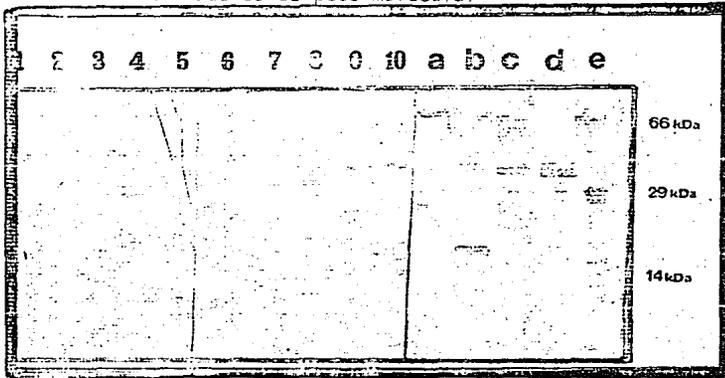
Carril a.- S. typhimurium

b.- S. typhi Ty21a

c.- S. typhi Ty2

d.- S. typhi 9,12 d Vi

e.- Marcadores de peso molecular



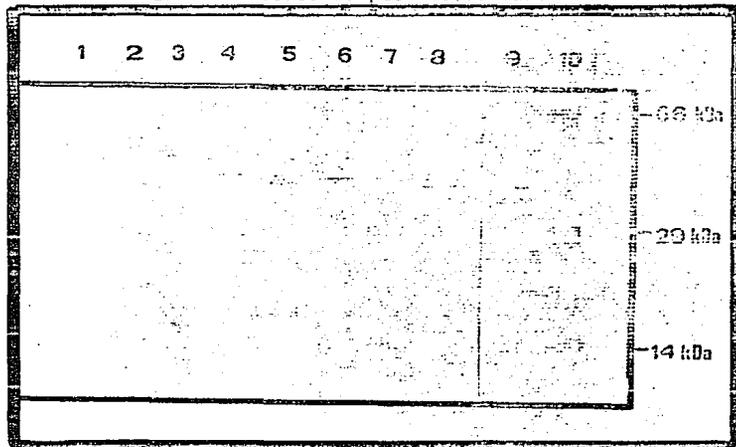
-Carriles del no. 1 al 5 revelados con suero de paciente con diagnóstico de fiebre tifoidea.

-Carriles del no. 6 al no. 10 revelados con suero de paciente con diagnóstico de fiebre tifoidea, diluido 1:50.

-Carriles del "a" al "e" teñidos con tinta china.

Figura 12. ELECTROTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA DE LAS PME DE TODAS LAS CEPAS ESTUDIADAS, REVELADAS CON SUERO DE PACIENTE CON DIAGNOSTICO DE FIEBRE TIFOIDEA.

- Carril no 1.- E. coli K12
 no 2.- E. coli 358
 no 3.- E. coli Hb
 no 4.- S. typhimurium
 no 5.- S. typhi Ty21a
 no 6.- S. typhi Ty2
 no 7.- S. typhi "0" 901
 no 8.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 9.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 10.- Marcadores de peso molecular.

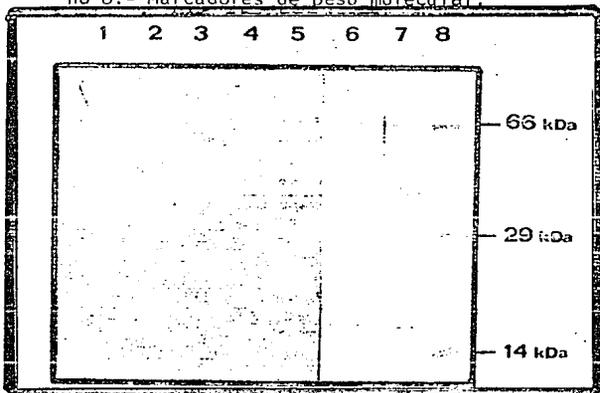


-Carriles del no. 1 al 8 revelados con suero de paciente con diagnóstico de fiebre tifoidea diluido 1:50;

-Carriles no 9 y no 10 teñido con tinta china.

Figura 13. ELECTROTRANSFERENCIA A PÁPEL DE NITROCELULOSA DE LAS PME DE LAS CEPAS DE SALMONELLA ESTUDIADAS, REVELADA CON SUERO DE CONEJO ANTI-PME DE S. typhi 9,12 d Vi

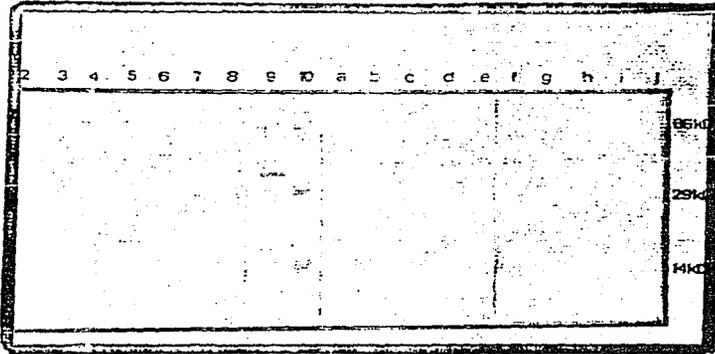
- Carril no 1.- S. typhimurium
 no 2.- S. typhi Ty21a
 no 3.- S. typhi Ty2
 no 4.- S. typhi "0" 901
 no 5.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 6.- S. typhi"0" 901
 no 7.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 8.- Marcadores de peso molecular.



- Carriles del no 1 al 5, revelados con suero de conejo anti-PME de ----
 S. typhi 9,12 d Vi, diluido 1:5.
 -Carriles del no 6 al no 8 teñidos con tinta china.

Figura 14. ELECTROTRANSFERENCIA A PAPEL DE NITROCELULOSA DE TODAS LAS CEPAS TRABAJADAS, REVELADA CON SUERO DE CONEJO ANTI-PME.

- Carril no 1.- E. coli Hb
 no 2.- E. coli 358
 no 3.- E. coli K12
 no 4.- S. typhimurium
 no 5.- S. typhi Ty21a
 no 6.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 7.- S. typhi "0" 901
 no 8.- S. typhi Ty2
 no 9.- S. typhi 9,12 d Vi
 no 10. Marcadores de peso molecular.
- Carril a y f.- S. typhimurium
 b y g.- S. typhi Ty21a
 c y h.- S. typhi Ty2
 d e i.- S. typhi "0" 901
 e y j.- S. typhi 9,12 d Vi'.



-Carriles del 1 al 8 revelados con suero de conejo anti-PME de S. typhi 9,12 d Vi, diluido 1:20.

-Carriles 9 y 10 teñidos con tinta china.

-Carriles del a al e revelados con suero de Conejo anti-PME de S. typhi "0" 901 diluido 1:20.

-Carriles del f al j revelados con suero de conejo anti-PME de S. typhimurium diluido 1:20.

DISCUSION

La composición y expresión de las proteínas de membranas externa --- (PME) de las bacterias gram-negativas está regulada entre otros factores - por las condiciones de cultivo (4), por tal motivo se emplearon las mismas condiciones para cultivar tanto las cepas de Salmonella como las de E. coli esto hizo posible obtener aproximadamente 10^8 bacterias por mililitro en la fase de crecimiento logarítmico en todos los casos, por lo que la cantidad de PME aislado fue semejante entre todas las cepas trabajadas (excepto E. coli Hb).

De las PME aisladas de Salmonella typhi (cuatro diferentes cepas) -- así como de S. typhimurium destaca un grupo de tres proteínas principales con los pesos moleculares de 36 kD a 41 kD. Estas proteínas por su tamaño se tratan de las proteínas formadoras de canales o pozos (4,7); sin embargo, será necesario confirmar por otros métodos su peso molecular ya que -- el obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida es ligeramente - superior al reportado por otros autores (11), quienes para las porinas de S. typhimurium han encontrado que son de 36 kD a 38 kD! Además se deberá - determinar otras características fisiocoquímicas tales como punto isoeléctrico, hidrofobicidad, capacidad de formar poros in vitro, etc. Por otro - lado, el medio de cultivo empleado solamente permitió que se expresaran co mo proteínas principales a tres de las cuatro porinas de S. typhimurium -- ello se debe a que la proteína phoE sólo se expresa en condiciones limitadas de fosfato inorgánico (11); por lo que será necesario cultivar S. typhi en dichas condiciones para determinar si es capaz de sintetizar esa - porina. Es importante hacer notar que a pesar de haber obtenido concentra ciones semejantes de proteína entre las cepas de E. coli (Hb, 358 y K12) de éstas únicamente se aisló una proteína que correspondería a las porinas de 37 kD, este resultado no coincide con los encontrados para E. coli ---- (B/r) de donde se han aislado tres porinas (8). Diferentes factores tales como los nutrientes del medio de cultivo o bien la carga genética de las - bacterias , probablemente influyeron en la expresión de porinas en estas - cepas de E. coli.

Otro grupo de proteínas principales presente únicamente en las cepas de Salmonella, lo constituyen aquellas con pesos moleculares de 23 kD a 28 kD, sugiriendo ser específicas de la tribu Salmonella. En contraste -- con este hecho, se encuentra una proteína de 17 kD, la cual está presente en ambos grupos de bacterias, sugiriendo ser común para la familia de -- Enterobacterias, sin embargo deberá ampliarse el grupo de análisis para - confirmar estas observaciones.

La presencia de lipopolisacárido en todas las preparaciones de PME -- obedece, en primer término, a que se trata del principal componente de la membrana externa (ocupando el 45% de la superficie bacteriana) y en segundo lugar, a que algunas PME necesitan unirse de manera no covalente al lipopolisacárido para llevar a cabo sus funciones biológicas (2).

Los resultados de las reacciones antígeno-anticuerpo apoyan la ---- existencia de proteínas específicas de cepa visto esto como una banda de precipitación con identidad parcial al hacer reaccionar en doble inmunodifusión sueros de conejo anti-PME con las PME de las cinco cepas de Salmonella, también observamos una banda de precipitación de identidad total a las proteínas comunes de especie. Empleando el método de inmunotransfe-- rencia se puso de manifiesto que las proteínas específicas de especie parecen ser las porinas, ya que son éstas las reconocidas principalmente por -- sueros de pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea, además estos sue-- ros también contienen anticuerpos que reconocen la proteína de 17 kD tanto de Salmonella como de E. coli. Es necesario hacer notar que el lipopolisacárido presente no influye en la reactividad entre las PME y los anticuerpos específicos contra éstas, ya que sueros de conejos anti-PME absorbidos con lipopolisacárido conservan su reactividad contra las proteínas.

El cruce antigénico entre las porinas de S. typhi y S. typhimurium -- plantea la probable similitud en más de un 50% en sus secuencias de aminoácidos debido esto a un posible origen ancestral común, o bien, que en la superficie bacteriana se localicen tanto regiones homólogas para las porinas de ambas cepas como regiones particulares de cada proteína. Por otro -- lado, la presencia de anticuerpos específicos contra las porinas de las -- cepas vacunales de S. typhi en sueros de paciente con fiebre tifoidea sugieren la probable participación de los componentes proteicos de la mem---

brana externa en la inducción de inmunidad protectora contra esta enfermedad; sin embargo, será necesario su purificación para estudiar su papel como inmunógenos en la fiebre tifoidea.

CONCLUSIONES

- 1) Las proteínas de membrana externa se S. typhi y S. typhimurium tienen pesos moleculares que van de 17 kD a 70 kD . Destaca un grupo de tres proteínas principales con pesos moleculares de 36 kD a 41 kD. las cuales se tratan de las porinas descritas en otras bacterias gram-negativas.
- 2) Las porinas de S. typhi 9,12 d Vi (aislada de paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea) y de S. typhi de cepas vacu- nales, tienen el mismo peso molecular en geles de poliacrilamida.
- 3) Las porinas de S. typhi 9,12 d Vi y las de cepas vacu- nales de la mis- ma son antigenicamente similares.
- 4) Sueros de paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea presentan anticuerpos específicos contra las porinas de S. typhi.

RESUMEN

Las proteínas de membrana externa (PME) de S. typhi "O" 901, S. typhi Ty2, S. typhi Ty21a, así como S. typhimurium se aislaron por el método de Schnaitman, con el objeto de caracterizarlas y compararlas entre ellas así como con las PME de S. typhi 9,12 d Vi, las cuales tienen pesos moleculares que van desde 70 kD hasta 14 kD y son capaces de inducir protección en el modelo de ratón a un reto con la misma bacteria (32).

Los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida de las PME de las cinco cepas estudiadas de Salmonella mostraron similitudes importantes en un grupo de proteínas con pesos moleculares que iban desde 36 kD a 41 kD, así como proteínas de 28 kD y en una proteína única muy cercana a los 17 kD. Estos mismos grupos de proteínas fueron reconocidos tanto por sueros de pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea, como por sueros de conejo inmunizados con las PME a través de la inmunotransferencia. Además, existen reacciones cruzadas entre las cepas estudiadas, visto esto ya sea por inmunotransferencia como por precipitación en gel (doble inmunodifusión).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood. Principles of microbiology and Immunology. A Hasper International Edition. New -- York, N.Y. , 1978.
- 2.- Nikaido, H. and M. Vaara. Molecular basis of Bacterial Outer Membrane --- Permeability. Microbiol. Rev. 1985. 49: 1-32.
- 3.- Nikaido, H. and T. Nakae. The Outer membrane of Gram Negative Bacteria. Adv. Microb.. Physiol. 1979. 20: 163-250.
- 4.- Osborn, M.J. and H.C.P. Wu. Protein of the Outer Membrane of Gram Negative Bacteria. Ana. Rev. Microbiol. 1980. 34: 369-422.
- 5.- Miura, T. and S. Mizushima . Separation by Density Gradient Centrifugation of Two Types of Membranes from Spheroplast Membrane of Escherichia coli K-12. Biochim Biophys. Acta. 1968. 150: 159-161.
- 6.- Miura, T. and S. Mizushima. Separation and Properties of Outer and Cytoplasmatic Membranes in E. coli. Biochim. Biophys. Acta. 1969. 193: 268-276.
- 7.- Schnaitman, C.A. Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of Escherichia coli by Triton X-100. J. Bacteriol. 1971. 108: 545-552.
- 8.- Schnaitman, C.A. Comparison of the Envelope Protein Composition of Several Gram Negative Bacteria. J. Bacteriol. 1970. 104: 1405-1409.
- 9.- Schnaitman, C.A. Outer Membrane Protein of E. coli III. Evidents that Major Protein of E. Coli III. Outer Membrane Constle of Four Distinct Polipeptide Species. J. Bacteriol. 1974. 118: 442-452.
- 10.- Isibasi, A., E. Ca Iva., V. Ortiz, . Vacunas contra la Fiebre Tifoidea a partir de Antigenos de Membrana Externa. Unidad de Investigación Biomédica; IMSS: Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología UNAM. 1985.
- 11.- Lugtenberg, B. and L. Van Aiphen. Molecular Architecture and Functioning of the Outer Membrane of Escherichia coli and other Gram Negative Bacteria. Biochim Biophys. Acta. 1983. 737: 51-115.

- 12.- Nakae, T. Outer Membrane of Salmonella isolation of Protein Complex - that Produces Transmembrane Channels. J. Biol. Chem. 1976. 251: 2176-2178.
- 13.- Decad, C.M. and H. Nikaido. Outer Membrane of Gram Negative Bacteria. XII. Molecular -Sieving Function of Cell Wall. J. Bacteriol. 1976. 128: -- 325-336.
- 14.- Nakae, T.J. Ishii, M. Tokunga. Subunit Structure of Functional Porin Oligomers that Form Permeability Channels in the Outer Membrane of E. coli. J. Biol. Chem. 1979. 254: 1457-1467.
- 15.- Pava, E. Tanei, P. Westermann. Arrangement of Protein I in E. coli. Outer Membrane Proteins Cross-Linking Study. J. Bacteriol. 1979. 133: 279-286.
- 16.- Nakamura, K., and S. Mizushima. Effects of Heating Dodecyl Sulfate -- Solution on the Conformation and Electrophoretic Mobility of Isolated Major Outer Membrane Proteins from Escherichia coli K-12. J. Biochem. 1976. 80: 1411-1422.
- 17.- Nikaido, H., E.Y. Rosenberg. Effect. of solute size on Diffusion rate through the Transmembrane pores of the Outer Membrane of Escherichia coli. J. Gen. Physiol. 1981. 77: 121-135.
- 18.- Van Alphen. W. R. Van Boxter., N.. Van Selm and B. Lugtenberg. Pores - in the outer Membrane of Escherichia coli K-12. Involvement of Proteins b - and c in the Permeation of Cephaloridine and Ampicilin. FEMS. Microbiol. Lett. 1978. 3: 103- 116.
- 19.- Van Alphen, W., N. Van Selm., B. Lugtenberg. Pores in the Outer Mem-- brane of Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 1978. 159: 75-83.
- 20.- Nikaido, H., M. Luchey and E.Y. Rosenberg. Non Specific Diffusion Cha nels in the Outer Membrane of E. coli. J. Supramol. Struct. 1980. ----- 13: 305-313.
- 21.- Schnaitman, C.A. Outer Membrane Proteins of Escherichia coli. I. Effe- ct of Preparative Conditions on the Migration of Proteins in Polyacrylamide Gels. Arch. Biochem. Biophys. 1973. 157: 541-552.
- 22.- Kamio, Y. and H. Nikaido. Outer Membrane of S. typhimurium. Identifica- tion of Proteins Exposed in Cell Surface. Biochim Biophys. Acta. 1977. 464: 589-601.
- 23.- Chen, R., W. Schmidmarr, C. Kramer., U. Chenschmeisser and U. Henning.

- Primary Structure of Major Outer Membrane Protein II+ (OmpA protein) of --
Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980. 77: 4592-4596.
- 24.- Sonntag, T., H. Schwarz., Y. Hirota and U. Henning. Cell Envelope --
and Shape of Escherichia coli: Multiple Mutants Missing the Outer Membrane
Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins. J. Bacteriol. 1978. --
136: 280-285.
- 25.- Weinbaum, G., Kadis, S., S.J. Ajl. Microbial Toxins. Volume IV. Bac-
terial Endotoxins. Chapter 4. Academic Press Inc. 1971. New York.
- 26.- De Martini, M. and M. Inouye. Interaction Between Two Major Outer --
Membrane Proteins of Escherichia coli: The Matrix Protein and the Lipopro-
tein. J. Bacteriol. 1978. 133: 328-335.
- 27.- Hall, M.N. and T.J. Silhavy. Transcriptional Regulation of Escheri-
chia coli K-12. Major Outer Membrane Protein I_b. J. Bacteriol. 1979. -----
140: 342-330.
- 28.- Van Alphen, L., B. Lugtenberg., R. Van Boxtel., A.M. Hack., C. Ver-
hoef and L. Herekes. I_{eo} A is the Structural Gene of Outer Membrane Pro-
tein C. of Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 1974. 169: 147-155.
- 29.- Galanos, C., and O. Ludertz. Electrodialysis of Lipopolysaccharides -
and their Conversion to Uniform Salt Forms. Furi. J. Biochem. 1975. 54: -
603-610.
- 30.- Jawest, E. Manual of Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno. No-
vena Edición. México. D.F. 1981. Cap. 1.
- 31.- Buchanan, T.M.W., A. Pearce., D.N. Shoolnik and R.J. Archo. Sectum IV
Genithourinir. Tract Disease in Humans. Etiology Agents and Antigens. --
J. infect. Dis. 1977' 136: 132-137.
- 32.- Kussi, N., M. Murrininer., H. Saxen., V. Matt. Outer Membrane Proteins
in Experimental Salmonellosis of Mice. Infect. Immun. 1979. 251: 857-862.
- 33.- Hernández, R.M., A. Isibasi., J. Kumate. Resumen del IV Congreso Na-
cional de Inmunología. 1982. Oaxtepec, Morelos. México.
- 34.- Isibasi, A., E. Calva., V. Ortiz, M. Fernández. Abstract VI Interna-
tional Congress of Immunology. Toronto, Canadá.
- 35.- González Saldaña, N. A.M. Torales. D.C. Barreda. Infectología Clí-
nica. Ed. Trillas. 1a. Edición. México, 1984. Cap. 6.
- 36.- Germanfer, R. Situación Actual de la Inmunización contra la Fiebre Ti-

foidea. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, Abril 1977.

- 37.- Pérez Miravette, A., R. Cabrera. Medidas Preventivas Empleadas en -- Infección Tifoidica. Salud Pública de México, Epoca V, Volumen XV, No. 2 Marzo- Abril 1974.
- 38.- Cowan, S.T. y J. Steel, Manual para la Identificación de Bacterias - de Importancia Médica. 2a. Edición, E, Cía. Editoria! Continental. S.A. - de C.V. México, 22 D.F. 1982.
- 39.- Lowry, O.H. N.J. Rosebrough., A.L. Farr. Protein Measurement with - the Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951. 193: 265-275.
- 40.- Karhanis, Y.O. , J.Y. Zelther, J.J. Jackson., D.J. Carlo. A New Im-- proved Microassay to Determine 2-keto-3-deoxy-octonate in Lipopolysacharide in Gram - Negative Bacteria. Anal. Biochem. 1978. 85: 595-601.
- 41.- Towbin, H., T. Stachelin and J. Gordon. Electrophoretic Transfer of Proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and Some Applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979. 75.