



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DISEÑO DE UN INMUNOENSAYO RÁPIDO
PARA LA DETECCIÓN DE SAT EN ORINA**

T E S I S

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

P R E S E N T A

GIOVANNI FABIAN LEON

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ULISES HERNÁNDEZ CHIÑAS



MÉXICO, D.F

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México Ubicada en la Unidad de Posgrado, Primer Piso, Laboratorio 36, en Ciudad Universitaria, CP. 04510.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ulises Hernández Chiñas

ASESOR INTERNO

M en C Ángel García Sánchez

ASESOR DE TESIS

Dr. Carlos Eslava Campos

DEDICATORIAS

A mis padres por ser un pilar fundamental en mi formación tanto académica como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Soy el reflejo de todos sus valores y dedicación, los quiero mucho.

A mis hermanas por estar conmigo, consentirme y por ese apoyo mutuo que me ha llevado a perseverar ante las diferentes adversidades.

A mi familia por contribuir a construir la persona que soy además de sus comentarios de apoyo y buenos deseos.

Al doctor Ulises por ser una persona con una enorme calidad humana que ha dedicado parte de sus experiencias académicas y profesionales en el desarrollo de este trabajo, además de los buenos momentos y consejos compartidos que han contribuido en mi formación personal pero sobre todo por su comprensión, paciencia y honestidad. Eres un gran maestro.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir el desarrollo de mi carrera profesional en las aulas de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en donde además de la formación académica ha desarrollado en mí, principios y valores éticos que siempre llevare presentes en el desarrollo de mis actividades profesionales.

A todas aquellas personas que han contribuido con sus experiencias y consejos en mi vida y que han sembrado en mí semillas que hoy están dando sus primeros frutos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme seguir adelante para lograr cumplir este objetivo.

Al Doctor Carlos Eslava por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su equipo de trabajo, por su confianza, calidad humana y por las aportaciones a lo largo del proyecto, por sus opiniones profesionales y personales compartidas que han contribuido en mi formación académica y personal.

A Lulu y Paloma por todo el apoyo recibido durante este tiempo además de sus consejos, compañía y por hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

Le agradezco al profesor Ángel García por aceptar ser parte de este proyecto, su asesoramiento y paciencia mostrados.

A mis amigos de la universidad Natalia, Eduardo, Yaravid, Carlos, Ignacio, Juan Manuel, Mario por haber compartido este tiempo dentro de la facultad por acompañarme durante esta trayectoria de aprendizaje, por su amistad y por estar presente en esos momentos especiales.

A mis compañeros de trabajo Raúl, Eduardo, Jorge, Lizeth, Delfino y Anabel por su apoyo incondicional, consejos y experiencias compartidas durante esta etapa de mi vida.

A todos aquellos que con sus buenas ideas ayudaron a reforzar este trabajo.

A los miembros del jurado por el tiempo y disposición mostrada en la revisión de este escrito.

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Listado de Términos

Abreviaturas	Significado	Abreviaturas	Significado
ITUs	Infecciones del Tracto Urinario	Tris	Trisaminometano
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Extraintestinales Patógenas (del inglés Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i>)	EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatógena (del inglés Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>)	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
IBC	Comunidades Bacterianas Intracelulares (del inglés Intracellular Bacterial Communities)	BSA	Albumina de Suero Bovino (Del inglés Bovine Serum Albumine)
SPATEs	Serin Proteasas Autotransportadas de la Familia Enterobacteriaceae (Del inglés Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae)	BCIPT/NBT	Combinación de nitroazul de tetrazolio con una sal de p-toloidina 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato
Pet	Toxina Codificada en el Plásmido (proveniente del inglés Plasmid Encoded Toxin)	M	molar
Pic	Proteína Involucrada en la Colonización (Del inglés Protein Involved in Colonization)	mM	milimolar
PicU	Proteína Involucrada en la Colonización de <i>E. coli</i> Uropatógena (Del inglés Protein Involved in colonization from UPEC)	mL	mililitros

Sat	Secreted Autotransported Toxin	°C	grados centígrados
HlyA	Hemolisina α	Min	minutos
CNF-1	Factor Necrotizante Citotóxico 1 (Del inglés Cytotoxic necrotizing factor 1)	μ L	Microlitros
PAI	Isla de Patogenicidad (Del inglés Patogenicity Island)	nm	Nanómetros
UFC	Unidad Formadora de Colonias	mA	miliamperes
KDa	Kilodaltons	PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
Ac	Anticuerpos	pNPP	Paranitro fenil fosfato
Ag	Antígeno	D.O	Densidad óptica
IgG	Inmunoglobulina G	DGE	Dirección General de Epidemiología
KHL	Hemocianina de la lapa californiana (Del inglés Keyhole limpet hemocyanin)	ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
CL	Caldo Luria	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

DEFINICIONES

Patotipo: Este término se refiere a un grupo de cepas bacterianas aisladas de una misma especie que tienen un proceso similar de patogénesis en un hospedero específico ya que comparten un conjunto de genes de virulencia.

Plasticidad genómica bacteriana: Término que describe la diversidad y flexibilidad genética. Una alta plasticidad genómica depende de los elementos genéticos móviles como p. ej. los plásmidos y transposones. Es la capacidad de una bacteria de integrar con facilidad información genética externa a través de un proceso de conjugación, transducción o transformación e insertarlo en su genoma.

Antígeno: Molécula que reacciona de manera específica con un anticuerpo o con los receptores de una célula sensibilizada.

Inmunógeno: Sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Epítotope: Secuencia específica de un antígeno macromolecular al cual se une a un anticuerpo. Existen epítotos lineales, conformacionales y discontinuos. Generalmente los epítotos lineales son secuencias compuestas por 4 a 10 aminoácidos.

Mimototope: Es una secuencia molecular que tiene la capacidad de mimetizar un epítotope de un antígeno en particular.

Fagototope: Fagos que expresan en su superficie mimototos del antígeno analizado

Anticuerpos policlonales: Mezcla compleja de anticuerpos producidos a partir de distintas clonas de linfocitos B que reconocen múltiples epítotos en un mismo antígeno.

Anticuerpos monoclonales: Anticuerpos producidos por una clona de linfocito B que se une a un único epítotope y por lo tanto son específicos

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I RESUMEN	11
II INTRODUCCIÓN	13
III MARCO TEÓRICO	14
III.1 Las infecciones del tracto urinario.....	14
III.2 Etiología.....	16
III.3 <i>Escherichia coli</i> Uropatógena (UPEC).....	17
III.3.1 Factores y mecanismo de virulencia en UPEC.....	18
III.3.2 Exotoxinas.....	20
III.4 SPATEs (Serin Proteasas Autotransportadas de la Familia Enterobacteriaceae) en UPEC.....	21
III.4.1 Proteína Involucrada en la Colonización (Pic U).....	22
III.4.2 Toxina autotransportada vacuolizante (Vat).....	22
III.4.3 Toxina autotransportada secretada (Sat).....	23
III.5 Diagnóstico de las infecciones bacterianas del Tracto Urinario.....	24
III.5.1 Técnicas inmunoquímicas.....	27
III.5.2 Técnicas inmunoenzimáticas.....	30
III.5.3 Phage display (Presentación de Fagos).....	33
III.6 Obtención de anticuerpos antimimotoxos de Sat.....	35
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
V HIPÓTESIS	37
VI OBJETIVOS	38
VI.1 Objetivos generales.....	38
VI.2 Objetivos particulares.....	38
VII MATERIALES Y MÉTODOS	39
VII.1 Tipo de Estudio.....	39
VII.2 Variables.....	39
VII.3 Purificación de las proteasas de serina PetS260I, Pic y Sat.....	39

VII.4 Obtención de las Gammaglobulinas de los sueros antimimotoxos y sueros anti proteasas Pet, Pic y Sat.....	40
VII.5 Ensayo de ELISA.....	41
VII.5.1 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotoxos en contra de la proteína Sat.....	41
VII.5.2 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotoxos en contra de su péptido sintético homólogo...	43
VII.5.3 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotoxos en contra de las proteasas de serina PetS260I y Pic.....	44
VII.6 Ensayo de Dot-Blot.....	45
VII.6.1 Detección de Sat por los anticuerpos anti-Fago B17.....	45
VII.6.2 Detección de PetS260I, Pic y LPS por los anticuerpos Anti-Fago B17.....	47
VII.6.3 Análisis microbiológico de orina.....	48
VII.6.4 Detección de Sat en una muestra de orina.....	49
VII.6.5 Detección de Sat en orina cultivada con las clonas de <i>E. coli</i> CFT073 y <i>E. coli</i> 049766.....	50
VIII RESULTADOS.....	52
VIII.1 Selección de la clona mínima productora de las proteasas PetS260I, Pic y Sat.....	52
VIII.2 Purificación de las SPATE´s PetS260I, Pic y Sat.....	53
VIII.3 Purificación, caracterización y cuantificación de las inmunoglobulinas Anti-Pet, Anti-Pic, Anti-Sat, Anti-Péptido AIDLTM, Anti-Fagotopo B17 e IgGs de Suero Preinmune.....	59
VIII.4 Ensayos ELISA.....	60
VIII.4.1 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotoxos en contra de Sat.....	60
VIII.4.2 Reactividad de los anticuerpos antimimotoxos Anti-Péptido AIDLTM, Anti-Fagotopo B17 contra el péptido sintético homólogo por el método de ELISA.....	64

VIII.4.3 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotopos y anticuerpos Pre-inmunes contra las SPATEs PetS260I y Pic por el método de ELISA.....	65
VII.5 Ensayos Dot-Blot.....	68
VIII.5.1 Evaluación de la reactividad de las IgGs Anti-Fagotopo B17 en contra de Sat.....	68
VIII.5.2 Evaluación de la IgG Anti-Fagotopo B17 contra PetS260I, Pic y LPS por el método de Dot-Blot.....	71
VIII.5.3 Detección de Sat en una muestra de orina.....	73
VIII.5.3.1 Determinación de Sat en orina inoculada, utilizando anticuerpos Anti-Fagotopo B17 y Anti-Sat.....	73
VIII.5.3.2 Determinación de Sat en orina inoculada con las cepas de <i>E. coli</i> CFT073 y 049766.....	75
IX DISCUSIÓN.....	78
X CONCLUSIONES.....	93
XI PERSPECTIVAS.....	94
XII REFERENCIAS.....	95
XII ANEXOS.....	100
XII.1 Lista de materiales.....	100

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Modelo del mecanismo de virulencia de UPEC en el tracto urinario.	20
Figura 2. Secuencia básica de la técnica inmunoenzimática indirecta.	33
Figura 3 Selección de la clona mínima productora de PetS260I y Pic. Perfil electroforético por SDS-PAGE al 8%.....	53
Figura 4 Perfil cromatográfico de PetS260I.....	54
Figura 5 Purificación de PetS260I. Análisis por SDS-PAGE al 6%.....	55
Figura 6 Perfil cromatográfico de Pic.....	55
Figura 7 Purificación de Pic. Análisis por SDS-PAGE al 8%.....	56
Figura 8 Selección de Sat de diferentes Lotes. Caracterización por SDS-PAGE.....	58
Figura 9 Selección de Sat de diferentes Lotes. Identificación de Sat por Western-Blot de diferentes lotes.....	58
Figura 10 Caracterización de las inmunoglobulinas G purificadas.....	60
Figura 11 Ensayo de ELISA: Evaluación de la reactividad de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de Sat.....	62
Figura 12 Ensayo de ELISA: Análisis de la reactividad de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de Sat.....	63
Figura 13 Ensayo de ELISA: Evaluación de la reactividad de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago en contra de un péptido sintético con la secuencia MSPFAIDLTMVS.....	65
Figura 14 Ensayo de ELISA: Reactividad inespecífica de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de Pic y PetS260I.....	67
Figura 15 Ensayo de Dot-Blot. Reconocimiento de Sat por diferentes inmunoglobulinas....	70
Figura 16 Ensayo de Dot-Blot. Detección de Sat por el Anti-Fago B17 y su anticuerpo homologo	70
Figura 17 Ensayo de Dot-Blot. Detección de Sat por los anticuerpos Anti-Fago B17 y Anti-Sat.....	71
Figura 18 Ensayo de Dot-Blot. Reconocimiento de PetS260I y Pic por los anticuerpos Anti-Fago B17 y homólogos correspondientes.....	72
Figura 19 Ensayo de Dot-Blot. Reconocimiento de LPS (<i>E. coli</i> O157).....	73
Figura 20 Ensayo de Dot-Blot. Detección de Sat en orina.....	75
Figura 21 Detección de Sat por Dot-Blot en orina inoculada con la cepa CFT073 y 049766.....	77
Figura 22 Identificación de Sat en las muestras de orina centrifugadas y filtradas.....	77

I RESUMEN

Sat es una serín proteasa autotransportada de la subfamilia de las SPATEs. Sat es considerada un marcador de virulencia asociado a *Escherichia coli* Uropatogena (UPEC), principal bacteria causante de infecciones del tracto urinario. En el mecanismo de patogenicidad la secreción de esta toxina se encuentra relacionada con la persistencia del patógeno en el huésped. Este efecto sumado a la selección de cepas resistentes por el manejo inadecuado de antimicrobianos, provoca que los tratamientos empíricos no sean efectivos lo que a su vez origina una recurrencia de la infección y secuelas en el paciente. Por tal motivo el contar con un método de screening para el diagnóstico de UPEC secretora de Sat permitirá al médico proporcionar un seguimiento oportuno con la aplicación de un tratamiento adecuado en base a estudios de antibiograma. En el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina se han realizado una serie de proyectos encaminados al desarrollo de un método de inmunodiagnóstico de cepas UPEC secretoras de Sat. En la primera etapa se utilizó la técnica de Phage display para identificar motivos inmunodominantes de la toxina. Mediante esta tecnología se obtuvo al fago B17 (fagotopo) con una secuencia aminopeptídica que mimetiza un epítipo de Sat. Como resultado de la inmunización con el fagotopo y un péptido sintetizado con la misma secuencia identificada (MSPFAIDLTMUVS) se obtuvieron los anticuerpos antimimotopos anti-Fago B17 y anti-Péptido, respectivamente, los cuales se utilizaron como reactivos en este trabajo. En este proyecto se planteó el uso de Dot-Blot como método de inmunodiagnóstico, sin embargo, el estudio partió con una serie de pruebas iniciales por ELISA para evaluar la reactividad de los anticuerpos antimimotopos. Por ELISA se realizaron pruebas de especificidad empleando a PetS260I y Pic dos proteínas pertenecientes a la misma subfamilia de Sat. De la misma forma se empleó el péptido sintético MSPFAIDLTMUVS con la secuencia mimetizada de Sat. La reactividad observada a concentraciones variables de antígeno y anticuerpo determinó la sensibilidad y el rango de concentraciones óptimas de uso. Los datos obtenidos por ELISA fueron aplicados al método de Dot-Blot, con este último se estudió la reactividad y especificidad de los anticuerpos

antimimotopos con otras SPATEs (PetS260I y Pic) además de LPS. Posteriormente se involucró el uso de orina inoculando concentraciones conocidas de la proteína Sat, seguido del desarrollo de un ensayo de Dot-blot con los anticuerpos antimimotopos. La reactividad de los anticuerpos en orina origino la realización de un ensayo *in vitro* con dos cepas productoras de Sat. Las cepas de *E. coli* CFT073 y 049766 fueron cultivadas en orina para evaluar la respuesta de los anticuerpos antimimotopos en contra de la proteína nativa secretada en orina. En el ensayo además se evaluó la centrifugación y filtración (0.22 μm) como métodos para el tratamiento de la orina obtenida con las clonas cultivadas. Al final el método de Dot-Blot resulto útil empleando los anticuerpos anti-Fago B17 en la detección de Sat en orina, estos anticuerpos pueden ser aprovechados también para la detección de Pic, una proteína homóloga a PicU que al igual que Sat se encuentra asociada a cepas UPEC. El tratamiento de la orina por centrifugación permite obtener buenos resultados y una muestra de orina libre de partículas grandes. La utilidad de esta prueba como screening debe ser evaluada en muestras reales de pacientes con infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli*.

II INTRODUCCIÓN

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es el principal patógeno implicado en la etiología de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU), al respecto es responsable entre el 70 y 90% de las ITU de la comunidad y del 60% de las de origen intrahospitalario. UPEC, pertenece al grupo de *E. coli* virulenta que produce infecciones extraintestinales (ExPEC). La capacidad para ubicarse en el tracto urinario se debe a la plasticidad genómica de la bacteria, que le permite adaptarse a vivir en un ambiente diferente al de su hábitat natural, invadir y persistir. La expresión de los llamados factores de virulencia entre los que se incluye la resistencia a los antimicrobianos. Por sus características las ITU se han clasificado como agudas y crónicas, estas a su vez se definen como persistentes (cuando el agente responsable siempre es el mismo) y recurrentes (cuando diferentes microorganismos son los causantes del cuadro). La consecuencia de las infecciones crónicas es el daño renal permanente con la consecuente insuficiencia funcional de dicho órgano. La identificación de las clonas de *E. coli* responsables de las infecciones crónicas es difícil de realizar en laboratorios clínicos y Hospitales, debido a que se requieren procedimientos como la tipificación serológica o técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), procedimiento que identifica los genes relacionados con expresión de la virulencia de la bacteria. Lo anterior plantea la necesidad de desarrollar procedimientos para el diagnóstico rápido y preciso de las ITU asociadas a UPEC. Sat (Secreted Autotransported Toxin) es una proteasa asociada al daño celular que se sabe es secretada por el 40-50% de cepas de UPEC, lo que permite considerarla como un buen candidato para su búsqueda en la orina de pacientes con ITU. En el laboratorio

de investigación básica de la Facultad de Medicina en la UNAM, se han desarrollado proyectos dirigidos al estudio de esta toxina. En un estudio previo al respecto, se realizó la identificación de motivos inmunodominantes de la toxina Sat, en el mismo se utilizó la técnica *in vitro* denominada Phage display, como producto de los resultados se obtuvieron fagotopos que presentaban en una de sus proteínas de superficie (P-III), una secuencia de aminoácidos que mimetizan (mimotopo) un sitio inmunodominante de Sat. A partir de la secuencia se obtuvo un péptido sintético, con este se inmunizaron conejos para la obtención de anticuerpos policlonales antimimotopos. En este estudio se evaluó la capacidad de dichos anticuerpos para reconocer la toxina Sat en muestras de orina inoculadas con la toxina purificada. Con los resultados que se obtengan, se podrá proponer el desarrollo de un método de inmunodiagnóstico para UPEC productora de Sat, lo que orientara al médico a tomar la decisión de realizar un urocultivo ya que este grupo de bacterias se asocian a la recurrencia de ITUs.

III MARCO TEÓRICO O FUNDAMENTACIÓN

III.1 Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario se definen como una respuesta inflamatoria del epitelio renal con presencia de glóbulos blancos (piuria), asociadas a la aparición de microorganismos en orina (bacteriuria)¹. Pueden presentarse síntomas como malestar en la región lumbar así como urgencia y frecuencia al orinar ya sea con dolor, ardor y/o presencia de sangre (hematuria)², esta última relacionada a un daño renal grave. Sin embargo, existen casos donde la infección puede ser asintomática representando riesgos en mujeres embarazadas y personas con prescripción

quirúrgica urológica³. Las ITU pueden clasificarse tomando en cuenta distintos criterios, sin embargo, el más común es ubicando el sitio anatómico de la infección, de acuerdo a esto, pueden dividirse en ITU bajas y altas^{4,1}. Las ITU bajas incluyen síndromes como uretritis, cistitis y prostatitis, por otro lado, las ITU altas implican abscesos intra-renales y pielonefritis. Asimismo las ITU pueden designarse como complicadas o no complicadas considerando la existencia previa de anomalías anatómo-funcionales o patológicas del tracto urinario que puedan comprometer la funcionalidad de vejiga y riñones⁵, por ejemplo la presencia de cicatrices renales, insuficiencia renal crónica, diabetes, cálculos renales así como la existencia de inmunosupresión o sonda vesical⁴. Las infecciones urinarias permanecen como uno de los padecimientos más frecuentes, ubicándose como la tercera causa de morbilidad en México (boletín epidemiológico Diciembre del 2009), afectando a una cantidad variable de individuos con diferentes edades. En un análisis poblacional por sexos⁶, se observó una mayor frecuencia en varones durante los primeros tres meses de vida, sin embargo, en edades posteriores la prevalencia de la infección aumenta en mujeres. Este cambio se argumenta por las diferencias anatómicas que existen entre ambos sexos, es decir, la corta distancia entre la uretra y el recto en la mujer lo que hace que sean más susceptibles a infectarse por patógenos bacterianos por medio de una vía ascendente⁴. Por otro lado las malas costumbres de higiene íntima (limpieza retrograda), dan lugar a que se presente la contaminación de la uretra por bacterias de la biota intestinal. En edades posteriores a los 50 años el riesgo de contraer una ITU aumenta en ambos sexos, en el varón a causa de problemas funcionales (como modificaciones anatómicas en la próstata o el reflujo vesico-uretral) y en la mujer por cambios hormonales

implicados en el proceso de menopausia, que ocasionan un cambio en las condiciones de la biota vaginal. A pesar de las medidas antimicrobianas impuestas, la prevalencia de la infección se mantiene alta lo que a su vez genera una mala calidad de vida en los pacientes, cepas con propiedades multiresistentes (complicando el tratamiento) y un impacto económico alto en el sector del cuidado de la salud⁴.

III.2 Etiología

Si bien es verdad que el tracto urinario en condiciones normales permanece libre de bacterias, la presencia de factores predisponentes provoca que pueda ser invadido a través de diversas rutas. La infección del tracto urinario puede ser por vía ascendente o hematógena; la ascendente se observa en las infecciones de individuos sin trastornos, esta vía es la que se relaciona por la contaminación con las bacterias presentes en el colon que llegan a la uretra, la vejiga e incluso pueden infectar el riñón (pielonefritis). La vía hematógena es muy rara cuando se trata de patógenos urinarios comunes, se ha relacionado con mayor frecuencia en pacientes con bacteriemia o fungemia originada por microorganismos transmitidos por sangre (p. ej. *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*). Dentro del grupo de bacterias que pueden colonizar el tracto urinario predominan los bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae^{1,4,7}, por lo general bacterias del género, como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter, spp* y *Serratia spp* y una minoría de bacterias Gram positivas que pueden infectar este ambiente como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. No obstante, el

microorganismo aislado en el 80% de los casos de las infecciones de la comunidad es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Esta bacteria causa daño al epitelio renal mediante la expresión de factores de virulencia (adquiridos vía transferencia de DNA horizontal de plásmidos, transposones, bacteriófagos, e islas de patogenicidad⁸), que le permiten adaptarse y obtener nutrientes para sobrevivir al microambiente del hospedero, tales factores han sido estudiados por mucho tiempo en cepas UPEC aisladas de pacientes con pielonefritis como CFT073(O6:K2:H1)² y de pacientes con cistitis como las cepas 536 (O6:K15:H31) e UTI89(O18:K1:H7)⁸.

III.3 *Escherichia coli* uropatógena (UPEC)

UPEC forma parte del grupo de *E. coli* extraintestinales patógenas (ExPEC) caracterizadas por ocasionar daño en ambientes diferentes al tracto intestinal², estas cepas forman un grupo bacteriano muy heterogéneo, debido en gran parte a su variabilidad y elevada plasticidad genómica^{8,9}. El tracto urinario es uno de los ambientes más pobres en nutrientes, sin embargo, UPEC ha adquirido y desarrollado con el paso del tiempo, herramientas que le permiten sobrevivir y adaptarse al contraste del entorno. Este bacilo tiene la capacidad de colonizar el tracto urinario mediante un mecanismo complejo¹⁰, donde intervienen diferentes rasgos de virulencia que interaccionan con las células renales del hospedero para obtener nutrientes, proliferar y desarrollar comunidades bacterianas que provocan la invasión de otras células renales¹⁰. Una vez establecido continua el ciclo de patogenicidad hasta lograr formar biopelículas, estructuras filamentosas o formas quiescentes^{11,12}. La disposición adquirida se ve asociada a la generación de

infecciones recurrentes, que inician de nuevo el ciclo, causando en promedio de tres a seis episodios infecciosos por año en la persona infectada².

III.3.1 Factores y Mecanismo de Virulencia en UPEC

La expresión de los determinantes de virulencia depende mucho de las señales generadas por el entorno del hospedero, una herramienta útil en el repertorio de factores de virulencia empleada al inicio de su proceso patogénico es la adherencia a células del tracto urinario. La adhesión es lograda a través de estructuras de tipo fimbrial principalmente las fimbrias de tipo 1, P, S y F1C, además de las adhesinas H (Fim H), M, y las de la familia Dr. Uno de los pasos fundamentales en el mecanismo de patogénesis de UPEC es la interacción que existe entre Fim H de la Fimbria tipo 1 con distintos receptores de uroplaquina de células epiteliales del tracto urinario¹⁰. Esta interacción desencadenan una serie de procesos de señalización química que resultan en la internalización de la bacteria, y el desarrollo de una estructura similar a un endosoma constituido por una red de filamentos de actina de la célula hospedera^{11,12}. Esta forma puede proliferar llegando a constituir las llamadas comunidades bacterianas intracelulares (IBCs) obteniendo una configuración similar a una biopelícula que funciona como un reservorio persistente, además de proteger contra el reconocimiento del patógeno y de la acción de antibióticos, esta disposición bacteriana fue descrita en tres etapas una temprana al inicio, una intermedia y una tardía. En la última etapa el complejo bacteriano puede migrar en un proceso denominado “fluxing” y adoptar una morfología filamentosa con una longitud de hasta 70 μm ¹¹, facilitando la diseminación de UPEC en el tracto urinario. Como consecuencia de esta invasión se pone en marcha una fase de

exfoliación celular por el hospedero, eliminando cierta cantidad de bacterias y de IBCs, no obstante, se exponen células uroteliales inmaduras que son blanco fácil para las bacterias que logran permanecer en el lumen epitelial^{11,12}. Una vez establecida en las células inmaduras puede adoptar otra disposición designada como reservorios intracelulares quiescentes (QIRs), esto contribuye a su establecimiento en la célula por un largo periodo hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables para su desarrollo, de manera consecuente se da la reincidencia en la infección. Otra herramienta útil para la bacteria presente en el genoma de UPEC son los genes para la expresión de sideróforos que forman parte de los sistemas de adquisición de hierro, los principales sistemas están conformados por la enterobactina, aerobactina, salmochelina y yersinobactina^{2,8,13}. Estos sideróforos permiten a la bacteria competir por cantidades extremadamente bajas de hierro en la orina, mineral necesario para llevar a cabo diferentes funciones, por ejemplo la reducción de oxígeno en la síntesis de ATP en condiciones aerobias o la reducción de precursores ribosilados de ADN¹³, reacciones enzimáticas esenciales para su metabolismo.

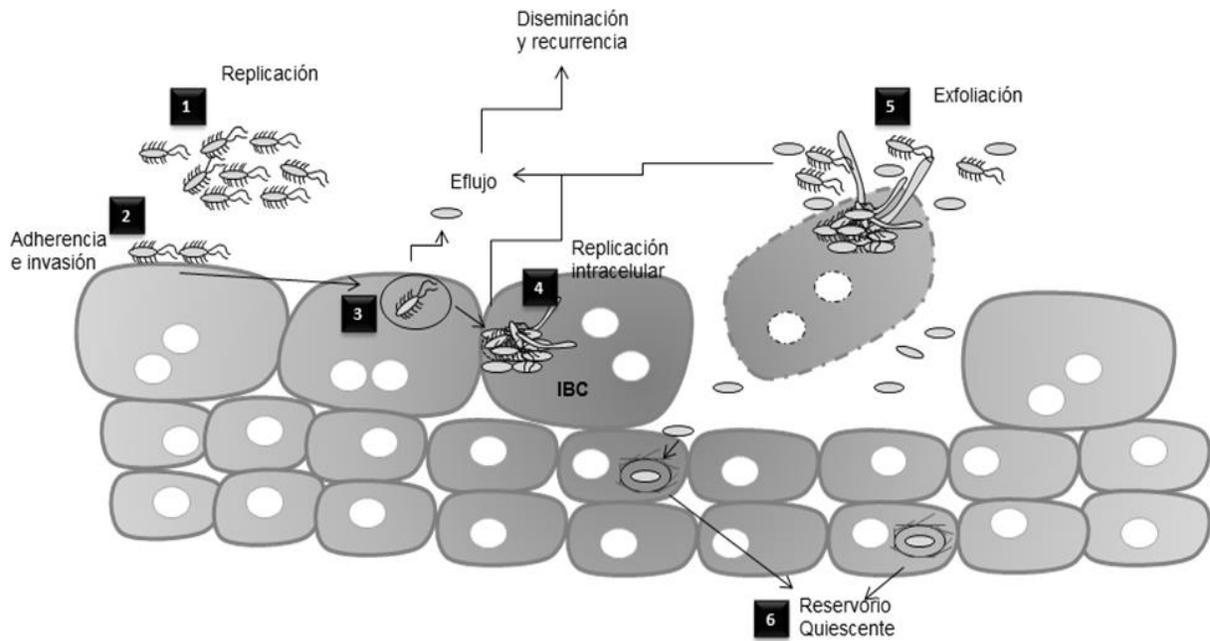


Figura 1. Modelo del mecanismo de patogenicidad de UPEC en el tracto urinario. Se muestran las diferentes fases del proceso patogénico de UPEC, desde la replicación (1), el proceso de adherencia a las células uroepiteliales (2) en donde se produce una interacción entre la Fim H de la fimbria tipo 1 con receptores de uroplaquina que al final resultan en la internalización del bacilo (3). Puede proliferar y formar comunidades intercelulares de bacterias o IBC por sus siglas en inglés (4) o filamentos que pueden eliminarse mediante un proceso de exfoliación celular del hospedero (5), sin embargo, puede también adoptar un estado de reservorio quiescente (6). Las estructuras que puede tomar contribuyen a su persistencia y recurrencia en el tracto urinario.

Tomado de FEMS Microbiol Rev 2012; 36:616-648, con algunas modificaciones.

III.3.2 Exotoxinas

Dentro de las estrategias utilizadas por UPEC en su mecanismo de virulencia se encuentra la secreción de toxinas como la hemolisina α (HlyA), el factor citotóxico necrotizante (CNF-1) y el grupo de serina proteasas autotransportadas (SPATEs) como la toxina autotransportadora secretada (Sat), la proteína involucrada en la colonización (PicU) y toxina autotransportada vacuolizante (Vat). Todas estas toxinas ejercen un efecto de daño importante sobre las células del hospedero. La participación de HlyA en el mecanismo de patogenicidad, es proporcionar a la

bacteria nutrientes como el hierro después de lisar los eritrocitos, por su parte CNF-1 ayuda a la bacteria a evadir el sistema inmune innato, disminuyendo la capacidad fagocítica de los polimorfonucleares¹⁴ así como en el proceso de estimulación *in vitro* de apoptosis sobre células epiteliales de vejiga, acontecimiento que se asoció *in vivo* a la exfoliación celular, lo que permite que UPEC invada células inmaduras.

III.4 SPATEs (Serin Proteasas Autotransportadas de la Familia Enterobacteriaceae) en UPEC

Las SPATEs forman parte de la familia de serín proteasas autotransportadas y utilizan para estos el sistema de secreción de tipo V. Las SPATEs poseen una estructura bien organizada constituida por un péptido señal en la región N-terminal, el dominio pasajero o inductor y un translocón o dominio de β -barril en la región C-terminal^{15,16,17}. El mecanismo de transporte a través de la pared celular de las bacterias Gram negativas inicia con la interacción del péptido señal con un complejo de proteínas pertenecientes a una Vía General de Secreción (Por su Significado en Ingles General Secretary Pathway o Vía Sec), este contribuye el paso de la toxina, del espacio citoplasmático y a través de la membrana interna al espacio periplásmico, en este punto ocurren diferentes eventos, inicialmente por acción de proteínas chaperonas se evita la proteólisis de la proteasa, además se da un correcto plegamiento del translocón que en la membrana externa forma una estructura de β -barril similar a una porina que facilita la salida del dominio pasajero para que sea expuesto en la superficie de la bacteria. Solo algunas SPATEs son liberadas al espacio extracelular por auto-proteólisis o por otras enzimas localizadas en la membrana externa de la bacteria. El inductor o dominio pasajero presenta un

peso mayor a los 100 kDa y su función está relacionada con el efecto citopático, citotóxico, en procesos de inflamación, resistencia al suero, hemaglutinante, en el secuestro de hierro y como adhesina en la células del huésped¹⁷. UPEC secreta algunas SPATEs (Pic U, Vat y Sat) asociados a la virulencia de la bacteria.

III.4.1 Proteína Involucrada en la Colonización (Pic U)

Pic U, es una proteína con propiedades proteolíticas sobre mucina, pepsina y el factor V de la coagulación¹⁸, actividades similares a las descritas para Pic, serin proteasa secretada por *E. coli* Enteroagregativa (EAEC). La participación de Pic U en el mecanismo de patogenicidad de UPEC, se relaciona en etapas tempranas, por su capacidad para degradar la capa de moco del tracto urinario, favoreciendo la colonización por UPEC, en esta etapa se sugiere la acción sinérgica de Sat y Vat, SPATEs secretadas también por las cepas UPEC¹⁶, sin embargo, la participación de Pic U *in vivo* no ha sido demostrada.

III.4.2 Toxina Autotransportada Vacuolizante (Vat)

Vat es una serin proteasa identificada originalmente en la isla de patogenicidad designada VAT-PAI perteneciente a una variante de *E. coli* patógena en Aves (APEC)¹⁹, años más tarde fue identificada en el genoma de la cepa de UPEC (CFT073) aislada de una mujer con pielonefritis⁹. En aves la participación de Vat se ha asociado a la celulitis aviar, provocando daños graves a nivel de tejido pulmonar, subcutáneo, adiposo y muscular, que en la mayoría de los casos ocasionan la muerte del ave infectada. Este efecto se ha asociado a su actividad vacuolizante en líneas celulares, sin embargo, en UPEC se desconoce su participación en el

mecanismo de patogenicidad. Algunos autores creen que el efecto vacuolizante presentado en Vat puede jugar un papel similar al de Sat en células uroteliales, sin embargo, no se ha encontrado el sustrato de esta citotoxina²¹.

III.4.3 Toxina Autotransportadora Secretada (Sat)

Sat es una toxina proteolítica de 107 KDa descrita en cepas de *E. coli* uropatógenas asociadas a pielonefritis^{22,23}. El gen de Sat fue ubicada en la isla de patogenicidad II (PAI II) de la cepa pielonefrítica de *E. coli* CFT073²². Los efectos bioquímicos de Sat han sido reportados *in vitro*, incluyendo la degradación de caseína, espectrina, fodrina (espectrina no eritróide), factor V de coagulación pero no de mucina o pepsina^{21,24}. En líneas celulares de riñón (VERO) y vejiga (HK-2)⁶ Sat promueve efectos citopáticos y citotóxico²³. En un modelo de ratón de ITU ascendente, Sat promueve lesiones en el tracto urinario como disolución y vacuolización glomerular¹⁵. Esta toxina es capaz de internalizarse en las células del hospedero mediante una vía retrograda y escindir a la fodrina, proteína estructural de la membrana celular, que forma parte importante del citoesqueleto eucarionte²⁴. Además, Sat se ha asociado con la generación de lesiones a nivel de las uniones intercelulares o “tight junctions”²⁵. Por lo mencionado anteriormente, Sat es considerada como una de las toxinas con mayores repercusiones en las infecciones del tracto urinario superior.

III.5 Diagnóstico de las Infecciones Bacterianas del Tracto Urinario

El diagnóstico de una infección urinaria es realizada mediante el análisis de una muestra de orina, un estudio completo consta de los exámenes físico, químico, microbiológico y bioquímico⁷. Uno de los puntos importantes en el urianálisis es la toma de muestra. El espécimen a analizar debe de ser colectado apropiadamente, uno de los procedimientos con los que se puede obtener una muestra de orina en forma aséptica y adecuada es mediante la punción vesical suprapúbica. Con esta se consigue una representación fiel del estado estéril de la vejiga y riñones, sin embargo, la técnica es reservada casi exclusivamente para pacientes pediátricos (neonatos y niños pequeños), por la dificultad que existe en estos de obtener una muestra adecuada. A pesar de que la punción suprapúbica y otras técnicas de toma de muestra (como la inserción de catéteres en pacientes), proporcionan un espécimen correcto, no están exentas de riesgos ya que con éstas se pueden introducir bacterias al paciente. Por tal motivo uno de los métodos preferentes es la recolección del chorro medio de la primera orina de la mañana. Previo a la recolección de la orina es recomendado realizar la limpieza general de la zona que rodea a la uretra con solución jabonosa y abundante agua, ya que evita la contaminación de la muestra con bacterias provenientes de la biota uretral. Sin embargo, en algunas ocasiones las instrucciones acerca del procedimiento proporcionadas al paciente son incompletas o no quedan del todo claras, dando como resultado una muestra (espécimen) deficiente. Luego de la recolección de la orina esta debe de ser transportada al laboratorio lo antes posible para ser procesada, ya que de no ser así puede afectar directamente algunos parámetros

del análisis como es el caso de la cuenta de organismos por mililitro de orina en el urocultivo.

La medición de los primeros parámetros de la muestra son realizados a simple vista (examen físico) registrando el color, aspecto, claridad y turbidez de la orina, posteriormente se efectúa un examen químico utilizando una tira reactiva que toma en cuenta la medición semicuantitativa de 10 parámetros^{4,7} (glucosa, bilirrubina, cetonas, densidad, sangre, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos y leucocitos) proporcionando información acerca del estado del hígado (bilirrubina y urobilinógeno), funcionando también para la monitorización de pacientes con diabetes mellitus (glucosa, cetonas) y por supuesto para el tamizaje de enfermedades en el tracto urinario (proteínas, sangre, leucocitos, nitritos, gravedad específica, pH). De igual modo puede realizarse un diagnóstico presuntivo de bacteriuria (antes de la identificación exacta del microorganismo), tomando en cuenta resultados positivos en las zonas reactivas correspondientes a nitritos y esterasas leucocitarias de la tira reactiva, así como el conteo de 10 o más bacterias por campo en el análisis por microscopio del sedimento urinario.

Por otra parte, en el proceso de diagnóstico puede ser indicada la realización de un urocultivo, así como la posterior identificación del microorganismo y una prueba de sensibilidad antimicrobiana^{4,7}. En el urocultivo pueden emplearse distintos medios de cultivo, dentro de los más utilizados para la identificación microbiológica se encuentra el agar con sangre de carnero al 5% así como el agar Mc Conkey, EMB (Agar Eosina Azul de Metileno) y en algunas ocasiones tomando en cuenta el costo por muestra, medios de aislamiento para bacterias Gram positivas (p. ej. Agar colistina-ácido nalidixico o agar feniletilalcohol)⁷. Al final, una persona con una ITU

presenta en el urocultivo un conteo bacteriano de entre 10,000 a 100,000 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de orina⁷ (Kass), por el contrario una persona sana tiene un conteo inferior a 10^2 UFC/ml o no presenta ninguna UFC/ml, y una muestra se considera contaminada en caso de obtener tres o más diferentes tipos de colonias (bacterias) y con una cuenta mayor o igual a 10^5 UFC/ml ⁴, en consecuencia este estudio sigue siendo considerado valioso en el laboratorio clínico para el diagnóstico de las ITU. Una vez confirmada la presencia de bacterias en orina, se procede a la identificación del microorganismo o microorganismos tomando en cuenta su perfil bioquímico con diversos sustratos, asimismo se evalúa la resistencia o sensibilidad a un conjunto estándar de antibióticos u otros agentes quimioterapéuticos mediante la prueba con discos impregnados con el antimicrobiano⁷ (Prueba de Kirby-Bauer).

Puesto que la mayoría de las ITU son ocasionadas por bacterias Gram negativas, generalmente el personal médico solo recurre a realizar un análisis profundo en la orina si el tratamiento empírico recetado no incide de forma significativa sobre la condición clínica del paciente, dado que trata en gran parte reducir los costos del mismo al enfocarlos en un tratamiento adecuado que erradique la enfermedad. Si bien estas medidas establecidas suprimen los síntomas del paciente, se ha visto que esta no es una forma preventiva para reducir el número de episodios con reinfecciones por microorganismos que presentan multiresistencia y rasgos de virulencia²⁶. En la ciudad de México UPEC ha presentado un incremento en la resistencia antimicrobiana frente a cefalosporinas, fluoroquinolonas y trimetropin²⁷, que en consecuencia limita las opciones terapéuticas disponibles. Por consiguiente UPEC es uno de los microorganismos con mayor impacto clínico en el diagnóstico

de las ITU, de modo que la identificación correcta de este patotipo de *E. coli* es uno de los pasos fundamentales para el manejo integral de los pacientes. No obstante, con los estudios de diagnóstico establecidos en el laboratorio clínico no se puede asegurar que el agente causal es una cepa de UPEC, solo mediante pruebas serológicas²⁶ del microorganismo aislado o por pruebas de biología molecular como la de PCR²⁸, que ponen de manifiesto genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad. El análisis molecular de una cepa bacteriana demora tiempo en identificar correctamente a UPEC, además del impacto económico que ejerce en los laboratorios de diagnóstico y en la salud del paciente si no es tratado a tiempo. Una de las opciones para el diagnóstico clínico podría ser mediante el uso de ensayos inmunoquímicos rápidos, que hagan evidente algunos de los marcadores de virulencia en UPEC.

III.5.1 Técnicas Inmunoquímicas

Desde el descubrimiento de los anticuerpos (Ac) y su utilización como una herramienta de reconocimiento molecular, se puso en marcha una revolución tecnológica que dio origen al desarrollo de técnicas, métodos e instrumentos²⁹ que aprovecharon con gran potencial la especificidad presentada frente a una sustancia para cuantificarla. Así se crearon los primeros inmunoensayos que constaban de pruebas que comprendían la precipitación con antígenos (Ag) solubles o la aglutinación de antígenos particulados (unidos a glóbulos rojos o partículas inertes)³⁰, midiendo la cantidad del complejo supramolecular formado a simple vista o mediante técnicas de espectrometría, aportando la determinación de una zona de equivalencia entre la cantidad de anticuerpos y antígeno adicionado.

Consecutivamente a la par de estas técnicas, en la búsqueda de sistemas más sensibles se desarrolló en el año de 1950 la técnica de radioinmunoensayo (RIA) donde se estableció un sistema de marcaje con radioisótopos [carbono 14(^{14}C), tritio(^3H), iodo 125(^{125}I)] inicialmente en el antígeno analizado y posteriormente en los anticuerpos utilizados (ensayo inmunoradiométrico), resultando en una cuantificación más precisa y exacta de la sustancia medida, aunque, con los inconvenientes de utilizar materiales radioactivos y el impacto costo-beneficio que esto generaba. Así en la década de los años 60's del siglo pasado, los radioisótopos fueron reemplazados por técnicas de marcaje de anticuerpos con enzimas³¹, iniciando la utilización de métodos inmunoenzimáticos, como los de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés ELISA), Ensayo Inmunológico Multiplicado por Enzimas (por sus siglas en inglés EMIT), siendo estos sencillos, seguros y rápidos. Posteriormente a finales de 1993 se desarrolla un nuevo sistema de marcaje con esteres de acridinio, en donde a través de una reacción química emitían luz propia para ser cuantificada, esta técnica fue nombrada de quimioluminiscencia representando otra alternativa simple, barata y muy sensible a comparación de otras técnicas espectrofotométricas. Desde entonces y hasta la actualidad han sido desarrolladas nuevas técnicas y variantes de los procedimientos ya establecidos definiendo a los inmunoensayos, como uno de los métodos analíticos más versátiles, caracterizados por presentar alta especificidad generada por la interacción antígeno-anticuerpo, alta sensibilidad con niveles de detección del orden de partes por billón (ppb) o inferiores a un nanogramo, además de ser simples, precisos y relativamente económicos.

En el área del diagnóstico clínico en la salud humana, el uso de inmunoensayos que aprovechan la especificidad de anticuerpos en sus variantes monoclonales o policlonales, han sido utilizados por mucho tiempo como pruebas para diagnóstico de numerosas enfermedades infecciosas así como de cambios metabólicos u hormonales en especímenes derivados de fluidos biológicos (sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, líquido sinovial), en las que principalmente se puede detectar un marcador conservado y homogéneo de la patología³². Sin embargo, uno de los problemas más comunes durante la cuantificación de un analito en un fluido biológico, son las reacciones cruzadas que pueden existir entre los anticuerpos utilizados con moléculas químicamente diferentes pero estructuralmente similares^{32,33}. Otra dificultad es la presencia de proformas, variantes de splicing, fragmentos y complejos del analito, dicho de otra manera, algunos antígenos presentan demasiada heterogeneidad en su forma circulante³². No obstante, ciertos analitos han tomado importancia, especialmente porque pueden ser utilizados para pruebas de screening, que discriminan entre varias patologías así como para monitorear el curso de la enfermedad, por ejemplo el antígeno prostático específico (PSA), la hemoglobina glucosilada, la progesterona, la gonadotropina coriónica humana (CGH) y algunas otras hormonas, en el caso de agentes infecciosos los analitos pueden ser proteínas de la cubierta del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o hepatitis, marcadores de virulencia bacterianos como toxinas, fimbrias, pilis y proteínas de la cubierta de algunos parásitos de importancia clínica. Una de las aplicaciones en la industria del cuidado de la salud, ha sido la implementación de dispositivos tipo “Dip-Stick”, estas pruebas consisten de un sistema de inmunocromatografía de flujo lateral donde existe el reconocimiento del antígeno o

anticuerpos formados durante la seroconversión del paciente en el líquido biológico corporal analizado. Estos dispositivos de diagnóstico han sido muy útiles como pruebas de diagnóstico al lado del paciente³⁴ (por sus siglas en inglés: Point of Care Testing-POCT), con la premisa de obtener resultados en un tiempo muy breve (minutos), exactos y eficientes. Con respecto a su aplicación, las técnicas inmunoquímicas no solo se encuentra limitada al cuidado de la salud humana ya que su uso se ha extrapolado a diversas áreas de la industria³⁵, tales como la agrícola, alimenticia, farmacéutica, ambiental, veterinaria, en el área forense, deportiva (pruebas de antidopaje) y del cuidado sanitario por mencionar algunas.

III.5.2 Técnicas Inmunoenzimáticas

La introducción de los anticuerpos ligadas a enzimas fue una de las formas innovadoras de amplificar una reacción inmunoquímica para la localización y cuantificación de un analito específico, este hecho fue logrado en parte a los avances realizados en el área de la inmunohistoquímica. Uno de los métodos heterogéneos reconocidos dentro de este ámbito es sin duda el ensayo de ELISA (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay), este se caracteriza por ser una de las técnicas con mayor auge en el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas³⁶, lo anterior está dado por su sensibilidad y capacidad de detectar concentraciones muy bajas del antígeno analizado. Una de las cualidades de la técnica es que con ella pueden procesarse desde un número pequeños de especímenes hasta grandes lotes de muestras. Esta técnica tiene la peculiaridad de que uno de los reactivos o analitos (el Ag o Ac) es adsorbido en una fase sólida de poliestireno en donde es realizada la inmunolocalización de forma directa o indirecta con un anticuerpo ligado

a una enzima^{30,31}, cuantificando la reacción con el uso de técnicas espectrofotométricas. El método directo funciona solo para la detección de antígenos con un anticuerpo marcado. Este método tiene la ventaja de ser rápido, sencillo aunque menos sensible y costoso ya que requiere la utilización de un anticuerpo marcado por cada antígeno a medir. En cambio en el método indirecto se pueden detectar antígenos y anticuerpos, mediante la formación de estructuras tipo sándwich con diferentes variantes que dependen esencialmente del analito a evaluar, es decir, para el análisis de antígenos en alguna muestra el anticuerpo primario es adsorbido en la placa realizando un sándwich de tipo Ac1rio-Ag (Analito)-Ac1rio-Ac2rio(conjugado con enzima) y para el análisis indirecto de Anticuerpos se genera un complejo de tipo Ag-Ac1rio(Analito)-Ac2rio(marcado con enzima). Por consiguiente el método indirecto ha llegado a convertirse en uno de los más utilizados, debido a que funciona también para la medición de anticuerpos en el suero de pacientes, y porque aprovecha la capacidad de generar anticuerpos dirigidos contra la región Fc que pueden utilizarse para amplificar la unión de un complejo Ag-Ac primario, haciéndolo más barato y eficiente. La enzima conjugada puede elegirse en base a la capacidad del equipo de lectura, costos y sensibilidad deseada, empleando habitualmente peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, esta última preferida entre la comunidad científica por su bajo costo, fácil conjugación y por la amplia variedad de sustratos que posee³¹.

Es importante mencionar además, la existencia de algunas técnicas moleculares que toman en cuenta el procedimiento empleado en los métodos inmunoenzimáticos, pero que utilizan una fase sólida diferente compuesta por membranas de nitrocelulosa y polifluoruro de vinilideno (PVDF). El ensayo de

western-blot es uno de ellos, el cual se fundamenta en técnicas de electroforesis (separación proteica) e inmunotransferencia donde se identifica una proteína (Ag) de una mezcla molecular de sustancias por la reacción indirecta del complejo Ag-Ac. El revelado de la reacción es realizado por la adición de un sustrato que a su vez precipita sobre la membrana originando una señal colorida o mediante técnicas de quimioluminiscencia. Otra técnica molecular que utiliza como base los métodos inmunoenzimáticos y que es útil en el screening para diagnóstico clínico es el ensayo de Dot-blot, en este método no existe el proceso de separación molecular por electroforesis ni la inmunotransferencia de las muestras como en el western-blot. Esta técnica se fundamenta en la afinidad que tiene la nitrocelulosa por la carga de las proteínas, el ensayo se lleva a cabo colocado la muestra a analizar como puntos (origen de Dot) de 2 a 5µl aproximadamente, después de su aplicación y posterior secado son analizados por una reacción indirecta del complejo Ag-Ac, utilizando el mismo sistema de revelado que en el western-blot. El ensayo de Dot-blot tiene la limitante de ser utilizada solo si es conocida la especificidad del Ac. Considerando lo anterior, estas técnicas han sido aprovechadas para la evaluación de anticuerpos en métodos de diagnóstico de enfermedades parasitarias, bacterianas y virales, así como para la evaluación del estado de inmunidad y seguimiento de seroconversión poblacional inducida por vacunas. Las técnicas inmunoenzimáticas continúan avanzando y a la fecha se han enfocado en el desarrollo de nuevas tecnologías de diseño de anticuerpos³⁷, una de las técnicas con mayor auge en este campo ha sido el método de Phage display^{37,38}.

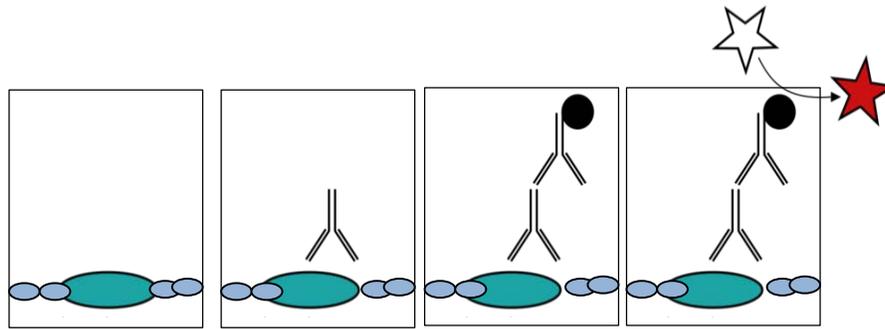


Figura 2. Secuencia básica de la técnica inmunoenzimática indirecta. Se adsorbe el antígeno sobre una fase sólida se continúa con el bloqueo de espacios vacíos con una proteína inerte. En cada fase se realizan enjuagues con una solución de buffer con Tween. Se añade el anticuerpo primario o muestra. Se adiciona un anticuerpo secundario conjugado con una enzima la cual después de cortar el sustrato proporciona un producto coloreado cuando existe reacción.

III.5.3 Phage display (Presentación de Fagos)

Los anticuerpos constituyen una de las herramientas más útiles en el campo del inmunodiagnóstico clínico, han demostrado la capacidad analítica de reconocer específicamente un antígeno frente a una mezcla molecular de especies diferentes. Esta capacidad se ha optimizado conforme a la introducción de tecnologías como la de hibridomas y la generación de anticuerpos monoclonales, minimizando la reactividad inespecífica contra epítopes similares e impropios del analito. Sin embargo, la producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas, origen de alguna manera ciertos obstáculos³⁷ devenidos de las necesidades constantes de contar con opciones que se adapten al investigador, de forma que hicieran posible una manipulación más precisa del método. Planteando a la fecha, una selección artificial de anticuerpos mediante métodos *in vitro*, uno de ellos que se ha popularizado en los últimos años es denominado "Phage display". Este método introducido por George Smith en el año de 1985, consiste en la creación de una biblioteca de péptidos que se expresan al azar en la cubierta del fago filamentoso M13. Algunos de los péptidos expresados sobre los fagos (fagotopos), son

mimotopos del antígeno analizado, permitiendo así la selección de epítopes inmunodominantes^{37,38}. La técnica toma en cuenta el empleo de una fase sólida (microplaca de 96 pocillos) en la cual se adsorben los anticuerpos que seleccionaran los fagos con mayor afinidad, en cada paso se van descartando los fagos no relacionados mediante lavados con amortiguador y amplificando los fagos seleccionados por medio de la infección de una *E. coli* específica. Después de una serie de rondas de selección (biopanning) con los anticuerpos, los fagos seleccionados son secuenciados, y analizados para determinar si existe una secuencia compartida o secuencia consenso. Una vez obtenida la secuencia consenso, puede utilizarse para ubicar el o los sitios inmunodominantes en la secuencia del antígeno, si es que se conoce. Posteriormente los fagos seleccionados pueden utilizarse para la producción de nuevos anticuerpos que van dirigidos contra los sitios inmunodominantes identificados. Por lo dicho anteriormente esta técnica es una de las plataformas inmunológicas que contribuye a la obtención de anticuerpos a través de un mapeo de epítopes, que pueden funcionar para un diagnóstico inmunológico más preciso y costeable. Existen otras aplicaciones notables principalmente en el área de investigación. En el campo de la enzimología pueden determinarse la especificidad de un sustrato así como desarrollar moduladores de sitios activos y alostéricos en una enzima³⁸, en farmacología puede utilizarse para la identificación de agonistas y antagonistas en varios receptores. Otra de las aplicaciones es dentro del análisis de las interacciones que se da entre proteína-proteína.

III.6 Obtención de Anticuerpos Anti-mimotopo de Sat

Uno de los proyectos del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, es el desarrollo de un dispositivo tipo “Dip-Stick” para la detección rápida de UPEC productora de SPATEs. El primer objetivo fue identificar los sitios inmunodominantes en la toxina Sat mediante la técnica de Phage display, utilizando una librería de péptidos al azar de 12 aminoácidos expresados sobre la envoltura de un fago filamentoso M13 (BioLabs New England®) que se expusieron ante IgGs policlonales Anti-Sat adsorbidos a un pozo de una placa de ELISA. Después de 4 rondas de bioselección se obtuvieron fagos con una secuencia consenso de aminoácidos (AIDLTM) que fue localizada en la secuencia lineal de Sat ⁷⁵⁶GIDISGELTMMG⁷⁶⁷ y en el modelo tridimensional de la proteína. Los fagos con la secuencia consenso fueron utilizados para la producción de anticuerpos en conejos. El anticuerpo con mayor reactividad a la proteína Sat fue el obtenido después de inmunizar los conejos con el fagotopo B17 (MSPFAIDLTMUVS). Para confirmar el resultado anterior se envió a sintetizar el péptido MSPFAIDLTMUVS conjugado con KLH (Hemocianina de Lapa Californiana), cuya secuencia es la obtenida del fago B17, con el cual se inocularon conejos para la producción de anticuerpos Anti-Péptido mimotopo, dichos anticuerpos reconocieron tanto al péptido como a la proteína Sat, por lo que se concluyó que la secuencia AIDLTM es un mimotopo de Sat. En el presente estudio se evaluaron ambos anticuerpos antimimotopos, como reactivo para su utilización en el diagnóstico de Sat en orina.

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es uno de los principales agentes causales de las infecciones del tracto urinario (ITU) involucrados en más del 80% de los casos, por otro lado la persistencia de este patógeno puede llegar a causar complicaciones graves (como insuficiencia renal y sepsis), en recién nacidos, niños, adultos mayores, individuos con deformaciones urológicas y personas inmunocomprometidas. Constituyendo uno de los problemas de salud pública de interés en México después de las infecciones gastrointestinales, es necesario tomar las medidas preventivas necesarias para atender este problema y así reducir los costos ocasionados por el manejo clínico del paciente y de los recursos públicos destinados al cuidado de salud. Sat es una serín proteasa autotransportada por UPEC, su participación en el mecanismo de patogenicidad está relacionada con un efecto citotóxico y citopático sobre células de vejiga y riñón *in vitro*, así como en la formación de agregados bacterianos asociado a la persistencia de la bacteria en el huésped, lo que a su vez produce un daño renal recurrente. Sat es un marcador de virulencia ya que se encuentra en 40-50% de las cepas uropatógenas aisladas de pacientes con ITU. Identificar a Sat en una muestra de orina por una prueba específica, rápida, reproducible y barata, permitirá conocer su participación en la recurrencia de la infección por UPEC e informara al médico para que tome la decisión de enviar al laboratorio la identificación de la bacteria por urocultivo y seguir el curso de la infección, evitando generar pérdidas económicas por la introducción de tratamientos empíricos ineficaces así como de la producción de cepas multiresistentes.

V HIPÓTESIS

Con anticuerpos antimimotopos dirigidos al epítope AIDLTM, se podrá identificar de manera eficiente la presencia de Sat, en muestras de orina de pacientes infectados por UPEC.

VI OBJETIVOS

VI.1 Objetivo General

Desarrollar un método de inmunodiagnóstico para la detección de Sat en orina, empleando anticuerpos antimimotopos (AIDLTM) de Sat obtenidos por Phage display, con el fin de aplicarlo en muestras de pacientes con Infecciones del Tracto Urinario.

VI.2 Objetivos Particulares

- Obtener la serín proteasa Sat por métodos de purificación de proteínas.
- Purificar Inmunoglobulinas G de los sueros de conejos inmunizados con la proteína Sat, el fagotopo B17 y con el péptido sintético AIDLTM acoplado a KHL, así como de los sueros preinmunes.
- Evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-Sat y anti-mimotopo (AIDLTM) de Sat contra diferentes SPATEs (Pet, Pic y Sat) y su péptido homólogo.
- Diseñar una prueba de tamizaje de inmunodiagnóstico estándar, barato, válido y reproducible en muestras de orina.
- Evaluar la técnica desarrollada mediante una prueba de detección *in vitro*.

VII MATERIAL Y MÉTODOS.

VII.1 Tipo de Estudio

Experimental; Descriptivo.

VII.2 Variables

Variables Dependientes: Afinidad, especificidad, sensibilidad, reactividad de los anticuerpos, reactividad cruzada, concentración de Sat secretado *in vitro* por las cepas :CFT073 y 049766 en orina.

Variables Independientes: Temperatura, pH, concentración de Ag, concentración de Ac, pureza de las toxinas, pureza de las Inmunoglobulinas.

VII.3 Purificación de las proteasas de serina PetS260I, Pic y Sat.

En este trabajo se purificaron las serín proteasas PetS260I, Pic y Sat de los sobrenadantes obtenidos del cultivo de *E. coli* HB101 pCEF2 (Eslava y cols. 1998), *E. coli* HB101 pP56 (Henderson y cols, 1999) y *E. coli* HB101 pPDG7 (Guyer y cols, 2002) respectivamente. La purificación de cada una de las serín proteasas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Villaseca y cols. 2000 con algunas modificaciones. Tubos con caldo luria (CL) se inocularon con una asada de cada una de las clonas, incubándose durante 4 horas a 37°C con agitación continua de 200 rpm. Del cultivo anterior se transfirió 1 ml a un litro de CL y se incubaron durante 18 horas a 37°C con agitación continua de 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 8000 rpm por 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se recolectó y se hizo precipitar toda una noche a 4 °C con sulfato de amonio al 60%. El siguiente día la solución se centrifugo bajo las mismas condiciones (8000 rpm; 30min; 4 °C) y el pellet obtenido (proteínas totales) se resuspendió en

amortiguador de fosfatos de sodio 0.07M estéril. El concentrado proteínico se dializo durante 3 días con el mismo amortiguador para eliminar el exceso de sal, se realizaron recambios de buffer cada 12 horas y en el último cambio se utilizó una solución amortiguadora estéril 0.05 M Tris-HCl en 0.01 M de EDTA, se emplearon bolsas de diálisis con poro de 12 a 14 KDa. El concentrado proteínico fue sometido a una cromatografía de intercambio aniónico (Q-sefarosa) y posteriormente a una cromatografía de intercambio catiónico (Mono S). Los eluatos obtenidos se analizaron por SDS-PAGE al 8% bajo condiciones desnaturalizantes, recolectando las fracciones puras. Al final se determinó la concentración de las proteínas purificadas por el método de Bradford (Bio-Rad®), la reacción colorida se midió a 575 nm en un espectrofotómetro. La concentración se calculó por comparación con una curva estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA). La identidad de cada una de las proteasas se realizó mediante una prueba de western-blot con sus anticuerpos homólogos.

VII.4 Obtención de las gammaglobulinas de los sueros antimimopos y sueros Anti-proteasas Pet, Pic y Sat.

Se purifico inmunoglobulina G a partir de sueros proporcionados por el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina, dichos sueros fueron obtenidos por inmunización con los mimotopos (fagotopo B17 y péptido) y las serín proteasas Pet, Pic y Sat. Los sueros con los anticuerpos correspondientes (anti-Fago B17, anti-Péptido, anti-Pet, Anti-Pic y anti-Sat) además de un pool de sueros preinmunes se mezclaron con una resina de proteína A (Bio-Rad) previamente ajustada a un pH de 8.2 con una solución de NaCl 0.15M en Fosfato de sodio 0.01M. La purificación de

cada anticuerpo se llevó a cabo de forma individual siguiendo las instrucciones del fabricante. En tubos eppendorff de 1.6 ml se mezclaron 500 μ L de suero con 250 μ L de resina. El tiempo de contacto con la resina fue de 20 min mezclando cada 2 min. Una vez concluido el tiempo, se realizaron 10 lavados con 1 mL del mismo amortiguador (NaCl 0.15M en Fosfato de sodio 0.01M pH 8.2). En cada lavado la mezcla fue centrifugada a 1500 rpm durante 1min y posteriormente el sobrenadante fue desechado. El complejo de IgG-Proteína A fue disociado realizando lavados con una solución de citrato de sodio pH 3 siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente. Las fracciones recolectadas se ajustaron a un pH de 7.0 con una solución de Trizma base 2 M. Las inmunoglobulinas purificadas se caracterizaron por SDS-PAGE al 15% y se cuantificaron por el método de Bradford a 575nm (Spectronic® Genesys 5) realizando una curva estándar con BSA.

VII.5 Ensayo de ELISA

VII.5.1 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotopos en contra de la proteína Sat por ELISA.

Para evaluar la respuesta de las gammaglobulinas anti-Fago B17 y anti-Péptido (anti mimotopos), se desarrollaron una serie de pruebas de ELISA empleando a Sat como antígeno. En este estudio se utilizaron como control positivo los anticuerpos homólogos del antígeno (anti-Sat) y los anticuerpos anti-Pet, anti-Pic e IgGs de suero preimmune como controles negativos. Para el desarrollo del ELISA se adsorbieron microplacas de 96 pocillos con 200 μ L de antígeno por pocillo a concentraciones de 0.8, 0.4 y 0.05 μ g/mL diluido en amortiguador de carbonato/bicarbonato pH 9.6 0.05 M (amortiguador de carbonatos). La placa se

incubo toda la noche a 4°C, realizando tres lavados el siguiente día con PBS-Tween al 0.1%. Los espacios libres de los pocillos fueron bloqueados con una solución de leche descremada Svelty®-PBS al 1% (solución de bloqueo), incubando por 1 hora a 37°C. Se lavó seis ocasiones más con PBS-Tween al 0.1% y posteriormente se adicionaron los anticuerpos antimimotoxos y controles diluidos en solución de bloqueo a concentraciones de entre 100 a 6.25 µg/ml, la microplaca se incubó durante una hora a 37°C. Concluido el tiempo se realizaron 6 lavados más con PBS-Tween al 0.1%. La reacción antígeno-anticuerpo fue amplificada por la adición de anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Millipore®) diluida 1:3500 en solución de bloqueo. La detección de la reacción se realizó después de incubar 20 min a 37°C con 200 µL de p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich) por pocillo a una concentración de 1mg/mL diluido en una solución de dietalonamina 1M en 0.5 mM de cloruro de magnesio pH 9.8. La lectura fue medida en un lector de ELISA a 405nm (MR580, Dynatech®) después de parar la reacción con hidróxido de sodio 3M.

Para los siguientes ensayos de ELISA se estableció una concentración de 50 µg/mL de los anticuerpos antimimotoxos y controles. El desarrollo del ensayo se llevó a cabo adsorbiendo un intervalo de entre 0.8 a 0.025 µg/mL de la proteína Sat en una microplaca de ELISA. El ensayo se realizó por triplicado, al respecto el desarrollo de la prueba siguió el mismo protocolo descrito con anterioridad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado empleando controles negativos del anticuerpo primario y secundario con la solución de bloqueo. La media de las lecturas de absorbancia obtenidas en los ensayos fueron graficados al igual que la desviación estándar de la media calculada a partir de los resultados de una medición repetida.

VII.5.2 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotopos en contra de un péptido sintético homólogo por ELISA.

Como parte de la evaluación de los anticuerpos antimimotopos, se investigó su reactividad por el método de ELISA en contra de un péptido sintético con la secuencia aminopeptídica del epítipo identificado en Sat (mimotopo). El péptido sintético liofilizado con la secuencia MSPFAIDLTMVS fue diluido en agua estéril y después adsorbido en una microplaca de ELISA con 200 μ L de péptido por pocillo a una concentración final de 0.8 μ g/mL diluido en amortiguador de carbonatos, incubando toda la noche a 4°C. Después de realizar tres lavados con solución de PBS-Tween al 0.1% se bloquearon los espacios vacíos con 200 μ L de una solución de leche descremada Svelty®-PBS al 1%, incubando a 37°C por una hora. Concluido el tiempo se realizaron seis lavados más con solución de PBS-Tween al 0.1%, continuando con la adición de los anticuerpos anti-Fago B17, anti-Péptido, anti-Sat, anti-Pet y anti-Pic en una concentración variable de 100 a 3.125 μ g/mL contenidos en solución de bloqueo. Después de la incubación a 37°C por una hora, se realizaron seis lavados con PBS-Tween al 0.1%. La microplaca se incubó bajo las mismas condiciones con una dilución 1:3500 en solución de bloqueo de anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Millipore®). La detección del complejo antígeno-anticuerpo fue realizada después de adicionar una solución de p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL diluido en dietalonamina 1M en 0.5 mM de cloruro de magnesio pH 9.8. La lectura fue medida en un lector de ELISA a 405nm (MR580, Dynatech®) después de parar la reacción con hidróxido de sodio 3M. Los resultados fueron expresados en una gráfica

utilizando la media de los datos obtenidos por duplicado calculando la desviación estándar.

VII.5.3 Evaluación de la reactividad de los anticuerpos antimimotoxos en contra de las proteasas de serina PetS260I y Pic por el método de ELISA.

Como parte del estudio se evaluó la especificidad de los anticuerpos antimimotoxos mediante la utilización de proteasas pertenecientes a la misma subfamilia de Sat. Aplicando el método de ELISA indirecto se utilizaron las proteínas PetS260I y Pic como antígenos en ensayos independientes. Para el desarrollo de esta prueba se siguió el protocolo de ELISA descrito con anterioridad. Cada proteína fue diluida en solución amortiguadora de carbonatos hasta una concentración de 0.8 µg/mL. Doscientos microlitros de la solución anterior se incubaron toda la noche a 4°C en microplacas de 96 pocillos. Al siguiente día, después de tres lavados con PBS-Tween al 0.1%, se cubrió la superficie de los pozos con 200 µL de una solución al 1% de leche descremada Svelty®-PBS, incubando a 37°C por una hora. Pasado este tiempo se lavó durante seis ocasiones más con solución PBS-Tween al 0.1%. En seguida se agregaron los anticuerpos anti-Fago B17, anti-Péptido y anticuerpos homólogos correspondientes de cada serin proteasa (anti-Pet y anti-Pic) a concentraciones variables de entre 100 a 3.125 µg/mL incubando por una hora a 37°C. Una vez concluido en periodo de incubación se continuó realizando seis lavados con PBS-Tween al 0.1%. El complejo antígeno-anticuerpo se amplificó mediante la adición de anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Millipore®) a una dilución 1:3500 en solución bloqueante. La detección de la reacción se realizó después de agregar 1 mg/mL de p-nitrofenilfosfato (Sigma-

Aldrich) diluido en dietalonamina 1M en 0.5 mM de cloruro de magnesio pH 9.8. La reacción colorida se midió a una longitud de onda de 405nm (MR580, Dynatech®) después de parar la reacción con hidróxido de sodio 3M. Como en los ensayos anteriores se realizó por duplicado, graficando la media de los datos obtenidos y expresando la desviación estándar calculada.

VII.6 Ensayo de Dot-Blot

VII.6.1 Detección de Sat por los anticuerpos anti-Fago B17 por Dot-Blot.

Con el objetivo de desarrollar una técnica inmunoenzimática de screening para la detección de Sat en fase sólida se optó por emplear el método de Dot-Blot. Como parte inicial de este estudio se comenzó por determinar la concentración óptima de los anticuerpos de prueba. Para el desarrollo de esta prueba, dos microlitros de Sat diluida en PBS estéril a una concentración de 100 µg/mL fueron colocados como puntos en una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) cortada en tiras de 10 cm de largo por 0.5 cm de ancho. Después de dejar secar por 20 min las tiras se depositaron en charolas con canales independientes (Bio-Rad). Se bloquearon los espacios vacíos de la membrana con una solución al 5% de leche descremada Svelty®-PBS (solución bloqueo), incubando con agitación constante por una hora a temperatura ambiente. Concluido el periodo se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBS-Tween 20 al 0.1%. Se continuó adicionando los anticuerpos de prueba diluidos en solución de bloqueo a concentraciones comprendidas entre 100 y 3.125 µg/mL. La adición de los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Péptido incluyó el uso de un control positivo (anti-Sat), negativo (IgGs suero preinmune) y de reacciones inespecíficas (anti-Pet y anti-Pic). Se incubó bajo las mismas

condiciones, realizando tres lavados más con PBS-Tween 20 al 0.1% después del periodo de incubación. Posteriormente se adiciono el conjugado de anti-IgG de conejo con fosfatasa alcalina en una dilución 1:3500 en solución de bloqueo. La prueba se visualizó después de una hora de incubación y tres lavados más. La adición de una solución cromogénica BC IPT/NBT reveló la reacción del complejo antígeno-anticuerpo. La reacción fue leída por la intensidad mostrada.

El estudio de los anticuerpos antimimotoxinas derivó en la selección de los anticuerpos anti-Fago B17 para el desarrollo de las siguientes pruebas. El proceso para definir la concentración óptima de los anticuerpos seleccionados. Para dicha prueba un intervalo de entre 400 a 3.125 µg/mL de la proteína Sat diluidas en solución de bloqueo fue aplicado como puntos de 2 µL en tiras de nitrocelulosa. Después de dejar secar durante 20 min se bloquearon los espacios vacíos incubando por una hora a temperatura ambiente con una solución al 5% de leche descremada Svelty® en PBS. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% cada uno con un lapso de 5 min y agitación constante. La adición de los anticuerpos de prueba se realizó a una concentración constante de 100 µg/mL diluida en solución de bloqueo, se pusieron en contacto los anticuerpos anti-Fago B17, anti-Sat e IgGs de suero preinmune durante una hora a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron tres lavados con solución de PBS-Tween 20 al 0.1% bajo las mismas condiciones. Trascurrido este proceso, la reacción antígeno-anticuerpos fue amplificada por la adición de anti-IgG de conejo con fosfatasa alcalina en una dilución 1:3500 en solución de bloqueo. La reacción fue leída por la intensidad de las manchas después de la adición del sustrato BC IPT/NBT.

Con el propósito de observar un perfil más completo de la reactividad presentada por los anticuerpos anti-Fago B17 en contra de Sat, se elaboró un ensayo por Dot-Blot utilizando un intervalo de concentraciones comprendido entre 100 a 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antígeno. La proteína fue aplicada bajo las mismas condiciones descritas previamente en tiras de nitrocelulosa. Después de bloquear con leche descremada Svelty® en PBS al 5% y lavar tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1%, se adicionaron los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Sat empleando el mismo intervalo de concentraciones que el antígeno. La unión antígeno-anticuerpos fue desarrollada con anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina. La reacción se observó después de utilizar BC IPT/NBT como sustrato.

VII.6.2 Detección de PetS260I, Pic y LPS por los anticuerpos anti-Fago B17 en fase solida por Dot-Blot.

Dentro del proceso de adecuación del método de Dot-Blot se realizó un ensayo para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-Fago B17 utilizando las serin proteasas PetS260I y Pic. Al respecto se siguió el mismo procedimiento de Dot-Blot descrito con anterioridad, las proteínas se aplicaron a concentraciones de entre 400 a 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tiras de nitrocelulosa, dejando secar por 20 min. Se continuo bloqueando con una solución al 5% de leche descremada Svelty® en PBS y realizando tres lavados después con PBS-Tween 20 al 0.1%. Los anticuerpos se adicionaron a una concentración constante de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluidos en solución de bloqueo. Además de los anticuerpos anti-Fago B17, se utilizaron los anticuerpos específicos de cada proteína (anti-Pet y anti-Pic respectivamente) así como los anticuerpos anti-Sat e IgGs de suero preimmune. La unión antígeno-anticuerpo fue

amplificada mediante la adición de anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina diluida 1:3500 en solución de bloqueo. La reacción se reveló con BCIPT/NBT.

VII.6.3 Análisis Microbiológico de orina.

Para llevar a cabo los siguientes ensayos era necesario contar con una muestra de orina sin la presencia de bacterias ni de la proteína de estudio Sat. Con ese propósito se analizaron tres muestras de orina de personas sin la presencia de signos derivados de una infección del tracto urinario. Las muestras fueron obtenidas de la primera orina de la mañana recolectada de la micción media. Las bacterias de cada muestra se cuantificaron por el método de extensión en superficie. Se colocaron 100 μ L de cada una de las muestras distribuyendo con una espátula tipo drigalsky de vidrio estéril en Agar Sangre al 5% y Agar Mc Conkey. Posteriormente las muestras se centrifugaron por 3500 rpm durante 15 min y el sedimento fue sembrado en placas de Agar sangre al 5% y Agar Mc Conkey con asa bacteriológica sobre toda la superficie. Una muestra del mismo sedimento obtenido se observó en fresco con un microscopio óptico a 100X. Las placas sembradas fueron incubadas por 24 hrs a 37°C, concluido este periodo se contaron las UFC contenidas en un mililitro de orina. El sobrenadante obtenido de la muestra se analizó por duplicado en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 8%) en condiciones desnaturalizantes, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y otro fue sometido a una electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa con amperaje constante (200mA) durante 90 min, realizando un ensayo de western-blot con el uso de los anticuerpos

anti-Sat y anti-Fago B17, la reacción fue amplificada con anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina y revelada con la adición de BC IPT/NBT.

VII.6.4 Dot-Blot para la detección de Sat en una muestra de orina.

Con el propósito de emplear los anticuerpos anti-Fago B17 en el desarrollo de una prueba rápida en orina se planteó como fase inicial evaluar la respuesta de los anticuerpos por Dot-Blot utilizando la proteína Sat diluida en una muestra de orina. Al respecto la orina utilizada en el ensayo fue analizada previamente. La orina fue sometida a un proceso de filtración con una membrana de 0.22 micras de tamaño de poro. Para el desarrollo de la prueba de Dot-Blot 2 μ L de la proteína diluida en orina se aplicaron en tiras de nitrocelulosa a una concentración de 100 μ g/mL. Una vez transcurrido 20 min las tiras secas se colocaron en charolas con canales independientes donde se adiciono una solución de bloqueo (leche descremada en PBS al 5%), incubando con esta solución durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.1 % empleando agitación constante. Se continuó adicionando los anticuerpos anti-Sat y anti-Fago B17 a concentraciones comprendidas entre 100 y 3.12 μ g/mL diluidas en solución de bloqueo. Con los anticuerpos las tiras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente empleando agitación constante. Concluido el tiempo de incubación se reprodujo el proceso de lavado tres ocasiones más con solución de PBS-Tween al 0.1%. El complejo antígeno-anticuerpo formado se amplificó con anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:3500 en solución de bloqueo. La reacción se observó después de la adición de BC IPT/NBT.

VII.6.5 Detección de Sat por Dot-Blot en orina cultivada con las cepas de *E. coli* CFT073 y 049766.

Se diseñó un ensayo *in vitro* utilizando orina como medio para el cultivo de dos cepas de *E. coli* productoras de Sat. El propósito del ensayo fue evaluar la reactividad de los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Sat en la detección de la proteína secretada por las clonas en orina. Previo al ensayo se analizó la orina utilizada siguiendo el procedimiento descrito previamente. Para el desarrollo del ensayo la orina se centrifugo en tubos falcón estériles a 3300 rpm por 15 minutos a 10°C. El sobrenadante se decantó en otro tubo falcón estéril y posteriormente se filtró con una membrana de 0.22 micras de tamaño de poro, el filtrado se recolecto en otro tubo falcón estéril. Cien microlitros de la orina obtenida se sembró en una placa de agar sangre al 5%. Posteriormente en dos matraces Erlenmeyer estériles de 50 mL se colocaron 20 mL de la orina filtrada y se adicionaron 20 µL de la cepa UPEC CFT073 (Mobley H.L y cols, 1990) y de la cepa EAEC 049766 (Eslava C. y cols 1993) ajustadas al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland en caldo luria, cuantificando el inculo por el método de extensión en superficie sobre agar LB. El matraz se incubo durante 18 horas a 37°C con agitación constante (200 rpm). Concluido el periodo de incubación se cuantificaron las UFC/mL del cultivo obtenido por extensión en superficie en agar LB realizando las diluciones correspondientes en PBS. Para separar las fracciones celulares bacterianas de la proteína Sat secretada en la orina se evaluaron dos procedimientos: centrifugación y filtración por membrana (0.22 µm). Bajo estas dos condiciones se analizó el cultivo en la orina obtenida de cada proceso por Dot-Blot empleando los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Sat. Para el desarrollo del ensayo de Dot-Blot dos microlitros de la orina filtrada

y centrifugada de cada clona se colocaron como puntos en tiras de nitrocelulosa de 10 por 0.5 cm. Las tiras se dejaron secar durante 20 minutos y se bloquearon con una solución de leche descremada Svelty® en PBS al 5% durante una hora a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron tres lavados consecutivos de 5 min cada uno con PBS-Tween 20 al 0.1%. Posteriormente se aplicaron los anticuerpos anti-Sat y anti-Fago B17 a concentraciones de entre 100 a 3.12 µg/mL diluidos en solución de bloqueo. Después de incubar toda la noche a 4°C con los anticuerpos se realizaron tres lavados más con PBS-Tween 20 al 0.1%. El complejo antígeno-anticuerpos se amplificó por la adición de anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:3500 en solución de bloqueo, incubando por una hora a temperatura ambiente y agitación constante. La reacción se observó después de adicionar BC IPT/NBT como sustrato. Al final la orina utilizada se analizó por SDS-PAGE al 8% en condiciones desnaturizantes por duplicado, las proteínas se observaron después de teñir uno de los geles con azul de Coomassie. El gel sobrante se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con amperaje constante (200 mA) durante 90 min. Con la membrana se realizó un ensayo de Western-Blot utilizando los anticuerpos anti-Sat y anti-Fago B17 como anticuerpos primarios a una dilución 1:100 en solución bloqueante, la reacción fue amplificada con anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina y revelada con la adición de BC IPT/NBT.

VIII RESULTADOS.

VIII.1 Selección de la clona mínima productora de las proteasas de serina PetS260I, Pic y Sat.

Para la purificación de las serinas de proteasa PetS260I, Pic y Sat, se seleccionaron del cepario 20 copias de las clonas mínimas, 4 clonas de *E. coli* HB101 (pCEF2), 4 clonas de *E. coli* HB101 (p56) y 12 clonas de *E. coli* HB101 (pDG7) productoras de PetS260I, Pic y Sat respectivamente. Dentro del proceso de selección de cepas, se consideraron criterios de pureza microbiológica presentando rasgos uniformes en la morfología colonial en agar Sangre al 5%, agar Luria Bertani (LB) y agar Mac Conkey, obteniendo colonias puntiformes, redondas y convexas con una fermentación negativa a lactosa en agar Mac Conkey, características propias de estas clonas mínimas. El sobrenadante del cultivo de las 20 clonas mínimas fueron concentradas por ultrafiltración a través de una membrana de PVDF de 50 kDa. Veinte microlitros del concentrado proteico se separó por SDS-PAGE al 8%. Después de teñir el gel con azul de Coomassie, se observaron varias bandas entre ellas una proteína con un peso correspondiente a las SPATE's (> 100 kDa), se tomó en cuenta la producción de la SPATE por el ancho de banda para elegir la clona con mayor capacidad de secreción. Las clonas seleccionadas para la purificación de PetS260I y Pic fue del lote fechado en abril del 2008 (Fig. 3). En el caso de la proteína Sat fue seleccionada de entre varios concentrados proteínicos que se tenían en el laboratorio, estos fueron sometidos a evaluación, observando la presencia de Sat. Para identificar cada una de las SPATE's se realizó un ensayo de western-blot, utilizando anticuerpos policlonales para cada proteasa de serina, observando un reconocimiento de la proteína PetS260I (104 kDa), Pic (110 kDa) y

de Sat (107 kDa), además en algunos casos se observó una banda de 100 kDa. Este ensayo permitió seleccionar una clona hiperproductora de cada una de las proteasa de serina, para su purificación.

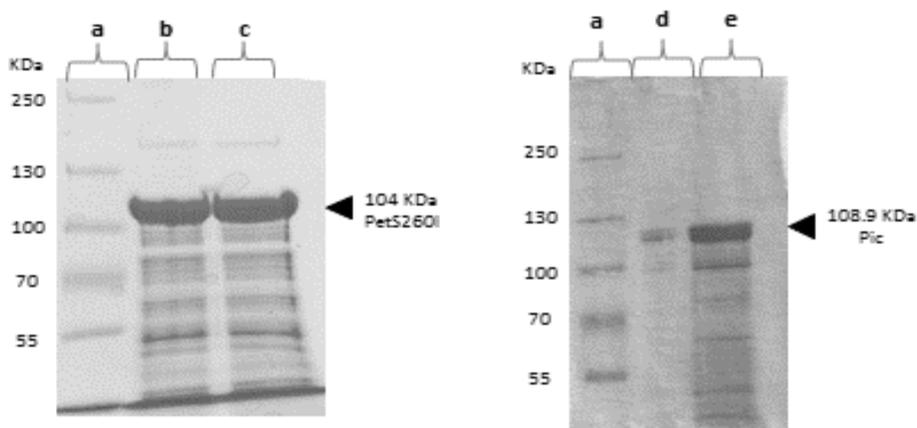


Fig. 3. Selección de la clona mínima productora de *PetS260I* y *Pic*. Perfil electroforético por SDS-PAGE al 8%. Sobrenadante obtenido de las clonas seleccionadas, se observan a *PetS260I* y *Pic*, además de proteínas contaminantes, previo al proceso de purificación. **a)** Marcador de Peso molecular Fermentas® Protein Ladder # SM1811; **b)** Clona CEFN1 Lote de Abril/05; **c)** Clona CEFN2 Lote de Abril/08; **d)** Clona p56 Lote del Abril/05; **e)** Clona p56 Lote Abril/08.

VIII.2 Purificación de las SPATE´s, *PetS260I*, *Pic* y *Sat*

La purificación de las proteasas de serina *PetS260I*, *Pic* y *Sat* se realizó a partir del sobrenadante del cultivo las clonas *E. coli* HB101 (pCEFN2), *E. coli* HB101 (p56) y *E. coli* HB101 (pDG7) respectivamente. El proceso de purificación se llevó a cabo en varias etapas, la primera de ellas consistió en la obtención de un precipitado proteico del sobrenadante cultivado. El dializado obtenido fue sometido a una cromatografía de intercambio aniónico utilizando la resina Q-Sepharosa como fase estacionaria, la elución de la toxina se monitoreo elaborando un perfil cromatográfico por Bradford de cada uno de los 40 eluatos recolectados. Se purificaron dos lotes de la toxina *PetS260I* observando un perfil de elusión similar en los dos ensayos con dos puntos máximos de densidad óptica (*Pico I* y *Pico II*)

(Fig. 4). Las proteínas eluidas en cada fracción fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes. En el lote uno PetS260I fue localizada en las fracciones del pico II, en el segundo lote se observó en el pico I y II, observando una mayor pureza de PetS260I en las fracciones recolectadas del pico II (Fig. 5). La purificación de Pic se llevó a cabo a partir de un solo lote obteniendo dos picos en su perfil cromatográfico (Fig. 6). El análisis electroforético muestra una proteína de alto peso molecular correspondiente a Pic en ambos picos, sin embargo, la proteína con menor número de bandas contaminantes se encontró en las fracciones del segundo pico (Fig. 7).

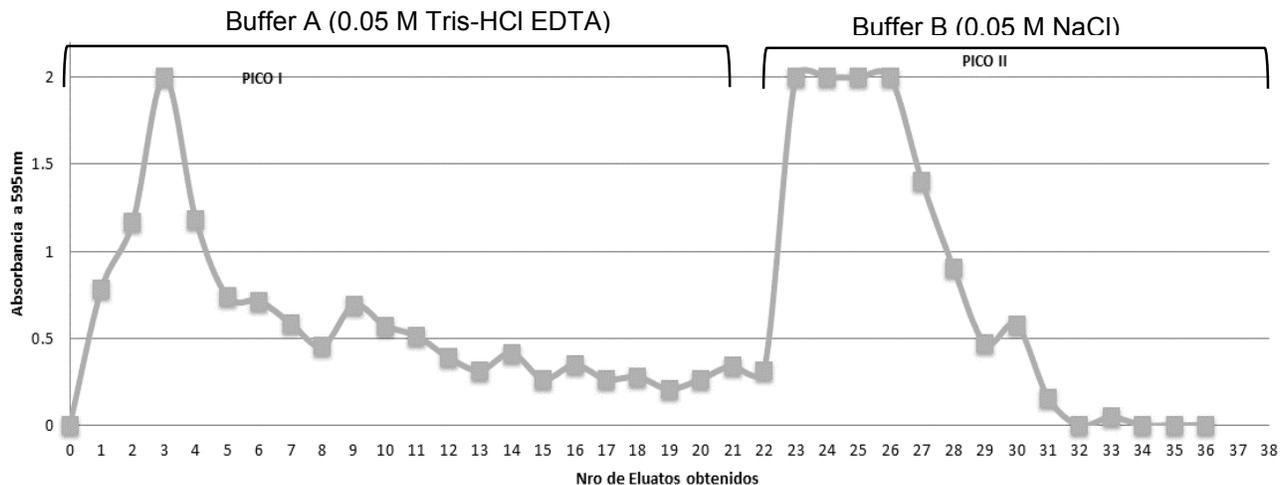


Fig. 4. *Perfil Cromatográfico de PetS260I.* Proceso de purificación por cromatografía de intercambio aniónico. Veinte microlitros de cada una de las fracciones del lote uno se evaluaron por el método de Bradford en microplaca de ELISA, se observan las muestras con mayor concentración de proteínas identificadas como picos I y II, se muestra la secuencia de buffers utilizados para la adsorción y elusión de la muestra.

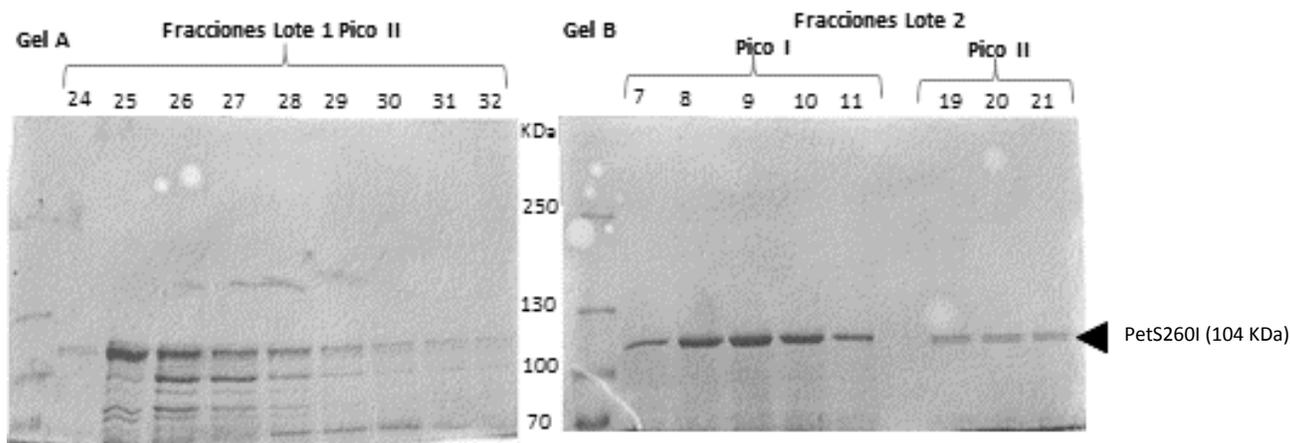


Fig 5. *Purificación de PetS260I.* Análisis por SDS-PAGE al 6% de eluidos obtenidos después de la cromatografía de intercambio aniónico. **Gel A:** Perfil electroforético obtenido durante la elución del lote uno. **Gel B:** Perfil electroforético del pico I y II obtenido durante la elución del lote dos. Al inicio de cada gel se muestra el marcador de peso molecular.

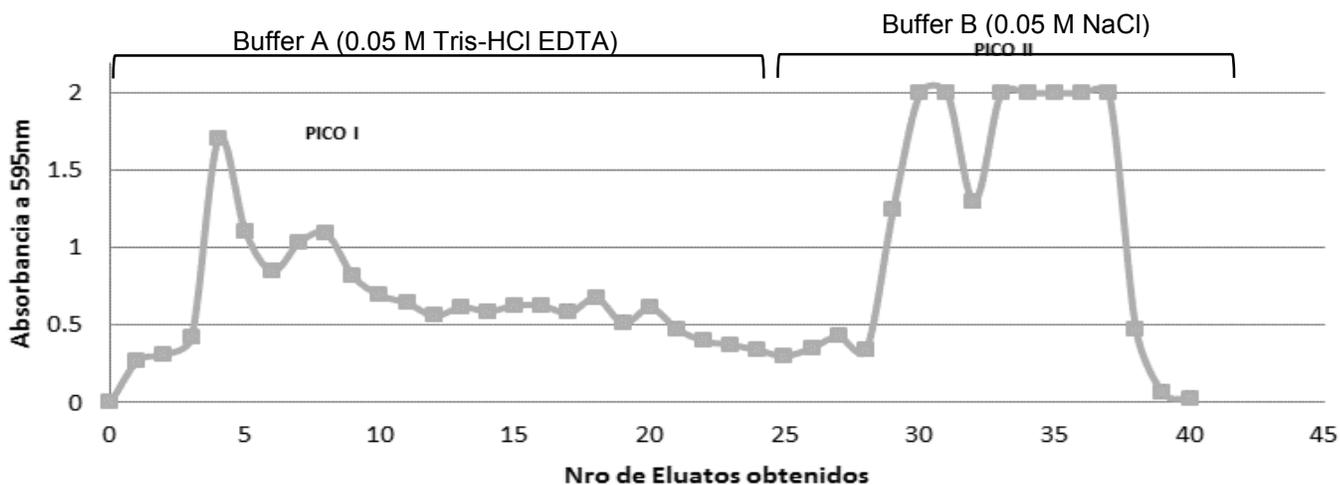


Fig 6. *Perfil cromatográfico de Pic.* Proceso de purificación de Pic por cromatografía de intercambio aniónico. 20µl de cada una de las fracciones se evaluaron por el método de Bradford en microplaca de ELISA, se muestra la secuencia de buffers utilizados para la adsorción y elusión de la muestra. Se observan las muestras con mayor concentración de proteínas, identificadas como picos máximos.

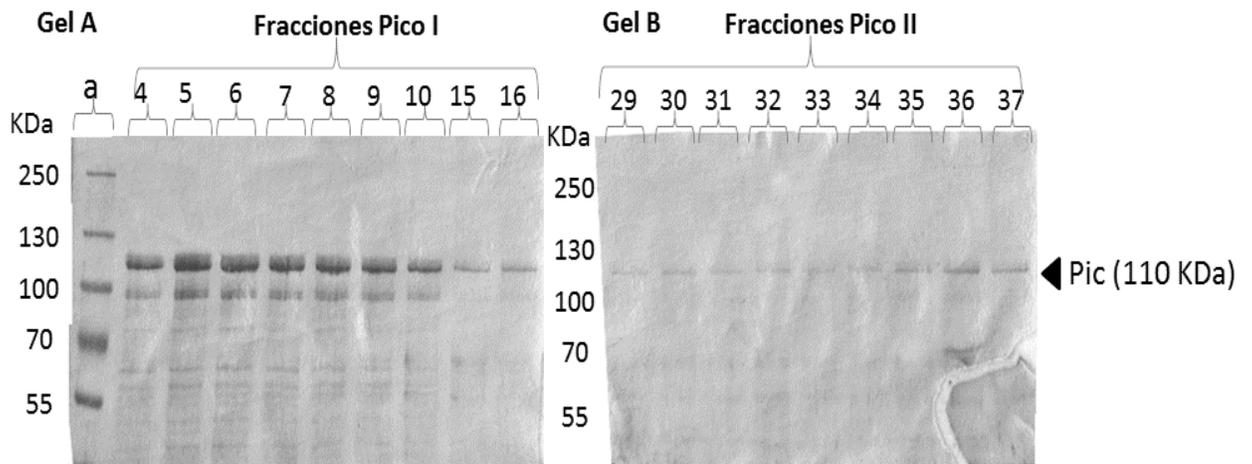


Fig 7. Purificación de Pic. Análisis por SDS-PAGE al 8% de los eluidos recolectados correspondientes a los picos máximos después de la cromatografía de intercambio aniónico. **Gel A:** Perfil electroforético de las fracciones obtenidas del pico I. **Gel B:** Perfil electroforético de las fracciones comprendidas por el pico II. Al inicio del Gel A se muestra el marcador de peso molecular.

La clona seleccionada para el proceso de purificación de la toxina Sat presento una capacidad de secreción escasa, lo anterior dificulto la obtención de una cantidad suficiente para continuar con el estudio. Se comenzó a analizar el sobrenadante de otras clonas de *E. coli* HB101 (pDG7), sin embargo, no se consiguió alguna con capacidad de secreción. Este hecho origino la búsqueda de concentrados proteínicos de Sat con características de pureza y concentración adecuadas para el estudio, al respecto se seleccionaron y evaluaron ocho muestras de precipitados proteicos del sobrenadante del cultivo de la clona *E. coli* HB101 (pDG7) por (SDS-PAGE 8%) y la identificación de Sat por western-blot. El primer vial proporcionado por una compañera adscrita al Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, demostró la presencia de bandas contaminantes en su análisis electroforético, el concentrado proteínico se encontraba en una etapa intermedia de purificación, fue necesario completar la purificación de Sat por

Cromatografía de Intercambio Iónico. A partir de la cromatografía se identificaron seis picos con máximos medidos a 595nm por el método de Bradford, las concentraciones obtenidas se encontraron dentro de un intervalo de 0.266 a 0.020 mg/ml, el rendimiento fue mínimo, no obstante, uno de los picos identificados presento alto grado de pureza además de un reconocimiento optimo por los anticuerpos Anti-Sat en el blotting. La toxina purificada a pesar de ser escasa, fue útil como control positivo durante la caracterización de los concentrados proteicos posteriores.

Las ocho muestras de concentrados proteínicos se identificaron como lotes del uno al ocho, veinte microlitros de cada lote fueron aplicados en geles de policarilamida al 8% (Fig. 8), el perfil electroforético mostro una banda con un peso mayor a 100 KDa (Sat) en las muestras del lote 1, 2, 3, 4 y 8 seguido de un efecto de banner o sombra que también se observó en el control positivo y en el marcador de peso molecular. Algunas de las muestras presentaron una cantidad variable de proteínas con menor peso molecular, entre ellas la muestra más contaminada fue el lote 4.

En el blotting de los lotes analizados (Fig. 9), la muestra de referencia exhibió un bandeo tenue por debajo de Sat, este efecto también fue observable en las muestras probadas, algunas de las cuales presentaron bandas de proteínas contaminantes (lotes 3 y 4) con una intensidad remarcada. Al final se eligieron los lotes 1, 2 y 8, los cuales cumplieron con características de identidad y pureza comparada con la muestra de referencia.

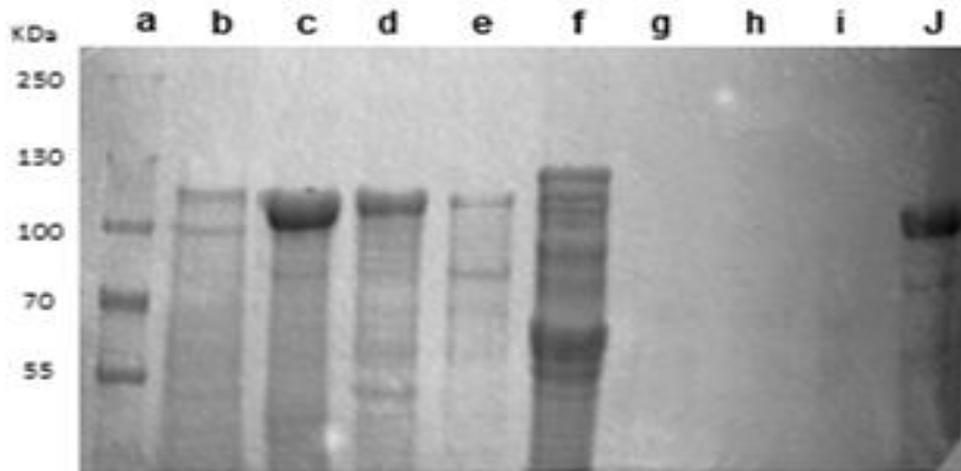


Fig 8. Selección de Sat de diferentes Lotes. Caracterización por SDS-PAGE al 8% de diferentes lotes recuperados de Sat. Veinte microlitros de cada lote fue aplicado a un gel, después de la electroforesis se tiñó con azul de coomassie. Se observa la pureza que presentan los ocho distintos lotes. Carriles: **a)** Marcador de Peso molecular Fermentas® Protein Ladder #SM1811; **b)** Control positivo de Sat; **c)** Sat Lote 1; **d)** Sat Lote 2; **e)** Sat Lote 3; **f)** Sat Lote 4; **g)** Sat Lote 5; **h)** Sat Lote 6; **i)** Sat Lote 7; **j)** Sat Lote 8.

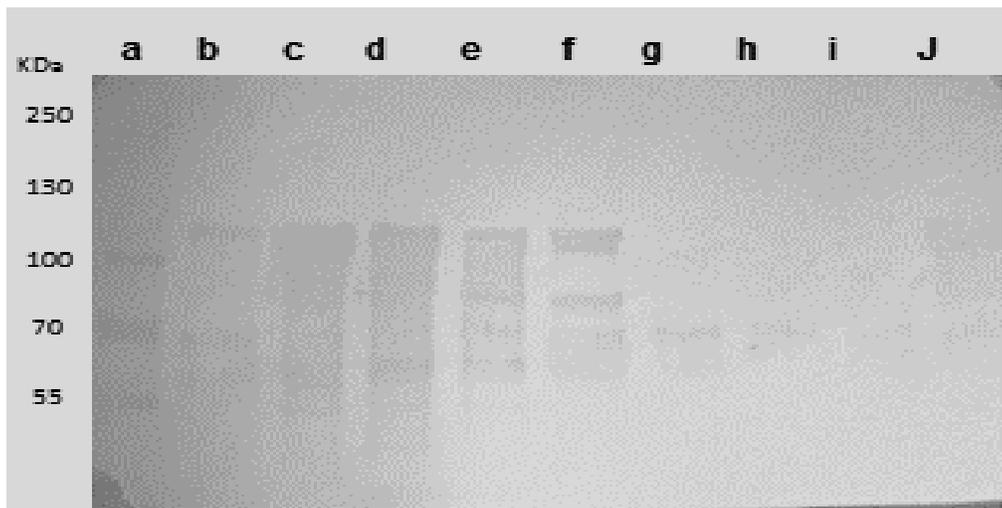


Fig 9. Selección de Sat de diferentes Lotes. Identificación de Sat por Western-Blot de diferentes lotes. Veinte microlitros de cada lote fueron separados por SDS-PAGE al 8% seguido de una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, una vez bloqueado, se incubo con anticuerpos Anti-Sat (1:100). La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelada con BCIP/NBT como sustrato. Se observa la identificación de Sat, una banda mayor a 100 KDa, además de proteínas contaminantes en los lotes 3 y 4 . Carriles: **a)** Marcador de Peso molecular Fermentas® Protein Ladder #SM1811; **b)** Control positivo de Sat; **c)** Sat Lote 1; **d)** Sat Lote 2; **e)** Sat Lote 3; **f)** Sat Lote 4; **g)** Sat Lote 5; **h)** Sat Lote 6; **i)** Sat Lote 7; **j)** Sat Lote 8.

Las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante método de Bradford y distribuyeron en alícuotas de 1 mL con el fin de reducir la degradación proteica conservando en congelación.

VIII.3 Purificación, caracterización y cuantificación de las inmunoglobulinas Anti- PetS260I, Anti-Pic, Anti-Sat, Anti-Péptido AIDLTM, Anti-Fagotopo B17 e IgGs de suero Pre-inmune.

Las inmunoglobulinas purificadas mostraron un alto grado de pureza en el análisis por SDS-PAGE al 15% (Fig 8), se observaron bandas gruesas con un peso molecular de 55 y 25 kDa correspondiente a las cadenas pesadas y ligeras de las IgG. Dentro de los perfiles electroforéticos obtenidos, las IgGs Anti-Pic demostraron un bandeo de proteínas contaminantes. En general el rendimiento de IgGs obtenido fue bajo, sin embargo, durante la purificación de las Inmunoglobulinas fueron recolectados un promedio de 8 mL durante cada purificación, por lo tanto la cantidad de IgG obtenida fue de aproximadamente 3 mg. La concentración media más alta obtenida fue de 3.07mg/ml y la más baja de 0.235mg/ml correspondiente a las la IgG Anti-Pic e IgG Anti-péptido (AIDLTM) respectivamente.

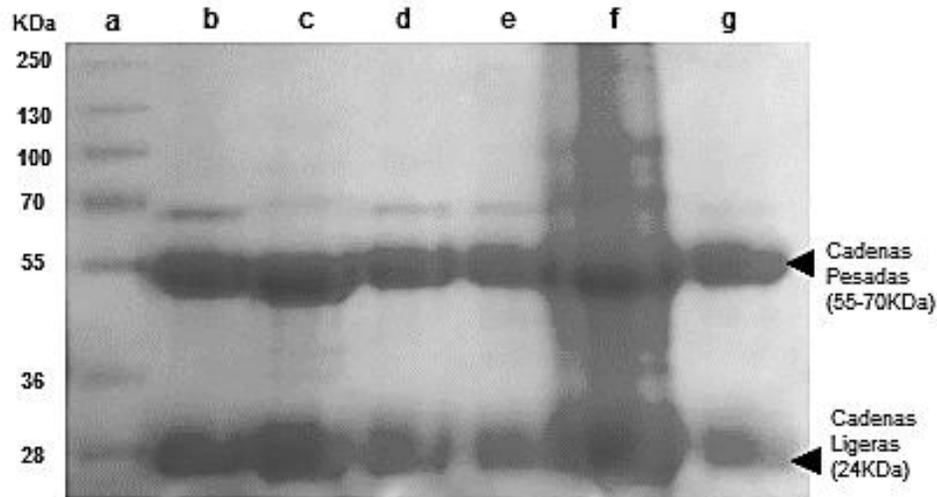


Fig 10. *Caracterización de las Inmunoglobulinas G purificadas.* Veinte microlitros de las inmunoglobulinas obtenidas por cromatografía de afinidad fueron aplicadas a un gel de poliacrilamida al 15%. Después de la separación por electroforesis se tiñó con azul de coomassie. Se identificaron bandas correspondientes a las cadenas pesadas (55-70 KDa) y ligeras (24 KDa) de las IgGs purificadas. Carriles: **a)** Marcador de Peso molecular Fermentas® Protein Ladder #SM1811; **b)** IgG Anti-Sat; **c)** IgG Anti-Pet; **d)** IgG Anti-Fago B17; **e)** IgG Anti-Péptido; **f)** IgG Anti-Pic; **g)** IgG del Suero Pre-inmune. El perfil electroforetico demuestra un grado de pureza aceptable.

VIII.4 Ensayos de ELISA

VIII.4.1 Evaluación de la reactividad de los Anticuerpos Antimimotopo en contra de Sat.

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti-mimotopos purificados por la técnica de ELISA indirecta. Al respecto se realizaron varios ensayos, las pruebas iniciales consistieron en retar tres concentraciones constantes de toxina Sat (0.8, 0.4 y 0.05 $\mu\text{g/ml}$) en contra de un intervalo de anticuerpos anti mimotopos (Anti-Fago B17 y Anti-Péptido) comprendidos entre 100 a 6.25 $\mu\text{g/ml}$, en el mismo ensayo se evaluó la reactividad de los anticuerpos Anti-Sat como control positivo, anticuerpos inespecíficos (Anti-PetS260I, Anti-Pic) y como control negativo IgGs del Suero Pre-inmune. Dentro de los resultados obtenidos en este ensayo se observó una

respuesta alta (D.O. 2.0) de las IgGs Anti-Sat empleando concentraciones de 0.8 y 0.4 $\mu\text{g/mL}$ de Sat, la reactividad disminuye a partir del uso de 25 ó 50 $\mu\text{g/mL}$ de IgG Anti-Sat respectivamente en cada ensayo (Fig.11 A y B).

También observamos que los anticuerpos anti mimotopos (anti-Fago B17 y anti Péptido) reaccionaron contra Sat, existiendo una alta reactividad utilizando los anticuerpos Anti Fago B17. El comportamiento del anticuerpo anti Fago B17 es similar utilizando 0.4 y 0.8 $\mu\text{g/mL}$ de Sat (Fig. 11 Ay B), a las mismas concentraciones se observa una respuesta por arriba de 0.5 de D.O con el uso de 50 $\mu\text{g/mL}$ de IgG anti fago B17. El otro anticuerpo anti mimotopo (anti Péptido) se comporta de la misma manera que el anticuerpo pre-inmune, resultados semejantes se observaron con los anticuerpos anti-Pet y anti-Pic (Fig. 11 A y B). Por otro lado, la disminución de la concentración de la toxina Sat a 0.05 $\mu\text{g/mL}$ presento una reactividad por debajo de 1.0 de D.O, la reacción de los anticuerpos analizados fue deficiente con una tendencia variable (Fig. 11 C).

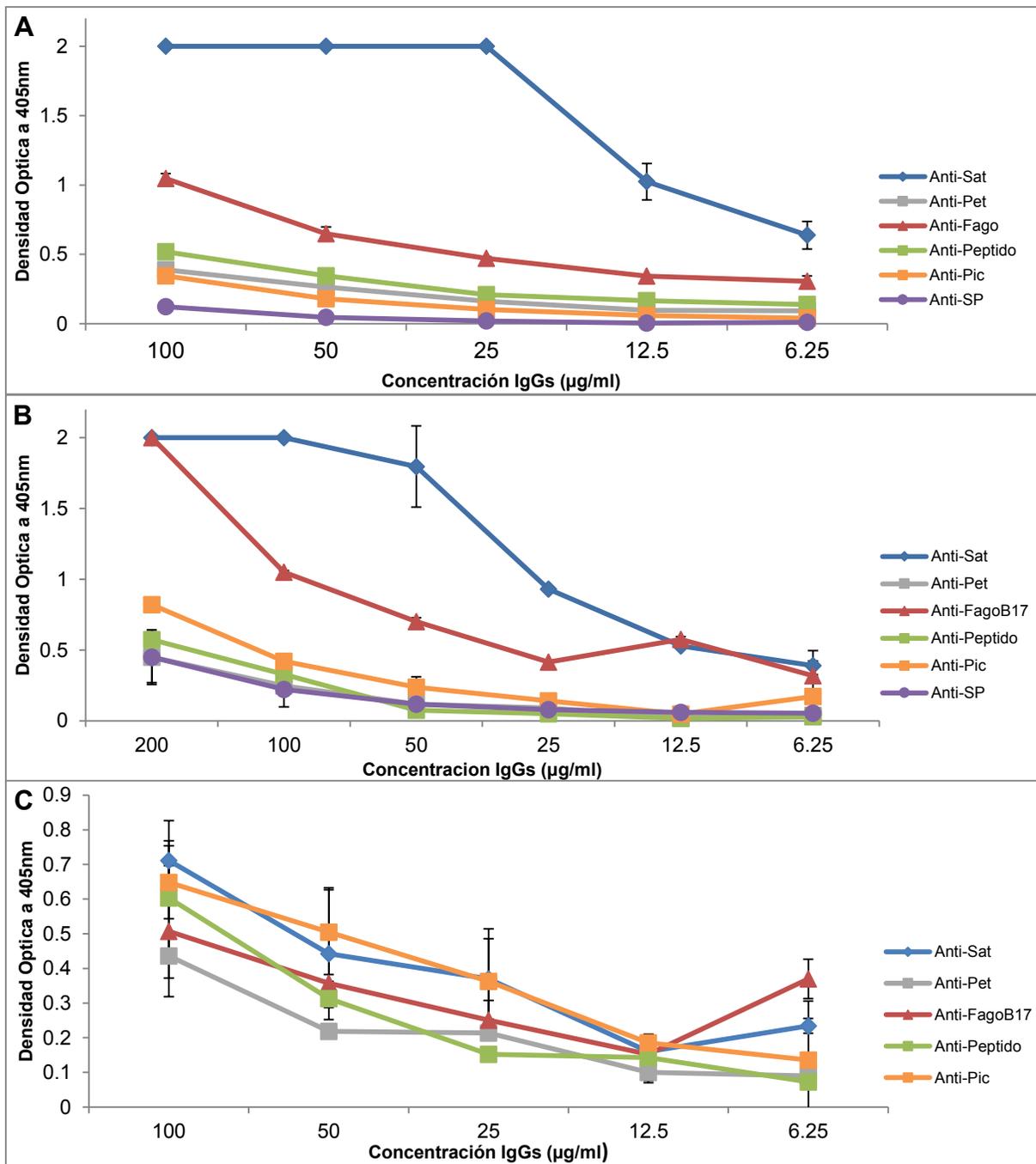


Fig 11. Ensayo de ELISA: Evaluación de la reactividad de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de Sat. Una microplaca de ELISA fue recubierta con 0.8 µg/mL (A), 0.4 µg/mL (B) y 0.05 µg/mL (C) de Sat, luego de bloquear y lavar se ensayaron seis anticuerpos (IgGs) a concentraciones de entre 100 y 6.25 µg/mL. La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina y revelada con pNPP(S0942 SIGMA®). Las curvas representan el comportamiento por duplicado de cada anticuerpo a las diferentes concentraciones evaluadas y las líneas verticales representan el error estándar.

A partir de la concentración de Inmunoglobulinas seleccionada (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se desarrollaron otras pruebas por ELISA indirecto empleando cantidades de Sat comprendidas entre 0.8 a 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el fin de determinar la cantidad óptima de Sat detectada por los anticuerpos Anti-mimotopos. Esta prueba se reprodujo bajo las mismas condiciones por cuadruplicado, con el propósito de observar la reproducibilidad del ensayo.

En la figura 12 se muestra el resultado del ensayo de ELISA que fue reproducible. Al igual que en el ensayo anterior la reactividad del anticuerpo anti Sat fue el más alto, logrando detectar una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sat y en segundo término el anticuerpo anti-Fago B17 reconoce a Sat a una concentración de 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los anticuerpos anti-péptido, anti-Pic y anti-Pet, presentaron una reactividad por debajo de 0.5 D.O., resultado semejante al suero pre-inmune (Fig. 12).

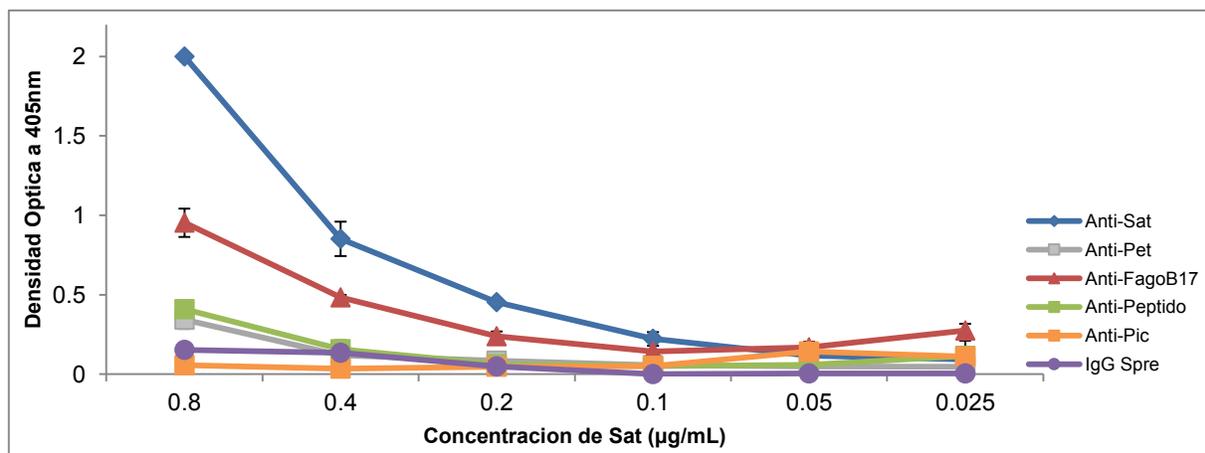


Fig. 12. *Ensayo de ELISA:* Análisis de la reactividad de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de Sat. Una microplaca fue recubierta con cantidades de Sat comprendidas entre 0.8 y 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$, luego de bloquear y lavar se ensayaron seis anticuerpos (IgGs) a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina y revelada con pNPP (S0942 SIGMA®).

VIII.4.2 Reactividad de los anticuerpos Antimimoto Anti-Péptido AIDLTM, Anti-Fagotopo B17 contra el péptido sintético homólogo por el método de ELISA.

Con la secuencia del amino-Fagotopo B17 se realizó el diseño del aminopéptido MSPFAIDLTMVS el cual se envió a sintetizar. Este péptido sintético fue empleado para evaluar la especificidad de los anticuerpos antimimoto (anti Fago B17 y Anti Péptido). Se realizó un ensayo de ELISA indirecto utilizando concentraciones de inmunoglobulinas comprendidas entre 100 y 3.12 $\mu\text{g/ml}$. Las lecturas de absorbancia con una mayor respuesta en contra del péptido fueron obtenidas empleando 100 $\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos anti-péptido, la respuesta disminuye paulatinamente hasta una superposición con las lecturas que presentan los demás anticuerpos a una concentración de 1.25 $\mu\text{g/ml}$. La tendencia presentada por las IgGs del Anti-Fago B17 es ligeramente menor a los anticuerpos Anti-péptido. Los anticuerpos restantes obtuvieron lecturas de absorbancia por debajo de 0.2, con una distribución de respuesta encabezada por Anti-Sat, seguida de Anti-Pet y Anti-Pic (Fig. 13).

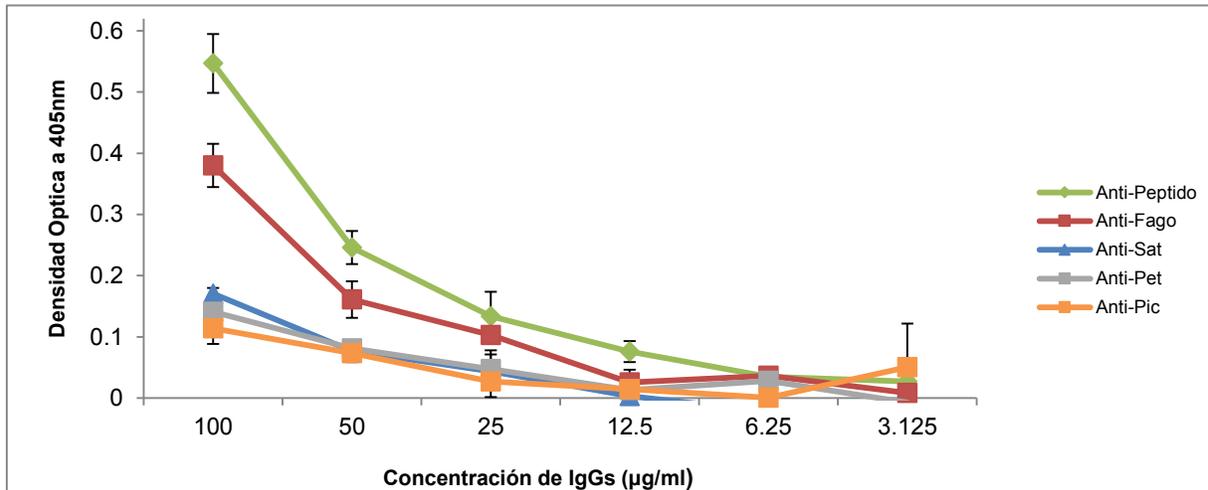


Fig 13. *Ensayo de ELISA: Evaluación de la reactividad de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de un péptido sintético con la secuencia MSPFAIDLTMVS. 0.8 µg/mL del péptido sintético fueron adsorbidos en una microplaca de ELISA, luego de bloquear y lavar se ensayaron cinco anticuerpos (IgGs) a concentraciones de entre 100 y 0.3125 µg/mL. La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina y revelada con pNPP (S0942 SIGMA®). Las curvas representan el comportamiento por duplicado de cada anticuerpo a las diferentes concentraciones evaluadas y las líneas verticales representan el error estándar. Comparación de las diferentes lecturas obtenidas, la respuesta de los anticuerpos probados es mínima.*

VIII.4.3 Evaluación de la reactividad de los Anticuerpos Antimimotopo y anticuerpos Pre-inmunes contra las SPATEs PetS260I y Pic por el método de ELISA.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos antimimotopos de Sat y descartar interferencias de IgGs preinmunes se probaron estos en contra de las SPATEs PetS260I, Pic y Sat por un ensayo de ELISA indirecto. Los resultados demostraron una reactividad nula de los anticuerpos pre-inmunes en contra de las diferentes SPATEs, se observaron valores de densidad óptica negativos y con un comportamiento decreciente, indicando ausencia de IgGs pre-inmunes dirigidas en contra de PetS260I, Pic y Sat.

Lo siguiente fue evaluar la especificidad de los Anticuerpos Anti-Fagotopo B17 y Anti-Péptido por un ensayo de ELISA, para ello se emplearon las proteínas PetS260I y Pic como antígenos, dos toxinas pertenecientes a la familia de las SPATEs. Los anticuerpos anti mimotopo (Anti-Péptido y anti-Fago B17) reconocieron a Pic (Fig. 14 A) y PetS260I (Fig.14 B). La proteína Pic presentó una reactividad más alta con los anticuerpos anti mimotopo que con el anticuerpo homologo (IgG anti-Pic) a concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG y a concentraciones más bajas (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solo el anticuerpo anti fago-B17 mantiene esta diferencia (Fig. 14 A). En el caso de la proteína PetS260I la reactividad de los anticuerpos anti-mimotopo fue diferente, la reactividad de estos anticuerpos a concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG fue menor al anticuerpo homologo (anti-Pet). Sin embargo, el anticuerpo anti-Fago B17 presenta una reactividad ascendente a concentraciones de IgG menores a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 14 B).

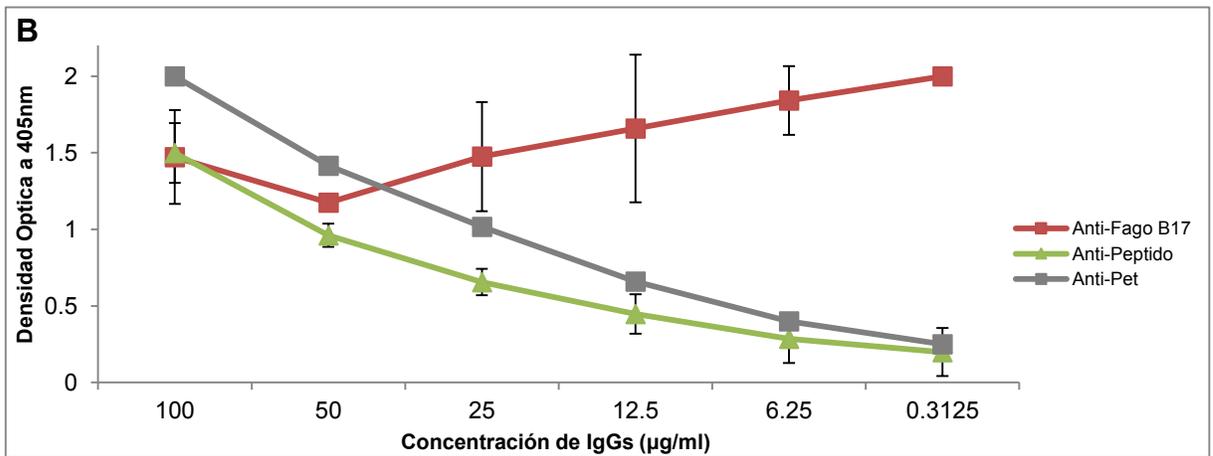
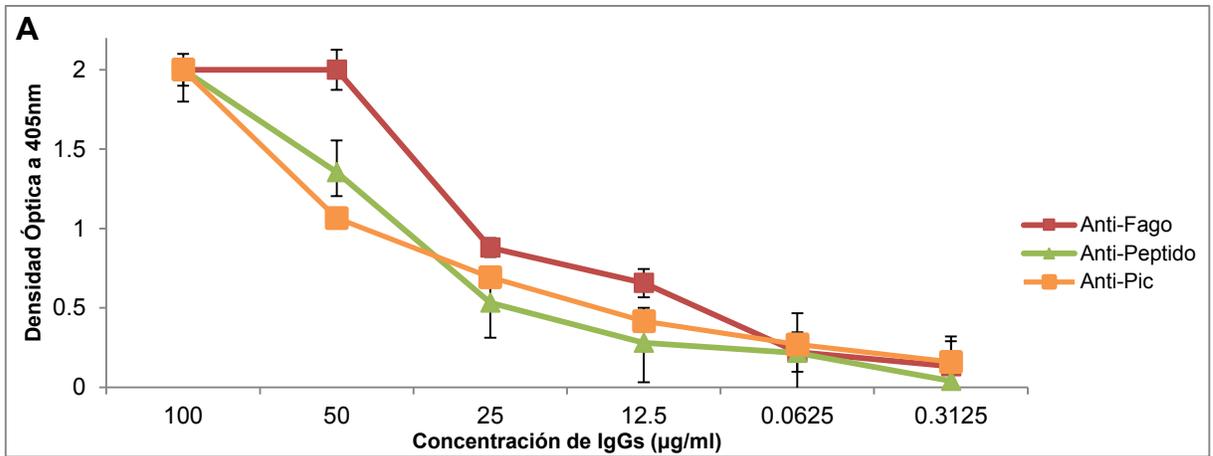


Fig 14. *Ensayo de ELISA: Reactividad inespecífica de los anticuerpos Anti-Péptido, Anti-Fago B17 en contra de Pic (A) y PetS260I (B). 0.8 µg/mL de Pic ó PetS260I fueron adsorbidos en una microplaca de ELISA, luego de bloquear y lavar se ensayaron cuatro anticuerpos (IgGs) a concentraciones de entre 100 y 0.3125 µg/mL. La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina y revelada con pNPP (S0942 SIGMA®). Las curvas representan el comportamiento por duplicado de cada anticuerpo a las diferentes concentraciones evaluadas y las líneas verticales representan el error estándar, se observa una tendencia ascendente por parte de las IgGs Anti-Fago B17.*

VIII.5 Ensayos de Dot-Blot.

VIII.5.1 Evaluación de la reactividad de las IgG Anti-Fagotopo B17 en contra de Sat.

Con los resultados anteriores se concluyó que solo el antimimotopo anti-fago B17 reconoce a nuestra proteína de estudio Sat. Utilizando estos anticuerpo anti-mimotopo y como control positivo IgG anti-Sat obtenido en conejo, se estandarizo un método de Dot-blot como una técnica rápida de detección inmunoenzimática. En un primer ensayo se evaluó la reactividad de los anticuerpos Anti-Fago B17 contra Sat. El primer ensayo se llevó a cabo empleando diferentes concentraciones de anticuerpos y conservando fija una cantidad de 100 $\mu\text{g/mL}$ de Sat (Fig. 15). Las IgGs Anti-Fago B17 presentaron reactividad en cinco de las concentraciones empleadas. Se observó una respuesta óptima con una intensidad que se mantiene uniforme utilizando 100 y hasta 6.25 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo, después de este punto comienza a disminuir la reactividad contra de Sat (Fig. 15D), al comparar este resultado con el control positivo (anticuerpos Anti-Sat) mostraron una reacción más intensa que las IgGs Anti-Fago B17, observando el reconocimiento de Sat con concentraciones hasta de 3.2 $\mu\text{g/mL}$ de IgG Anti-Sat (Fig. 15A), como control negativo se utilizó el suero pre-inmune donde no se observó reactividad alguna con la proteína Sat.

A pesar de los resultados obtenidos por el ensayo de ELISA, donde muestra que los anticuerpos anti-péptido no reconocen a Sat. Decidimos evaluar su reactividad por Dot-blot. Los resultados observados muestran muy baja reactividad de los anticuerpos (Fig. 15E).

Para evaluar nuevamente la existencia de reacciones cruzadas de anticuerpos anti-Pet y anti-Pic contra Sat, se desarrolló un ensayo de Dot-blot. Los resultados obtenidos muestran un reconocimiento de anticuerpos anti-Pet a la proteína Sat (Fig. 15B), no así los anticuerpos anti-Pic (Fig. 15C)

Para determinar la concentración mínima de detección de Sat por el anticuerpo anti-fago B17 en el siguiente ensayo se invirtiendo las condiciones de trabajo, de tal forma que se emplearon diferentes concentraciones de toxina y una cantidad constante (100 µg/ml) de anticuerpos Anti-Sat y Anti-Fago B17 (Fig. 16). Bajo estas condiciones el Anti Fago B17 mostro la capacidad de detectar 200 µg/mL de toxina. Al comparar el resultado anterior con la respuesta en las IgGs Anti-Sat se observa la detección de una cantidad menor de toxina (50 µg/mL)(Fig. 16A).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos se desarrolló una prueba mediante Dot-Blot que permitiera obtener un perfil completo de la reactividad de las IgGs Anti-Fago B17 contra Sat. Se estableció para la proteína Sat y los anticuerpos IgG Anti-Sat y Anti-Fago B17 una concentración de trabajo a partir de 100 µg/mL y hasta 3.12 µg/mL (Fig. 17), sin embargo, en la figura 17 mostramos solo la reactividad de los anticuerpos hasta una concentración de 25 µg/mL de Sat, debido a que a menor concentración no se observa reactividad. Los resultados obtenidos por Dot-blot muestran el reconocimiento visible de Sat hasta una concentración de 25 µg/mL utilizando el anticuerpo anti-Sat y de 50 µg/mL con el anticuerpo anti-Fago B17, la concentración mínima de reconocimiento de los anticuerpos fue de 25 µg/mL de la IgG anti-Sat y de 50 µg/mL de la IgG anti-Fago B17 (Fig. 17).

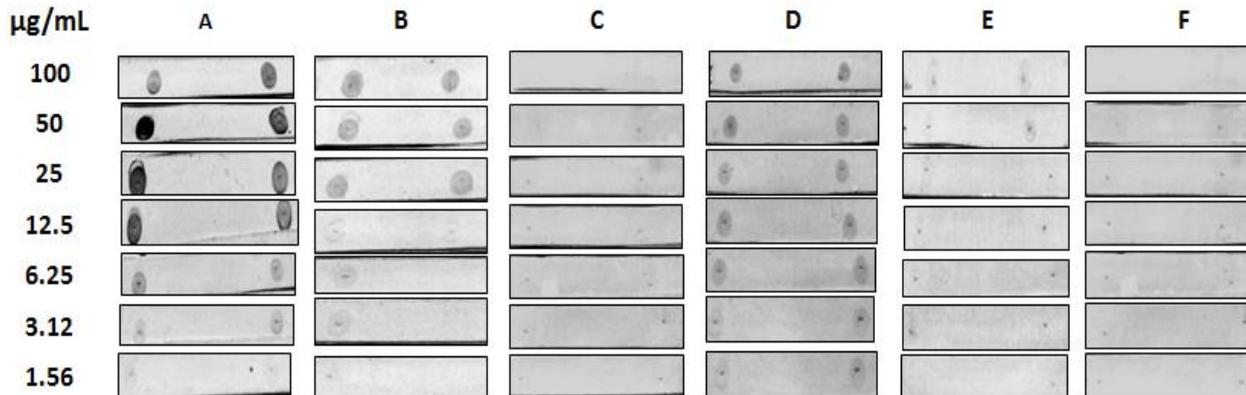


Fig. 15. Ensayo de Dot-Blot. Reconocimiento de Sat por diferentes Inmunoglobulinas. Brevemente 100 $\mu\text{g/mL}$ de Sat fueron colocadas como puntos de 2 μL sobre una membrana de nitrocelulosa, después de bloquear y lavar se adicionaron 6 anticuerpos a diferentes concentraciones: Anti-Sat (A); Anti-Pet (B); Anti-Pic(C); Anti-Fago B17 (D); Anti-Péptido (E) y las IgGs del Suero Pre-inmune (F). La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelada con BCIP/NBT como sustrato. Este ensayo se realizó por duplicado. La reactividad del anticuerpo homólogo Anti-Sat contrasta por obtener una resolución intensa que decae en 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Las IgGs Anti Fago B17 mantienen una respuesta óptima con intensidad uniforme empleando una concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Se observa un reconocimiento de Sat por los anticuerpos Anti-Pet. La respuesta de los anticuerpos Anti-Péptido fue escasa. No existe algún reconocimiento de Sat por los anticuerpos Anti-Pic ni del Suero Pre-inmune.

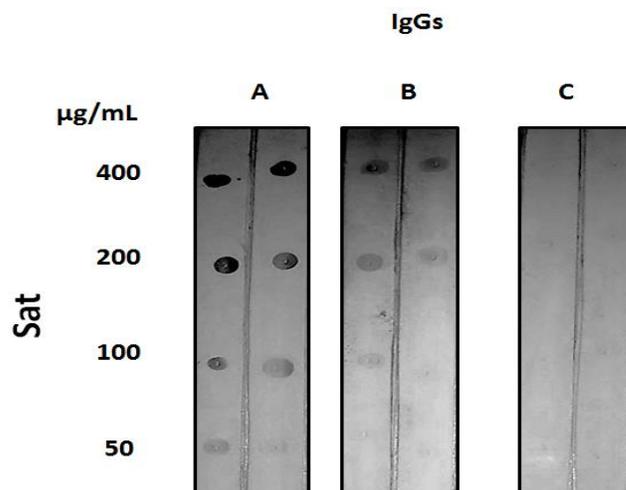


Fig. 16. Ensayo de Dot-Blot. Detección de Sat por el Anti-Fago B17 y su anticuerpo homólogo (Anti-Sat). Se aplicaron 2 μL de una serie de diluciones de la proteína Sat sobre una membrana de nitrocelulosa, después de bloquear y realizar lavados se adicionaron 3 anticuerpos a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$: (A) IgGs Anti-Sat; (B) IgGs Anti-Fago B17; (C) IgGs de Suero Pre-inmune. La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelada con BCIP/NBT como sustrato. Este ensayo se efectuó por duplicado. Los anticuerpos Anti-Fago B17 presentaron una capacidad de detección menor que la alcanzada por las IgGs Anti-Sat. No existe reconocimiento por las inmunoglobulinas G del suero pre-inmune.

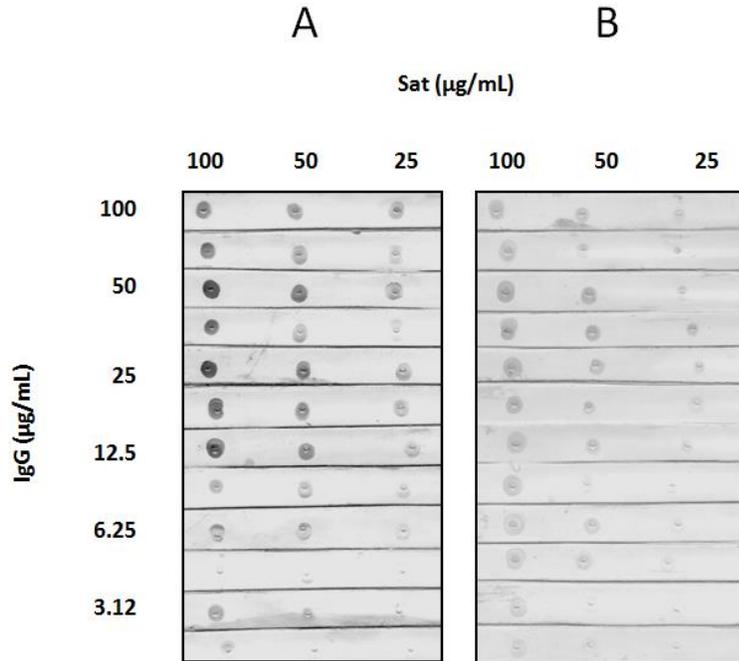


Fig. 17. *Ensayo de Dot-Blot.* Detección de Sat por los anticuerpos Anti-Fago B17 y Anti-Sat. La proteína Sat fue diluida en PBS a diferentes concentraciones, se colocaron 2µl de cada dilución sobre una membrana de nitrocelulosa, después de bloquear y lavar, las membrana se incubaron con 6 diferentes concentraciones de anticuerpos Anti-Sat **(A)** o Anti-Fagotopo B17 **(B)**. La reacción fue desarrollada con anti- IgG de conejo conjugado con Fosfatasa alcalina y como sustrato BCIP/NBT. Los ensayos se realizaron por duplicado. Utilizando 6.25 µg/ml de IgGs Anti-Fago B17 se logra detectar una concentración de 50 µg/ml de toxina. Se observa que a la misma concentración de anticuerpo las IgGs Anti-Sat pueden reconocer 25 µg/ml de Sat. Existe una respuesta óptima empleado 50 µg/ml de IgGs Anti-Fago B17, una concentración útil en la detección de una cantidad igual de toxina.

VIII.5.2 Evaluación de la IgG Anti-Fagotopo B17 contra PetS260I, Pic y LPS por el método de Dot-Blot

Una vez definida la respuesta de la IgG anti-Fago B17 en contra de Sat se continuó realizando ensayos de especificidad donde fueron empleados Pic y PetS260I como antígenos inespecíficos. Se estableció un intervalo de 400 a 3.125 µg/mL para el empleo de los antígenos. Durante los ensayos de Dot-Blot las innumoglobulinas se mantuvieron a una concentración constante de 100 µg/mL. Las IgG anti-fago B17 reaccionaron con PetS260I y Pic a concentraciones por arriba de 200 µg/mL de las

proteínas PetS260I y Pic (Fig 18 I y II), comparado con su anticuerpo homologo que reconoce hasta 50 $\mu\text{g/mL}$ de PetS260I o Pic respectivamente. Lo que observamos también es una reacción cruzada de las IgGs Anti-Fago B17 con Pet y Pic (Fig 18 IB y IIB). Nuestro control de suero pre-inmune no reconoció a Pet o Pic. El siguiente ensayo consistió en evaluar el reconocimiento inespecífico de los anticuerpos Anti-Fago B17 al lipopolisacarido (LPS) de *E. coli*, para este ensayo se utilizó LPS purificado obtenido de *E. coli* O157, los resultados obtenidos mostraron una reacción parcial mínima a la concentración más alta analizada 250 $\mu\text{g/mL}$ (0.5 μg) de LPS (Fig. 19), se observó además un reconocimiento a la misma concentración en los anticuerpos Anti-Sat.

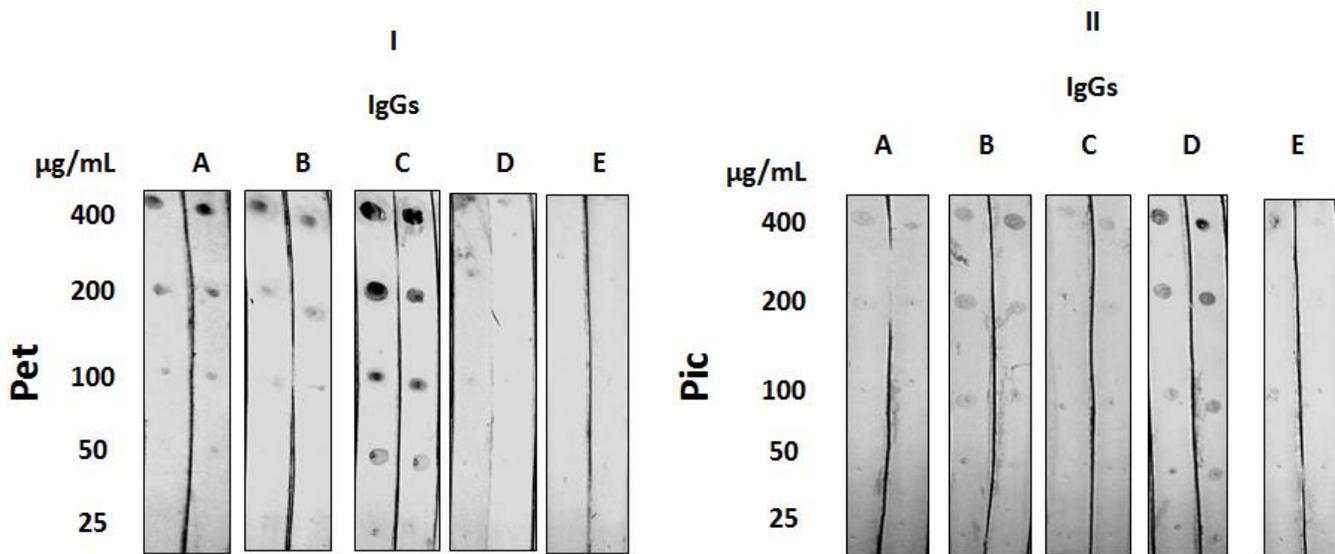


Fig. 18. Ensayo de Dot-Blot. Reconocimiento de PetS260I (I) y Pic (II) por los anticuerpos Anti-Fago B17 y homólogos correspondientes. Se aplicaron 2 μL de una serie de diluciones de las toxinas PetS260I y Pic sobre una membrana de nitrocelulosa, después de bloquear y realizar lavados se probaron 5 anticuerpos a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$: (A) Anti-Sat; (B) Anti-Fago B17; (C) Anti-Pet; (D) Anti-Pic; (E) IgGs Suero Pre-inmune. La reacción fue amplificada por la adición de Anti- IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelada con BCIP/NBT como sustrato. Este ensayo se efectuó por duplicado. El reconocimiento inespecífico de las IgGs Anti-Fago B17 es observable con una intensidad aceptable hasta 200 $\mu\text{g/mL}$ de PetS260I y Pic. Existe una intensidad escasa a 100 $\mu\text{g/mL}$ donde la reactividad es pobre.

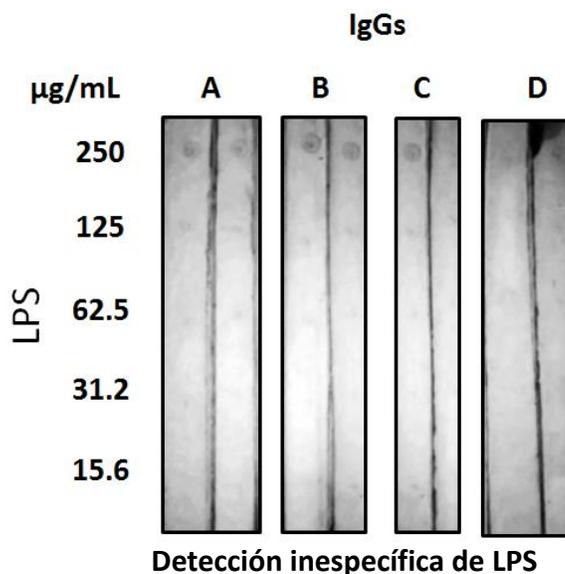


Fig. 19. *Ensayo de Dot-Blot. Reconocimiento de LPS (E. coli O157).* Se aplicaron 2 µL de cada dilución correspondiente de LPS sobre una membrana de nitrocelulosa, después de bloquear y realizar lavados se adicionaron 4 anticuerpos a una concentración de 100 µg/mL: **(A)** Anti-Sat; **(B)** Anti-Fago B17; **(C)** IgGs de Suero Pre-inmune; **(D)** Anti-Péptido. La reacción fue amplificada por la adición de Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelada con BCIP/NBT como sustrato. Este ensayo se realizó por duplicado. Se observa una respuesta con baja intensidad en 250 µg/mL, en general existe una falta de reactividad en contra de LPS por las IgGs Anti-Fago B17.

VIII.5.3 Detección de Sat en una muestra de Orina

VIII.5.3.1 Determinación de Sat en orina inoculada, utilizando anticuerpos Anti-Fagotopo B17 y Anti-Sat.

Después de un análisis bacteriológico de tres muestras de orina de personas sanas, sin la presencia de signos derivados de una infección del tracto urinario. Dos de los candidatos presentaron 420 y 300 UFC/mL respectivamente. La muestra de orina seleccionada mostró en el urocultivo un conteo de 60 UFC/mL, sin la presencia de bacteriuria. El análisis de la orina seleccionada por SDS-PAGE al 8% no reveló la presencia de ninguna proteína con las características de peso molecular de Sat, ni reconocimiento de ninguna banda por western-blot empleando anticuerpos Anti-Sat y Anti-Fago B17. Entre otros estudios la observación del sedimento urinario en una

preparación en fresco demostró la presencia de abundantes cristales de oxalato, un conteo de 4 a 5 leucocitos por campo (40X), poca cantidad de bacterias, escasos cristales de fosfato triple y escasas células epiteliales. Estos resultados se mantuvieron dentro de un intervalo aceptable durante el análisis de distintas muestras de orina pertenecientes al mismo individuo. La orina que se empleó durante el estudio se hizo pasar a través de un filtro de nitrocelulosa con un poro de 0.22 μm . La orina estéril se inoculó con 14 μg de Sat obteniendo una concentración inicial en orina de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluyendo hasta 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, en la figura 20 solo mostramos las dos primeras diluciones de Sat, ya que a partir de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observa reactividad (Fig. 20). El anticuerpo anti-Sat y anti-Fago B17 reconocieron a Sat a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo, a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sat en orina la reactividad fue visible utilizando 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo anti-Sat o anti-Fago B17, y solo con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anti-Fago B17 hay un reconocimiento de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sat en orina (Fig. 20).

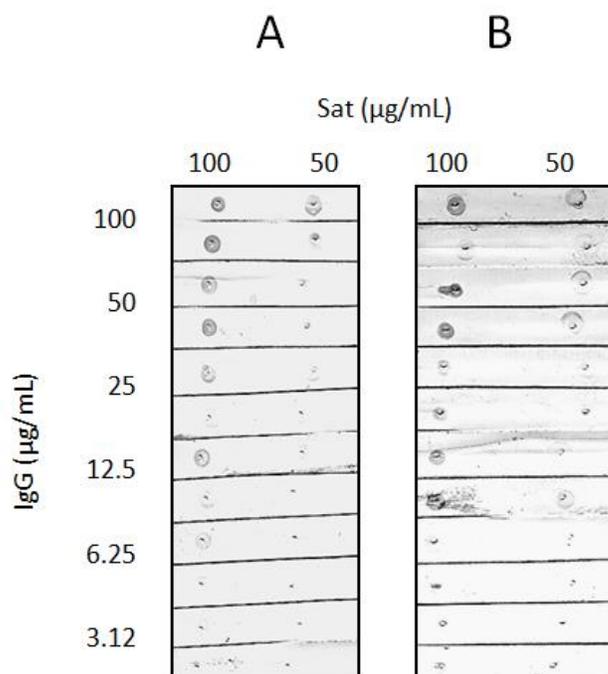


Fig. 20. *Ensayo de Dot-Blot. Detección de Sat en Orina.* Cien microlitros de orina filtrada a través de una membrana de 0.22 μm , fue inoculada con diferentes concentraciones de la proteína Sat, 2 μl de cada dilución se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa, después de bloquear y lavar, las membrana se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-Sat (**A**) o anti-Fagotopo B17 (**B**). La reacción fue desarrollada con anti- IgG de conejo conjugado con Fosfatasa alcalina y como sustrato BCIP/NBT. Los ensayos se realizaron dos veces con duplicados. Se observa una respuesta similar con ambos anticuerpos.

VIII.5.3.2 Determinación de Sat en orina inoculada con las cepas de *E. coli* CFT073 y 049766.

Los resultados anteriores permitieron diseñar un ensayo que representara las condiciones *in vitro* de la secreción de Sat en orina estéril por una cepa uropatógena de *E. coli*. Se emplearon dos cepas: *E. coli* CFT073 (UPEC) y *E. coli* 049766 (EAEC) ambas productoras de Sat. Previo a la realización del ensayo se analizó sobrenadante del cultivo de ambas cepas por SDS-PAGE al 8%. El análisis del gel mostro bandas individuales y definidas con un peso mayor a 100 KDa. Empleando suero Anti-Sat se identificó la banda proteica por western-blot. Al inicio de este

ensayo se analizó el crecimiento de estas bacterias en orina, se inocularon 15×10^8 UFC/ml de cada cepa y después de 18 horas de incubación se recuperaron 1.57×10^{16} UFC/ml de la cepa CFT073 y 1×10^{11} UFC/ml de la cepa 049766. El cultivo de orina recuperado de cada cepa fue sometido a un proceso de centrifugación y filtración ($0.22 \mu\text{m}$), la muestra de orina obtenida en cada paso se analizó por Dot-Blot utilizando los anticuerpos Anti-Sat y Anti-Fago B17 (Fig. 21). Los resultados obtenidos muestran la presencia de Sat en la orina inoculada con las cepas de *E. coli* CFT073 y 049766 (Fig. 21).

En la orina inoculada con la cepa CFT073 ó 049766 se identificó la presencia de Sat en la orina filtrada y centrifugada, utilizando los anticuerpos anti-Sat y anti-Fago B17, observando una mayor sensibilidad utilizando el anticuerpo anti-Fago B17 (reactividad hasta $12.5 \mu\text{g/mL}$) comparado con el anticuerpo anti-Sat (Fig 21).

Con el fin de confirmar la secreción de Sat por las cepas 049766 y CFT073 en la orina utilizada se evaluaron mediante un perfil por SDS-PAGE al 8% las muestras de orina centrifugadas y filtradas ($0.22 \mu\text{m}$). Los resultados se muestran en la Figura 22. El estudio verifico la presencia de una banda tenue con un peso aproximado de 107 kDa en las muestras de orina centrifugadas, el resultado fue confirmado mediante análisis por western-Blot con suero Anti-Sat y Anti-Fago B17. No se observó ninguna banda correspondiente a Sat en el perfil electroforético de las muestras filtradas o en las muestras donde se utilizó un filtro previamente bloqueado con BSA. En las muestras analizadas se observó la presencia de una proteína con un peso aproximado de 70 kDa. Al respecto se analizó la orina estéril utilizada en el ensayo mediante SDS-PAGE al 8%, observando la misma proteína. Sin embargo, los anticuerpos Anti-Sat y Anti-Fago B17 no identificaron esta proteína.

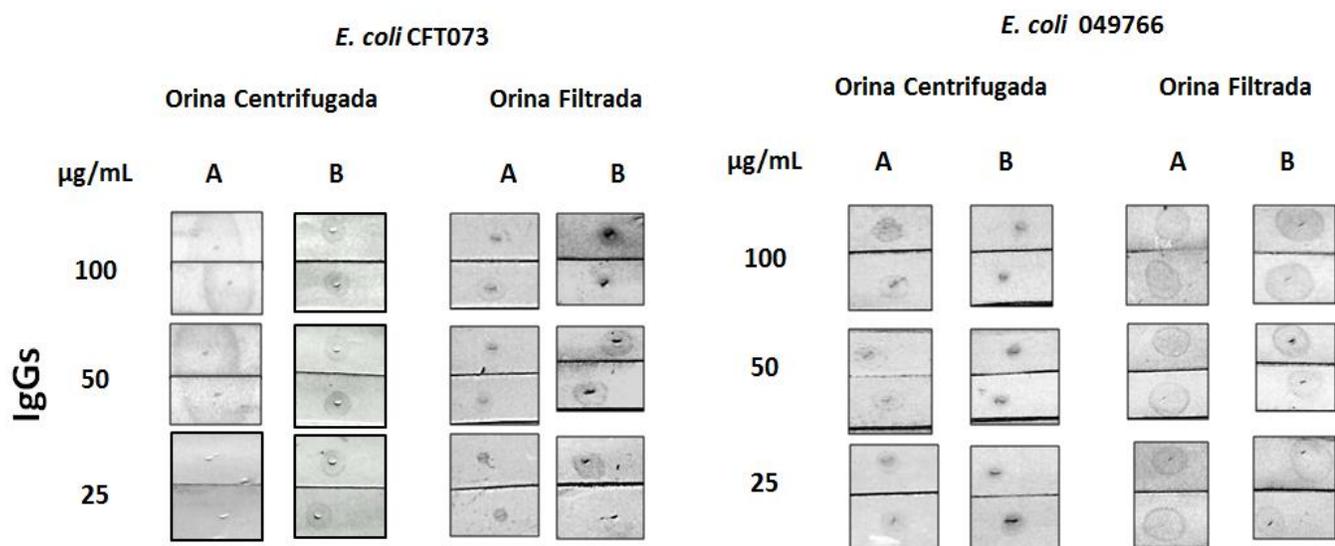


Fig. 21. Detección de Sat por Dot-Blot en orina inoculada con la cepa CFT073 y 049766. Se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa 2 μ L del concentrado centrifugado y filtrado obtenido de la orina cultivada con la cepa de *E. coli* CFT073 y 049766. Después de bloquear y realizar lavados se probaron 100 μ g/mL de los anticuerpos Anti-Sat (**A**) y Anti-Fago B17 (**B**). La reacción fue amplificada por la adición de IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y revelada con BCIP/NBT como sustrato. Este ensayo se efectuó por duplicado. La resolución de la respuesta obtenida con las IgGs Anti-Fago B17 es positiva en la orina tratada con las cepas.

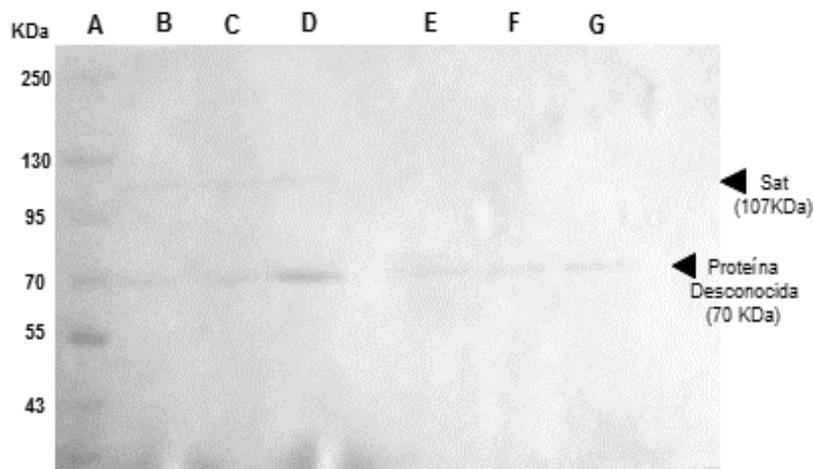


Fig. 22. Identificación de Sat en las muestras de orina centrifugadas y filtradas. Perfil electroforético SDS-PAGE al 8%. Veinte microlitros de orina obtenida después de centrifugar y filtrar se aplicaron a un gel de poliacrilamida al 8%, se utilizaron condiciones desnaturizantes. Carriles: (**A**) Marcador de Peso Molecular Fermentas; (**B**) Orina Centrifugada de la cepa CFT073; (**C**) Orina Filtrada de la cepa CFT073; (**D**) Orina Filtrada con un filtro bloqueado con BSA de la cepa CFT073; (**E**) Orina Centrifugada de la cepa 049766; (**F**) Orina Filtrada de la cepa 049766; (**G**) Orina Filtrada con un filtro bloqueado con BSA de la cepa 049766. Se observa una proteína con un peso molecular mayor de 100 KDa (Sat) y una proteína desconocida con un peso aproximado de 70 KDa.

IX DISCUSIÓN

Las infecciones del tracto urinario son consideradas un problema de salud pública en México, de acuerdo con datos estadísticos de la secretaria de salud se ubica como la tercera causa de morbilidad en el país⁵, presentando además una tasa de mortalidad importante generada principalmente por complicaciones desarrolladas de este padecimiento. El diagnóstico presuntivo de esta patología se lleva a cabo tomando en cuenta un conjunto de signos y síntomas. Dentro del proceso diagnóstico solo en aproximadamente 10% de los casos se investiga al microorganismo responsable de la ITU, esto debido en parte a la saturación que existe en algunos servicios de salud ⁴. Tradicionalmente se emplea un urocultivo como prueba diagnóstica confirmatoria de una ITU, sin embargo, este estudio implica tiempos largos en la identificación del o los patógenos involucrados. Lo anterior origina que en la mayoría de los casos se asigne un tratamiento profiláctico al paciente que al no ser eficaz en contra del patógeno puede ocasionar en algunas cepas resistencia al antimicrobiano suministrado. Dentro de los patógenos bacterianos asociados a las ITUs un patotipo uropatógeno de *Escherichia coli* denominado UPEC (por sus siglas en inglés Uropathogenic *Escherichia coli*) se ha implicado en el 90% de las ITUs adquiridas en la comunidad y poco más del 50% de las ITUs nosocomiales^{40,41}. La alta plasticidad genómica de este patógeno le ha permitido adquirir factores de virulencia que le confieren la capacidad de invadir, adaptarse, infectar y persistir en el entorno renal. Dentro de los factores de virulencia expresados por UPEC se encuentra Sat una serín proteasa de 107 KDa secretada por el 40-50% de cepas de UPEC. Esta toxina perteneciente a la subfamilia de las SPATEs presenta *in vitro* efectos vacuolizantes, citopáticos y citotóxicos sobre

células de riñón y vejiga^{22, 24}. Tales efectos se han relacionado con la capacidad que tiene la toxina de degradar la fodrina, espectrina, caseína y factor de coagulación V^{21, 24}. Al respecto parte de su actividad biológica se ha vinculado con el motivo de serina GDSGS. El efecto observado de esta toxina contribuye en el mecanismo de patogenicidad al daño en el epitelio renal favoreciendo la internalización de UPEC a las células renales del huésped lo que a su vez evita el reconocimiento de la bacteria por el sistema inmune^{12, 21}. Lo anterior favorece un estado de recurrencia en el paciente debido al reservorio bacteriano alojado en el epitelio renal, que de no ser erradicado puede dejar secuelas en el paciente provocando daños en el órgano afectado. Ante este panorama es necesario identificar tempranamente la presencia de la cepa de *E. coli* uropatógena productoras de Sat en el paciente para darle seguimiento y proporcionar un tratamiento personalizado en base a estudios de reto antimicrobiano que elimine al patógeno.

Algunos estudios se han dedicado a seleccionar factores de virulencia comunes en cepas UPEC que funcionen como marcador (marcador de virulencia) para su identificación⁴¹. Algunos trabajos al respecto han considerado a Sat un marcador de virulencia asociado a UPEC, debido a su identificación en aproximadamente la mitad de cepas aisladas causantes de pielonefritis y por la participación que tiene en su mecanismo de patogenicidad. En algunos países han aprovechado el uso de técnicas de biología molecular como la PCR para la detección del gen asociado a Sat en el diagnóstico de UPEC^{28, 43}. Sin embargo, su aplicación se ve limitada a laboratorios especializados debido a los equipos y reactivos costosos del método. Existen otras técnicas o reactivos en el campo de la investigación aplicables al área del diagnóstico. Uno de los ejemplos más claros ha sido el uso de anticuerpos como

una herramienta de apoyo utilizada por mucho tiempo en el diagnóstico de enfermedades. La especificidad y la potencia de un anticuerpo contra su antígeno determinan que los anticuerpos sean reactivos útiles para detectar un antígeno determinado. En años recientes se han popularizado técnicas inmunológicas que contribuyen al diseño de anticuerpos. Una de estas técnicas denominadas Phage display ha funcionado como una herramienta en la identificación de sitios inmunodominantes, su aplicación ha permitido estudiar las interacciones proteína-proteína⁶². La tecnología emergente basada en Phage Display ha beneficiado al área del diagnóstico especialmente por la generación de anticuerpos monoespecíficos que pueden ser utilizados en la detección de moléculas o antígenos siendo una nueva clase de reactivos de diagnóstico^{37,38}.

El presente estudio retoma una investigación desarrollada por Berrocal Pérez A⁴⁶. En dicho trabajo se lograron identificar mediante Phage display motivos inmunodominantes de Sat. Tal investigación contribuyó en la obtención de anticuerpos dirigidos contra la secuencia MSPFAIDLTMVT, identificada como una región en la proteína Sat. Los anticuerpos fueron generados mediante la inmunización de conejos con el fagotopo B17 y un péptido que fue sintetizado con la misma secuencia encontrada. En nuestro estudio se utilizaron los anticuerpos anti-fago B17 y anti-péptido obtenidos en su investigación, con el fin de emplearlos en el desarrollo de un método inmunodiagnóstico para la detección de Sat en orina. Para tal efecto se decidió como primer paso evaluar la reactividad de los anticuerpos antimimotoxos (Anti-Fago B17 y Anti-Péptido) en contra de Sat. Lo anterior originó la necesidad de purificar los antígenos y anticuerpos que se utilizarían durante la realización de este estudio.

Como primera fase se inició con la purificación de las proteínas PetS260I, Pic y Sat, dentro de este proceso se lograron seleccionar las clonas con una mayor capacidad de producción en la obtención de cada una de las toxinas antes mencionadas. El porcentaje de recuperación de las proteínas PetS260I y Pic fue aproximadamente del 1.5% (calculado en base a la obtención de 10 mg en el precipitado inicial), este resultado es razonable considerando trabajos relacionados donde se reportan rendimientos del 3.14%⁶⁴. El proceso de purificación de la toxina Sat presentó algunas complicaciones debido principalmente a la escasa secreción de la toxina en la clona pDG7 seleccionada. Lo anterior originó la búsqueda de la proteína en el sobrenadante de otras clonas pDG7, sin embargo, algunas de ellas no mostraron la presencia de Sat en su perfil electroforético y en otras se observó la misma deficiencia de toxina. Es posible que los hechos antes mencionados puedan estar relacionados con el número de pases o subcultivos realizados en las cepas. Algunos trabajos reportan que un número reducido de subcultivos proporciona un mantenimiento estable del material genético⁴⁷. En nuestro caso existen además otros factores que pudieron haber intervenido como la edad de las células conservadas (fase en el ciclo de crecimiento) y la temperatura de almacenamiento. Se han reportado trabajos que describen una reducción genotípica bacteriana en los procesos de atenuación en patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*⁴⁷. En estos estudios se ha visto que mediante el subcultivo sucesivo del patógeno bajo ciertas condiciones se logra obtener un microorganismo atenuado, lo que resulta en modificaciones fenotípicas debidas a cambios genéticos ocurridos en las cepas bacterianas durante el paso del tiempo. Por estas evidencias y los resultados obtenidos, se piensa que las clonas seleccionadas como hiperproductoras de

PetS260I y Pic probablemente correspondan a las cepas con un menor número de subcultivos, no obstante, esto también explica el comportamiento observado en las clonas pDG7.

Como alternativa en la obtención de Sat, se decidieron utilizar para el estudio tres muestras de concentrados proteínicos de la toxina almacenados en el laboratorio. Las muestras seleccionadas demostraron la identidad de la proteína por western-blot y un número reducido de proteínas contaminantes en su perfil electroforético. Al final la pureza obtenida en las toxinas PetS260I, Pic y Sat fue mayor del 90% tomando en cuenta el bajo número de bandas contaminantes observadas en el perfil electroforético. El análisis de las muestras proteínicas por SDS-PAGE contribuyó al monitoreo en el proceso de purificación observando una reducción gradual de bandas o proteínas contaminantes, al mismo tiempo que se redujo la concentración de proteínas en cada etapa de purificación.

Resulta interesante observar que en algunas pruebas de identidad por Western-blot durante la selección de las clonas, se presentó el reconocimiento de una banda con un peso molecular aproximado de 100 KDa por el suero Anti-Sat. Trabajos previos realizados en el laboratorio con estas proteasas demuestran que esta banda es originada por la autodegradación proteica de la toxina^{65, 45,48}. En algunos artículos se describe la utilización de inhibidores de proteasa como una forma de evitar este efecto de autodegradación, sin embargo, su uso puede ocasionar interferencias en los ensayos ya que generalmente se unen irreversiblemente. En nuestro estudio se optó por reducir el efecto a través de la conservación a bajas temperaturas de la muestra durante la realización de los ensayos, además de la cuantificación y

caracterización rutinaria de la toxina. Al final del estudio se observó una reducción en promedio del 15%.

Se continuó el estudio con la obtención de inmunoglobulinas G (IgG) a partir de los sueros anti-fago B17, anti-péptido, anti-Sat, anti-Pet, anti-Pic, y sueros preinmunes. El proceso de purificación se llevó a cabo utilizando una resina de afinidad conjugada con proteína A (Bio-Rad Affi-Gel Protein A). El proveedor menciona que utilizando un sistema de buffer de la misma marca es posible la purificación de 10 mg de IgG de ratón por mililitro de gel, sin embargo, en nuestro estudio la cantidad de inmunoglobulina G obtenida fue en promedio de 3 mg/mL, aproximadamente tres veces menor que la reportada. Diversos factores determinan el resultado, dentro de los elementos que pudieron intervenir se encuentra las relacionadas con la resina como su capacidad de retención, la regeneración de los sitios de unión después de su uso, el pH óptimo de trabajo, el tiempo de incubación con el suero y la utilización del sistema de buffer recomendado por el proveedor. Pese a la cantidad obtenida de las inmunoglobulinas G, la pureza observada en los perfiles electroforéticos fue buena, de aproximadamente 90%.

Una vez obtenidos los anticuerpos de estudio y las proteínas de prueba se continuó el estudio con el desarrollo de un ensayo de ELISA indirecto con la finalidad de evaluar la reactividad de los anticuerpos antimimoto (Anti-Fago B17 y Anti-péptido) en contra de Sat. Los resultados demostraron una mayor respuesta de las IgGs Anti-Fago B17 en la detección de Sat. En trabajos relacionados al respecto se ha observado un comportamiento similar⁴⁸ donde el anti-fagotopo obtiene una mayor reactividad que los anticuerpos anti-péptido. Los resultados observados en el análisis de los anticuerpos antimimoto por ELISA, permitieron definir las

concentraciones óptimas para la detección de Sat. Se observó además que 50 $\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos anti-fago B17 son capaces de detectar hasta 0.4 $\mu\text{g/ml}$ de Sat con una respuesta adecuada ($>$ a 0.5 de D.O). El control positivo utilizado (anti-Sat) alcanzo lecturas por encima de las obtenidas con los anticuerpos antimimotoxos, por otro lado los anticuerpos anti-Pet y anti-Pic generaron una respuesta similar a las del suero preinmune, estableciendo el punto basal de reconocimiento inespecífico.

La diferencia de reactividades observadas en los anticuerpos probados puede estar asociada a la naturaleza policlonal de los anticuerpos antimimotoxos (anti-fago B17, anti-péptido) y anti-Sat. Lo anterior plantea en primer lugar que las IgGs anti-Sat poseen una población clonal dirigidas contra varios sitios de la toxina ya que fueron producidas por la inmunización de la toxina completa, esto podría generar la unión de las IgGs en contra de una mayor superficie lo que a su vez produce una respuesta alta con lecturas que sobresalen de los valores detectados. Con este argumento es probable entonces que los anticuerpos anti-fago B17 solo reconozcan a los epítomos identificados en Sat provocando una reactividad intermedia debido a su población clonal específica. En los anticuerpos anti-péptido es posible que esté ocurriendo un evento similar donde se unen a un sitio más específico y por lo tanto a una secuencia más reducida de la estructura de Sat ocasionando una saturación del área de reacción generando una respuesta deficiente. En el mismo ensayo se observó además un patrón de reactividad similar con los anticuerpos anti-Sat y anti-Fago B17 empleando 0.8 y 0.4 $\mu\text{g/mL}$ de Sat, este comportamiento indica que empleando los anticuerpos a una concentración mayor a 50 $\mu\text{g/mL}$ son capaces de detectar diferentes cantidades de Sat sin alterar demasiado su respuesta. El estudio

también demostró que ambos anticuerpos antimimotopos, incluso el control positivo (anti-Sat) no son capaces de detectar cantidades cercanas a 0.05 µg/mL de Sat, empleando esta concentración la respuesta obtenida no es confiable por presentar interferencias con lecturas parecidas a los anticuerpos anti-Pet, anti-Pic e IgGs preinmunes. Estos últimos mantuvieron una respuesta constante en los ensayos realizados, siendo útiles como controles en la obtención de una respuesta inespecífica.

El estudio fue continuado a través del desarrollo de un ensayo para verificar el reconocimiento de la secuencia mimetizada del epítipo de Sat por los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-péptido. Para tal fin se utilizó un péptido sintético con la secuencia MSPFAIDLTMV, identificada previamente por Phage display en el estudio de Berrocal Perez⁴⁶. En los resultados obtenidos se observaron lecturas mínimas que expresan poca respuesta ante el péptido. Este resultado puede ser atribuido a la distribución del péptido en la superficie de la microplaca de ELISA, es probable que en el proceso de adsorción una fracción del antígeno haya sufrido un evento de unión con posiciones que evitaron la exposición de los sitios de reconocimiento, además del tamaño del sitio de unión en la secuencia del péptido. Lo anterior aunado a la afinidad de cada anticuerpo resulta en una respuesta deficiente.

Dentro del proceso de evaluación de los anticuerpos por ELISA se estudió la especificidad ante PetS260I y Pic, dos proteínas pertenecientes a la misma subfamilia de las SPATEs. PetS260I es una variante de Pet mutada en la posición serina 260 por una isoleucina. En los resultados se observó que existe un reconocimiento inespecífico de estas toxinas por ambos anticuerpos antimimotopos.

En el ensayo en contra de PetS260I destaca el patrón de reactividad ascendente de las IgG anti-fago B17. Lo anterior indica que el uso de bajas concentraciones de anticuerpo aumenta la capacidad de detección de PetS260I. En el mismo ensayo las IgGs anti-péptido obtuvieron una tendencia que en promedio se encuentra 0.3 unidades de densidad óptica menor a la presentada por los anticuerpos anti-Pet. Los resultados obtenidos son razonables si se toma en cuenta que PetS260I presenta un porcentaje de identidad/similitud estructural con Sat del 53.8/71.1%²¹. Estudios al respecto relacionan el grado de similitud con la actividad biológica que presentan ambas toxinas^{23, 46}. En relación al ensayo realizado en contra de Pic, ambos anticuerpos antimimotopos lograron reconocer a la proteína con una reactividad similar a la del anticuerpo homólogo anti-Pic. Por lo anterior los anticuerpos antimimotopos no son específicos ya que logran detectar a PetS260I y Pic con una respuesta similar a la de su anticuerpo homólogo correspondiente, sin embargo, este resultado es concordante con lo reportado por otros trabajos donde se han encontrado secuencias compartidas entre diferentes SPATEs⁴⁹. En nuestro trabajo la capacidad en la detección de Pic puede ser aprovechada debido a que algunas cepas uropatógenas secretan una variante de esta proteína denominada Pic U, la cual según reportes existe un porcentaje de identidad del 96.7% con la proteína Pic utilizada en este estudio⁵¹. Esta capacidad de respuesta ante Pic favorece el uso de los anticuerpos antimimotopos como reactivos en la detección de un factor de virulencia adicional asociado a UPEC.

El uso de la técnica de ELISA contribuyó a diferenciar la especificidad presentada de los anticuerpos antimimotopos frente a proteínas pertenecientes a la misma subfamilia de las SPATEs, los resultados relacionan la similitud estructural de Sat y

PetS260I. Adicionalmente el contar con anticuerpos que reconozcan una proteína estructuralmente similar a PicU aumenta la probabilidad en la detección de UPEC. En los resultados obtenidos por ELISA, se observó un mejor desempeño de los anticuerpos anti-fago B17 por tal razón fueron seleccionados para continuar con los estudios que desarrollaron con posterioridad.

La siguiente fase de nuestro trabajo consistió en el diseño de un ensayo “in vitro” para la detección rápida de Sat en orina. Al respecto dentro del campo diagnóstico de proteínas asociadas a patógenos; varios trabajos han señalado a la técnica de Dot-blot como una alternativa confiable y que ha dado buenos resultados siendo utilizado en el diagnóstico de bacterias como *Salmonella typhi*⁵², *Mycobacterium tuberculosis*⁵³, algunos parásitos como *Taenia solium*⁵⁵, *Oncocerca volvulus*⁵⁴, incluso en el diagnóstico de rabia⁵⁶ por mencionar algunos. Por lo anterior decidimos utilizar en nuestro trabajo la técnica de Dot-Blot para la detección de Sat en orina. Previo a la aplicación del método en orina, se comenzó por estandarizar la técnica evaluando la reactividad los anticuerpos anti-Fago B17 en contra de Sat y posteriormente la especificidad ante PetS260I y Pic. Dentro de nuestra investigación se introdujeron los anticuerpos anti-péptido en el desarrollo del primer ensayo (Fig. 17), se observó la misma deficiencia en su reactividad presentada en ensayos anteriores. Esta respuesta se atribuye a un esquema de inmunización inadecuado con el péptido sintético por tal motivo se excluyó su uso de los ensayos posteriores. En el proceso de evaluación por Dot-Blot en contra de Sat se observó que los anticuerpos anti-fago B17 mantienen una intensidad uniforme en su respuesta, sin embargo, su sensibilidad es menor ya que generalmente detectan una mayor concentración de proteína que las IgGs anti-Sat. En los ensayos de ELISA se había

observado previamente esta diferencia de respuesta. Consideramos que este resultado se encuentra asociado al reconocimiento de un epítope inmunodominante de Sat por los anticuerpos anti-Fago B17, ya que la intensidad no se reduce con la disminución de la concentración de antígeno.

Por otro lado en las pruebas de reconocimiento inespecífico por Dot-Blot se observó que existe una detección mutua de los anticuerpos anti-Pet y Anti-Sat por las proteínas PetS260I y Sat, esto confirma la similitud estructural reportada entre ambas toxinas. En las pruebas respectivas a Pic se observó que aquellos anticuerpos que van dirigidos en contra de Sat (anti- Fago B17 y Anti-Sat) logran reconocer a Pic a concentraciones altas. No ocurre lo mismo con el reconocimiento de Sat por las IgGs anti-Pic, este hecho hace suponer la existencia de epítomos que en la forma nativa de Pic sean similares a los de Sat. El reconocimiento cruzado con otras SPATEs ha sido reportado por las secuencias compartidas entre algunas toxinas de esta subfamilia⁵⁰. Estudios previos realizados por Berrocal Perez A⁴⁶ mencionan la falta de especificidad en contra de Pic observada en nuestro trabajo. En tal caso los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los reportados previamente por Berrocal Perez A. Este argumento contribuye a explicar la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-fago B17 en contra de Pic. Si bien ya se había mencionado que existe una falta de especificidad por la detección de Pic, puede ser útil para la aplicación de un diagnóstico más completo en la detección de ambas SPATEs asociadas a UPEC.

Como parte de nuestro estudio se realizó un ensayo adicional de Dot-Blot utilizando LPS puro obtenido de una *E. coli* patógena (donada por al Dr. Armando Navarro. Facultad de Medicina UNAM). Esta prueba se realizó previo a la aplicación del

método en una muestra de orina. La razón de dicho ensayo surgió a raíz de encontrar restos de LPS en una muestra de orina contaminada por *E. coli*. La reactividad fue pobre a concentraciones de 250 µg/mL, incluso con el anticuerpo homólogo lo que indica que existe un inadecuado reconocimiento del antígeno. Lo que sugiere una buena especificidad de nuestros anticuerpos.

Se continuó el proyecto desarrollando un ensayo *in vitro* con la proteína Sat pura en orina, su propósito era comprobar la funcionalidad de los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Sat en este medio. Para la realización de este estudio era necesario contar con una muestra de orina sin la presencia de la proteína de estudio y una cuenta escasa de bacterias. El urocultivo de la orina seleccionada mostro resultados satisfactorios, sin embargo, como paso adicional se filtró por una membrana con un poro de 0.22 µm para evitar la contaminación con bacterias o la introducción de restos celulares en el estudio. Un análisis comparativo de los perfiles de respuesta obtenidos con los anticuerpos anti-Sat y Anti-Fago B17 en buffer (Fig. 15) y con el uso de orina (Fig. 18) mostro una reducción en este último. La sensibilidad de los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Sat disminuye con el uso de orina hasta la mitad de la concentración detectada en buffer. Al respecto en la orina existen varios factores que pueden haber contribuido a esta reducción tales como el pH, proteasas, sales y solutos. Es probable que estos factores hayan modificado la estructura terciaria de la proteína la cual es necesaria para que los anticuerpos se unan adecuadamente al sitio de unión. Tomando en cuenta que el epítopo identificado en Sat es discontinuo⁴⁶ la modificación de su conformación pudo haber sido alterada por las propiedades químicas de la orina, reduciendo la respuesta en el reconocimiento de los epítopos identificados.

Los hechos observados determinan que la proteína podría modificarse o degradarse con la orina, sin embargo, dentro del mecanismo de patogenicidad descrito por algunos autores el proceso de secreción de Sat en UPEC se desarrolla en este medio, siendo el entorno “in vivo” de la toxina. Lo anterior, planteó el diseño de un estudio “in vitro” en orina con dos cepas productoras de Sat (UPEC CFT073 y EAEC 049766) para simular las condiciones de secreción y evaluar por Dot-Blot la detección de la proteína nativa con los anticuerpos anti-Fago B17 y anti-Sat. En el ensayo se observó la presencia de Sat por SDS-PAGE y western-blot en el sobrenadante de las cepas antes y después del cultivo con orina. En el mismo estudio observamos en el gel de poliacrilamida una proteína de 70 kDa con el uso de orina, sin embargo, no se identificó por western-blot con los anticuerpos de prueba descartando reacciones inespecíficas con los componentes en la orina. Dicha banda puede pertenecer a restos de proteínas de bajo peso molecular como microalbúminas las cuales son secretadas normalmente en mínimas cantidades.

Con relación al cultivo de las cepas en orina nuestro estudio demostró un mayor desarrollo de la cepa uropatógena CFT073 que la enteroagregativa 049766. Al respecto Alteri CJ y cols, 2009 sugieren la utilización de péptidos y aminoácidos por CFT073 como principal fuente de carbono durante una infección de vías urinarias. Por otro lado Andrew T. y cols. han demostrado que esta cepa (CFT073) puede degradar la serina un aminoácido abundante en la orina y a su vez metabolizar el acetato generado con una serie de enzimas que le proporcionan una ventaja en un entorno tan escaso de nutrientes⁶⁶. Se ha sugerido que el crecimiento en la orina puede representar una característica específica de las bacterias uropatógenas, sin embargo, en nuestro estudio se observó que la cepa 049766 asociada a cuadros de

diarrea persistente, también puede desarrollarse en orina. Este hecho ya había sido observado por Alteri CJ y Mobley HL en 2007, ellos reportan el uso de orina como medio de cultivo y demuestran que la mayoría de las cepas de *E. coli* tienen la capacidad de crecer en la orina humana a pesar de ser clasificado como comensal, enteropatógeno o uropatógeno. Aunado a esto existe evidencia reciente de un brote de ITUs causado por una cepa EAEC O78:H10, que demuestra la heterogeneidad y capacidad de este patotipo para desarrollarse en el tracto urinario⁶¹.

Previo a la detección de Sat en la orina cultivada con las cepas antes mencionadas, fue necesario aplicar un tratamiento para eliminar la presencia de partículas grandes que pudieran interferir en el estudio. Después de un proceso de centrifugación o filtración (0.22 μ m), la orina obtenida de cada cepa fue analizada con los anticuerpos de estudio (anti-Fago B17 y anti-Sat). Los resultados mostraron mejores resultados en la orina filtrada después bloquear el filtro con BSA, esta medida fue aplicada al observar ausencia de Sat en el filtrado, lo que sugiere la unión de la proteína al filtro principalmente a la nitrocelulosa un componente de la membrana filtrante con afinidad por las proteínas. El análisis por Dot-Blot de la orina centrifugada mostro resultados comparables con la filtración de la muestra, por lo que ambos métodos son adecuados para evitar reacciones cruzadas con partículas grandes. No obstante, de los dos métodos utilizados, la centrifugación es una opción más versátil, rápida y económica.

La detección “in vitro” de Sat por Dot-blot con la orina obtenida de las diferentes cepas proporciono información importante sobre la reactividad de los anticuerpos anti-Sat y anti-Fago B17. La respuesta fue mayor empleando los anticuerpos anti-Fago B17, resultado diferente a lo observado previamente donde los anticuerpos

anti-Sat mostraban la reacción más alta. No obstante, ambos anticuerpos reaccionaron con una respuesta mayor en la orina de la cepa 049766. Se piensa que estos resultados se asocian a la especificidad mostrada en los anticuerpos y al grupo de SPATEs secretadas por las cepas de prueba. En las cepas empleadas además de Sat se han identificado otras proteínas de la misma subfamilia, Pic se ha descrito en la cepa 049766 y PicU una variante 96.7% idéntica a Pic es producida de manera natural por la cepa uropatógena CFT073⁵¹. En los anticuerpos empleados se identificó una reacción cruzada en contra de Pet, no obstante, el anticuerpo antimimotoipo (anti-Fago B17) presentó además el reconocimiento en contra de Pic. De acuerdo con lo anterior es posible que en la orina obtenida de la cepa enteroagregativa los anticuerpos empleados hayan reconocido en conjunto con Sat, a las proteínas de la misma subfamilia con la que obtuvieron una reacción cruzada, hecho que explicaría la diferencia de respuesta con la orina la cepa CFT073.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que los anticuerpos anti-Fago B17 pueden ser utilizados como herramientas de inmunodiagnóstico para la detección oportuna de Sat y Pic en muestras de orina, así como en la identificación de Pet, otra proteína asociada a bacterias patógenas del tracto intestinal (EAEC) con potencial uropatógeno. La respuesta observada de los anticuerpos Anti-fago B17 permitirán continuar con el desarrollo de pruebas en muestras clínicas y dar paso al diseño de un dispositivo de screening que ayude al médico en la toma de decisión para el diagnóstico correcto de la bacteria y así proporcionar al paciente un tratamiento personalizado.

X CONCLUSIONES

Se pueden obtener rendimientos adecuados en el proceso de purificación de proteínas con tiempos rápidos de trabajo y condiciones de temperatura controladas.

Es importante llevar a cabo un control en el número de subcultivos en las clonas mínimas para evitar la pérdida genotípica de la misma.

Los anticuerpos anti-Fago B17 tienen la capacidad de reconocer a Pic una serin proteasa asociada a cepas uropatógenas de *E.coli* y a Pet una proteína estructuralmente similar a Sat.

Existe buena reactividad de los anticuerpos anti-Fago B17 en el reconocimiento de la proteína Sat nativa secretada en orina, una opción útil en el tratamiento previo de la muestra de orina es la centrifugación de la misma.

La técnica de Dot-Blot puede ser implementada para el uso de pruebas de screening en la detección de Sat y Pic para la identificación de cepas uropatógenas de *E. coli*.

Existen secuencias inmunodominantes compartidas entre las diferentes SPATEs que pueden ser utilizadas para la identificación de más de una proteína.

XI PERSPECTIVAS

Emplear los resultados obtenidos para el diseño de un estudio de campo en muestras de orina de pacientes con infección de vías urinarias empleando los anticuerpos anti-Fago B17 y realizar un análisis estadístico para evaluar su aplicación.

Establecer la realización de ensayos utilizando otras SPATEs diferentes producidas por UPEC como la proteína VAT.

XII REFERENCIAS

1. Shaeffer A.J, Shaeffer E.M. Infections of the Urinary Tract. Campbell-Walsh Urology. Décima Edición. 2012 [documento en la Internet]. [Citado 2013 Sep 11]; disponible en: http://elibrary.rajavithi.go.th/homelibrary/EBook_data/Campbelalsh%20Urology10th2011/10.pdf
2. Molina Lopez J, Manjarrez Hernandez HÁ, Aparicio Ozores G. *Escherichia coli* Uropatógena. In: Molina López J. Microbiología y Parasitología Medicas. 4ta Ed. México: Méndez Editores; 2010. P. 106-110.
3. Diaz A.E. De la bacteriuria asintomática a la infección de vías urinarias: ¿Tratarla o no hacerlo?. Artículo de Revision. Univ. Med. Bogota(Colombia) 2008; 49(2): 206-220.
4. Barragán AIA BA. 1er Conceso Nacional sobre manejo Antimicrobiano de Infecciones de Vías Urinarias (IVUs) en el Adulto. Bol Coleg Mex Urol 2005; 20(2): 46-57.
5. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud, México D.F. Panorama Epidemiológico de las infecciones de las vías urinarias en México. Reporte de Periodo 2003 – 2008; 51(13) Semana 51: 1-4. URL disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2009/sem51.pdf>, (fecha de acceso: 15 de Septiembre del 2013).
6. González-Chamorro F, Palacios R, Alcover J, Campos J, Borrego F, Dámaso D. La infección urinaria y su prevención. Actas Urológicas Españolas (Edición en Español) [Internet]. 2012 Enero [cited 2013 Sep 29]; 36(1):48–53. Disponible en: [http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/eop/S0210-4806\(11\)00229-4.pdf](http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/eop/S0210-4806(11)00229-4.pdf)
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires, 1999
8. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. Int J Nephrol. 2012 :681473. doi:10.1155/2012/681473. 15 paginas.
9. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev. 1991 Jan;4(1):80-128.
10. Thumbikat, P. et al. Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. PLoS Pathog. 2009 May;5(5):e1000415.
11. Anerson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract. Trends Microbiol 2004 Sep;12(9):424-30.
12. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010 Jan;8(1):26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265.

13. J. B. Neilands et al. Minireview: Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J Biol Chem.* 1995. Nov; 270 (45): 26723–26726.
14. Hofman P, Le Negrate G, Mograbi B, Hofman V, Brest P, Alliana-Schmid A, Flatau G et al. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2000 Oct;68(4):522-8.
15. Guyer DM, Gunther NW 4th, Mobley HL. Secreted Proteins and Other Features Specific to Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2001 Mar 1;183 (Suppl 1):S32-5.
16. Navarro-Garcia F, Elias WP. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes.* 2011 Jan-Feb;2(1):13-24. doi: 10.4161/gmic.2.1.14933.
17. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1231-43.
18. Nick J. Parham, Usha Srinivasan, Mickaël Desvaux, Betsy Foxman, Carl F. Marrs, Ian R. Henderson. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jan 15;230(1):73-83.
19. Parreira VR, Gyles CL. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect. Immun.* 2003 Sep;71(9):5087–96.
20. Dziva F, Stevens MP. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology [Internet].* 2008 [citado 2013 Sep 29];37(4):355–66. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079450802216652>
21. Dutta PR, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* [Internet]. 2002 12–1 [citado 2013 Sep 29];70(12):7105–13. Disponible en: <http://iai.asm.org/content/70/12/7105>
22. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* Oct 2000. 38(1):53-66.
23. Guyer, D.M., Radulovic, S., Jones, F.E., Mobley, H.L. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun.* 2002. 70, 4539–4546.
24. Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes F-E, Mobley HLT. Protease Activity, Secretion, Cell Entry, Cytotoxicity, and Cellular Targets of Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* [Internet]. 2006 11–1 [citado 2013 Sep 29];74(11):6124–34. Disponible en: <http://iai.asm.org/content/74/11/6124>
25. Guignot J, Chaplais C, Coconnier-Polter MH, Servin AL. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr

- diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2007 Jan;9(1):204-21. Epub 2006 Aug 11.
26. Rodríguez-Angeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx [revista en la Internet]*. 2002 Sep [citado 2013 Sep 11] ; 44(5): 464-475. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es.
 27. Molina-López J, Manjarrez-Hernández HÁ. Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, et. al. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries.* 2011 Dec 13;5(12):840-849.
 28. Arenas Hernandez M, Navarro Ocaña A., Martinez A. Identificación de *Escherichia coli* uropatógena por reacción en cadena de la polimerasa múltiple y serotipificación. En: 4to congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud. Mexico: UNAM, BUAP; Junio 2013.
 29. Wu AHB. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta [Internet]*. 2006 Jul 31 [citado 2013 Sep 29];369(2):119–24. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106002075>
 30. Roca P, Oliver J, Rodriguez M. A. *Bioquímica: técnicas y métodos.* España; Madrid. Helice. 2004. p. 202-210.
 31. Beltrán PM, Falero GI, Gonzalez AO. Inmunología Experimental. En: *Los inmunoensayos enzimáticos.* 1.ed. La Habana, 1997:1-35.
 32. Stenman UH. Immunoassay Standardization: Is It Possible, Who Is Responsible, Who Is Capable?. *Clin Chem.* 2001 May;47(5):815-20.
 33. Daniel MacDougall , Warren B. Crummett ,et al. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 1980, 52, 2242–2249.
 34. Trevino EA, Weissfeld AS. The case for point-of-care testing in infectious-disease diagnosis. *Clin Microbiol Newsl,* 2007; 29: 177-179.
 35. Jill Yeakel. Immunoassay techniques [Internet]. The Center for forensic science research and education.; Available from: <http://forensicscienceeducation.org/wp-content/uploads/2013/02/Immunoassay-Techniques-student-copy.pdf>.
 36. Felipe Ochoa P. et al. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunopidemiológicos. Finlay Ediciones. Cuba. 2012 [documento en la Internet]. [citado 2013 Sep 11]; disponible en : <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>
 37. Hairul Bahara NH, Tye GJ, Choong YS, Ong EB, Ismail A, Lim TS. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals.* 2013 Jul;41(4):209-16. doi: 10.1016/j.biologicals.2013.04.001. Epub 2013 May 3.
 38. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv.* 2010 Nov-

- Dec;28(6):849-58. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004. Epub 2010 Jul 23.
39. Eslava C, Navarro-García F, Czczulin JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro JP. Pet, an Autotransporter Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1998 Jul 1;66(7):3155–63.
 40. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 8 de julio de 2002;113 Suppl 1A:5S-13S.
 41. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008 Aug;85(1):11–9.
 42. Toval F, Köhler C-D, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al. Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb 1;52(2):407–18.
 43. Saraylu J, Mehrabadi JF, Fooladi AAI, Sabbaghi A, Aghamirzaei HM, Hasankhani M. Prevalence and Evaluation of Toxin Genes among Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Isolates by Duplex PCR. *Journal of Medical Bacteriology* [Internet]. 2012 [cited 2014 Aug 3];1(1, 2). Available from: <http://jmb.tums.ac.ir/index.php/jmb/article/view/61>
 44. Azzazy HME, Highsmith WE. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002 Sep;35(6):425–45.
 45. Berrocal Pérez, Alejandra, sustentante Identificación por el método de Phage display de mimótopos de epítopes inmunodominantes en la proteína sat / 2013.
 46. Villaseca JM, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. Pet Toxin from Enteroaggregative *Escherichia coli* Produces Cellular Damage Associated with Fodrin Disruption. *Infect Immun*. 2000 Oct 1;68(10):5920–7.
 47. Molina-Torres CA, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole ST, Vera-Cabrera L. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. 2010 Apr;59(Pt 4):384–91.
 48. Hernández Ruiz, Columba Grisel, sustentante Detección rápida de proteasas de serina de la sub-familia spate's (serine proteases autotransporter from enterobacteriaceae) / 2013.
 49. Dautin N. Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins (Basel)*. 2010 May 28;2(6):1179–206.
 50. Ulises H-C, Tatiana G, Karlen G, Guillermo M-H, Juan X-C, Carlos E. Peptide sequences identified by Phage display are immunodominant functional motifs of Pet and Pic serine proteases secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Peptides*. 2009 Dec;30(12):2127–35.
 51. Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jan 15;230(1):73–83.

52. Cardona-Castro N, Gotuzzo E, Rodriguez M, Guerra H. Clinical Application of a Dot Blot Test for Diagnosis of Enteric Fever Due to *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Patients with Typhoid Fever from Colombia and Peru. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Mar;7(2):312–3.
53. Vera-Cabrera L, Rendon A, Diaz-Rodriguez M, Handzel V, Laszlo A. Dot Blot Assay for Detection of Antidiacyltrehalose Antibodies in Tuberculous Patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Sep;6(5):686–9.
54. Guzmán GE, Awadzi K, Opoku N, Narayanan RB, Akuffo HO. Comparison between the skin snip test and simple dot blot assay as potential rapid assessment tools for Onchocerciasis in the postcontrol era in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Sep;9(5):1014–20.
55. Agudelo PF, Palacio LG. Dot-Blot para el diagnostic de la cisticercosis porcina. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*2009,28(3), 1077-1084.
56. Madhusudana SN, Paul JPV, Abhilash VK, Suja MS. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. *Int J Infect Dis*. 2004 Nov;8(6):339–45.
57. Alteri CJ, Smith SN, Mobley HLT. Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000448.
58. Anfora AT, Halladin DK, Haugen BJ, Welch RA. Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 is adapted to acetatogenic growth but does not require acetate during murine urinary tract infection. *Infect Immun*. 2008 Dec;76(12):5760–7.
59. Alteri CJ, Mobley HLT. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect Immun*. 2007 Jun;75(6):2679–88.
60. Boll EJ, Struve C, Boisen N, Olesen B, Stahlhut SG, Krogfelt KA. 2013. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect. Immun*. 81:1164–1171. 10.1128/IAI.01376-1
61. Olesen B, Scheutz F, Andersen RL, Menard M, Boisen N, Johnston B, Hansen DS, Krogfelt KA, Nataro JP, Johnson JR. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol*. 50:3703–3711. 10.1128/JCM.01909-12
62. Sidhu SS, Fairbrother WJ, Deshayes K. Exploring protein-protein interactions with Phage display. *Chembiochem*. 2003 Jan 3;4(1):14–25.
63. Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D. & Warren, J. W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: Role of hemolysin in some strains. *Infect. Immunol*. 1990. May; 58(5), 1281–1289.
64. Eslava C, Villaseca J, Morales R, Navarro A, Cravioto A. Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. 1993. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105; p. 44.

65. Benitez A , Eslava C , Gonzalez C, Torres M. Pet Induces IL1, TNF α , MIF and IL1Ra Through the IKK $\alpha\beta$ /NF κ B Pathway. Open Immunol J. 2011. July; 4(1), 16-21.

XIII ANEXOS

XIII.1 LISTA DE MATERIALES

Biológicos

-Cepas de *Escherichia coli*.

E. coli HB101 (pCEF2) productora de la proteína Pet mutada en el aminoácido nucleofílico serina 260 por una Isoleucina (PetS260I).

E. coli HB101 (p56) clona mínima productora de Pic.

E. coli HB101 (pDG7) clona mínima productora de Sat.

E. coli HB101 (no patógena).

Cepa de *E. coli* Uropatogénica CFT073 (O6:K2:H1) aislada de una mujer con pielonefritis.

Cepa de *E. coli* Enteroagregativa 049766 (O?:H10) aislada de un brote de diarrea en un Hospital Pediátrico de México.

-Antígenos.

Proteína Pet, mutada en el aminoácido Serina 260 (aminoácido nucleofílico) por una Isoleucina (PetS260I).

Proteína Pic.

Proteína Sat.

Péptido sintético con la secuencia aminoacídica MSPFAIDLTMUVS acoplado a KLH (Byosynthesis® Lewisville, Texas).

Lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O157.

-Anticuerpos

Anti IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Millipore®).

-Sueros para la purificación de Anticuerpos.

Suero de conejo Preimmune (Suero Preimmune).

Suero de conejo obtenido de la inmunización de PetS260I (Suero Anti-Pet).

Suero de conejo obtenido de la inmunización de Pic (Suero Anti-Pic).

Suero de conejo obtenido de la inmunización de Sat (Suero Anti-Sat).

Suero de conejo obtenido de la inmunización del Fagotopo B17 (Suero Anti-FagotopoB17).

Suero de conejo obtenido de la inmunización del péptido mimotopo (AIDLTM) conjugado con KLH (Hemocianina de Lapa Californiana) (Suero Anti-Péptido).

-Orina de un paciente sano, sin presencia de bacteriuria o algún trastorno urinario.

Primera orina de la mañana colectada del chorro medio en un envase comercial estéril.

Químicos

-Medios de Cultivo

- Bacto Triptona (Becton dickinson®)
- Extracto de Levadura (Sigma Aldrich®)
- Agar Luria Bertani (LB) de formulación interna con o sin la adición de Tetraciclina (10 µg/ml) o Ampicilina (5 µg/ml)
- Base de Agar Sangre (Bioxon®)
- Agar Mc Conkey (Bioxon®)
- Caldo LB de formulación interna con o sin la adición de Tetraciclina (10 µg/ml) o Ampicilina (5 µg/ml).

-Reactivos

- Agua Destilada
- Agua Desionizada (Destilador Millipore® Direct Q3)
- Hidróxido de sodio (Merck®)
- Sulfato de Amonio (Reactivos Química Meyer®)
- Citrato de sodio (JT Baker®)
- Fosfato de Potasio (JT Baker®)
- Fosfato monobásico de Sodio (JT Baker®)
- Fosfato Dibasico de sodio (JT Baker®)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Sigma Aldrich®)
- Ácido Etilendiaminotetraacético (Sigma Aldrich®)
- Acrilamida (Bio-Rad®)
- Bisacrilamida (Bio-Rad®)
- Dodecilsulfato de sodio(SDS) (Sigma Aldrich®)
- Persulfato de Amonio (APS) (Sigma Aldrich®)
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad®)
- Reactivo de Bradford (Bio-Rad®)
- Cloruro de Sodio (JT Baker®)
- Cloruro de Potasio (JT Baker®)
- Azul de Coomasie (Sigma Aldrich®)
- Metanol (JT Baker®)
- Ácido Acético Glacial (JT Baker®)
- Glicina (Bio-Rad®)
- Tween 20 (Sigma Aldrich®)
- Carbonato de sodio (JT Baker®)
- Leche descremada (Svelty®)
- Albumina de Suero Bovino (BSA) (Sigma Aldrich®)
- Dietanolamina (Sigma Aldrich®)
- Cloruro de Magnesio (Merck®)
- Sustrato de Fosfatasa Alcalina BCIP/NBT (Sigma Aldrich®)
- Resina de Agarosa acoplada a Proteína A de *Staphylococcus aureus* (Bio-Rad®).

Equipo e Instrumental

- Placas de ELISA (COSTAR® 3590)

- Membrana de Nitrocelulosa (Bio-Rad®)
- Tubos Falcon (Axygen®)
- Tubos de Ensayo (Pyrex®)
- Filtro (Millipore®) con un poro de 0.22µm de diámetro
- Matraces y probetas de 100, 250, 500 y 1000 mL (Pyrex®)
- Pipetas Serológicas de 2, 5 y 10 mL (Pyrex®)
- Micropipetas (Eppendorff®) de 10, 100 y 1000µL
- Puntas para Micropipetas universales (Axygen®)
- Gradillas
- Cajas Petri desechables
- Mechero Fisher
- Tripie con lámina de asbesto.
- Autoclave (AESAs®)
- Incubadora con Agitación G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.)
- Centrifuga (Sorvall® RT6000D)
- Vortex (Genie 2®)
- Fuente de Poder para Electroforesis (Bio-Rad®)
- Cámara para electroforesis y electrotransferencia (Bio-Rad®)
- Incubadora para bacteriología (Riossa®)
- Shaker de balanceo (Heidolph Duomax 1030®)
- Shaker orbital (Bellco Biotechnology®)
- Espectrofotómetro UV/visible (Spectronic® Genesys 5)
- Lector de Placas ELISA (MR580, Dynatech®)
- Balanza Granataría (OHAUS®)
- Balanza Analítica (OHAUS®).