



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

“IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Pet Y Pic DE  
*Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA EN  
AISLADOS DE PACIENTES MEDIANTE EL USO DE  
ANTICUERPOS MONOCLONALES”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ  
CAMACHO**

ASESOR: DR. JORGE MATEO VILLASECA FLORES

COASESORA: Q.F.B. OLGA MATA RUIZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015.



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Identificación de proteínas Pet y Pic de *Escherichia coli* enteroagregativa en aislados de pacientes mediante el uso de anticuerpos monoclonales**

Que presenta el pasante: **Luis Fernando Hernández Camacho**

Con número de cuenta: **305135184** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de abril de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>VOCAL</b>	Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Verónica Ruiz Solorio	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

**Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bacterias Patógenas, ubicado en el sexto piso, edificio A, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Jorge M. Villaseca, en colaboración con la Q.F.B. Olga Mata Ruíz del Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud.**

*Yo acostumbraba a decir: “Espero que las cosas cambien.” Luego aprendí que la única forma de que cambien las cosas es cuando yo cambie.*

*No podemos permitirnos gastar la mayor cantidad de tiempo en cosas sin importancia y dejar poco tiempo para las cosas más importantes.*

*Jim Rohn*

## **DEDICATORIA**

Dios, gracias por permitirme llegar a la cumbre de este largo y hermoso camino, por todos los errores y aciertos que me guiaron a través de este trayecto y por poner a todas esas grandes personas que hoy forman, formaron y formarán parte de mi vida.

A mi mamá Juana Camacho, que con su gran fortaleza, cariño y enseñanzas, me dio ánimos para continuar siempre en pie de lucha y nunca rendirme a pesar de las adversidades.

A mi papá Felipe Hernández, por haber creído en mí, por su apoyo, comprensión y dedicación, en formar a este hombre de bien.

A mis hermanos Karina Hernández y Diego Hernández, que con grandes regaños y enseñanzas me hicieron ver los errores que tuve, los aciertos que obtuve y los nuevos caminos a los que nos enfrentaremos.

A mis grandes amigos de la FES Cuautitlán (San, María, Marisol, Chispa, Sara, Ruth, Yanis, Nina, Yesis, Alayde, Liz, Mau, Gabo, Rene, Toño, Bladimir, Alonso, Samuel, Panes, Zeta, Incomodo, Fuerza, Edgar, Omar, Chester, Vago, Joda, Pollo, Tronco) que sin ellos el camino hubiera sido insípido, inodoro e incoloro.

A todas aquellas personas que no mencione, pero en algún momento formaron parte de esta travesía.

La dedicatoria más especial es para todas aquellas personas que no creyeron en mí, que me dieron más que ánimos para continuar y demostrarme a mí mismo, que a pesar de los tropiezos siempre hay un nuevo día, en el que se pueden llegar a alcanzar esas pequeñas metas y con ellas construir un gran triunfo.

“La vida es cruel y desgraciada, pero esa sólo es una opción”

Luis Fernando Hernández Camacho

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al **Dr. Jorge M. Villaseca** por todo el conocimiento académico y por el proyecto del cual fui partícipe y sobre todo, por los grandes conocimientos y experiencias personales.

A la **Maestra Olga Mata** por compartir sus conocimientos dentro del área, que me guiaron durante este largo proceso. También debo agradecer su paciencia, comprensión y dedicación que no sólo fue profesional si no personal.

A la **Maestra Yolanda Medina** por haberme permitido ser parte de su gran familia llamada “Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales”.

A la pequeña pero gran familia del Laboratorio de Anticuerpos monoclonales, entre ellos, la **Maestra Edith Medina**, La **Doctora Anabelle Manzo**, al **señor Mario Valdivia** por su conocimiento y aportación en este proyecto.

A la **Auxiliar Técnico Patricia Moreno Durán**, por su colaboración y apoyo técnico en la obtención y purificación de proteínas.

Al **M. en C. Armando Navarro Ocaña**, Jefe del Cepario de la Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo en el cultivo y conservación de cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Al **Dr. Juan José García García**, del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, por el apoyo en el análisis estadístico de los resultados y por sus comentarios y sugerencias para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio, que no solo hicieron posible este proyecto, también me ayudaron en mi formación profesional y personal; **Marisol, Amanda, Conny, Alonso, Arnulfo, Mariela, Alejandra y Karen**.

Al personal del **Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos**, al laboratorio de Biología Molecular por las prácticas profesionales, a los laboratorios de medios de cultivo y leptospirosis por el servicio social, que están formando parte de mi formación profesional.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por abrirme las puertas desde el bachillerato y formarme como un profesional con grandes valores.

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, por las grandes lecciones académicas y personales, que me demostraron que no importa la escuela, si no el alumno.

# ÍNDICE

Dedicatoria.	ii
Agradecimientos.	iii
Índice.	iv
Índice de cuadros, figuras y gráficos.	vi
Abreviaturas.	vii
Resumen.	ix
1. Introducción.	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> generalidades.	1
1.1.1. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).	6
1.1.2. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).	6
1.1.3. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).	6
1.1.4. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).	7
1.1.5. <i>E. coli</i> de adherente difusa (DAEC).	7
1.1.6. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).	8
1.2. Serina Proteasa Autotransportadora de <i>Enterobacteriaceae</i> (SPATE).	8
1.2.1 Toxina Pet.	9
1.2.2 Toxina Pic.	9
1.3 Anticuerpos Monoclonales.	10
1.3.1 Características generales de los anticuerpos.	10
1.3.2 Obtención de anticuerpos monoclonales.	12
1.3.3 Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales.	13
2. Justificación.	14
3. Objetivos.	14
3.1 Objetivo General.	14
3.2 Objetivos Particulares.	15
4. Hipótesis.	15

5. Materiales y Métodos.	15
5.1 Crecimiento de clonas celulares productoras de los anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic.	15
5.2 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic.	16
5.2.1 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-Pic por cromatografía de absorción tiofílica (Columna Hi-trap IgM).	16
5.2.2 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-Pet por columna de Sefarosa Proteína A CL4B.	17
5.3 Selección y crecimiento de las cepas de aislados de pacientes basado en el patrón de adherencia característico de <i>E. coli</i> .	17
5.4 Purificación de toxinas Pet y Pic de clonas de <i>E. coli</i> hiperproductoras y de cepas EAEC provenientes de muestras clínicas.	18
5.5 Identificación de las toxinas Pet y Pic por inmunoensayos con anticuerpos monoclonales.	19
5.5.1 ELISA indirecto.	19
5.5.2 Inmunoelectrotransferencia.	20
5.5.2.1 Electroforesis.	21
5.5.2.1.1 Tinción de Coomasie.	21
5.5.2.2 Inmunoelectrotransferencia.	21
5.5.2.3 Revelado inmunoenzimático.	22
5.5.2.4 Análisis estadístico.	22
6. Resultados.	22
6.1 Proteínas Pet y Pic.	22
6.2 Anticuerpos monoclonales.	23
6.3 Muestras de <i>E. coli</i> enteroagregativa a partir de aislados de pacientes.	28
6.4 Inmunoensayos.	29
6.5 Análisis estadístico.	30
7. Discusión.	31
8. Conclusiones.	36
9. Referencias.	37

## Índice de cuadros.

Cuadro 1.	Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> .	2
Cuadro 2.	Serotipos y serogrupos más comunes de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea.	4
Cuadro 3.	País de origen de las muestras clínicas donadas por el Cepario del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.	28
Cuadro 4.	Relación del número de cepas con adherencia agregativa y las características clínicas de los pacientes.	28
Cuadro 5.	Resultado de la prueba de ELISA que muestra el número de cepas con adherencia agregativa en donde se detectaron las toxinas Pet y Pic.	29
Cuadro 6.	Resultados de la prueba de inmunoelectrotransferencia que muestra el número de cepas con adherencia agregativa en donde se detectaron las toxinas Pet y Pic.	30

## Índice de figuras.

Figura 1.	Colonias de <i>Escherichia coli</i> .	2
Figura 2.	Patrones de adherencia de <i>E. coli</i> en células epiteliales HEp-2.	5
Figura 3.	Daño celular causado por la toxina Pet de EAEC.	10
Figura 4.	Principales regiones de los anticuerpos monoclonales.	11
Figura 5.	Obtención de anticuerpos monoclonales.	13
Figura 6.	Electroforesis de las toxinas Pet y Pic.	23
Figura 7.	Inmunoelectrotransferencia de las toxinas Pet y Pic.	24

## Índice de gráficos.

Gráfico 1.	Evaluación de la producción de anticuerpos monoclonales por ELISA indirecto.	24
Gráfico 2.	Reconocimiento de anticuerpos anti-Pet y anti-Pic.	25
Gráfico 3.	Identificación de subclases de inmunoglobulinas de los anticuerpos anti-Pic y anti-Pet por ELISA.	26
Gráfico 4.	Concentración de antígeno contra anticuerpo anti-Pet.	27
Gráfico 5.	Concentración de antígeno contra anticuerpo anti-Pic.	27

## Abreviaturas.

µg o ug	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
AA	Adherencia agregativa
CFA	Factores de colonización de antígenos
CT	Región Carboxilo terminal Constante
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
DA	Adherencia difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherente difusa
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
Fab	Fragmento que se une al antígeno
Fc	Fragmento cristizable
H	Antígeno Flagelar
HEp-2	Línea celular del tipo epitelial derivada de carcinoma de laringe
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
Hrs	Horas
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
Ig D	Inmunoglobulina D
Ig E	Inmunoglobulina E
Ig G	Inmunoglobulina G
Ig M	Inmunoglobulina M
K	Antígeno capsular
kDa	Kilo Daltones
LA	Adherencia localizada

LT	Toxina termolábil
M	Molar
MEM	Medio Mínimo Esencial
MDa	Mega Daltones
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
NC	Nitrocelulosa
Nm	Nanómetros
O	Antígeno somático
PCC5	Anticuerpo anti-Pic 52F7F7C5
PCG7	Anticuerpo anti-Pic 52F7F7G7
PCB2	Anticuerpo anti-Pic 52F7E7B2
Pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
Pet	Toxina codificada por plásmido
pH	Potencial de Hidrógeno
Pic	Proteína involucrada en la colonización intestinal
PTD4	Anticuerpo anti-Pet PT2F8G5D4
PTF7	Anticuerpo anti-Pet PT2F8G5F7
PTD8	Anticuerpo anti-Pet PT2F8G5D8
RPMI-1640	Medio de cultivo para células linfoides desarrollado por el Instituto Roswell Parque Memorial
SAT	Toxina Autotransportadora Secretada
SFB	Suero Fetal Bovino
SPATEs	Serina Proteasas Autotransportadoras de <i>Enterobacteriaceae</i>
ST	Toxina termoestable
STX	Toxina parecida a Shiga
TSA	Agar Soya Trypticaseina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
V	Región Amino terminal Variable
VH	Cadena pesada

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) es un agente etiológico de infecciones gastrointestinales y afecta de manera importante a la población infantil de países en vías de desarrollo. La patogénesis de EAEC está mediada por la producción de serina proteasas autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs) y dentro de este grupo de autotransportadores se encuentra la proteína involucrada en la colonización intestinal (Pic) y la toxina codificada en plásmido (Pet). En este trabajo se detectó la producción de Pet y Pic en cepas EAEC aisladas de muestras clínicas, utilizando anticuerpos monoclonales.

A partir del sobrenadante de los cultivos de los hibridomas PTF7 y PCG7 se obtuvieron los anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic, de manera respectiva, y se purificaron por cromatografía de afinidad. Mediante las técnicas de ELISA e inmunoelectrotransferencia se determinó la presencia de las toxinas Pet y Pic en los sobrenadantes de los cultivos de 75 cepas EAEC aisladas de pacientes. Seis cepas fueron aisladas de pacientes asintomáticos y 69 cepas correspondieron a pacientes con diferentes manifestaciones de diarrea: 5 de diarrea persistente con sangre, 29 de diarrea aguda, 19 de diarrea con sangre y 16 de diarrea indeterminada. Por ELISA se detectaron: 52 para Pet, 72 para Pic y 52 para la conjunción Pet-Pic. Por inmunoelectrotransferencia se detectaron: 43 para Pet, 20 para Pic y 12 para la conjunción Pet-Pic.

Se analizaron las posibles asociaciones entre la presencia de estas proteasas y el cuadro diarreico, para lo cual se aplicó la prueba exacta de Fisher bilateral con una significancia estadística de 0.05.

Los resultados mostraron que existe una asociación significativa cuando se detecta la toxina Pet por la prueba de ELISA en diarrea persistente con sangre ( $p=0.0486$ ) y en diarrea indeterminada ( $p=0.0576$ ).

El análisis de la dependencia entre Pet y Pic, para el grupo de diarrea total, en los ensayos de ELISA e inmunoelectrotransferencia, mostraron que ambas toxinas actúan en conjunto ( $p<0.01$ ). Resultados significativos también se observaron para el grupo de diarrea aguda cuando se detectan por ELISA ( $p=0.0119$ ) e inmunoelectrotransferencia ( $p=0.034$ ). Para el grupo de diarrea con sangre por ELISA, mostró una  $p=0.0188$ . Los resultados sugieren que las toxinas Pet y Pic no actúan de manera independiente entre sí.

## INTRODUCCIÓN.

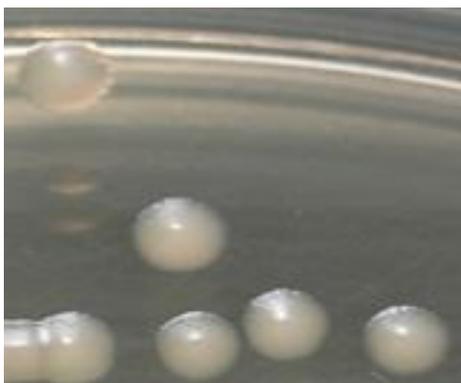
### 1.1 *Escherichia coli* generalidades.

*Escherichia coli* (*E. coli*) coloniza el intestino delgado y el colon del hombre pocas horas después del nacimiento y establece una relación simbiótica con el hospedero durante toda la vida. Sin embargo, la relevancia de dicha bacteria como agente etiológico de infecciones gastrointestinales, así como problemas en vías urinarias, sepsis y meningitis ha aumentado (Romero 2007, Navarro 2010, Fariñas 2013).

El género *Escherichia* se encuentra dentro del *Phylum Proteobacteria*, en la Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Enterobacteriales*, incluido en la Familia *Enterobacteriaceae*. *E. coli* es la especie prototipo del género *Escherichia* (Gibert, 2010) cuyas características generales son las siguientes:

- Pequeños bacilos Gram negativos de 0.3 a 1.0  $\mu\text{m}$  x 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ .
- Anaerobios facultativos.
- No forman esporas.
- Inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos.
- Los pili o fimbrias participan en la fijación de las células bacterianas a otras bacterias, células huésped y a los bacteriófagos.
- Tiene una sola cadena de ADN espiral.
- Con información genética en plásmidos que son responsables de la producción de toxinas y la resistencia a antimicrobianos (Joklink, 1997; Murray, 2005; Romero, 2007).

Esta bacteria se desarrolla bien en medios de cultivo simples, así como selectivos, sus colonias son medianas, circulares, convexas y con bordes redondeados (Murray, 2005).



**Figura 1.** Colonias de *Escherichia coli*, crecimiento en agar soya tripticaseina, incubado a 35°C en condiciones aerobias por 24 horas.

En el siguiente cuadro se muestran las principales propiedades bioquímicas de *E. coli*:

**Cuadro 1.** Identificación bioquímica de *Escherichia coli* (Rodríguez, 2002).

Prueba bioquímica	% de positividad
Catalasa 24 hrs	99
Oxidasa	0
Nitrato a nitrito	100
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H <sub>2</sub> S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36°C	95
Hidrólisis de gelatina a 22°C	0

KCN crecimiento	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de $\alpha$ -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
DNAsa a 25°C	0
ONPG	95

Las cepas diarreogénicas son una de las causas más importantes de diarrea aguda y persistente en niños de países en vías de desarrollo. Actualmente las *E. coli* diarreogénicas se han clasificado en seis patotipos o grupos patógenos en base a criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC),

adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC) (Nataro, 1998; Rodríguez, 2002; Cortés, 2002; Vidal, 2007).

*E. coli* puede ser recuperada fácilmente a partir de muestras clínicas, cultivada en medios simples o selectivos, a una temperatura de 37 ° C, bajo condiciones aerobias. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen se utiliza el esquema modificado de Kauffman, basado en sus antígenos; 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico (Nataro, 1998; Rodríguez, 2002).

**Cuadro 2.** Serotipos y serogrupos más comunes de *Escherichia coli* causantes de diarrea (Rodríguez, 2002).

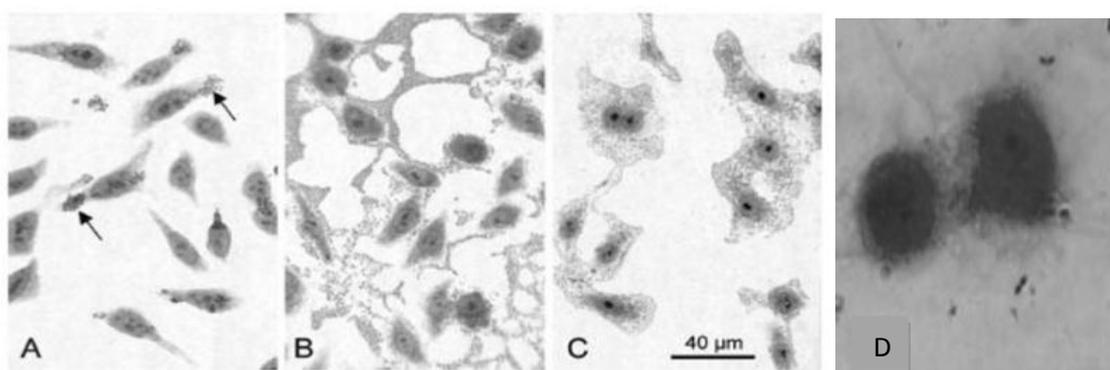
ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	EHEC
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:H1
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H2
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H20
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:HNT
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O2:H1
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H6
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H7
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H27
O27:H7	O144:H-	O111:H-	-	O4:H40
O27:H20	O152:H-	O111ab:H2	-	O5:H-
O80	O167:H5	O119:H6	-	O5:H16
O85:H7	-	O125ac:H21	-	O6:H-
O114:H21	-	O126:H-	-	O6:H1
O115:H21	-	O126:H2	-	O6:H29
O126:H9	-	O126:H27	-	O8:H-
O128ac:H27	-	O127:H21	-	O8:H14
O139	-	O128ab:H2	-	O8:H21
O148:H28	-	O128:H12	-	O9ab:H-

O149:H4	-	O142:H6	-	O11:H49
O149:H10	-	O158:H23	-	O14:H-
O153:H45	-	-	-	O15:H-
O159:H-	-	-	-	O15:H27
O159:H4	-	-	-	O16:H-
O159:H20	-	-	-	O16:H6
O166:H27	-	-	-	O17:H18

NT: No Tipificable.

H-: No identificado.

Uno de los ensayos fenotípicos más útiles para el diagnóstico de *E. coli* diarreogénica, es el ensayo de adherencia a células HEP-2 (línea celular del tipo epitelial derivada de carcinoma de laringe). Este ensayo fue descrito por primera vez en 1979 por Cravioto y cols. Esta prueba sigue siendo uno de los mejores métodos para el diagnóstico y diferenciación de los tres grupos diarreogénicos de *E. coli* adherentes (EPEC, EAEC, y DAEC). La adherencia localizada (LA) la presentan las cepas de EPEC mostrando una agrupación definida y localizada sobre las células HEP-2, la adherencia agregativa (AA) que se caracteriza por la agrupación en forma de ladrillos apilados sobre las células HEP-2 y la superficie del vidrio de preparación, la presentan las cepas EAEC y la adherencia difusa (DA) que no tiene una agrupación definida sobre las células HEP-2, es característica de las cepas DAEC. (Nataro 1998).



**Figura 2.** Patrones de adherencia de diferentes patotipos de *E. coli* en células epiteliales HEP-2. A. patrón de adherencia localizada de EPEC (muestra agrupaciones definidas de bacterias); B. Patrones de adherencia agregativa de EAEC (las bacterias se ordenan a manera de ladrillos apilados); C. Patrones de adherencia difusa de DAEC (agrupación indefinida de bacterias) y D. Sin adherencia. (Robins et al. 2002 y Riveros 2011).

### **1.1.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC).**

A mediados de la década de los cuarenta se identificaron en Inglaterra brotes de diarrea en niños de guarderías asociados a *E. coli*. La bacteria se llamó *E. coli* enteropatógena (EPEC), para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de la microbiota intestinal normal. EPEC tiene la propiedad de formar un patrón de adherencia localizada sobre la superficie de las células HEp-2 donde se observan microcolonias. Una de las principales características de la infección es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad. Además, es común que los niños infectados presenten vómito y fiebre. EPEC induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (adherencia y eliminación). La lesión se lleva a cabo mediante un factor de virulencia característico; pilus BFP (pilus formadores de haces), que promueve la adherencia íntima a enterocitos; posteriormente se produce la polimerización de la actina del citoesqueleto, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito “adherencia y esfacelamiento” (Cortés, 2002; Scaletsky, 2002; Vidal, 2007).

### **1.1.2 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).**

Produce lesiones similares a EPEC en el eritrocito (adherencia y esfacelamiento), además de sintetizar dos citotoxinas, que llevan el nombre de toxina semejante a la de Shiga I y II, (STX I y II), por su semejanza con las producidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1, que producen lisis celular. Se ha reportado que la estructura de estas toxinas es similar a la LT de las cepas ETEC y su mecanismo de acción se basa en la alteración de la síntesis proteínica. Además, poseen un plásmido de 90 pb que codifica para la enterohemolisina. Este plásmido se encuentra presente en todos los aislamientos clínicos de O157:H7 asociados con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. La producción de diarrea aguda y crónica en niños se debe a la acción de las toxinas y a la adherencia al enterocito por sus fimbrias (Cortés, 2002).

### **1.1.3 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).**

Se adquiere al igual que otros grupos patógenos de *E. coli*, por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de los pili

o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (Factores de colonización de antígenos). Su principal mecanismo de patogenicidad radica en la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST), estas toxinas aumentan el nivel intracelular de Adenocina-5'(AMPc) y Guanosina-5' monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente; que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción de las vellosidades, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea aguda acuosa principalmente en niños menores de 2 años, así como diarrea del viajero en adultos (Nataro, 1998; Rodríguez, 2002; Cortés, 2002).

#### **1.1.4 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).**

El mecanismo de patogenicidad es la invasividad que se inicia con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino grueso, seguida por la entrada a la célula a través de una fagocitosis, lo que afecta el borde de cepillo del enterocito. Ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas; la destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfonucleares y macrófagos, desencadenan el proceso de inflamación y la aparición de diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella*. En este mecanismo están implicados un plásmido de alto peso molecular (120-140 MDa) y genes de invasión en el genóforo bacteriano, que codifican y regulan todo el proceso invasivo (Cortés, 2002).

#### **1.1.5 *E. coli* de adherencia difusa (DAEC).**

Los serogrupos predominantes son O75, O15 y O126. Afecta principalmente a preescolares, niños pequeños y lactantes, los cuales presentan un cuadro clínico de diarrea aguda, sin sangre ni leucocitos. No se conocen el período de incubación, ni otras manifestaciones. Su diagnóstico consiste en un estudio coprocitológico; cultivo, aislamiento e identificación de DAEC y estudios de adherencia en células HEp-2. (González, 2013).

### **1.1.6 *E. coli* enteroagregativa (EAEC).**

Scaletsky y Nataro aislaron cepas de *E. coli* que no correspondían al grupo EPEC mediante serología, pero si presentaban un patrón característico de adherencia, además eran negativas a la prueba de factor de adherencia de EPEC. En estudios posteriores se encontró un nuevo fenotipo de adherencia, en donde las bacterias se adhieren a la superficie de las células HEP-2 en cultivo y a la superficie del vidrio de la preparación, en forma de ladrillos apilados, que ha sido nombrada adherencia agregativa (AA). El fenotipo agregativo se encuentra directamente relacionado con la presencia de un plásmido de 65 MDa. Ambas propiedades se utilizan como pruebas de referencia para el diagnóstico de EAEC. El sitio blanco de daño de EAEC es la mucosa del intestino delgado y grueso, e inducen la producción y secreción de moco en donde las bacterias se autoaglutinan, formando una biopelícula sobre el epitelio intestinal. La producción de moco está relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea (Rodríguez, 2002; Bellini 2005).

Cuando los individuos ingieren la bacteria, en agua y alimentos contaminados, el periodo de incubación para causar los primeros síntomas es de al menos ocho horas y las manifestaciones clínicas pueden durar de 18 o 20 días. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. (Rodríguez, 2002; Villaseca, 2002; Bellini, 2005).

### **1.2 Serina Proteasa Autotransportadora de *Enterobacteriaceae* (SPATE).**

La patogénesis de EAEC también está mediada por la producción de proteínas tóxicas de alto peso molecular, que son exportadas al medio a través del sistema de secreción tipo V. Estas proteínas pertenecen a la subfamilia de las Serina Proteasas Autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs). Dentro de este grupo de proteínas se encuentran la toxina Pet “Toxina codificada por plásmido”, la toxina Pic “Proteína involucrada en la colonización intestinal” y la toxina Sat “Toxina Autotransportadora Secretada”. Las proteínas Pet y Pic, se han identificado en cepas EAEC aisladas de niños que murieron de diarrea persistente. Además, de manera experimental, estas proteínas al ser probadas en el modelo de asa ligada de intestino de

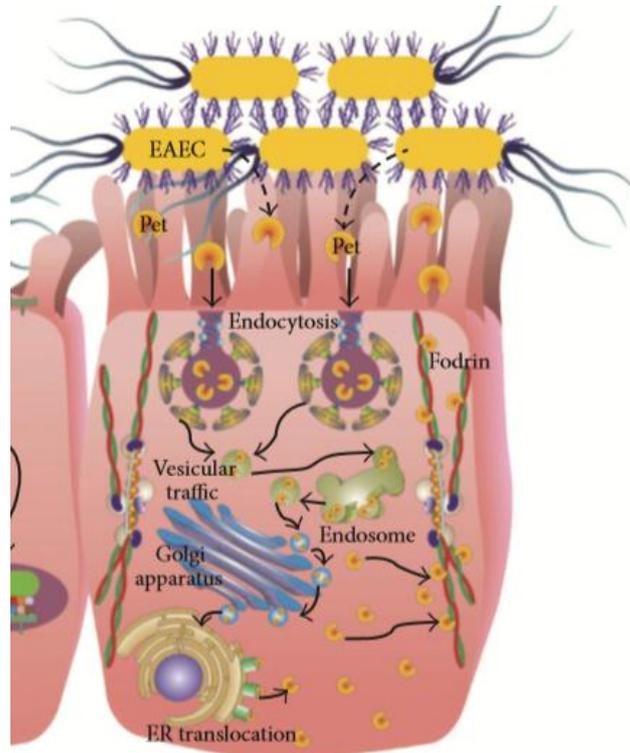
rata, producen acortamiento de las vellosidades intestinales, hemorragia y necrosis de la mucosa intestinal. (Rodríguez, 2002; Cortés, 2002; Bellini 2005, Villaseca, 2005).

### **1.2.1 Toxina Pet.**

La información genética de la proteína Pet se encuentra codificada en un plásmido de 65 MDa, el cual regula la adherencia agregativa (AA) de la bacteria. El precursor de Pet recién sintetizado en el citoplasma bacteriano tiene un peso molecular de 146.5 kDa que madura extracelularmente adquiriendo un peso molecular de 104 a 108 kDa. Esta proteína al ser analizada en ensayos de toxicidad en células HEP-2, produce un efecto citopático, caracterizado por el redondeo y desprendimiento de las células, así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En un estudio realizado por Villaseca y cols se demostró que Pet produce degradación de espectrina y fodrina (espectrina no eritroide). Esta proteína se encuentra en un 10 y 50 % de las cepas EAEC, dependiendo de la región del estudio realizado. (Rodríguez, 2002; Cortés, 2002; Bellini 2005, Villaseca, 2005).

### **1.2.2 Toxina Pic.**

La toxina Pic esta codificada por el gen *pic/she* en una isla de patogenicidad llamada SHI-1, localizada en el cromosoma bacteriano de EAEC. El precursor de Pic tiene un peso molecular 146.5 kDa y la proteína madura extracelular tiene un peso molecular entre 110 a 116 kDa. Pic induce secreción intestinal, aumenta el AMPc/GMPc y atrapa al grupo Hem de los eritrocitos, la actividad proteolítica de Pic se caracteriza por tener como sustrato a la pepsina, espectrina y muscina, lo que le confiere una ventaja en los procesos de colonización. Esta proteína se encuentra presente en un 40% de las cepas EAEC. (Henderson, 1999; Rodríguez, 2002; Cortés, 2002; Bellini 2005, Villaseca, 2005).



**Figura 3.** Daño celular causado por la toxina Pet de EAEC (Navarro 2013). EAEC al colonizar los enterocitos libera una serie de toxinas entre ellas “Pet”, que ingresa a la célula por endocitosis produciendo un efecto citopático y contracción del citoesqueleto por degradación de fodrina.

### 1.3 Anticuerpos Monoclonales.

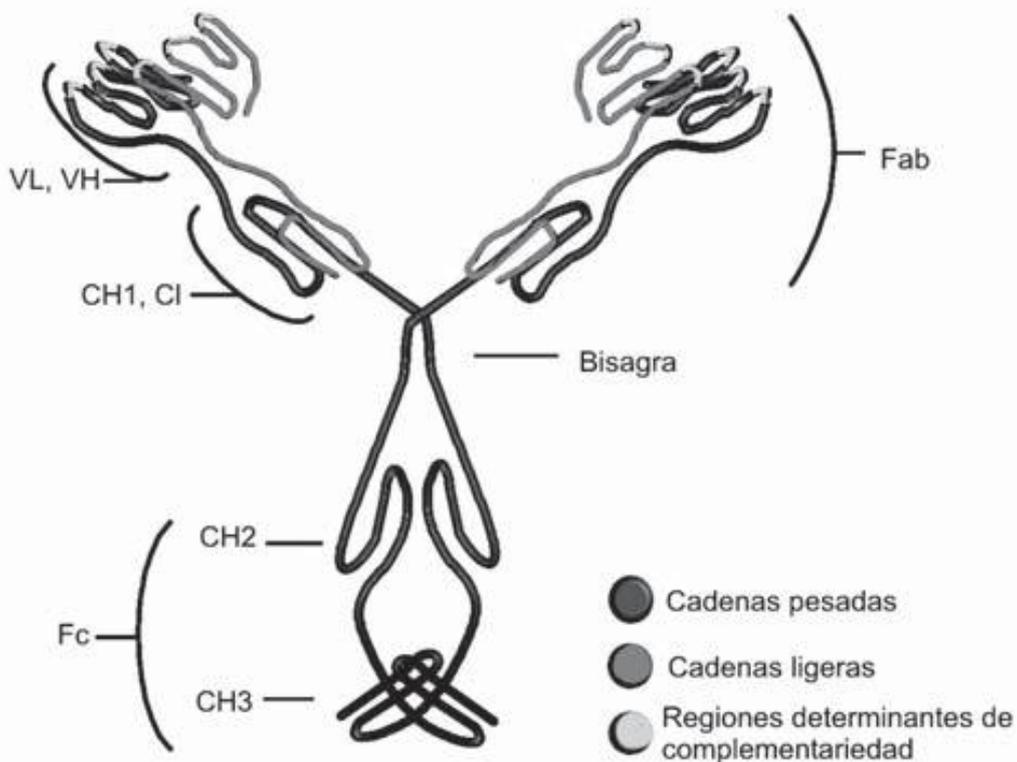
#### 1.3.1 Características generales de los anticuerpos.

Los anticuerpos también denominados inmunoglobulinas, son glucoproteínas solubles especializadas producidas por animales vertebrados, que forman parte del sistema inmune adaptativo; son producidos por los linfocitos B (Machado, 2006; Gavilondo, 1995).

Los anticuerpos poseen una estructura básica simétrica compuesta por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (cadenas H), de peso molecular entre 55 y 70 kDa, unidas entre sí por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (cadena L) de 25 kDa, igualmente idénticas entre si y que se unen individualmente a una de las cadenas

pesadas por interacciones covalentes y no covalentes. También poseen unidades repetidas o dominios de aproximadamente 110 aminoácidos. Dentro de cada dominio hay un puente disulfuro intracatenario, esencial para el correcto plegamiento y la función de la proteína (Machado, 2006; Álvarez, 2004).

Existen dos tipos de cadenas ligeras denominadas kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ) y cinco tipos de cadenas pesadas mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ) que dan lugar a las 5 clases de inmunoglobulinas existentes, IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas se componen de regiones aminoterminales variables (V) y de regiones carboxiterminales constantes (CT). La región V de la cadena pesada consta de un dominio de inmunoglobulina (VH), y la región C de la cadena pesada consta de tres o cuatro dominios (CH1, CH2, CH3, CH4). La región V de la cadena ligera tiene un dominio de inmunoglobulina (VL) y la región C de la cadena ligera tiene un único dominio (CL) (Machado, 2006; Álvarez, 2004).



**Figura 4.** Principales regiones de los anticuerpos monoclonales (Machado 2006).

La molécula de inmunoglobulina presenta tres regiones unidas mediante un fragmento polipeptídico flexible denominado región de bisagra, de modo que adquiere una formación semejante a una Y, cada brazo de la Y (región Fab) está formado por el

apareamiento de una cadena ligera con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada. El tallo de la Y (región Fc) está formado por la asociación de los otros dominios CH de ambas cadenas pesadas. Los puentes disulfuro que unen ambas cadenas se forman a nivel de la región bisagra. Ésta confiere una gran flexibilidad de la molécula y le permite unirse a distintos tipos de antígenos (Machado, 2006; Álvarez, 2004).

La molécula de anticuerpo tiene dos sitios de unión al antígeno, de la misma especificidad, localizados en la región variable. Los dominios aminoterminales de ambas cadenas H y L (regiones V) presentan una gran variabilidad secuencial entre diferentes inmunoglobulinas y determinan su especificidad antigénica. El centro de unión con el antígeno está formado por tres segmentos peptídicos no colineales pertenecientes al dominio V de la cadena pesada (VH) y tres de la cadena ligera (VL), que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátopo) donde se aloja la región del antígeno reconocida por el anticuerpo (epítopo) (Machado, 2006; Goding, 1993).

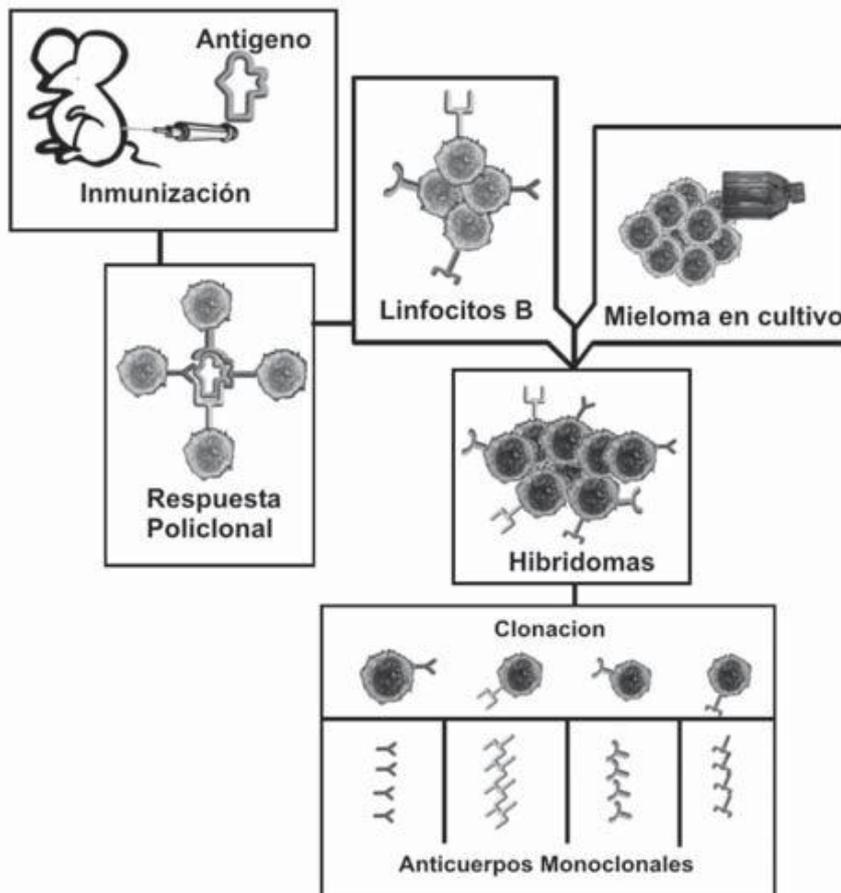
La respuesta inmunológica específica se desarrolla cuando un organismo ha sido expuesto a uno o varios antígenos, originando una respuesta policlonal, es decir, la producción de anticuerpos contra un rango amplio de estructuras presentes en los antígenos. Por el contrario, la respuesta monoclonal se da por la selección de un solo linfocito B activado, que produce un anticuerpo para un determinante antigénico (Machado, 2006; Goding, 1993).

### **1.3.2 Obtención de anticuerpos monoclonales.**

La producción de anticuerpos monoclonales se estableció con la tecnología creada en 1975 por Georges Köhler y César Milstein, que consistía en la generación de una línea celular estable, secretora de un isotipo determinado de inmunoglobulina contra un antígeno específico, fruto de la fusión de dos células diferentes, linfocitos B y mielomas, por medios químicos y físicos (polietilenglicol-centrifugación). (Machado, 2006; Gavilondo, 1995).

La primera célula involucrada es un linfocito B de un animal previamente inmunizado con el antígeno de interés, que aporta la memoria inmunológica y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico. La segunda es una célula tumoral de

mieloma no secretora de anticuerpos, deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), útil en el proceso de selección posterior de los hibridomas, que aporta su capacidad de división ilimitada (inmortalidad). De esta unión surge un tipo de célula inmortal con la capacidad virtualmente ilimitada de producción de anticuerpos monoclonales, llamada “hibridoma” (Machado, 2006; Gavilondo 1995).



**Figura 5.** Obtención de anticuerpos monoclonales (Machado 2006).

### 1.3.3 Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales.

La propiedad de los anticuerpos de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permite su utilización como herramientas esenciales en investigación biomédica y clínica, por lo que se han utilizado para (Álvarez, 2004):

- Detectar y cuantificar niveles de expresión de genes.
- Identificación de marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular en particular.

- Inmunodiagnóstico.
- El diagnóstico de enfermedades infecciosas y sistémicas.
- Permitir la detección de antígenos y anticuerpos específicos en la circulación o tejidos.
- Marcadores específicos para el diagnóstico por imágenes.
- Diagnóstico y tratamiento de tumores específicos.
- Análisis funcionales de moléculas de la superficie celular o de proteínas secretorias.
- En la investigación inmunológica, son una herramienta invaluable para definir la función de moléculas.

Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales son prácticamente ilimitadas no sólo en los estudios funcionales sino, también, en la selección de posibles blancos terapéuticos y de candidatos para vacunas. Las técnicas de biología molecular e ingeniería genética han ampliado el horizonte de la generación de los anticuerpos monoclonales y sus usos (Álvarez, 2004; Machado, 2006).

## **2. Justificación.**

La importancia clínica y epidemiológica de EAEC está ampliamente demostrada. La patogenicidad de esta bacteria se asocia con diferentes factores de virulencia principalmente toxinas de excreción.

La identificación de las toxinas de excreción Pet y Pic utilizando anticuerpos monoclonales podría ayudar a asociar la presencia de EAEC con el cuadro clínico característico.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo General.**

Identificar las proteínas Pet y Pic de EAEC en aislados de pacientes mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

### **3.2 Objetivos Particulares.**

**3.2.1** Purificar las proteínas Pet y Pic recombinantes a partir del sobrenadante del cultivo de las clonas hiperproductoras de *E. coli* CEFN1 y p56, respectivamente.

**3.2.2** Obtener las proteínas de secreción totales de cepas EAEC aisladas de pacientes, a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos.

**3.2.3** Obtener anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic a partir de los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas productores de inmunoglobulinas.

**3.2.4** Purificar los anticuerpos monoclonales por cromatografía de afinidad.

**3.2.5** Detectar las toxinas Pet y Pic en las proteínas de secreción de las cepas EAEC provenientes de pacientes con los anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic por ELISA e inmunoelectrotransferencia.

**3.2.6** Correlacionar la presencia de las proteínas Pet y Pic con el cuadro clínico del paciente, aplicando la prueba exacta de Fisher bilateral.

### **4. Hipótesis.**

EAEC produce diarrea por medio de las toxinas Pet y Pic, por lo que su identificación en cepas aisladas de pacientes utilizando anticuerpos monoclonales, permitirá hacer una asociación con el cuadro clínico.

### **5. Materiales y Métodos.**

#### **5.1 Crecimiento de clonas celulares productoras de los anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic.**

Se descongelaron 3 clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-Pic; (anti-Pic 52F7F7C5 [PCC5], anti-Pic 52F7F7G7 [PCG7] y anti-Pic 52F7E7B2 [PCB2]), las cuales fueron producidas y parcialmente caracterizadas (García 2009), también se descongelaron 3 clonas anti-Pet; (anti-Pet PT2F8G5D4 [PTD4] anti-Pet PT2F8G5F7 [PTF7] y anti-Pet PT2F8G5D8 [PTD8]) producidas en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dichas clonas se mantuvieron en cultivo *in vitro* utilizando medio de cultivo RPMI 1640, complementado con suero fetal bovino del 8 al 10%. De las clonas que se adaptaron a la vida *in vitro* se recolectó el sobrenadante

de cultivo. La evaluación de la producción de anticuerpos monoclonales se realizó por medio de un ELISA Indirecto (ver punto 5.5.1).

## **5.2 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic.**

Se eligieron dos clonas celulares, que produjeran anticuerpos monoclonales contra las toxinas (Pet y Pic), las de mejor adaptación a la vida *in vitro* y alta producción de anticuerpos monoclonales, fueron escaladas, para obtener un litro del sobrenadante de medio de cultivo que las contenía. El sistema Amicón de Milipore con un poro de 10 kDa se utilizó para concentrar diez veces dicho sobrenadante. La eliminación de residuos del medio de cultivo, se realizó por una diálisis con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) y una membrana de diálisis con un corte de peso molecular de 6 a 8 kDa, la solución amortiguadora se cambió cada 20 minutos hasta completar una hora de diálisis con agitación continua a temperatura ambiente. Terminado el dializado se purificaron los anticuerpos monoclonales como a continuación se describe.

### **5.2.1 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-Pic por cromatografía de absorción tiofílica (Columna Hi trap IgM).**

La purificación de los anticuerpos anti-Pic se realizó mediante una columna Hi trap IgM de General Electric. Para lavar la columna se pasaron 5 mL de solución amortiguadora de unión, seguido de 5 mL de solución amortiguadora de elución y 5 mL de solución amortiguadora de regeneración, sin ejercer una presión externa al sistema, los siguientes procesos se realizaron en las mismas condiciones.

La columna se regeneró cuando se lavó con 5 mL de solución amortiguadora de unión. La obtención de los anticuerpos monoclonales se realizó, pasando 8 mL del dializado por la columna “Hi trap IgM”, donde los anticuerpos se retuvieron, la eliminación de proteínas diferentes de las inmunoglobulinas se realizó con 15 mL de solución amortiguadora de unión. La elución de los anticuerpos de interés se realizó con 12 mL de solución amortiguadora de elución, recolectando cada mililitro en tubos eppendorf con capacidad de 2 mL. La determinación de la concentración proteínica se realizó mediante el reactivo de Bradford de BioRad. Una vez recolectados los anticuerpos, se regeneró la columna con 7 mL de solución amortiguadora de regeneración y 5 mL de solución amortiguadora de unión, reequilibrando así la fase estacionaria. Los tubos que contenían una alta

concentración proteínica se mezclaron y dializaron, utilizando una membrana de diálisis, con un corte de peso molecular de 6 a 8 kDa, contra PBS, por 60 minutos, con cambios de PBS cada 20 min. Terminado el tiempo de dializado se determinó la concentración proteínica y se almacenaron a -70°C hasta ser utilizados.

### **5.2.2 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-Pet por columna de Sefarosa Proteína A CL4B.**

La purificación de los anticuerpos anti-Pet, se realizó por cromatografía de afinidad utilizando como fase solida; Sefarosa Proteína A (Protein A Sepharose) CL4B. El sobrenadante de cultivo recuperado se pasó por una columna de Sefarosa donde los anticuerpos monoclonales se unieron a la Proteína A, para eliminar los componentes que no interactuaban con la columna se utilizaron 50 mL de PBS (0.1M pH 7.5), la elución de los anticuerpos purificados se realizó con 10 mL de glicina (0.1M pH 2.5). Cada mililitro fue recuperado en diferentes tubos de ensaye a los cuales se les cuantificó la concentración proteínica mediante un espectrofotómetro a 280 nm. Los tubos con una alta concentración proteínica se dializaron con PBS durante 60 min con 3 cambios, uno cada 20 min para eliminar la glicina, la concentración proteínica se determinó mediante el reactivo de Bradford de BioRad. Los anticuerpos se fraccionaron y almacenaron a -70°C, hasta ser utilizados.

La pureza de cada anticuerpo monoclonal se determinó por electroforesis en condiciones reductoras, tiñendo con Azul de Coomassie y su actividad mediante ELISA Indirecto (ver punto 5.5.1).

### **5.3 Selección y crecimiento de las cepas de aislados de pacientes basado en el patrón de adherencia de *E. coli*.**

Las cepas provenientes de pacientes, que presentaban un cuadro diarrea por infección de EAEC, fueron proporcionadas por el Cepario del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina (UNAM). El patrón de adherencia se determinado de la siguiente forma:

Se prepararon monocapas de células HEp-2 en lentes de vidrio contenidas en placas de 24 pozos. Las células se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con suero fetal bovino al 12% con un 90% de humedad, en presencia

de una mezcla de CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> (5%:20%; [v/v]); a una temperatura de 37°C. Previo al ensayo se lavó la monocapa con PBS pH 7.4 e incubaron con 1% (p/v) de D-manosa en MEM libre de suero fetal y antibióticos. Las cepas bacterianas crecieron en caldo peptonado al 2%, con 1% de D-manosa e incubaron a 37°C durante toda la noche. Se inocularon con este cultivo las monocapas de células HEp-2. Las placas se incubaron durante 3 horas, posteriormente se lavaron con PBS y fijaron con metanol. La tinción se hizo con colorante de Giemsa. Por último, se montaron las lentes en un portaobjetos con resina y observaron al microscopio. Las cepas de *E. coli* se consideraron con adherencia agregativa, cuando el 40% de las células presentaron una agrupación en forma de tabiques apilados, característica del patotipo enteroagregativo de *E. coli*.

#### **5.4 Purificación de toxinas Pet y Pic de clonas de *E. coli* hiperproductoras y de cepas EAEC provenientes de muestras clínicas.**

La purificación de toxinas Pet y Pic controles se obtuvieron del sobrenadante de los cultivos de la clonas hiperproductoras HB101 CEFN1 y HB101 p56, de manera respectiva. También se utilizó la cepa K12 de *E. coli*, bacteria no patógena que no produce SPATEs. Los sobrenadantes del cultivo de las cepas anteriores se precipitaron con sulfato de amonio hasta la saturación al 75%, se dializaron contra PBS 0.01 M pH 8.2, hasta eliminar totalmente la sal. Solo los dializados que contenían las toxinas Pet y Pic se precipitaron con amortiguador de fosfatos de potasio K1/K2, de donde se obtuvo el sobrenadante de la precipitación a 1.15 M. De igual modo esta fracción se dializó contra amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M pH 8.2, para eliminar el exceso de sal. Por último se pasaron por una columna de Q-Sepharose. En donde las proteínas se eluyeron en el primer pico del perfil cromatográfico, utilizando amortiguador Tris-HCl 0.05M /EDTA 2Na 0.01M pH 8.0. Finalmente, las proteínas se estabilizaron al adicionarles glicerol a una concentración final del 50% (v/v) para su conservación y se guardaron a -20°C, hasta su uso.

Las cepas donadas por la Facultad de Medicina se conservaban en medio gelosa especial, a partir de estas muestras se inocularon tubos de ensayo con 5 mL de caldo Luria e incubaron por 18 horas a 37°C. Cada muestra que presentó crecimiento, se inoculó en matraces con 200 mL de caldo Luria, incubándolos en baño maría a

37°C por 18 horas con agitación constante. Una vez pasado el tiempo de incubación las bacterias fueron separadas del sobrenadante a través de unidades de filtración con un poro de 0.22µm, al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio, hasta obtener una solución saturada del 75%, dicha mezcla se mantuvo a una temperatura de 4°C durante 24 horas para precipitar las proteínas. La solución saturada se centrifugó a 754.65 gravedades, durante 15 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió y dializó en una solución amortiguadora de fosfato de sodio (0.07 M pH 8.2) con una membrana de diálisis con un corte de peso molecular de 6 a 8 kDa, el dializado se llevó a cabo durante 3 días con un cambio de solución amortiguadora cada 12 horas. Las proteínas de secreción totales contenidas en la membrana de diálisis, se llevaron a un volumen de 9 mL con el mismo amortiguador de fosfatos, y se mezclaron con 1 mL de glicerol (relación 10% [v/v]) para evitar la degradación proteica, obteniéndose un volumen final de 10 mL. Los extractos proteicos se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Consideramos que las EAEC se cultivaron en 200 mL de medio y los extractos proteicos se recuperaron en un volumen final de 10 mL, entonces las proteínas de secreción se concentraron por un factor de veinte (20X).

### **5.5 Identificación de las toxinas Pet y Pic por inmunoensayos con anticuerpos monoclonales.**

La identificación de las proteínas Pet y Pic se llevó a cabo mediante 2 inmunoensayos; ELISA indirecto e inmunolectrotransferencia, que se describen a continuación, utilizando los anticuerpos monoclonales obtenidos en el punto 5.2.

#### **5.5.1 ELISA Indirecto.**

Las condiciones de la técnica de ELISA indirecto se establecieron de la siguiente forma: Utilizando una placa de poliestireno de 96 pozos, se le agregó a cada pozo 100µL del antígeno (Pic o Pet) a diferentes concentraciones: 0.0, 0.024, 0.048, 0.097, 0.195, 0.390, 0.7812, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 µg/mL, diluido en solución amortiguadora de carbonatos pH de 9.6. La placa se incubó a 37°C por 2 horas, posteriormente se realizaron 3 lavados con 200µL por cada pozo con una

solución salina de fosfatos más Tween 20 (PBS-Tween) al 0.05%. El bloqueo de la placa se realizó con leche descremada al 5% en PBS-Tween e incubando por 30 min a 37°C posteriormente se realizaron 3 lavados de PBS-Tween. Se agregaron 100µL del anticuerpo primario. Para el anticuerpo monoclonal anti-Pet fueron: 5, 10, 20 y 40 µg/mL, mientras que para el anticuerpo anti-Pic fueron 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL. En seguida se incubaron a 37°C durante 2 horas, al término de la incubación se hicieron 3 lavados como anteriormente se explicó. Se utilizaron 2 tipos de conjugado ligados a peroxidasa: anti-IgM de ratón 1:1000 cuando se debía identificar a Pic y anti-IgG 1:3000 para identificar a Pet, diluido en PBS-Tween 0.05% e incubando 2 horas a 37°C, con tres lavados posteriores a la incubación. Como solución cromógeno se utilizó ortofenilendiamina y peróxido de hidrogeno 0.004mg/4µL en 10 mL de solución amortiguadora de citratos, colocando 100 µL por pozo, dejando reaccionar por 10 min y deteniendo la reacción con 100 µL de ácido sulfúrico 2N por pozo. La absorbancia se determinó en un lector de ELISA a 490 nm.

Las condiciones óptimas del ensayo de ELISA resultaron ser 20 µg/mL para ambos anticuerpos monoclonales y de 5 µg/mL para las toxinas Pic y Pet. Estas condiciones se utilizaron para la determinación la clase y subclase de inmunoglobulina de ratón de los anticuerpos monoclonales anti-Pic y anti-Pet.

La evaluación de la producción de anticuerpos monoclonales por las clonas celulares también se realizó por la misma prueba utilizando las toxinas Pic y Pet a la concentración de 5 µg/mL.

Las toxinas Pic y Pet se detectaron en las cepas EAEC, aisladas de pacientes, por el mismo sistema. De las proteínas de secreción obtenidas de colocando 100 µL por pozo y se revelaron bajo las condiciones del ensayo de ELISA previamente establecidas.

### **5.5.2 Inmunoelectrotransferencia.**

La técnica de inmunoelectrotransferencia se lleva a cabo en tres pasos, descritos a continuación:

### **5.5.2.1 Electroforesis.**

Las toxinas Pet y Pic controles y las proteínas de secreción de las cepas EAEC, aisladas de casos clínicos, fueron analizadas por electroforesis en condiciones reductoras. El gel separador se preparó a una concentración del 12% de acrilamida y el gel concentrador al 5%. Se tomaron proteínas de secreción y se mezclaron 1:2 con una solución amortiguadora de muestra (2-beta-mercaptoetanol) que proporcione condiciones reductoras, se calentaron en baño maría a 100°C durante 5 min. En el primer carril de cada gel se colocó un marcador estándar de pesos moleculares que va de los 10 a los 250 kDa (Kaleidoscope de la marca BioRad) en los siguientes 2 carriles se colocaron los controles positivo y negativo, en el resto de los carriles se colocaron las muestras. La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts hasta la entrada del frente de corrimiento en el gel separador, después se ajustó la corriente a 150 volts constantes. Se corrieron geles por duplicado, uno para teñir con Azul de Coomasie y el otro para transferir.

#### **5.5.2.1.1 Tinción de Coomasie:**

Los geles fueron separados de los cristales y sumergidos en la solución de azul de Coomasie durante 12 horas, posteriormente se destiñeron con una mezcla de metanol: ácido acético: agua en proporciones 40:10:50 respectivamente. Se realizaron cambios de la solución de desteñir hasta observar solo las bandas de interés (marcador de peso molecular y controles).

#### **5.5.2.2 Inmunoelectrotransferencia.**

Se empaquetaron en un “cassette de transferencia” colocando 2 fibras para transferencia, 2 papel filtro, el gel separador y la membrana de Nitrocelulosa, colocando nuevamente 2 papel filtro y 2 fibras para cerrar el sistema. Posterior al empaquetado se introdujo el cassette en una cámara de transferencia (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo a 100 volts durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se tiñó con rojo de Ponceau la membrana de nitrocelulosa para verificar que las proteínas fueron transferidas correctamente, la eliminación del colorante se realiza con lavados de agua destilada.

### **5.5.2.3 Revelado inmunoenzimático.**

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS-Tween, incubando a 4°C por 12 horas. Posterior a la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween. La membrana de nitrocelulosa fue sumergida en el primer anticuerpo (anticuerpo monoclonal anti-Pic o anti-Pet) a una concentración de 40 µg/mL, con agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente, se llevaron a cabo tres lavados con PBS-Tween. Los conjugados utilizados fueron de 2 tipos ligados a peroxidasa, uno anti IgM 1:5000 para identificar a Pic y otro anti-IgG 1:2000 para identificar a Pet, ambos diluidos en PBS-Tween, se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente, con tres lavados posterior a la incubación. Como solución de revelado se utilizó 3,3'Diaminobenzidina/peróxido de hidrogeno en PBS, la membrana de nitrocelulosa se colocó en esta solución hasta observar las bandas de interés (Controles positivos), la reacción se detuvo con agua corriente.

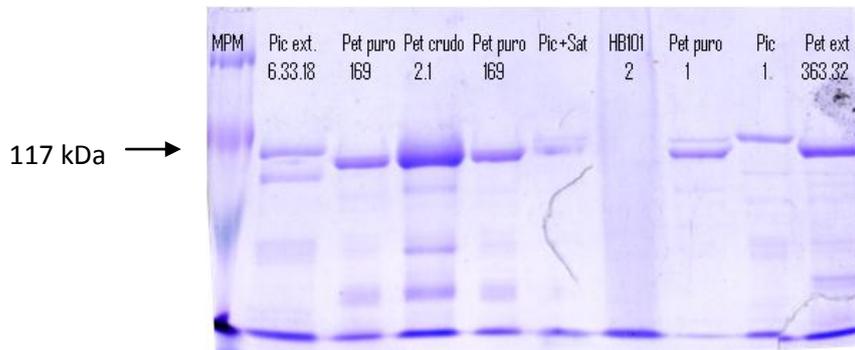
### **5.5.2.4 Análisis estadístico.**

Se les aplicó la prueba exacta de Fisher bilateral, con un nivel de significancia ( $p$ ) de 0.05, a los datos obtenidos.

## **6. Resultados.**

### **6.1 Proteínas Pet y Pic.**

La correcta purificación de las toxinas Pet y Pic controles, se evaluó mediante electroforesis en condiciones reductoras (Figura 6). Las clonas P56 y CEFN1 expresaron las proteínas Pic y Pet, respectivamente. Las proteínas muestran un alto grado de pureza y corresponden al peso molecular esperado. La cepa K12 de *E. coli* no expresa las proteínas autotransportadoras.



**Figura 6.** Electroforesis de las proteínas Pet y Pic. Carril 1. Marcador de peso molecular, 2. Pic extracto 633.18 $\mu\text{g/ml}$ , 3.Pet puro 169  $\mu\text{g/ml}$ , 4.Pet crudo CEFNI 21mg/ml, 5.Pet puro 169 $\mu\text{g/ml}$ , 6.Pic+Sat 116 y 108kDA, 7.Cepa K12 control (-), 8.Pet puro 1mg/ml, 9.Pic 1 mg/ml, 10.Pet CENFI extracto 363.32  $\mu\text{g/ml}$ .

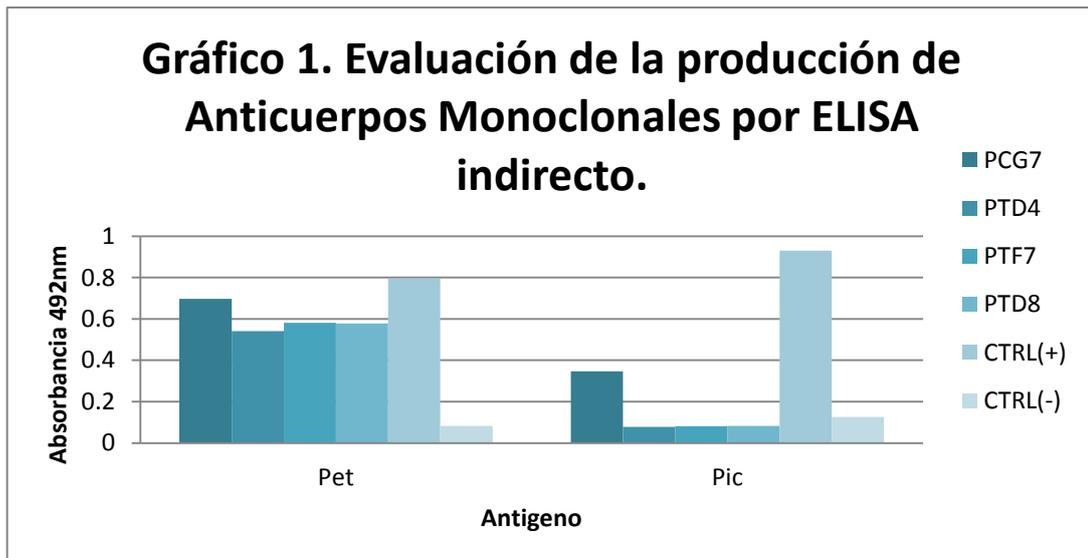
La concentración proteínica se determinó mediante el reactivo de Bradford de BioRad, se obtuvieron concentraciones de los 0.096  $\mu\text{g/mL}$  a los 0.934  $\mu\text{g/mL}$ .

La concentración proteínica de los controles positivos y negativos fue de:

- ✓ 169  $\mu\text{g/mL}$  (Control +) toxina Pet.
- ✓ 106  $\mu\text{g/mL}$  (Control +) toxina Pic.
- ✓ 970  $\mu\text{g/mL}$  (Control -) cepa K12.

## 6.2 Anticuerpos monoclonales.

De las clonas celulares descongeladas; anti-Pic 52F7F7C5 (PCC5), anti-Pic 52F7F7G7 (PCG7), anti-Pic 52F7E7B2 (PCB2), anti-Pet PT2F8G5D4 (PTD4), anti-Pet PT2F8G5F7 (PTF7) y anti-Pet PT2F8G5D8 (PTD8). Las que mejor se adaptaron al cultivo *in vitro* fueron PCG7, PTD4, PTF7 y PTD8. El sobrenadante obtenido de cada clona fue evaluado por ELISA e inmunoelectrotransferencia (Gráfico 1 y Figura 7). La prueba de ELISA mostró que los sobrenadantes de los hibridomas reconocieron las toxinas Pic y Pet, lo que fue corroborado por inmunoelectrotransferencia donde se observó un alto grado de reconocimiento de los antígenos (Figura 7).



**Gráfico 1.** Evaluación de las producción de anticuerpos monoclonales por ELISA donde se observa la identificación del antígeno por parte de los anticuerpos monoclonales obtenidos de las clonas que mejor se adaptaron al cultivo *in vitro*. Clonas PCG7, PTD4, PTF7 y PTD8. CTRL (+) y CTRL (-), suero de ratón control positivo y negativo, respectivamente.

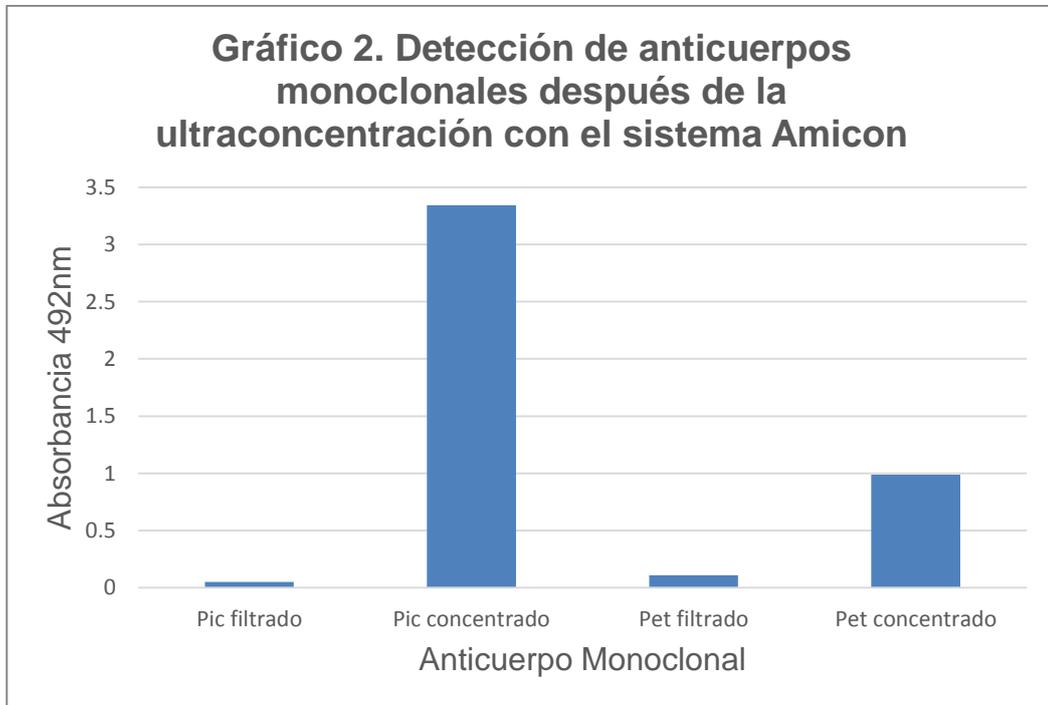


**Figura 7.** Inmunoelectrotransferencia de las toxinas Pet y Pic. Los anticuerpos monoclonales reconocieron las proteínas autotransportadoras. Carriles 0 y 9 Marcador de peso molecular 117 kDa, 1. PCG7, 2. PCG7, 3. PCC5, 4. PCB2, 5. PCG7, 6. PTD8, 7 y 14. Control (-), 8 y 13. Control (+), 10. PTD8, 11. PTD4, 12. PTF7.

Una vez que se verifico el reconocimiento de las toxinas mediante las clonas productoras de anticuerpos monoclonales, se seleccionaron las clonas PCG7 y PTF7, para producir los anticuerpos anti-Pet y anti-Pic, respectivamente, a mediana escala.

El sobrenadante que contenía los anticuerpos monoclonales se almaceno a 4°C, hasta obtener la cantidad necesaria para comenzar con los ensayos inmunológicos.

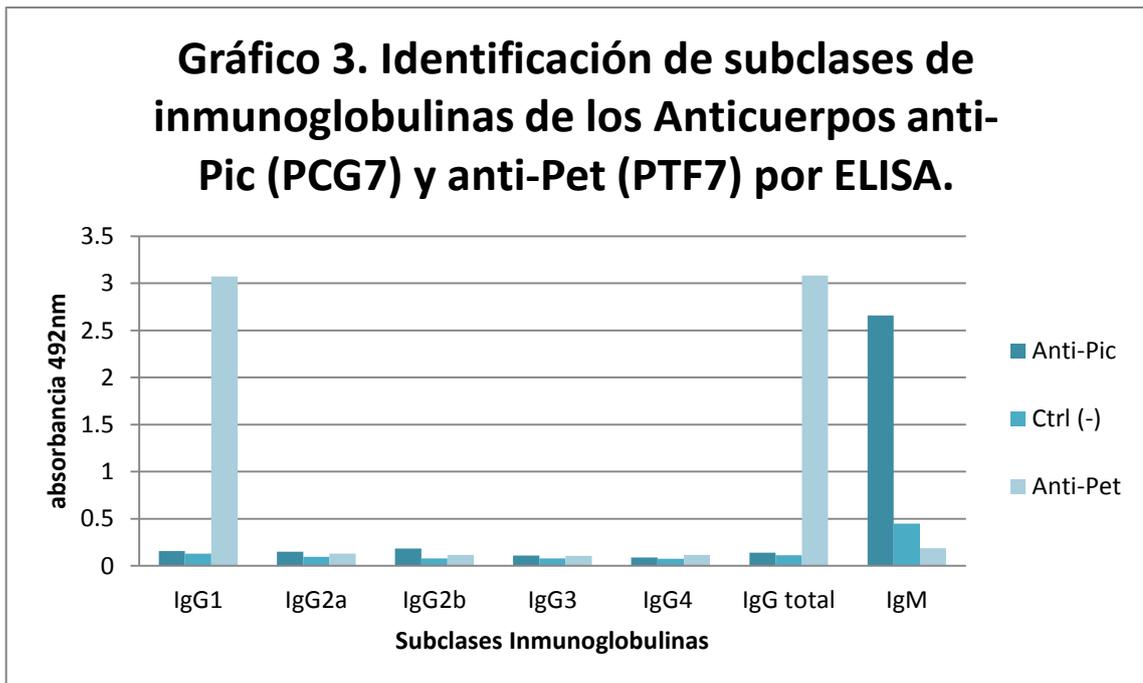
El sobrenadante obtenido se concentró 10X por ultrafiltración a través del sistema Amicon 8050 de Millipore, la evaluación del buen funcionamiento de dicho sistema se realizó mediante un ELISA indirecto (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Reconocimiento de anticuerpos anti-Pet (PTF7) y anti-Pic (PCG7), después de ser concentrados por el sistema Amicon 8050 de Millipore y evaluados por ELISA indirecto.

El sobrenadante concentrado de ambos anticuerpos (gráfico 2) reconoce a los antígenos correspondientes, mientras que el resto del sobrenadante no tiene reacción significativa con las proteínas de interés; con esto vemos que la ultrafiltración fue realizada de manera adecuada y sin alterar la afinidad de los anticuerpos por su antígeno.

Se determinó la clase y subclase de inmunoglobulina al que corresponden los anticuerpos monoclonales (anti-Pic y anti-Pet) mediante un ELISA (Gráfico 3) y se obtuvieron los siguientes resultados: anti-Pic corresponde al tipo IgM mientras que el anticuerpo anti-Pet es del tipo IgG1.



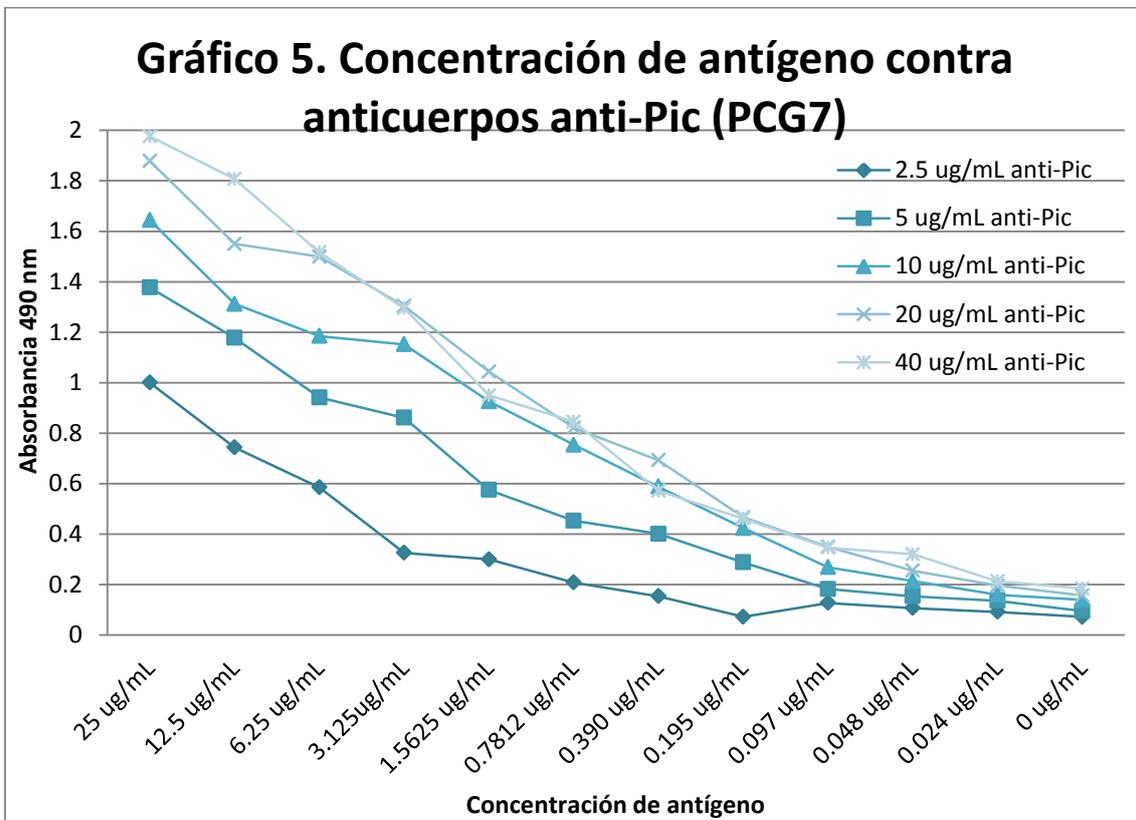
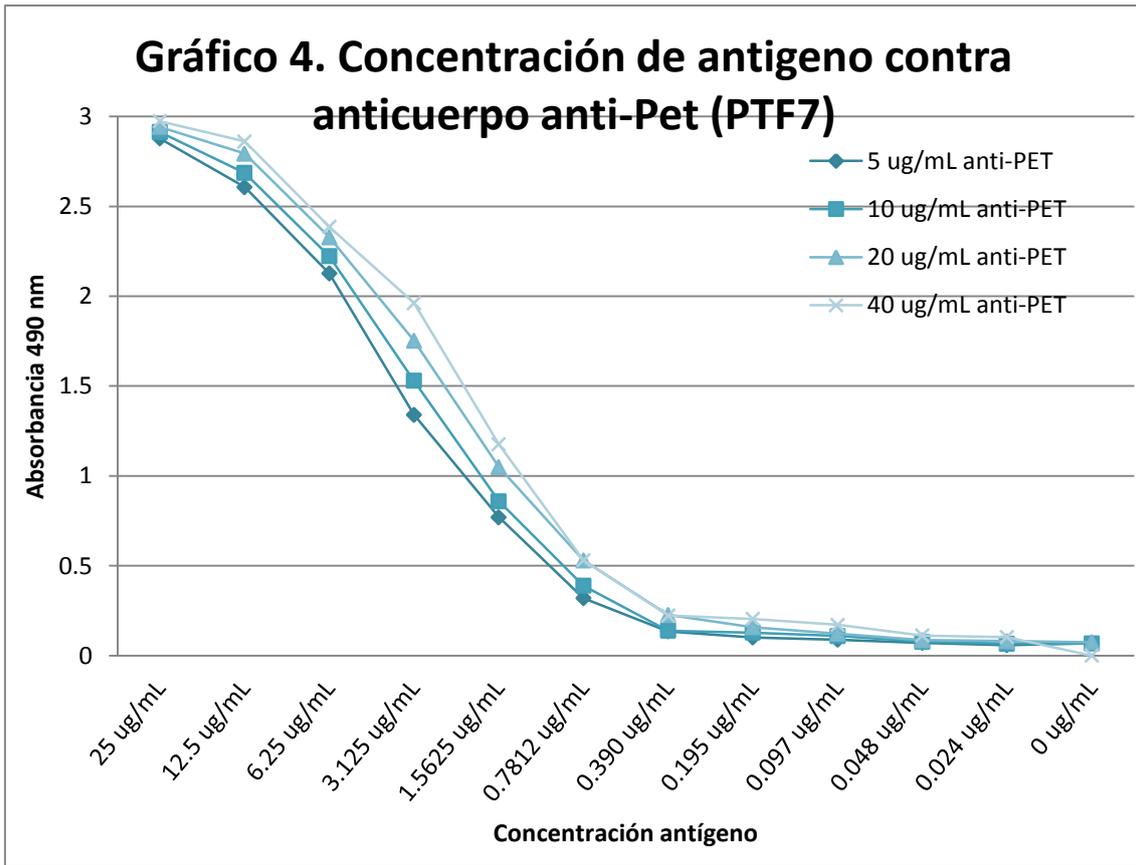
**Grafico 3.** Resultado de la determinación de la clase y subclase de inmunoglobulina de ratón por ELISA de los anticuerpos monoclonales anti-Pic (PCG7) y anti-Pet (PTF7).

Posteriormente se llevó a cabo la purificación de los anticuerpos monoclonales por cromatografía de afinidad para los anticuerpos anti-Pet y de adsorción tiofilica para los anticuerpos anti-Pic. La concentración final se determinó mediante el reactivo de Bradford de BioRad:

- ✓ Anticuerpo anti-Pic, concentración final de 560  $\mu\text{g/mL}$ .
- ✓ Anticuerpo anti-Pet, concentración final de 881  $\mu\text{g/mL}$ .

La concentración de trabajo se estableció mediante un ELISA (Gráficos 4 y 5), donde se utilizaron diferentes concentraciones de antígenos y anticuerpos.

La concentración de trabajo para ambos anticuerpos monoclonales fue de 20  $\mu\text{g/mL}$  y para las toxinas Pet y Pic de 5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.



**Gráficos 4 y 5.** Determinación de la concentración óptima de trabajo de los anticuerpos anti-Pet (PTF7) y anti-Pic (PCG7). (Las concentraciones son en microgramos/mL)

### 6.3 Muestras de *E. coli* enteroagregativa a partir de aislados de pacientes.

Las 100 muestras clínicas donadas por el Cepario del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, se conservaban en agar gelosa especial, el primer pase se realizó en caldo Luria del cual 89 de ellas tuvieron crecimiento, reduciendo la población del estudio.

<b>Cuadro 3. País de origen de las muestras clínicas donadas por el Cepario del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM</b>	
<b>País.</b>	<b>Muestras con crecimiento</b>
<b>México</b>	76
<b>Brasil</b>	13

De las 89 cepas que se adaptaron al cultivo *in vitro*, 76 de ellas son de pacientes mexicanos, mientras que el resto son aislados provenientes de Brasil (13 muestras). A todas las muestras se les determinó el patrón de adherencia, de las cuales, 75 presentaron Adherencia Agregativa (AA), 4 Adherencia Difusa (AD) y 10 no presentaron ningún tipo de adherencia.

<b>Cuadro 4. Relación del número de cepas con adherencia agregativa y las características clínicas de los pacientes.</b>		
<b>Tipo de adherencia (Número de muestras)</b>	<b>AA (75)</b>	<b>Característica clínica</b>
<b>De las cuales</b>	5	<b>Diarrea persistente con sangre.</b>
	29	<b>Diarrea aguda</b>
	19	<b>Diarrea con sangre</b>
	16	<b>Diarrea indeterminada</b>
	6	<b>Control Asintomático</b>

El cuadro 4 muestra el número de muestras de *E. coli* con adherencia agregativa (AA) y la característica clínica de los pacientes de donde se obtuvieron las muestras.

- ✓ El serotipo más común entre las cepas fue el O44:H18 con un 12.35% de presencia.
- ✓ El rango de edad va de los 0 años (recién nacidos) hasta los 12 años, con un promedio de 1 año 3 meses.

#### 6.4 Inmunoensayos.

Después de purificar los anticuerpos monoclonales y las proteínas de secreción de las cepas aisladas de pacientes, se realizaron los ensayos inmunológicos: ELISA (cuadro 5) e inmunolectrotransferencia (cuadro 6):

<b>Cuadro 5. Resultado de la prueba de ELISA que muestra el número de cepas con adherencia agregativa en donde se detectaron las toxinas Pet y Pic.</b>		
<b>Tipo de adherencia (Número de muestras)</b>	<b>AA (75)</b>	<b>Toxina(s) identificada(s)</b>
<b>De las cuales</b>	52	<b>Pet</b>
	72	<b>Pic</b>
	52	<b>Pet-Pic</b>

**Cuadro 5.** Presencia de las toxinas Pet y Pic en muestras de cepas EAEC aisladas de pacientes, identificadas por ELISA

Utilizando el ensayo de ELISA se detectaron las toxinas Pet y Pic en las cepas EAEC aisladas de pacientes. En la columna AA (Adherencia Agregativa) del Cuadro 5; 52 de las muestras presentaron la toxina Pet, 72 presentaron la toxina Pic y 52 de las muestras presentaron ambas toxinas.

<b>Cuadro 6. Resultados de la prueba de inmunoelectrotransferencia que muestra el número de cepas con adherencia agregativa en donde se detectaron las toxina Pet y Pic.</b>		
<b>Tipo de adherencia (Número de muestras)</b>	<b>AA</b>	<b>Toxina(s) identificada(s)</b>
	75	
<b>De las cuales</b>	43	<b>Pet Positivo</b>
	20	<b>Pic Positivo</b>
	12	<b>Pet-Pic positivo</b>

**Cuadro 6.** Identificación de las proteínas Pet y Pic por inmunoelectrotransferencia en muestras con adherencia agregativa.

Después de realizar la prueba de inmunoelectrotransferencia, mediante los anticuerpos anti-Pet, se identificó en 43 de las muestras la presencia de la toxina Pet, por medio de los anticuerpos anti-Pic, la proteína Pic fue reconocida en 20 de las muestras. La presencia de ambas toxinas se observa en la fila “Pet-Pic positivo” en 12 de las muestras con Adherencia Agregativa.

### **6.5 Análisis estadístico.**

Se relacionó la presencia de las toxinas (Pet y Pic) con las características clínicas de los pacientes, de donde se aislaron las cepas. A los datos obtenidos, considerando el número de casos, se les aplicó la prueba exacta de Fisher bilateral, con un nivel de significancia ( $p$ ) de 0.05.

Cuando se compararon la presencia de las toxinas Pet y Pic el grupo de diarrea total con los casos asintomáticos no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en el caso de la toxina Pet detectada por ELISA, en diarrea persistente con sangre, la prueba de Fisher mostró una  $p=0.08$ . También, en el caso de la toxina Pet detectada por inmunoelectrotransferencia, en diarrea con sangre, mostró una  $p=0.07$ .

La comparación de los tipos de diarrea tomando al grupo de diarrea total como referencia, mostró que, cuando se detecta la toxina Pet por el ensayo de ELISA, en

el grupo de diarrea indeterminada, la prueba de Fisher dio un valor de  $p=0.0576$ , muy cercano a la significancia estadística. Cuando se detectó la misma proteína Pet con el mismo ensayo de ELISA, pero para el grupo de diarrea persistente con sangre, se encontró una  $p=0.0486$ .

El análisis de otros grupos de diarrea con ambas toxinas no mostró asociación significativa.

Los resultados de la dependencia entre Pet y Pic, para el grupo de diarrea total, en el ensayo de ELISA, mostró una  $p<0.01$ . En este mismo grupo, en el ensayo de inmunoelectrotransferencia se encontró una  $p=0.0005$ .

La dependencia entre Pet y Pic, en el grupo de diarrea aguda, en el ensayo de ELISA, mostró una  $p=0.0119$ . En el grupo de diarrea aguda, con el ensayo por inmunoelectrotransferencia, se encontró una  $p=0.034$ . En el grupo de diarrea con sangre en el ensayo de ELISA, se obtuvo una  $p=0.0188$ .

## **7 Discusión.**

Las clonas PTF7 y PCG7 fueron elegidas para producir en grandes cantidades los anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic respectivamente, debido a que presentaron una excelente adaptación al cultivo *in vitro*, con una morfología celular oval, refringentes a la luz del microscopio y con un 90% de confluencia antes de cada pase celular (ATCC 2013).

Los anticuerpos monoclonales al ser proteínas de secreción se encuentran en el sobrenadante del cultivo celular (Machado, 2006). Para realizar cada evaluación se tomó el sobrenadante directamente.

La primer evaluación se realizó por ELISA, con esto se determinó la afinidad de los anticuerpos por el antígeno de interés. En un estudio previo realizado por García (2009), se determinó que el anticuerpo anti-Pic identificaba varias proteínas de la familia SPATE, por lo que era un anticuerpo monoclonal no específico, mientras que el anticuerpo anti-Pet era un anticuerpo monoclonal específico por solo

identificar a la proteína Pet (Machado, 2006). El conjugado utilizado para revelar los inmunoensayos fue un anticuerpo anti-IgG de ratón peroxidado.

Se evaluó el proceso de purificación de las SPATEs y de proteínas de secreción realizando electroforesis en condiciones reductoras, donde se observaron bandas de proteínas en el rango de las SPATEs de 100 a 120 kDa (Dutta, 2002). La prueba de inmunoelectrotransferencia se utilizó para corroborar la producción y afinidad de los anticuerpos monoclonales hacia los antígenos de interés, ya que se observaron bandas (Figura 6) que corresponden a los pesos moleculares reportado en estudios previos; toxina Pet 104 a 108 kDa y toxina Pic 110 a 116 kDa (Villaseca, 2005).

La concentración de anticuerpos monoclonales por el sistema de ultrafiltración Amicon 8050 de Millipore, a partir de los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas y su posterior purificación por cromatografía de afinidad, resultaron adecuadas para eliminar las proteínas que no eran de interés para este estudio, así como los nutrientes provenientes del medio de cultivo utilizado para la proliferación y mantenimiento de las clonas celulares.

La subclase inmunológica de los anticuerpos anti-Pet y anti-Pic se determinó para saber qué tipo de conjugado se utilizaría al revelar los inmunoensayos. El anticuerpo anti-Pet fue del tipo IgG1, mientras que el anticuerpo anti-Pic correspondió al tipo IgM, por lo que se utilizaron los conjugados correspondientes marcados con peroxidasa.

Al concentrar, purificar y obtener el subtipo de inmunoglobulina de cada anticuerpo, se determinó la concentración proteínica mediante el reactivo de Bradford de BioRad; el anticuerpo anti-Pet mostró una concentración de 881  $\mu\text{g/mL}$  y el anticuerpo anti-Pic de 560  $\mu\text{g/mL}$ . Este último al ser una inmunoglobulina pentamérica (IgM) y no específica (Machado, 2006) presentó una mayor afinidad ante los antígenos de interés y a pesar de tener un bajo rendimiento al momento de purificarse; no se presentaron limitantes durante el trascurso del proyecto.

De igual forma se determinó la concentración de trabajo de los anticuerpos monoclonales (anti-Pet y anti-Pic), para esto se tomaron en cuenta los siguientes factores:

- Que no existiera auto aglutinación entre los mismos anticuerpos.
- La suficiente concentración de anticuerpos para obtener una sensibilidad alta, que permitiera detectar la menor cantidad de antígeno en cada inmunoensayo.

Se evaluaron concentraciones de los 2.5  $\mu\text{g/mL}$  a los 40  $\mu\text{g/mL}$  de los anticuerpos monoclonales y de 0.024  $\mu\text{g/mL}$  a 25  $\mu\text{g/mL}$  de los antígenos. El punto mínimo de detección por parte de los anticuerpos hacia los antígenos fue de 1.56  $\mu\text{g/mL}$ . En este punto se determinó la concentración de trabajo de los anticuerpos monoclonales, resultando una concentración óptima para ambos anticuerpos de 20  $\mu\text{g/mL}$  y 40  $\mu\text{g/mL}$ . Como ambas concentraciones tenían una respuesta similar ante los antígenos, se optó por utilizar la menor concentración (20  $\mu\text{g/mL}$ ) para evitar autoaglutinaciones de los anticuerpos. Para el antígeno se consideró la concentración óptima de 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Al realizar la resiembra de las muestras clínicas donadas por el Cepario del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, 11 de ellas no fueron rescatadas, debido a que las cepas llevaban un prolongado periodo de conservación, en el mismo medio sin ser resembradas (Burguet, 2012). Las bacterias resembradas periódicamente mantienen sus características fenotípicas y genotípicas, al no existir una resiembra de las cepas, éstas tienden a perder sus características o morir (Weng, 2005).

El Cepario de la Facultad de Medicina, tiene convenios con investigadores de otras latitudes del mundo, por lo tanto, también se trabajaron con cepas provenientes de Brasil. En este estudio, no se tomó en cuenta la procedencia de las cepas, pero si se hará mención para estudios posteriores.

La prueba de adherencia celular es una de las mejores pruebas para clasificar las cepas de *Escherichia coli* (Riveros, 2011). Esta prueba se aplicó a las cepas

donadas, obteniendo datos relevantes, los cuales nos muestran que 75 de las cepas tenían adherencia agregativa, 4 de ellas adherencia difusa y 10 no presentaban adherencia; las muestras con adherencia difusa y sin algún tipo de adherencia se tomaron como controles negativos.

La prueba de serotipificación agrupa a las bacterias con características definidas y similares (Rodríguez, 2002), sin embargo para este estudio no resulta relevante ya que solo el 12.35% de las muestras presentaron el serotipo O44:H18, reportado como característico del grupo EAEC, mientras que el resto de los serotipos se encontraban por debajo del 2%.

El objetivo principal de este trabajo fue detectar las proteínas Pet y Pic en muestras clínicas de EAEC, utilizando anticuerpos monoclonales por medio de los inmunoensayos ELISA e inmunoelectrotransferencia. Mediante el ensayo de ELISA se detectaron 52 muestras con presencia de la toxina Pet, 72 con la toxina Pic y 52 presentaron ambas toxinas. Por inmunoelectrotransferencia se detectaron 43 muestras con presencia de la toxina Pet, 20 con la toxina Pic y 12 presentaron ambas toxinas Pet y Pic.

Al comparar la presencia de las toxinas Pet y Pic del grupo de diarrea total con los casos asintomáticos, no se encontró alguna relación estadística, debido al bajo número de muestras. Sin embargo, en el caso de la toxina Pet detectada por ELISA, en las muestras con un cuadro clínico de diarrea persistente con sangre y al detectar la misma proteína por inmunoelectrotransferencia, en las muestras con un cuadro clínico de diarrea con sangre, se obtuvieron valores de  $p=0.08$  y  $p=0.07$  respectivamente. En estos grupos de diarrea persistente con sangre y diarrea con sangre que expresan la toxina Pet, se observó cierta tendencia de asociación, sugiriendo, que si las muestras de los controles asintomáticos fueran más grandes, se obtendría una significancia estadística más clara (Díaz, 2009).

Cuando se compararon los tipos de diarrea, tomando al grupo de diarrea total como referencia y detectando la toxina Pet mediante el ensayo de ELISA, en el grupo de diarrea indeterminada, se encontró un valor muy cercano a la significancia estadística ( $p=0.0576$ ). Cuando se detectó la misma proteína Pet con el ensayo de

ELISA, para el grupo de diarrea persistente con sangre, se encontró una asociación significativa ( $p=0.0486$ ). Mientras que el análisis de otros grupos de diarrea con ambas toxinas no mostró asociación significativa.

Los resultados de la dependencia entre Pet y Pic, para el grupo de diarrea total, por en ELISA e inmunoelectrotransferencia, mostró ser significativo ( $p<0.01$  y  $p=0.0005$  respectivamente), lo que indicó que ambas toxinas no son independientes y actúan en conjunto. De igual manera, la dependencia entre Pet y Pic, en el grupo de diarrea aguda, para ambos ensayos, mostró también significancia (ELISA;  $p=0.0119$  e Inmunoelectrotransferencia;  $p=0.034$ ). Así mismo, con el grupo de diarrea con sangre en el ensayo de ELISA ( $p=0.0005$ ). Como se mencionó con anterioridad, los resultados muestran que la actuación de las toxinas Pic y Pet no es independiente, una de otra (Álvarez, 2007).

Debido a que la toxina Pet se encuentra codificada dentro de un plásmido y el gen de la toxina Pic se encuentra en una isla de patogenicidad del cromosoma bacteriano las toxinas son independientes desde el punto de vista genético. (Henderson, 1999; Rodríguez, 2002; Cortés, 2002; Bellini 2005; Villaseca, 2005). Sin embargo, los resultados anteriores muestran que las toxinas actúan en conjunto.

Los resultados obtenidos por la inmunoelectrotransferencia son más específicos en comparación con los obtenidos por el inmunoensayo ELISA, esto fue, por que las bandas que se observaron de las toxinas Pet y Pic, ya fueron caracterizadas (Dutta, 2002) y se conoce su peso molecular, por lo tanto, es más fácil reconocer las toxinas de interés, a pesar de tener anticuerpos monoclonales que reconocen epitopos similares o compartidos dentro del grupo de las SPATES, como es el caso del anticuerpo anti-Pic.

Las toxinas Pet y Pic fueron identificadas en un menor número de muestras de *Escherichia coli* adherencia enteroagregativa provenientes de aislados de pacientes mediante la prueba de inmunoelectrotransferencia en comparación con el inmunoensayo ELISA (Cuadros 5 y 6), la desnaturalización de las toxinas al realizar la inmunoelectrotransferencia posiblemente altero el epitopo que reconocen los anticuerpos monoclonales, para corroborar esta suposición es necesario conocer

la conformación cuaternaria de las proteínas Pet y Pic, así como el sitio de unión de los anticuerpos monoclonales, con objeto de estimar si la desnaturalización de las proteínas afectó en el resultado de esta investigación (Gavilondo, 1995).

Las enfermedades diarreicas en niños causadas por *E. coli* enteroagregativa, son más frecuentes en países en vías de desarrollo como es el caso de México y Brasil (Romero 2007), aunque los países desarrollados no están exentos, los métodos convencionales de diagnóstico para este tipo de bacterias consisten en un aislamiento, identificación del microorganismo por pruebas bioquímicas, serológicas y el tipo de adherencia (Murray, 2005), las cuales conllevan un largo tiempo de incubación y no permiten un tratamiento a corto plazo. Las pruebas de biología molecular, que buscan genes específicos son más rápidas (Jenkins, 2007), aunque no todos los centros hospitalarios cuentan con este servicio. En esta investigación se evaluaron pruebas inmunológicas por separado, para poder diseñar una prueba rápida, en un futuro y así detectar las toxinas de excreción en las heces de pacientes con síntomas característicos de enfermedad causada por EAEC, con lo que se podrá dar un diagnóstico y tratamiento en un menor tiempo, en comparación con las pruebas convencionales.

## **8. Conclusiones.**

Las clonas celulares anti-Pet PT2F8G5F7 y anti-Pic 52F7F7G7 se adaptaron y reprodujeron en cultivo *in vitro* para obtener anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic respectivamente

El anticuerpo monoclonal anti-Pic reconoció un epitopo similar o compartido entre las SPATEs.

El anticuerpo monoclonal anti-Pet fue específico para la toxina Pet producida por *Escherichia coli* enteroagregativa.

Se purificaron las proteínas de excreción de las cepas de *Escherichia coli*, donadas por el Cepario de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los anticuerpos monoclonales anti-Pet y anti-Pic reconocieron las toxinas de interés (Pet y Pic) provenientes de cepas EAEC de aislados de pacientes, mediante los inmunoensayos; ELISA e inmunoelectrotransferencia.

El análisis estadístico mostró que la actuación de las toxinas Pet y Pic no es independiente una de otra, durante una infección con EAEC.

Se requiere realizar un análisis conformacional de las toxinas Pet y Pic, así como el sitio de unión de los anticuerpos monoclonales con dichas toxinas.

## 9. Referencias.

1. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. (2007) Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública Mex. Volumen 49. p.376-386.
2. Nataro, James P. and James B. Kaper (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Volumen 11:142.
3. Rodríguez-Angeles G. (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mex. Volumen 44. p. 464-475.
4. Bellini, Estela M., Waldir P. Elias, Tânia A.T. Gomes, Tânia L. Tanaka, Carla R. Taddei, Rocio Huerta, Fernando Navarro-Garcia, Marina B. Martinez. (2005) Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Volumen 43. p. 259–264.
5. Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. (2005) Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. Rev Latinoam Microbiol. Volumen 47. p. 140-159.
6. Villaseca Flores, Jorge M. (2002) Efecto de la toxina Pet de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC) sobre el esqueleto membranal de diferentes células. Tesis de doctorado en ciencias (biología). Facultad de ciencias, UNAM.

7. Machado Nina P.; Germán Téllez, John Castaño. (2006) Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. Asociación colombiana de infectología. Volumen 10-3. p. 186-197.
8. García Picón, Aholiba. (2009) Producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína Pic de *Escherichia coli* enteroagregativa y su reactividad contra proteínas autotransportadoras. Tesis de licenciatura FESC, UNAM.
9. Medina Flores, Yolanda, Juan Carlos Carpio, Olga Mata, Edith Medina, Reyna Gutiérrez. (2012) Manual XVI taller internacional de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y otras moléculas. Laboratorio de anticuerpos monoclonales, InDRE.
10. Roja Espinosa, Óscar. (2006) Inmunología de memoria. 3ª ed. Editorial medica pamericana, México, p.p. 50
11. Cortés-Ortiz IA, Rodríguez Angeles G, Moreno Escobar EA, Tenorio Lara JM, Torres Mazadiego BP, Montiel Vázquez E. (2002) Brote causado por *Escherichia Coli* en Chalco, México. Salud Pública Mex Volumen 44. p. 297-302.
12. Riveros, Maribel, Francesca Barletta, Martín Cabello, Davis Durand, Erik Mercado, Carmen Contreras, Fulton Rivera, Susana Mosquito, Ángela Lluque, Theresa Ochoa. (2011) Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. Revista Peruana de medicina experimental y salud pública. Volumen 28 Número 1.
13. Scaletsky Isabel C A, Fabbriotti Sandra H, Carvalho Rozane L B, Nunes Claudia R, Maranhão Helcio S, Morais Mauro B, Fagundes-Neto Ulysses (2002) Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study *Journal of Clinical Microbiology*. Volumen 40. p. 645-648
14. González Ayala, Silvia E. Cecchini, Diego M. (Octubre 2013) Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Alimentos. Organización panamericana de la salud.  
<http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2w.html>.
15. ATCC (Octubre 2013) HEp-2 (ATCC® CCL-23™). [www.atcc.org/products/all/CCL-23.aspx?slp=1#characteristics](http://www.atcc.org/products/all/CCL-23.aspx?slp=1#characteristics).

16. Piva, Iriane C.; Alex L. Pereira, Lúcia R. Ferraz, Rejane S. N. Silva, Ataíza C. Vieira, Jesus E. Blanco, Miguel Blanco, Jorge Blanco and Loreny G. Giugliano. (2003) Virulence Markers of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Children and Adults with Diarrhea in Brasília, Brazil. *Journal of clinical microbiology*. p. 182–183
17. Navarro García, Fernando; Javier Gutiérrez Jiménez, Carlos García Tovar, Luis A. Castro, Héctor Salazar Gonzalez and Vanessa Cordova (2010) Pic, an Autotransporter Protein Secreted by Different Pathogens in the *Enterobacteriaceae* Family, Is a Potent Mucus Secretagogue. *Infection and immunity*, Volumen 78, No. 10 p. 4101–4109.
18. Murray, Patrick; Kens Rosenthal, Michael A. Pfaller. (2005) *Medical Microbiology*. 5° ed. Elsevier. United States of America. p. 323-330.
19. Romero Cabello, Raúl. (2007) *Microbiología y parasitología humana; bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3° ed. Ed. Panamericana, México. p. 753-767.
20. Joklink, Wolfgang, et al. (1997) *Microbiología* 20° ed. Ed. Medica panamericana, Argentina. p. 736-743.
21. Koneman, Elmer W. et al (2001) *Diagnóstico Microbiológico; texto y atlas a color*. 5° ed. Ed. Médica Panamericana, España. p. 196-199.
22. Gibert, Magdalena. (2010) *Detección y caracterización de aislados de Escherichia coli de origen clínico y fecal en ganillas ponedoras*. Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid, España. p.p. 184.
23. Robins, Roy M.; Elizabeth L. Hartland. (2002) *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *Jurnal of Gastroenterology and hepatology*. Volumen 17:467-475.
24. Navarro García, Fernando; Antonio Serapio, Paul Ugalde, Gabriela Tapia, Lucia Chávez (2013) Actin Cytoskeleton Manipulation by Effector Proteins Secreted by Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes. *BioMed Research International* Volumen 2013. p. 22.
25. Guyer, Debra; Ian R. Henderson, James P. Nataro, Harry L. T. (2000) Chromosomal Expression of the Haemophilus influenzae Hap Autotransporter Allows Fine-Tuned Regulation of Adhesive Potential via Inhibition of Intermolecular Autoproteolysis. *Molecular microbiology*. Volumen 38. p. 53-66.

26. Strockbine, Nancy A.; Lilian R. M. Marques, Randall K. Holmes, Alison D. O'brien (1985) Characterization of Monoclonal Antibodies against Shiga-Like Toxin from *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. Volumen 50. p. 695-700.
27. Svennerholm, Ann-Mari; Marianne Wikstrom, Marianne Lindblad, Jan Holmgren (1986) Monoclonal Antibodies Against *Escherichia coli* Heat-Stable Toxin ( STa ) and Their Use in a Diagnostic ST Ganglioside GM1-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of clinical microbiology*. Volumen 24. p. 585-590.
28. Chow Siu-Kei, Arturo Casadevall (2012) Monoclonal antibodies and toxins--a perspective on function and isotype. *Toxins*. Volumen 4. P. 430-454.
29. Dudley, Edward G.; Nicholas R. Thomson, Julian Parkhill, Nicholas P. Morin, James P. Nataro. (2006) Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. Volumen. 61. P. 1267–1282.
30. Morin, Nicholas; Araceli E. Santiago, Robert K. Ernst, Stacey J. Guillot, James P. Nataro (2013) Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. Volumen 81. p. 122–132.
31. Henderson, Ian; John Czczulin, Carlos Eslava, Fernando Noriega, James Nataro. (1999) Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. Volumen 67. p. 5587-5596.
32. Waldir, Elias; Samar Barros, Cristiano Moreira, Trabulsi R, Tânia Gomes.(2002) Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains among Classical Enteropathogenic *Escherichia coli* O Serogroups. *Journal of clinical microbiology*, Volumen. 40 p. 3540–3541.
33. Weng, Zulia; Raquel Junco, Olvido Díaz, Inalvis Álvarez, José Beltrán, María Rodríguez (2005) Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Revista Cubana Higiene y Epidemiología*. Volumen 43 número 2.
34. Burguet, Nancy; Nelson Sierra y Lázaro Brito. (2012) Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Volumen 43, Número 3.

35. Aguilón, Juan, Juan Contreras, Andrés Dotte, Andrea Cruzat, Diego Catalán, Lorena Salazar, María Molina, Julia Guerrero, Mercedes López. (2003) Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación. Revista médica de Chile. Volumen 131, número 12.
36. Dutta, Panaki; Renato Cappello, Fernando Navarro, James Nataro. (2002) Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. Infection and Immunity. Volumen 70 Número 12 p.p. 7105-7113.
37. Fariñas, María Carmen; Luis Martínez. (2013) Infecciones causadas por bacterias Gram-negativas multirresistentes: Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, y otros bacilos Gram-negativos no fermentadores. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Volumen 31 Número 6 p.p. 402-409.
38. Álvarez, Luis. (2004) Anticuerpos monoclonales. Realidad y perspectiva. Editorial Complutense. España. p.p. 172.
39. Goding, James. (1993) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 3ª Ed. Editorial Academic Press. Estados Unidos de Norteamérica. p.p. 492.
40. Gavilondo, Jorge. (1995) Anticuerpos Monoclonales. Editorial Elfos Scientiae. Cuba. p.p. 180.
41. Jenkins, C.; G. Chart, A. Willshaw, T. Cheasty. (2007) Association of putative pathogenicity genes with adherence characteristics and fimbrial genotypes in typical enteroaggregative *Escherichia coli* from patients with and without diarrhoea in the United Kingdom. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Volumen 26, p. 901–906.
42. Díaz, Abel (2009) Diseño estadístico de experimentos. 2da Edición. Universidad de Antioquia. p.p. 284.
43. Álvarez, Rafael. (2007) Estadística aplicada a la ciencia de la salud. Editorial Días de Santos. p.p. 996.