



21, 23  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

**ESTUDIO DE UNA PROTEINA CON ACTIVIDAD  
CITOTOXICA AISLADA DE UNA CEPA  
DE E. COLI**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA LAURA LOPEZ ALVAREZ

MEXICO, D. F.,

MARZO. 1988.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## G L O S A R I O

E CET: Escherichia coli enterotoxigénica  
E CEI: Escherichia coli enteroinvasora  
E CEP: Escherichia coli enteropatogénica  
E CEH: Escherichia coli asociada a colitis hemorrágica  
CFA/I: Factor de colonización I  
CFA/II: Factor de colonización II  
ST: Enterotoxina termoestable  
LT: Enterotoxina termolábil  
CT: Toxina del cólera  
VERO: Células de riñón de mono verde africano  
HELA: Células humanas cervicales de carcinoma  
CHO: Células de ovario de Hamster Chino  
EF-1: Factor de elongación 1  
EF-2: Factor de elongación 2  
EDTA: Acido Etilendiamino Tetracético (Sal disódica)  
TEMED: N,N,N',N',- Tetrametiletilendiamina  
BSA: Albúmina sérica de bovino  
U: Unidades

## I N D I C E

	Pág.	
Capítulo I	INTRODUCCION	1
Capítulo II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	21
Capítulo III	MATERIAL Y METODOS	23
Capítulo IV	RESULTADOS	50
Capítulo V	CONCLUSIONES	70
	BIBLIOGRAFIA	72

## CAPITULO I

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

ESCHERICHIA COLI

La bacteria de Escherichia coli fué descrita por Escherich a fines del siglo pasado. Es un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tribu Eschericheae, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. (1,2)

Varias cepas de Escherichia coli se han asociado con la producción de diarreas en humanos, estas E. coli pertenecen a cuatro grupos que son:

- 1) Escherichia coli enterotoxigénica (ECET)
- 2) Escherichia coli enteroinvasora (ECEI)
- 3) Escherichia coli enteropatogénica (ECEP)
- 4) Escherichia coli asociada a colitis hemorrágica (ECEH)

Cada uno de estos grupos de E. coli manifiesta -- distintos mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos, epidemiología y se asocian a diferentes serogrupos: (1)

Escherichia coli enterotoxigénica (ECET)

Son bioserotipos de E. coli dotados de la capacidad de producir enterotoxina termolábil (LT) y/o termoestable (ST). Además algunos pueden producir estructuras superficiales denominadas fimbrias, pilis o adhesinas, cuya función es promover la fijación de la bacteria a la mucosa intestinal. En las muestras de origen humano estas estructuras son llamadas factores antigénicos de colonización ---- (CFA).

Las ECET asociadas con infecciones humanas pueden presentar tres tipos de factores de colonización, denominados: CFA/I, CFA/II y PCF-8775. (1)

## TOXINAS

Las toxinas microbianas habitualmente se agrupan - como exotoxinas o endotoxinas.

Las características esenciales de cada grupo se - mencionan en el siguiente cuadro: (2)

Cuadro 1: Diferenciación de las exotoxinas de las endotoxi-  
nas

### EXOTOXINAS

Excretadas por células vivien-  
tes, se hallan en concentra-  
ciones elevadas en medio lí-  
quido.

Polipéptidos de peso molecu-  
lar de 10,000 a 900,000

Altamente antigénicas, esti-  
mulan la formación de antito-  
xina de título elevado. La  
antitoxina neutraliza la to-  
xina.

Convertidas a toxoides ató-  
xicos antigénicos con la for-  
malina, ácidos, calor, etc.

Muy tóxicas; mortales para -  
animales de laboratorio en -  
dosis de microgramos o menos.

No producen fiebre en el -  
huésped

### ENDOTOXINAS

Parte integral de la pared  
celular microbiana de los  
organismos Gram negativos,  
liberadas al ser desinte-  
grada dicha pared.

Polisacáridos complejos.  
Porción de lípido A, quizá  
sea la responsable de la -  
toxicidad.

No estimulan la formación  
de antitoxina estimulan la  
formación de anticuerpos -  
al residuo de polisacárido

No son convertidas a toxoi-  
des.

Poco tóxicas, mortales pa-  
ra animales de laboratorio  
en dosis de cientos de mi-  
crogramos.

Producen fiebre en el hués-  
ped con frecuencia.

Las toxinas microbianas también se pueden clasificar como:

- 1) Enterotoxinas: Son toxinas que afectan directamente el -- funcionamiento de las células intestinales por defectos en el mecanismo de absorción y secreción de fluidos. Son del tipo ST,LT y CT.
- 2) Citotoxinas: Dan muerte a las células ya que hay un ataque tóxico con consecuencia de muerte a las células.
- 3) Citotoninas: Afectan el tono de la célula, las deforman -- pero no le dan muerte a la célula.

La American Society for Microbiology las clasifica - como:

- 1) Acción extracelular
- 2) Acción intracelular: Cuyo mecanismo de acción involucra:
  - a) Unión a receptores específicos en la membrana plasmática
  - b) Internalización a través de la membrana.
  - c) Interacción con un blanco intracelular.

Las exotoxinas bacterianas y glicoproteínas hormonales poseen estructuras similares. Ambos tipos de moléculas tienen dos componentes en su estructura. La cadena A posee la actividad biológica, mientras que la cadena B media la --- unión a receptores. (5)

Las enterotoxinas de ECET (LT y ST) presentan las - siguientes características:

#### Enterotoxina LT (Termolábil)

Es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 80,000 daltones, es destruida a 60°C, su molécula --- comprende dos subunidades A y B unidas no covalentemente.

La subunidad A representa la parte biológicamente - activa de la molécula, está formada por A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>; mientras que la subunidad B es la responsable de la fijación a las células del huésped. Una vez excretada por la bacteria, la toxina LT

se fija al gangliósido  $GM_1$  del epitelio intestinal por medio de la subunidad 3, ya fijada al epitelio interacciones hidrofóbicas determinan la entrada a la célula de la subunidad A, se rompe el puente disulfuro que mantiene unidas a  $A_1$  más  $A_2$  y se separa en los fragmentos  $A_1$  de peso molecular 22,000 y  $A_2$  de peso molecular 5,500.  $A_2$  toma camino desconocido dentro de la célula y  $A_1$  por medio de su acción enzimática ADP-ribosilante activa a la adenil ciclasa localizada en la superficie interna de la membrana celular.

La activación de la adenil ciclasa da como resultado grandes cantidades de AMP cíclico, el AMP cíclico en concentraciones elevadas dentro de la célula epitelial determina alteraciones graves en el sistema de transporte de electrolitos. En las células hay una secreción aumentada de sodio, y por lo tanto de cloro y agua; a nivel de las criptas celulares hay un bloqueo de absorción de cloruro de sodio por el enterocito maduro, lo que ocasiona que salga agua por osmósis. Figura 1 (3)

Se han descrito dos clases antigénicamente diferentes de LT: LTI y LTII.

- LTI.- Es una toxina de efectos citotónicos en cultivos de células adrenales de ratón (línea Y-1) ó en cultivos de células de ovario de Hamster Chino (línea CHO). -- Antigénicamente cruza con la toxina del cólera (CT).
- LTII. Tiene una actividad biológica similar a LTI, aunque 25 veces más potente, no neutraliza con anticuerpos frente a LTI, ni con anticuerpos frente a CT.

El método clásico para la detección de LT es el del asa ligada de conejo, sin embargo lo caro y retardado de éste método ha obligado a desarrollar otros métodos más prácticos como son:

- Efectos citotónicos en cultivos celulares utilizando las líneas celulares Y-1, CHO y VERO.
- Detección de la toxina por el método de ELISA, utilizando su receptor natural el gangliósido  $GM_1$ .



- Coagulación y aglutinación con látex, sensibilizando - las bacterias y partículas de látex con anticuerpos espe- cíficos anti LT y detectando toxina en los extractos ce- llulares por aglutinación en laminillas.
- Prueba de BIKEN. Es una prueba de inmunodifusión en que - la toxina se libera in situ.
- Hibridización de DNA en colonia. Los genes que codifican- para la producción de toxinas LT y ST son marcados con -- fósforo radioactivo y puestos en contacto bajo condicio- nes controladas con el DNA de las bacterias problema para conseguir la hibridización.

Las ventajas y desventajas que presentan los ensa- yos para LT se muestran en el cuadro 2. (1,3,4)

#### Enterotoxina ST (Termo estable)

Es un péptido de peso molecular de aproximadamen- te 2,000 daltones, es estable al calor menor o igual a 60 °C, es inactivada a los 30 minutos de ebullición, es resis- tente a pH alcalino y ácido (pH 2.0 a 9.0), no es antigéni- ca y es diferente a LT tanto en su estructura como en sus - funciones. (1)

ST induce secreción en intestino delgado fijándo- se en receptores diferentes a los de LT. Determina secre- ción por activación de guanidil ciclasa, que aumenta el a- cumulo intracelular de GMP/cíclico, el cual altera las fun- ciones de membrana del enterocito ocasionando una secre- ción neta.

Hasta el momento se han descrito dos clases de - toxinas ST antigénicamente distintas:

- STI (STa).- Soluble en metanol y se detecta en ratón lac- tante.
- STII (STb).- Insoluble en metanol y cuya actividad se en- sayo en asa ligada de yeyuno de cerdo de 7 a 9 semanas.

Solamente STI ha sido encontrada en muestras de -

ECET asociadas en infecciones humanas. STII se encuentra en cerdos .

Para la detección de ST hay muchas dificultades - en cuanto al desarrollo de métodos confiables y aún sigue - empleandose como primera opción la detección de la toxina - STI por el método de ratón lactante y STII por el método -- de asa ligada de yeyuno en cerdo. (1,3,4)

El único método desarrollado con éxito hasta hoy es la hibridización de DNA en colonia tanto para STI como para STII. (3)

Los genes responsables de la producción de las enterotoxinas LT y ST son transportados por plásmidos denominados ent. Estos plásmidos ent también pueden transportar genes que codifican para la producción de factores de colonización CFA/I, CFA/II y PCF-8775. Estos plásmidos también. pueden transportar determinantes de resistencia.

Los plásmidos ent son transferidos de una E. coli a otra, pero existe una nítida preferencia de ciertos bio-serotipos de E. coli por éstos plásmidos. En ciertas muestras de ECET la transferencia de plásmidos ent es promovida por otro plásmido. (1)

### Bacteriología

Tabla 1: Antígenos O y H, fenotipos enterotoxigenicos y - factores de colonización de los serotipos más -- frecuentes de ECET.

ANTIGENOS		FENOTIPOS ENTEROTOXIGENICOS	FACTORES DE COLONIZACION.
O	H		
6	16	LT <sup>+</sup> / ST <sup>+</sup>	CFA/II
8	9	LT <sup>+</sup> / ST <sup>+</sup>	CFA/II
25	42	LT <sup>+</sup> / ST <sup>+</sup>	PCF-8775
63	H <sup>-</sup>	LT <sup>+</sup> //ST <sup>+</sup>	CFA/I
78	11,12	LT <sup>+</sup> / ST <sup>+</sup>	CFA/I
115	40,51	LT <sup>+</sup> / ST <sup>+</sup>	PCF-8775
128ac	7,12,21,27	LT <sup>-</sup> / ST <sup>+</sup>	CFA/I
148	28	LT <sup>-</sup> / ST <sup>-</sup>	?
Varios	Varios	LT <sup>+</sup> / ST <sup>-</sup>	?

## Patogénia

ECET produce diarrea aguda en un proceso de dos etapas:

1) Adherencia de la bacteria a la superficie de la mucosa del epitelio intestinal, pero sin penetración ni inflamación.

La adherencia de las ECET al epitelio es por medio de antígenos específicos llamados factores de colonización o fimbrias.

2) Una vez adherida la bacteria se reproduce y libera sus toxinas. La adherencia a la mucosa es un prerrequisito para que ocurra replicación.

Hay 3 fenotipos enterotoxigénicos:  $LT^+ / ST^-$ ,  $LT^- / ST^+$  y  $LT^+ / ST^+$ . Las infecciones causadas por el último fenotipo son las más severas.

Los individuos infectados por ECET pueden desarrollar inmunidad a la infección produciendo anticuerpos contra los antígenos somáticos de la bacteria, contra los factores de colonización y contra la enterotoxina LT, la toxina ST dado su bajo peso molecular no es antigénica.

## Epidemiología

ECET es universal, pero la frecuencia de algunos bioserotipos varía de una región a otra. En países en desarrollo estas bacterias se han aislado en un porcentaje elevado en niños con diarrea aguda.

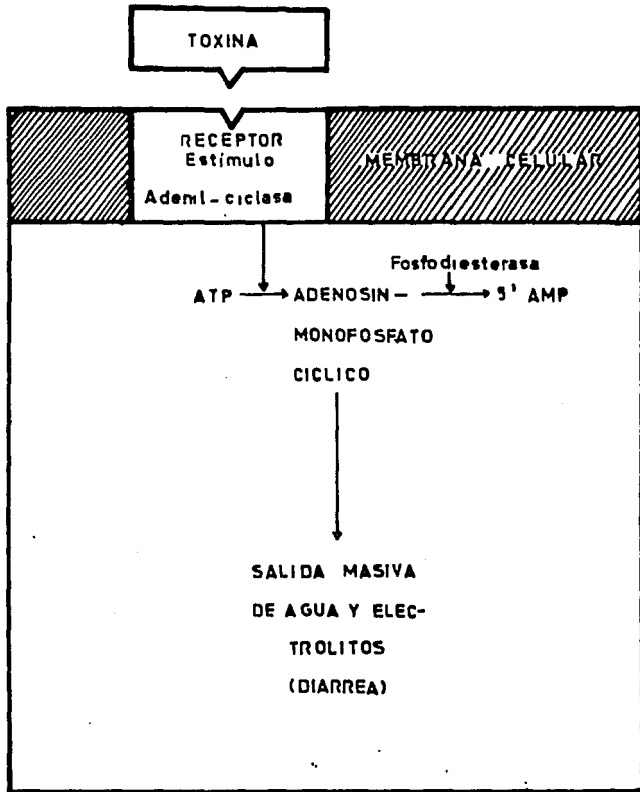
ECET esta entre los agentes responsables más importantes de la diarrea del viajero aislandose en un 50 a 70% de los casos.

Fue demostrado que la infección por ECET es principalmente transmitida por medio del agua y alimentos.

**Cuadro 2: Métodos para la detección de LT, ventajas y desventajas.**

ENSAYO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Asa ligada	Método considerado tipo	Costoso, con alto grado de dificultad, requiere equipo costoso.
Cultivo de células	Muy rápido y sencillo	Requiere equipo costoso, no se ha logrado buena estandarización, no se aplica a heces totales.
Coagulación y aglutinación con látex.	Sencilla Mediano costo	La sensibilidad depende de la calidad de la antitoxina, la cual se requiere de excelente calidad.
ELISA	Muy sensible, puede detectar toxina en heces completas, no requiere equipo muy caro	Requiere reactivos de excelente calidad, requiere muy buena estandarización.
Hibridación de DNA	Muy alta sensibilidad y especificidad permite trabajar muchas muestras a la vez, excelentes resultados con sobrenadantes de cultivos ó heces completas.	Uso de radioactividad, se requiere personal capacitado para trabajo molecular. Requiere equipo costoso.

Figura 1.- Acción de la enterotoxina de E. coli (termolábil) en el epitelio del intestino delgado.



Escherichia coli enteroinvasora (ECEI)

La característica principal de las cepas de ---- E. coli enteroinvasoras es su capacidad de invadir la mucosa intestinal humana produciendo diarrea semejante a la causada por Shigella. Las cepas de E. coli invasoras no tienen flagelos, por lo tanto son inmóviles. Pueden detectarse por causar queratoconjuntivitis experimental en cobayos- (Prueba de Sereny). (1)

Bacteriología

Las E. coli invasoras pertenecen a los siguientes serogrupos O: 28ac, 29, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164 y 167.

Los antígenos O de varias cepas de E. coli invasoras son idénticos a los antígenos O de los serotipos de Shigella, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 2: Relaciones antigénicas entre los antígenos O de --- E. coli invasora y Shigella.

<u>E. COLI</u> <u>INVASORA</u>	<u>SHIGELLA</u>	<u>RELACION</u>
028ac	<u>S. boydii</u> 13	Recíproca
0112ac	<u>S. dysenteriae</u> 2	Idéntica
0124	<u>S. dysenteriae</u> 3	Idéntica
0143	<u>S. boydii</u> 8	Idéntica
0144	<u>S. dysenteriae</u> 10	Recíproca
0167	<u>S. boydii</u> 13	Idéntica.

Patogénia

Las E. coli enteroinvasoras actúan penetrando - la mucosa intestinal, reproduciéndose en el tejido y produciendo reacción inflamatoria y lesiones ulcerosas con - el consiguiente efecto de salida de líquidos y electrolí-

tos. El ataque de los microorganismos es en la base de las microvellosidades donde penetran a las células epiteliales intestinales. La penetración se efectúa por englobamiento formándose un fagosoma, así E. coli es fagocitada por neutrófilos y monocitos en lámina propia. El duodeno y el yeyuno son los primeros sitios de ataque, después el ileon.

Se observa degeneración de las microvellosidades con el consiguiente decremento de la actividad enzimática de fosfatasas, disacaridasas y peptidasas. El tejido se engrosa a fin de impedir nuevos ataques.

Hasta el momento poco se sabe sobre los factores que determinan la invasividad de E. coli invasora. Datos recientes sugieren que la capacidad invasora de estas cepas de E. coli es mediada por genes cromosómicos y por genes localizados en un plásmido de aproximadamente 120 a -- 140 mega daltones. (1,3)

### Epidemiología

Hasta el momento E. coli invasora parece ser esencialmente un enteropatógeno humano. Las infecciones por estas cepas de E. coli pueden ser transmitidas por agua, alimentos o contacto directo.

Se ha demostrado que E. coli invasora es más frecuente en niños menores que en adultos. (1)

### Escherichia coli enteropatógena (ECEP)

Son ciertos serotipos de E. coli que se han asociado con diarrea infantil, principalmente en el primer año de vida. No producen enterotoxinas LT y/o ST, ni tampoco tienen la capacidad de invadir la mucosa intestinal. (1)

Bacteriología

Tabla 3: Serogrupos o serotipos de ECEP asociados con diarrea infantil. (1)

SEROGRUPOS	SEROTIPOS
018	-----
020	-----
026	026:H , 026:H11
044	-----
055	055:H, 055:H6, 055:H7
086	086:H34
0111	0111ab:(H2), 0111ab:H12
0114	-----
0119	0119:H6
0125	0125ac:H21
0126	0126:H, 0126:H27
0127	0127:H, 0127:H6, 0127:H21
0128	0128ab:H2
0142	0142:H6
0158	0158:H23

(H).- Muestras inmóviles con un mismo biotipo.

Patogénia

En la actualidad no se conoce el mecanismo de patogénia de estas cepas de E. coli. Dos tipos de mecanismos se han asociado a la capacidad de las EPEC para producir infección.

- 1) La capacidad de adhesión a la mucosa intestinal
- 2) La producción de toxinas

La capacidad de adhesión de varios serogrupos de -- EPEC ha sido demostrada en cultivos de tejidos de células --- principalmente en Hela y HEp-2, también se ha demostrado su adherencia a feto humano y animales de experimentación.

Se han descrito dos tipos de adherencia a células - en cultivo:

- 1) Adherencia difusa: Cuando las bacterias pueden adherirse a toda la superficie de la célula.



2) Adherencia localizada: Cuando la adherencia es en áreas -- localizadas de la célula.

Se cree que la adherencia es mediada por uno o varios factores de adhesión codificados por plásmidos y que esta propiedad esta relacionada con la enteropatogenicidad de estas cepas.

La producción de substancias tóxicas por ECEP ha sido demostrada por la acción de sobrenadantes de cultivos bacterianos, en cultivos de tejidos y en intestinos de animales.

En intestinos de animales se ha demostrado un aumento de secreción de agua y sodio, presentándose destrucción de microvellosidades.

En cultivos de tejidos se ha reportado en algunas ECEP, una acción citotóxica similar a la presentada con extractos de algunas cepas de Shigella.

Se cree que estas toxinas tienen un papel importante en la patogénea de la diarrea producida por estas cepas.

Se puede decir que una infección por ECEP incluye los siguientes pasos: (1,3)

- 1) Adherencia de la bacteria a la mucosa
- 2) Colonización del intestino
- 3) Producción de enterotoxinas y/o citotoxinas
- 4) Alteración funcional de la mucosa
- 5) Diarrea

### Epidemiología

Las infecciones intestinales por ECEP son predominantes en los primeros meses de vida. En varios países ECEP continua siendo una de las principales causas de diarrea infantil endémica. (1,3)

Escherichia coli asociada a colitis hemorrágica (ECEH)

Recientemente se ha descrito un cuarto grupo de--  
E. coli responsable de varios casos de colitis hemorrágica.

Hasta ahora solamente se ha encontrado el serogru-  
po 0157 asociado a este tipo de cuadro clínico. No se co--  
noce con exactitud su mecanismo de patogénia, pero se ha --  
encontrado una citotoxina similar a la encontrada en -----  
Shigella y en algunas cepas de ECEP que se piensa pueda ju-  
gar algún papel en dicho mecanismo. (1)

TOXINA SHIGA Y TOXINAS TIPO SHIGA.

I) Toxina de Shiga en Shigella sp.

La bacteria que causa la shigellosis pertenece a  
el género Shigella, la cual está clasificada en cuatro es--  
pecies:

- a) S. dysenteriae (serogrupo A)
- b) S. flexneri (Serogrupo B)
- c) S. boydii (Serogrupo C)
- d) S. sonnei (Serogrupo D)

Shigella dysenteriae tipo 1 elabora una toxina de  
signada como toxina Shiga, la cual posee las siguientes ca--  
racterísticas:

- Causa parálisis letal, citotoxicidad y actividades entero-  
tóxicas.
- Esta entre los agentes biológicos más tóxicos conocidos, -  
incluyendo las toxinas de tétanos y botulismo tipo A.
- Es relativamente estable al calor, a 60°C sufre una pe---  
queña pérdida de su actividad y a 90°C por 30 minutos --  
pierde completamente su actividad.
- Su peso molecular esta entre 58,000 y 70,000. Posee dos-  
subunidades: La subunidad A y la subunidad B.

Subunidad A: Es una cadena pesada, enzimáticamente activa, - su peso molecular es de 32,000; se sintetiza -- como proenzima y requiere ruptura proteolítica para expresar su actividad. La estructura de - la subunidad A de la toxina de Shiga es semejan te a la de la toxina del cólera y la tóxima -- termo lábil de E. coli, pero no hay cruce anti- génico entre ambas. La subunidad A contiene -- una región sensible a tripsina, la cual se cor ta y produce dos fragmentos  $A_1$  y  $A_2$  unidos por un enlace disulfuro.

Subunidad B: Es un oligómero que consiste en cinco cadenas - con un peso molecular de 7,700 cada uno. Posee 69 aminoácidos. En base a la secuencia de ami-- noácidos Nonetheless y Cols. observaron que -- la subunidad B de la toxina de Shiga es diferen te a la de la toxina del cólera y la toxina ter mo lábil de E. coli.

- La toxina Shiga es citotóxica a las siguientes líneas ce-- lulares: KB, hígado humano, riñón de mono verde africano (VERO) y células humanas cervicales de carcinoma (HELA). No es citotóxica a WI-38, ovario de Hamster Chino (CHO), L, BHK, y células de mieloma humano. Las células Henle -- 407 son resistentes a la toxina exógena y son sensibles a la citotoxina intracelular. (5,8,13)

#### Mecanismo de acción de la toxina Shiga.

La subunidad B es responsable de la interacción- de la toxina al receptor de la célula, mientras que la --- fracción  $A_1$  de la subunidad A es la responsable de la in- hibición de síntesis de proteínas en la célula blanco. - (Ver figura 2)

Figura 2: Modo de acción de la toxina Shiga en células blanco.

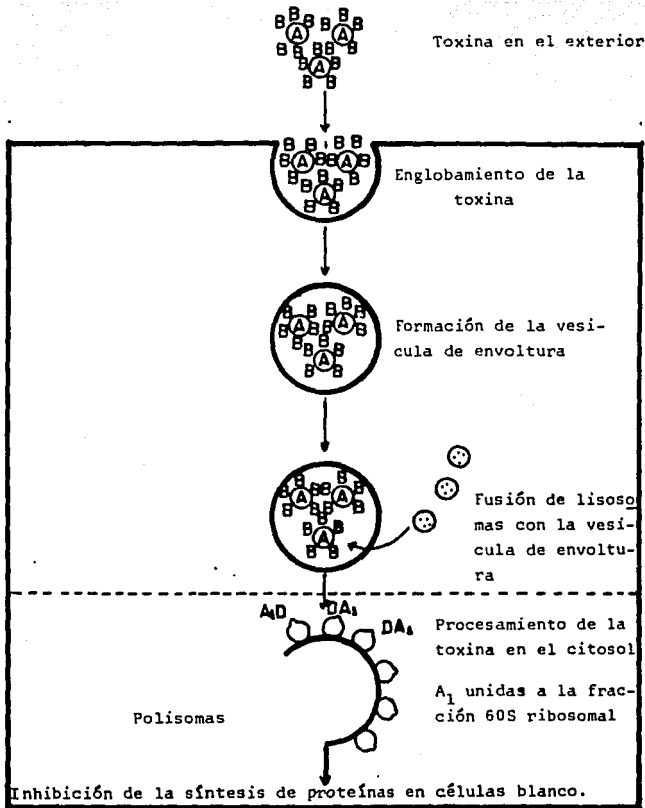


Figura 2.

La toxina Shiga entra a la célula mediada por un receptor. La subunidad B de la toxina se une al receptor de la célula del mamífero. Posteriormente ocurre el englobamiento de la toxina y la formación de la vesícula de envoltura, la vesícula es acidificada y se funde con los lisosomas. El mecanismo por el cual el fragmento A<sub>1</sub>,enzimáticamente activo de la toxina de Shiga, alcanza el citosol, no es conocido, pero se presume que involucra cortes proteolíticos y reducción de enlaces disulfuro de la subunidad A. El fragmento A<sub>1</sub> dentro del citosol se enlaza al ribosoma 60S -- dirigiendo la inhibición de la síntesis de proteínas y la muerte celular.

La toxina Shiga inhibe la elongación de la cadena peptídica. Obling y Cols. proponen que la toxina de Shiga - modifica estructuralmente la subunidad 60S del ribosoma, de la cual resulta una reducción en la afinidad del factor de elongación 1 (EF-1) y subsecuentemente de forma indirecta -- el factor de elongación 2 (EF-2) para el ribosoma.

Keusch y Jacewicz demostraron que el receptor de la célula para la toxina Shiga es destruido por enzimas --- proteolíticas, fosfolipasas y lisosomas pero no por neuroaminidasa ni galactosa oxidasa. En base a una serie de experimentos en los que se examinó el efecto de la tripsina , tunicamicina,  $\beta$  galactosidasa, B-N-acetyl glucosaminidasa , varios azúcares y lecitinas en la unión de la toxina y la toxicidad se concluye que el receptor funcional para la --- toxina Shiga en la célula es una N-glicoproteína.(13)

### Inmunología

Keusch demostró que los sueros de pacientes con - shigellosis debidas a S. flexneri ó S. sonnei contenían anticuerpos que podían neutralizar los efectos citotóxicos de la toxina Shiga en células HELA .

La toxina Shiga también fué neutralizada con sueros de pacientes con shigellosis debidas a S. dysenteriae - tipo 1 y S. dysenteriae tipo 2.

La respuesta de anticuerpos a la toxina de Shiga en el suero de humanos infectados esta limitada a la cadena pesada de la inmunoglobulina M, en tanto, que la respuesta en conejos comprende la fracción M de la inmunoglobulina y la fracción G.

Se ha visto que hay dos tipos de variantes antigénicas entre la familia de la toxina Shiga y tipo Shiga:

- 1) Las toxinas que no cruzan por neutralización con un solo antisuero de referencia.
- 2) Las toxinas que parcialmente cruzan por neutralización pero no son antigénicamente idénticas.

En tanto que no hay variantes de cruce entre las toxinas que producen diferentes cepas de Shigella. (13)

## II) Toxinas tipo Shiga en E. coli

La primera descripción de una toxina en ECEP fué hecha en 1977 por Konowalchuck.

Johnson y colaboradores observaron que una cepa de E. coli 0157:H7 era no enteroinvasiva y no producía enterotoxinas LT ni ST, pero producía una toxina tipo Shiga activa en células VERO.

Algunas cepas de E. coli enteropatogénica (ECEP) y todas las E. coli enterohemorrágicas (ECEH) pueden causar enfermedad intestinal por producir cantidades elevadas de citotoxina tipo Shiga.

O'Brien y Cols, observaron en cultivos de la cepa 0157:H7 que poseía dos citotoxinas, una de las cuales predominaba en los lisados celulares, a la cual le llamaron citotoxina tipo Shiga I (SLT-I) y otra que predominaba en los sobrenadantes a la cual le llamaron citotoxina tipo Shiga II (SLT-II).

O'Brien y colaboradores también observaron que la toxina VERO producida por ECEP 026:H11 cepa H-30 era idéntica a la toxina SLT-I de E. coli 0157:H7. Más tarde concluyeron que la toxina tipo Shiga y la toxina VERO son la misma toxina. (13)

### Estructura

Al ser purificada la citotoxina SLT-I aislada de las cepas ECEP y ECEH se observó que poseía una subunidad A y múltiples copias de la subunidad B.

Las moviidades electroforéticas en gel de poliacrilamida de las subunidades A y B de la citotoxina SLT-I purificada de ECEP cepa H-30 y ECEH cepa 933 fueron idénticas entre ambas e idénticas a la toxina Shiga purificada -

de S. dysenteriae tipo 1 cepa 60R.

La subunidad A de SLT-I tiene un peso molecular - de 32,000 y la subunidad B de 7,700. (13)

### Mecanismo de acción

Las toxinas SLT-I purificadas de E. coli H-30 y - E. coli 933 poseen las mismas actividades biológicas y actividades específicas que la toxina Shiga purificada.

- Citotoxicidad en células VERO y HELA
- Enterotoxicidad en segmentos de asa ligada de conejo
- Letalidad en dosis entre 100 ng y 2 mcg en ratón
- Inhiben la elongación de la cadena peptídica modificando - estructuralmente la subunidad 60S del ribosoma, por lo -- cual se inhibe la síntesis de proteínas en células HELA.

El receptor de SLT-I en células HELA es el mismo - al de la toxina Shiga.

SLT-II posee las mismas propiedades biológicas --- que SLT-I, pero por unidad de proteína en lisados celulares esta es más letal para ratón y menos citotóxica que SLT-I. (13)

### Inmunología

Estudios recientes establecieron que SLT-I y VT-I son la misma toxina al igual que SLT-II y VT-II

Ensayos de inmunodifusión con antitoxina Shiga y - preparaciones de cultivos de SLT-I purificados dan líneas - idénticas a las de la toxina Shiga.

SLT-II de E. coli es citotóxica, enterotóxica y -- con actividades letales similares a SLT-I y a la toxina --- Shiga, pero SLT-II no neutraliza con antisueros contra la to xina Shiga purificada o con anticuerpos monoclonales contra SLT-I, solamente neutraliza con antisero preparado contra - una preparación cruda de SLT-II. (13)



### III) Toxinas tipo Shiga en otras bacterias

Algunas cepas de Vibrio cholerae y Vibrio parahaemoliticus producen niveles bajos de una citotoxina activa en células HELA que puede ser neutralizada por suero policlonal antitoxina Shiga y suero monoclonal anti subunidad B de SLT-I.

Vibrio sp. y Campylobacter jejuni también producen niveles bajos de una citotoxina neutralizable con suero antitoxina Shiga. (13)

## CAPITULO II

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

2.1 Planteamiento del problema

Al estudiar la etiología de las diarreas en México en niños menores de 3 años se ha encontrado que en un -- alto porcentaje de los casos <sup>†</sup> 35 % no es posible aislar -- ningún agente patógeno, aún utilizando metodología muy desarrollada. Existen varios factores que pueden explicar esta observación:

- 1) Baja sensibilidad de las técnicas utilizadas.
- 2) Que el tiempo transcurrido desde el inicio de la diarrea hasta la colección de la muestra de heces no -- permita el aislamiento de algunos agentes.
- 3) La posible participación de nuevos agentes etiológicos y finalmente la presencia de nuevos factores de patogenicidad en los agentes considerados no patógenos.

El presente trabajo pretende contribuir en éste último aspecto, caracterizando un posible nuevo factor patogénico encontrado en un estudio etiológico realizado -- con niños del Hospital Infantil de México, \*Federico Gómez\* .

El posible factor patogénico que va a estudiarse es una citotoxina presente en una cepa de E. coli ---- P-119 considerada no patógena (por no pertenecer a ninguno de los grupos descritos hasta ahora como tales). Esta cepa de E. coli citotóxica fué aislada de una paciente, afectada por una diarrea aguda, sin moco ni sangre, con fiebre muy alta y negativa a todos los agentes patógenos buscados.

Habiéndose descrito en la literatura la presencia de citotoxinas en cepas de E. coli causantes de colitis hemorrágica (O157:H7) y en algunas cepas de serotipo-

enteropatógeno causantes de diarrea (026) es de sumo interés probar si la citotoxina encontrada en la cepa de E. coli no patógena tiene las mismas características que en los casos anteriores.

## 2.2 Objetivos

- 1) Purificar la proteína responsable de la actividad -- citotóxica en la cepa P-119
- 2) Producir anticuerpos contra dicha proteína
- 3) Probar su semejanza con otras citotoxinas reportadas en la literatura.

## CAPITULO III

## MATERIAL Y METODOS

3.1 MaterialA) Material biológico.

Células: Se utilizaron células VERO, la cual es una línea celular establecida obtenida de riñón de mono verde africano.

Cepas bacterianas:

- 0157: Es una cepa tipo de E. coli enterohemorrágica, serotipo 0157:H7

- P-119: Es una cepa salvaje de E. coli aislada de -- una paciente con diarrea aguda en el Hospital Infantil de México \*Federico Gómez\*

- CSH57r<sup>-</sup>: Es una cepa tipo de E. coli; sexo F<sup>-</sup>  
Genotipo: ara<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> las y pur<sup>-</sup> E gal trip<sup>-</sup> his arg G mal A str A xyl mtl iln met A o B thi.

Fenotipo: Ara<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Lac<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup>Gal<sup>-</sup>Trip<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Arg<sup>-</sup> Mal<sup>-</sup> Str<sup>-</sup>Xyl<sup>-</sup>Mtl<sup>-</sup> Ile<sup>-</sup> Met<sup>-</sup> Bl<sup>-</sup>

- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)c: Es una cepa lisogénica obtenida -- por lisogenación de CSH57r<sup>-</sup> con -- un fago de P-119 convertidor a citotoxicidad.

B) Medios de cultivo

## 1. Medio de cultivo para células VERO

- MEM con solución salina balanceada ----- 100 ml de Earles 25 hepes

- Suero fetal de bovino inactivado ----- 6 ml 30 minutos a 56°C

- Bicarbonato de sodio al 7.5% ----- 2.4 ml
- L-Glutamina 29.23 mg/ml ----- 1.5 ml
- Antibióticos Penicilina 250 mcg/ml
- Estreptomina 150 mcg/ml- 1.0 ml

2. Caldo Luria modificado.

- Triptona (DIFCO) ----- 10.0 g
- Extracto de levadura (DIFCO) ----- 5.0 g
- Cloruro de sodio ----- 5.0 g
- Tiamina (30mg/100ml) ----- 1.0 ml
- Agua destilada -----1000.0 ml

Ajustar a pH 7.0 con hidróxido de sodio 2N. Esterilizar a 15 lb (121°C) durante 15 minutos.

3. Caldo Luria más calcio.

Al caldo Luria esterilizado, se le agrega cloruro de calcio 0.1M (1 ml por cada 100 ml), previamente esterilizado 151 lb por 15 minutos.

4. Agar MacConkey con Estreptomina

- MacConkey (DIFCO) ----- 50.0 g
- Agar (DIFCO) ----- 3.5 g
- Agua destilada -----1000.0 ml

Esterilizar a 15 lb (121°C) durante 15 minutos.

- Preparar Estreptomina (100 mcg/ml). Esterilizar a través de filtración con una membrana Millipore de 0.22  $\mu$ .

- Añadir la Estreptomina estéril al agar MacConkey líquido y agitar.

- Vaciar el agar en cajas y dejar solidificar

5. Medio CYE

- Casaminoácidos (DIFCO) ----- 10.0 g
- Extracto de levadura (DIFCO) ----- 6.0 g
- Agua destilada -----1000.0 ml
- Sulfato de magnesio con 7 de agua 0.5% 10.0 ml
- Cloruro de manganeso con 4 de agua
- 0.05% -- 10.0 ml

Ajustar el pH a 8.5 con hidróxido de sodio 2N.

Esterilizar a 15 lb (121°C) durante 15 minutos.

## 6. Medio Mínimo

- Fosfato dibásico de potasio -----	1.75 g
- Fosfato monobásico de potasio -----	0.5 g
- Citrato de sodio -----	0.12 g
- Sulfato de magnesio -----	0.25 g
- Sulfato de amonio -----	0.25 g
- Agua destilada -----	250.0 ml

Ajustar el pH a 8,5 co hidróxido de sodio 2N. Es--  
terilizar en autoclave a 15 lb (121°C) durante 15 -  
minutos.

Por separado se prepara:

- Una solución al 20% de glucosa , Esterilizar a -  
15 libras por 15 minutos,
- Agregar 0,12ml de la solución de glucosa por ca -  
da 250 ml de medio original,

## 7. Medio para congelar células VERO

- MEM con solución salina balanceada de ---	100.0 ml
Earles 25 hepes,	
- Suero fetal de bovino inactivado -----	15.0 ml
30 minutos a 56°C	
- Glicerol estéril 3 veces -----	15.0 ml
- L-Glutamina 29,23 mg/ml -----	1.5 ml
- Antibioticos Penicilina 250 mcg/ml	
Estreptomicina 150 mcg/ml ---	1.0 ml

C) Soluciones

## 1. PBS

Solución 1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,01 M
	$\text{NaCl}$	0,15 M
	Aforar a un litro	
Solución 2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,01 M
	$\text{NaCl}$	0,15 M
	Aforar a 500 ml	

A la solución básica (1) se le va agregando poco  
a poco la solución ácida (2) hasta obtener un pH  
de 7,2,

## 2. Tripsina 10 X para desprender células VERO

- Tripsina (Estéril) -----	5.0 ml
- PBS pH 7.2 0.01M (Estéril) -----	94.0 ml
- EDTA 4% (Estéril) -----	1.0 ml

## 3. Buffer Tris-HCl 0.05M

- Tris-HCl -----	7.9 g
- Agua destilada -----	1000.0 ml

Ajustar el pH a 9 con hidroxido de sodio 5N

## 4. Buffer de corrida para geles de acrilamida Tris-glicina 5X.

- Tris-base -----	12.0 g
- Glicina -----	57.6 g
- Agua destilada -----	1000.0 ml

Solución de trabajo:

Diluir 300 ml de Buffer 5X a 1.5 lt con agua destilada. Añadir 12 ml de SDS al 10%.

## 5. Magic Mix 1X

- SDS al 1% -----	0.2 g
- Mercapto etanol 1% -----	100.0 mcl
- EDTA -----	0.07 mcg
- Glicerol 10% -----	1.0 ml
- Tris-HCl 0.05M, pH 6.8 -----	10.0 ml
- Azul de bromofenol -----	1 pizca

## 6. Acrilamida-bis (30-0.8%)

- Acrilamida -----	29.2 g
- N,N metilen bisacrilamida -----	0.8 g
- Agua destilada -----	100.0 ml

Usar guantes y cubre boca, debido a que la acrilamida es altamente tóxica.

## D) Marcadores de peso molecular.

( Sigma Chemical Company P.O. Box 14508 St. Louis M.O.  
63178, USA. Lote 47 F 6063).

MARCADOR	PESO MOLECULAR
Fosfolipasa B	92,500
BSA	66,200
Ovoalbúmina	45,000
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisosima	14,400

## E) Geles

Geles de poliacrilamida para electroforesis de protef--  
nas.

## 1. Gel inferior 10%

- Acrilamida-bis (30%-0.8%) ----- 5.5 ml
- Tris-base 2M, pH 8.8 ----- 3.0 ml
- SDS 10% en agua ----- 0.15ml
- Agua destilada ----- 6.0 ml
- Persulfato de amonio 150 mg/ml -----15.0 ul  
(Prepararlo cada vez que se use)
- Desgasificar al vacio con agitación por 2 minutos
- TEMED -----15.0 ul
- Desgasificar al vacio con agitación por 10 min.
- Verter con pipeta entre los vidrios de una cámara  
de electroforesis previamente montada <sup>+</sup> 9 ml de -  
gel y poner agua por encima con mucho cuidado <sup>+</sup> 2  
ml de agua. (Ver figura 3)
- Esperar a que polimerice ( Aproximadamente 30 min.)
- Quitar el agua y añadir el gel espaciador 4%

## 2. Gel superior espaciador 4%

- Acrilamida-bis (30%-0.8%) ----- 1.0 ml
- Tris-base 2M, pH 6.8 ----- 0.325 ml
- SDS 10% en agua ----- 0.05 ml
- Agua destilada ----- 6.0 ml
- Persulfato de amonio 150 mg/ml ----- 0.05 ml



- Desgasificar al vacío con agitación por 2 minutos
- TEMED ----- 15.0 ul
- Desgasificar al vacío con agitación por 10 min.
- Inmediatamente después de añadir el espaciador --  
4% poner el peine cuidando no hacer burbujas. Ver  
figura 3
- Esperar a que polimerice ( Aproximadamente 30 min)
- Una vez que ha polimerizado aflojar el soporte de -  
abajo de la cámara y quitar el peine
- Secar cada uno de los pozos inmediatamente con pa-  
pel filtro.
- Meter la cámara en la tina con buffer de corrida -  
Tris-glicina
- Quitar las burbujas que esten en contacto con el --  
vidrio.

#### F) Tinciones

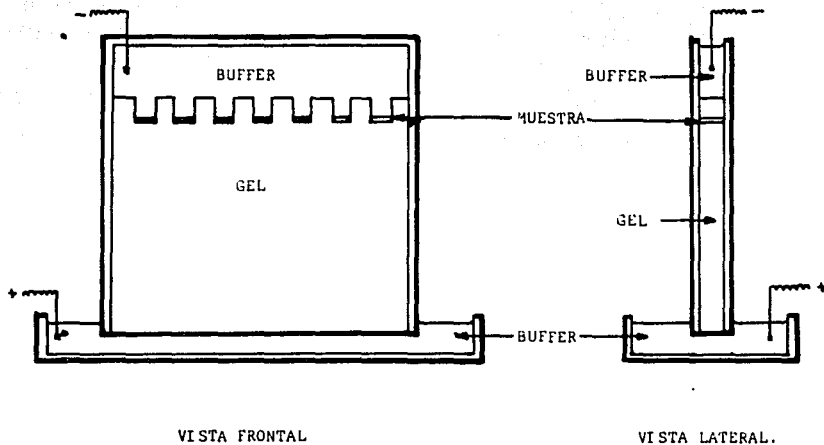
##### 1. Tinción de azul de Coomasie

- Metanol ----- 60 ml
- Acido acético ----- 20 ml
- Agua destilada ----- 120 ml
- Azul de Coomasie ----- 120 mg
- Teñir 30 minutos a 50°C ó 4 horas a temperatura am-  
biente.

##### 2. Tinción de Amido-Black

- Metanol ----- 45 ml
- Acido acético ----- 10 ml
- Agua destilada ----- 45 ml
- Amido-Black ----- 0.1 g
- Teñir 10 minutos a temperatura ambiente.

Figura 3: Cámara de Electroforesis



### 3.2 Métodos

#### I) Preparación de placas de células VERO.

Todos los procedimientos se realizan en condiciones - estériles . (Campana de flujo laminar)

1. Tomar una botella de 25 cm<sup>3</sup> con una confluencia de células VERO de 80-90% (las células deben tener <sup>+</sup> 48 horas de crecimiento).
2. Quitar el medio y poner de 1.0 a 1.5 ml de tripsina 1.25% (Ver preparación en material).
3. Incubar 5 minutos a 37°C a una atmósfera de CO<sub>2</sub> - al 5%
4. Una vez desprendidas las células a 37°C neutralizar la tripsina con 3 ml de medio MEM FLOW completo para células VERO (Ver preparación en material) y centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C.
5. Resuspender el sedimento en un ml de medio MEM --- FLOW completo para células VERO.
6. Tomar 0.3 ml del resuspendido anterior, para sub - cultivo y colocar en una botella de 25 cm<sup>3</sup> que --- contenga 4 ml de medio MEM FLOW completo para cé - lulas VERO.
7. Añadir 10 ml de medio MEM FLOW completo para células VERO a 0.2 ml de resuspendido, para preparar placas de 96 pozos.
8. Distribuir en una placa de 96 pozos a razón de 0.1- ml por cada pozo, cuidando que la suspensión celu - lar sea homogénea.
9. Incubar 48 horas a 35°C en una atmósfera al 5% de - CO<sub>2</sub> .

## II) Determinación de actividad citotóxica.

1. Observar que la placa tenga una confluencia de células  $\pm$  50%-60%
2. Hacer diluciones al doble de la muestra con medio MEM FLOW completo para células VERO desde - 1:2 hasta 1:252,144
3. Inocular 25  $\mu$ l en cada pozo de cada una de las diluciones.
4. Incubar 96 horas y leer% de redondeamiento de -- las células  $CD_{50}$  en relación al control positivo y negativo.

III) Preparación de concentrados de sobrenadantes de cultivos bacterianos.

1. Crecer un cultivo de 10 ml toda la noche de la cepa indicada.
2. Inocular un matraz conteniendo 1000 ml de caldo Luria más calcio con 10 ml del crecimiento de toda la noche obtenido en el paso anterior.
3. Incubar 18 horas a 37°C con agitación leve (200 rpm).
4. Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm durante 15 minutos.
5. Separar el sobrenadante y medir el volumen.
6. En frío agregar sulfato de amonio de 0-30% para precipitar (Ver tabla 4), con agitación continua hasta que se disuelva el sulfato de amonio.
7. Reposar una hora en hielo
8. Centrifugar a 10,000 rpm durante 30 minutos.
9. Separar el sobrenadante y medir el volumen
10. Agregar al sobrenadante sulfato de amonio de 30-70% (ver tabla 4) para precipitar, con agitación continua hasta que se disuelva el sulfato de amonio.
11. Repetir los pasos 6 y 7 una vez más
12. Desechar el sobrenadante y resuspender por separado los precipitados en 4 ml de buffer Tris-HCl 0.05M pH 9.
13. Dializar contra dos litros de buffer Tris-HCl 0.05M pH 9.0 en una bolsa de diálisis previamente tratada con albúmina bovina al 0.5%, por 24 horas en frío, cambiando 2 ó 3 veces el buffer.



## IV) Cuantificación de proteína por el método de LOWRY

- Solución A: Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N (Preparar cada vez que se use)
- Solución B: Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua.
- Solución C: Sulfato de cobre por 5 de agua al 2% en agua.
- Stock de albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/ml en PBS 0.015 M, pH 7.2
- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 en agua
- Reactivo de trabajo:
  - 9.8 ml de la solución A
  - 0.1 ml de la solución B
  - 0.1 ml de la solución C

Curva estandar.

TUBO	SOL. ESTANDAR DE ALBUMINA - SERICA BOVINA (1mg/ml)	CONC. DE PROTEINA	AGUA DESTILADA
0	-----	Blanco	1.0 ml
1	0.2 ml	200 mcg	0.8 ml
2	0.1 ml	100 mcg	0.9 ml
3	0.1 ml	50 mcg	1.9 ml
4	--- *	25 mcg	1.0 ml
5	--- *	12.5 mcg	1.0 ml

\* Del tubo 3 pasar 1ml al tubo 4

\* Del tubo 4 pasar 1ml al tubo 5

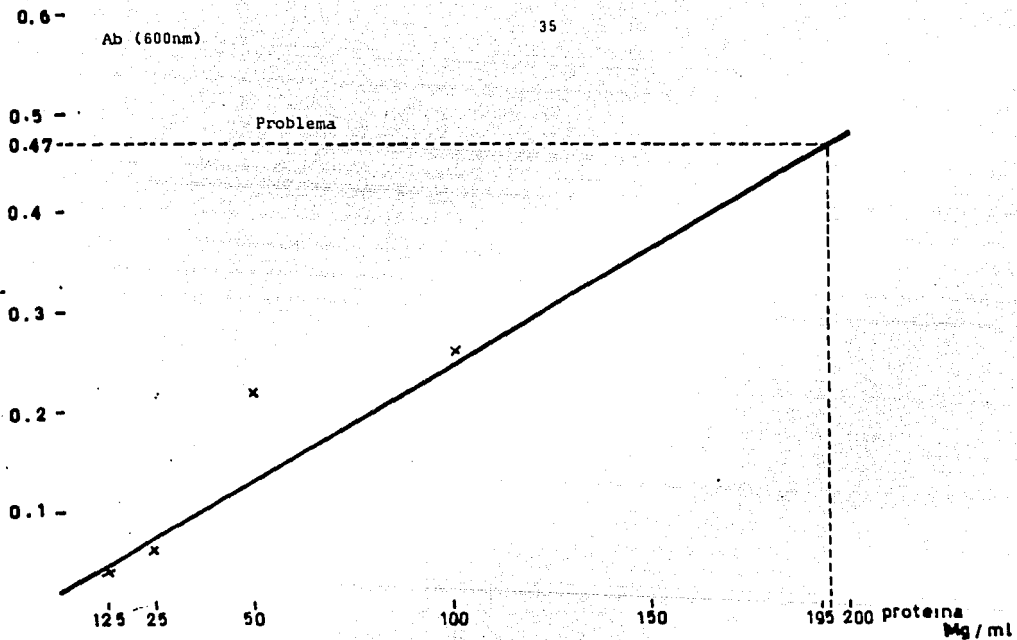
\* Del tubo 5 desechar 1ml.

Método

- Agregar a cada uno de los tubos 4ml de reactivo de trabajo.
- Agitar con vortex y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar a cada tubo 0.4ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 en agua, agitando con vortex

- Dejar reposar por 30 minutos y leer a 600 nm.
- Hacer curva de concentración de proteína contra -- absorbancia. (Ver ejemplo en la grafica 1)
- Problemas:
  - Preparar la dilución deseada aforando a un ml
  - Agregar 4 ml de reactivo de trabajo
  - Agitar con vortex y dejar reposar 10 minutos a -- temperatura ambiente.
  - Agregar a cada tubo 0.4 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 en agua, agitando con vortex.
  - Dejar reposar por 30 minutos a temperatura am-- biente.
  - Leer absorbancia a 600nm, e interpolar en la -- curva de concentración de proteína.





Gráfica 1: Curva de concentración de proteína contra absorbancia. (Método de LOWRY)

V) Método en tubo para seleccionar pH de trabajo con -  
intercambiador iónico.

- Seleccionar una serie de tubos de 10 X 15
- Adicionar 0.1g de Sephadex de intercambio iónico en cada tubo
- Equilibrar el gel de cada uno de los tubos a diferente pH lavando diez veces con diez ml de buffer 0.5M. Usar un intervalo de pH de 5 a 9 para intercambiadores aniónicos y pH de 4 a 8 para intercambiadores catiónicos, con un intervalo de pH de 0.5 entre cada tubo.
- Equilibrar en cada tubo el gel a una fuerza iónica baja (0.05M para Sephadex ó 0.01 M para Sepharosa y Sephacril de intercambio iónico) lavando 5 veces con 10 ml de buffer del mismo pH pero de baja fuerza iónica (0,05M).
- Añadir una cantidad constante conocida de la muestra a cada tubo.
- Mezclar el gel de 5 a 10 minutos
- Dejar reposar el gel
- Analizar el sobrenadante para la sustancia.

VI) Electroforesis de proteínas

- Medir el volumen de cada una de las muestras problema.
- Añadir acetona fría a cada una de las muestras ( 6 veces el volumen de acetona por volumen de muestra)
- Dejar reposar toda la noche a -20°C
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 minutos
- Resuspender el sedimento en 20 µl de MAGIC MIX - con mercapto-etanol (10 µl de mercapto-etanol por 1 ml de MAGIC MIX)
- Pasar a tubos Eppendorf
- Hervir cada una de las muestras en baño maría durante dos minutos
- Colocar cada una de las muestras en los pozos del gel de acrilamida previamente preparado (Ver preparación de materiales)
- Correr el gel con buffer de corrida Tris-glicina pH 8.8 a 10 MA
- Teñir el gel con azul de Coomasie durante 4 horas a temperatura ambiente
- Decolorar el gel con ácido acético al 10%

- Purificación de la protefina responsable de la actividad citotóxica de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>+</sup>

1. Inocular 5 ml de caldo Luria más calcio con la cepa - CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup>, dejar toda la noche a 37°C con agitación leve (200 rpm).
2. Reinocular 1000 ml de caldo Luria más calcio, con el cultivo anterior (1 ml de cultivo/100 ml de caldo -- Luria más calcio). Incubar 18 horas a 37°C con agitación leve (200 rpm)
3. Precipitar con sulfato de amonio de 0-30%, de 30-70% y dializar (Ver preparación de concentrados de sobrenadantes de cultivos bacterianos)
4. Pasar un ml de dializado a través de una columna de filtración molecular de Sephadex G-50 y/o G-75 ( de - 75cm de largo X 0.8cm de ancho), eluyendola con buffer Tris-HCl 0.05M pH 9.0
5. Colectar fracciones de un ml
6. Leer D.O a 280 nm de cada una de las fracciones
7. Trazar una grafica de Ab contra número de fracción
8. Titular cada una de las fracciones en células VERO - desde 1:2 hasta 1:262,144
9. Seleccionar las fracciones con más alto título de - citotoxina y juntarlas
10. Pasar las fracciones con actividad a través de una - columna de intercambio iónico (DEAE-50) de 40 cm de largo X 0,8 cm de ancho, equilibrada con buffer Tris-HCl 0.05M, pH 9.0, lavando con el mismo buffer hasta D.O. de cero, posteriormente eluir las protefinas retenidas con un gradiente discontinuo de fuerza iónica creciente: NaCl 0.15M; NaCl 0.16M; NaCl 0.17M; NaCl - 0.18M; NaCl 0.19M y NaCl 0.20M.
11. Colectar fracciones de un ml.

12. Leer D.O. a 280nm de cada una de las fracciones
13. Trazar una grafica de Ab contra número de fracción
14. Titular cada una de las fracciones en células -- VERO, (Ver determinación de actividad citotóxica)

- Producción de anticuerpos contra la citotoxina extracelular de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>†</sup>

1. Preparar un dializado de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> (ver preparación de concentrados de sobrenadantes en cultivos bacterianos)
2. Inocular el dializado anterior a un conejo por vía intramuscular a intervalo de 4 días bajo el siguiente esquema de inmunización:

Esquema de inmunización.

- Realizar una sangría de prueba en la oreja del conejo previa a la primera inoculación, separar el suero, filtrar a través de un filtro millipore de membrana 0,22  $\mu\text{m}$  y almacenar a 4°C. (Suero preinmune)

# DE DIA	VOLUMEN DE DIALIZADO INOCULADO	VOL. DE ADYUVANTE IN-COMPLETO DE FREUND'S	U DE PRO-TEINA	MG DE PRO-TEINA
1 día	0.2 ml	0.2 ml	1.05X10 <sup>6</sup>	0.76
5 día	0.2 ml	0.2 ml	1.05X10 <sup>6</sup>	0.76
9 día	0.2 ml	0.2 ml	1.05X10 <sup>6</sup>	0.78
13 día	0.4 ml	0.4 ml	2.10X10 <sup>6</sup>	1.52
17 día	0.5 ml	0.5 ml	2.63X10 <sup>6</sup>	1.90
21 día	0.5 ml	0.5 ml	2.63X10 <sup>6</sup>	1.90
25 día	0.5 ml	0.5 ml	2.63X10 <sup>6</sup>	1.90
29 día	0.5 ml	0.5 ml	2.63X10 <sup>6</sup>	1.90
33 día	0.5 ml	0.5 ml	2.63X10 <sup>6</sup>	1.90

- Dejar reposar 15 días al conejo

49 día      1.0 ml      1.0 ml      5.26X10<sup>6</sup>      3.80

- Dejar reposar 15 días al conejo

Al 65 día realizar una sangría de prueba en la oreja del conejo (Suero hiperinmune), determinar el título de anticuerpos por el siguiente ensayo de neutralización:

Ensayo de neutralización

1. Preparar un dializado de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>+</sup> , filtrarlo a través de un filtro millipore con membrana 0.22 micrometros y diluirlo con medio MEM FLOW completo para células VERO, empezando de 1:2 hasta -- 1:262,144
2. Diluir el suero hiperinmune de conejo 1:10 con medio MEM FLOW completo para células VERO
3. Mezclar 25 microlitros de cada una de las diluciones de -- citotoxina extracelular con 25 microlitros de suero hiperinmune de conejo, usando tubos Eppendorf estériles
4. Incubar a 37C durante una hora
5. Incubar toda la noche a 4C
6. Checar citotoxicidad CD<sub>50</sub> de cada una de las muestras en células VERO
7. Realizar al mismo tiempo y en las mismas condiciones el ensayo de neutralización con suero preinmune y titular la muestra de citotoxina de ----- CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>+</sup> .

- Neutralización de la citotoxina extracelular de la cepa CSH57r<sup>+</sup>(FpCh)<sup>c</sup> y las citotoxinas extracelulares de las cepas P-119 y 0157:H7

1. Seleccionar las fracciones con títulos más altos de citotoxina extracelular tanto de P-119, 0157:H7 y - CSH57r<sup>+</sup>(FpCh)<sup>c</sup>, después de pasar cada uno de los -- dializados a través de una columna de filtración -- molecular Sephadex G-75, (ver purificación de protefnas)
2. Diluir 1:32 cada una de las muestras elegidas con medio MEM FLOW completo para células VERO
3. Diluir el suero hiperinmune de conejo obtenido contra la citotoxina extracelular de CSH57r<sup>+</sup>(FpCh)<sup>c</sup> - con medio MEM FLOW completo para células VERO desde 1:2 hasta 1:256
4. Mezclar 25 µl de cada una de las diluciones del suero hiperinmune con 25 µl de cada una de las diluciones 1:32 de las muestras
5. Incubar a 37°C durante una hora
6. Incubar a 4°C toda la noche
7. Revisar citotoxicidad de cada una de las muestras - en células VERO
8. Titular al mismo tiempo cada una de las fracciones elegidas en el paso número 1
9. Realizar al mismo tiempo y en las mismas condiciones el ensayo de neutralización con el suero hiperinmune de conejo obtenido contra la citotoxina intracelular de P-119,



- Método de absorción de suero preparado contra la citotoxina extracelular de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>†</sup>

1. Preparar un dializado de la cepa CSH57r<sup>-</sup>
2. Determinar cantidad de proteína del dializado por el método de LOWRY
3. Ajustar la concentración de proteína del dializado a 20mg/ml con albúmina sérica bovina
4. Añadir glutaraldehído gota a gota a la solución de proteína con agitación (0.5 ml de una solución -- acuosa al 2.5% de glutaraldehído por cada 100 mg de proteína)
5. Observar que se forma un gel inmediatamente
6. Dejar reposar el gel por 3 horas a temperatura ambiente
7. Dispersar el gel con agitación en PBS 0.01M pH -- 7.2
8. Lavar el gel con PBS 0.01M pH 7.2 centrifugándolo a 10,000 rpm durante 15 minutos, hasta que el sobrenadante a 280nm tenga una D.O. menor a 0.01
9. Mezclar en igual volumen el gel inmuoabsorbido - con el suero contra la toxina extracelular de --- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>
10. Dejar a 4°C durante 24 horas
11. Almacenar a -20°C hasta ser usado

- Inmunoelectrotransferencia

Buffer de transferencia:

Stock 8X

- Tris-base 0.025M ----- 48.456 g
- Glicina 0.192M ----- 230.615 g
- Agua destilada ----- 2000.0 ml

Para preparar 10 litros se diluye 1:10

- 600 ml de buffer stock
- 1200 ml de metanol absoluto
- 4200 ml de agua destilada

Se transfieren las proteínas del gel de acrilamida al papel de nitrocelulosa a 250 M.A. por 3 horas en el cuarto frío.

Tratamiento del papel de nitrocelulosa

- El papel con las proteínas transferidas se cubre con una solución de PBS-BSA al 3% y azida de sodio 0.1% a 4°C y con agitación continua por 3 horas o toda la noche.
- Lavar el papel 3 veces cada una 10 minutos con PBS
- Diluir el primer anticuerpo en PBS-BSA al 3% a la concentración deseada e incubarlo por una hora a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar dos veces por 10 minutos cada una con PBS---TWEEN 20 al 0.3% y una vez con PBS 10 minutos
- Incubar con el segundo anticuerpo diluido en PBS---BSA al 3% por una hora a temperatura ambiente con agitación
- Lavar como se hizo después de la incubación con el primer anticuerpo

- Detectar las bandas de proteína sobre el papel:

- 1) Por autorradiografía si se usaron proteínas marcadas.
- 2) Con 3,3'-diamino-benzidina ó 1,4-cloro-naftol si se usaron anticuerpos acoplados a peroxidasa.  
50 mg de DAB en 100ml de PBS, agregar 10  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%  
30 mg de 1,4-cloro-naftol en 10 ml de metanol más 50 ml de PBS y agregar 50  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%.

Para parar la reacción se sumergen las tiras de papel en agua con azida de sodio al 0.1%.

Cuando se revelan las bandas de proteína con DAB las tiras de papel se pueden secar.

- Western-blot para detectar la proteína extracelular responsable de la actividad citotóxica de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>+</sup>

1. Preparar un dializado de la citotoxina extracelular de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>+</sup> y un dializado de la cepa receptora 57r<sup>-</sup>
2. Pasar cada uno de los dializados a través de una columna de filtración molecular Sephadex G-75, eluyendo con buffer Tris-HCl 0.05M pH 9.0
3. Seleccionar el pico de máxima actividad citotóxica - CD<sub>50</sub> de la cepa CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>+</sup>
4. Seleccionar las fracciones de la cepa receptora --- 57r<sup>-</sup> que salgan exactamente igual que el pico de -- máxima actividad citotóxica de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup>
5. Preparar y correr un gel de policrilamida para electroforesis de proteínas con las fracciones del inciso 3 y 4, a la vez también correr un patrón de pe-- sos moleculares y un control positivo (IgG de conejo)
6. Realizar una inmunoelectrotransferencia del gel anterior
7. Tratar el papel de nitrocelulosa, usando como primer anticuerpo el suero contra la toxina extracelular de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> absorbido con la cepa receptora 57r<sup>-</sup> y como segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa.
8. Detectar las bandas de proteína sobre el papel por el método de 1,4-cloro-naftol.

### 3.3 Cálculos

#### - Unidades de toxina

Para calcular las unidades de citotoxina presentes en un cierto volumen de muestra se siguen los siguientes pasos:

Usando un ejemplo observamos que si se usaron - 25  $\mu$ l de muestra en el ensayo de citotoxicidad éste valor se divide entre el título  $CD_{50}$  obtenido en dicho ensayo es decir:

$$\frac{25 \mu\text{l (Volumen de muestra usado)}}{2048 (\text{título } CD_{50} \text{ de dicha muestra})} = 0,0122 \mu\text{l}$$

0.0122  $\mu$ l representan el volumen mínimo de muestra que tiene actividad citotóxica detectable y corresponde a una Unidad de toxina.

Enseguida puede calcularse el número de Unidades de toxina en un volumen determinado:

$$\begin{array}{r} 0,0122 \mu\text{l} \text{ ----} 1 \text{ U toxina} \\ 1000 \mu\text{l} \text{ ----} \quad X \\ X = 8,19 \times 10^3 \text{ U de toxina/ml} \end{array}$$

#### - Actividad específica

Para calcular la actividad específica necesitamos considerar la concentración de proteína de la muestra en cuestión.

Por ejemplo si en un extracto con  $8,19 \times 10^3$  - U de toxina/ml se obtiene una concentración de proteína de 2mg/ml se hace el siguiente cálculo:

$$\begin{array}{r} 8,19 \times 10^3 \text{ U tox/ml} \text{ ---} 2\text{mg/ml} \\ X \text{ ----} 1\text{mg/ml} \\ X = 4,095 \times 10^3 \text{ U de toxina/mg} \end{array}$$

$4,095 \times 10^3$  representa la actividad específica en U de toxina por mg de proteína.

## - Título de neutralización

Para calcular la capacidad de neutralización de un suero hiperinmune se realizan los siguientes cálculos:

En el ensayo se determinan paralelamente el título de toxina de la muestra y la dilución mínima de suero capaz de neutralizar una cantidad conocida de toxina.

Primero se calcula las U de toxina / Vol. de muestra, en seguida se calculan las unidades de toxina que neutralizan 1 ml de suero.

Ejemplo: Se usaron 25  $\mu$ l de una muestra con un título de 1:262,144, se neutralizó con un suero hiperinmune, dando un título de neutralización de 1:16.

Por lo tanto:

$$25 \div 262,144 = 0.0001 \mu\text{l}$$

$$0.0001 \mu\text{l} \text{ ---- } 1 \text{ Unidad}$$

$$1000 \mu\text{l} \text{ ---- } X$$

$$X = 1 \times 10^7 \text{ U de toxina/ml}$$

$$26 \div 16 = 1.56 \mu\text{l}$$

$$1000 \mu\text{l} \text{ ----- } 1 \times 10^7 \text{ U de toxina/ml}$$

$$1.56 \mu\text{l} \text{ ----- } X$$

$$X = 1.56 \times 10^4 \text{ U de toxina/ml}$$

$$25 \mu\text{l} \text{ ----- } 1.56 \times 10^4 \text{ U de toxina/ml}$$

$$1000 \mu\text{l} \text{ ----- } X$$

$$X = 6.24 \times 10^5 \text{ Unidades de toxina neutralizadas por 1 ml de suero.}$$

$6.24 \times 10^5$  se multiplica por 10 que fué el factor de dilución que se utilizó para diluir el suero preinmune, por lo tanto:

$$6.24 \times 10^5 \times 10 = 6.24 \times 10^6 \text{ U de toxina neutralizadas por 1 ml de suero}$$

Con fines comparativos se determinaron las capacidades de neutralización de los distintos sueros hiperinmunes contra Unidades conocidas y fijas de toxina, para -- ello se realizan los siguientes cálculos:

Primero se calcula las U de toxina por volumen de muestra, enseguida las Unidades de toxina usadas y los  $\mu$ l de suero que neutralizan 1 Unidad de toxina, por último las Unidades de toxina que neutralizan 1 ml de suero. Ejemplo: Se usaron 25  $\mu$ l de una muestra, obteniéndose -- un título  $CD_{50}$  en células VERO de 1:8192, al neutralizar se utilizó una dilución constante de citotoxina de 1:32 y se obtuvo un título de neutralización con el antisuero de 1:256. Por lo tanto:

$$25 \div 8192 = 3.05 \times 10^{-3} \mu\text{l}$$

$$25 \div 32 = 0.78 \mu\text{l}$$

$$3.05 \times 10^{-3} \mu\text{l} \text{ ----- } 1 \text{ U de toxina}$$

$$0.78 \mu\text{l} \text{ ----- } X$$

X = 256 Unidades de toxina usadas.

$$256 \times 256 = 65,536$$

$$25 \div 65,536 = 3.82 \times 10^{-4} \mu\text{l de suero que neutralizan 1U de toxina}$$

$$(3.82 \times 10^{-4}) (256) = 0.0978 \mu\text{l de suero que neutralizan --}$$

$$256 \text{ U de toxina}$$

$$3.82 \times 10^{-4} \mu\text{l} \text{ ----- } 1 \text{ U de toxina}$$

$$1000 \mu\text{l} \text{ ----- } X$$

$$X = 2.6 \times 10^6 \text{ U de toxina que neutralizan 1 ml de suero.}$$

## CAPITULO IV

## R E S U L T A D O S

- Purificación de la proteína con actividad citotóxica presente en la cepa lisogénica CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup>

- Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de producción de citotoxina(s) en la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> se realizaron cultivos a diferentes tiempos de incubación determinándose la:

- Actividad citotóxica en células VERO de la citotoxina intracelular y extracelular.

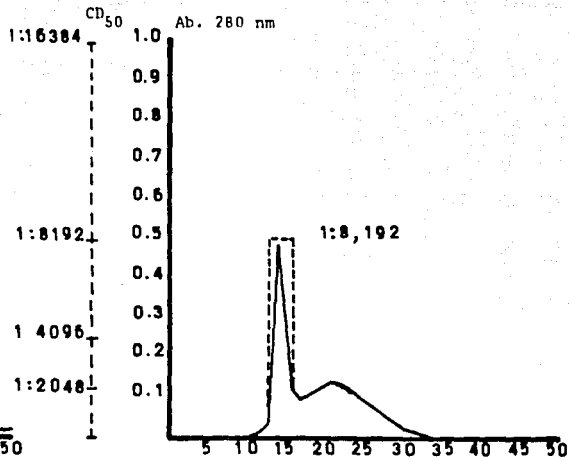
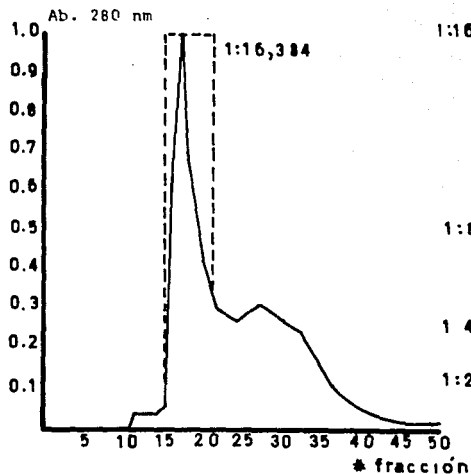
Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Act. citotóxica a 18 horas. (37°C)	Act. Citot. a 48 Hrs. (37°C)
Citotoxina Intracelular	0	0
Citotoxina Extracelular	1:4096	1:4096

En vista de que los resultados a las 18 y 48 horas de incubación fueron similares se decidió trabajar con cultivos de 18 horas y dado que la actividad citotóxica es de tipo extracelular se trabajó solamente con los sobrenadantes de los cultivos.

Se procedió a clonar por colonia la cepa lisogénica CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> para trabajar con aquella que presentara una mayor actividad citotóxica. Se eligieron 30 colonias aisladas y se determinó la actividad citotóxica en los sobrenadantes de cultivos de 18 horas, obteniéndose una colonia con un título de 1:16,384, con la cual se continuó el trabajo de purificación.





Curvas de elución en columnas de filtración molecular (Sephadex G-50 de 75cm X 0.8cm, eluidar con buffer Tris-HCl 0.05M pH=9).

II) Citotoxina Extracelular de CSH57r<sup>-</sup> (FpCh)<sup>†</sup>  
en cultivos de 18 horas

II<sup>-</sup>) Citotoxina extracelular de CSH57r<sup>-</sup>  
(FpCh)<sup>†</sup> en cultivos de 48 horas.

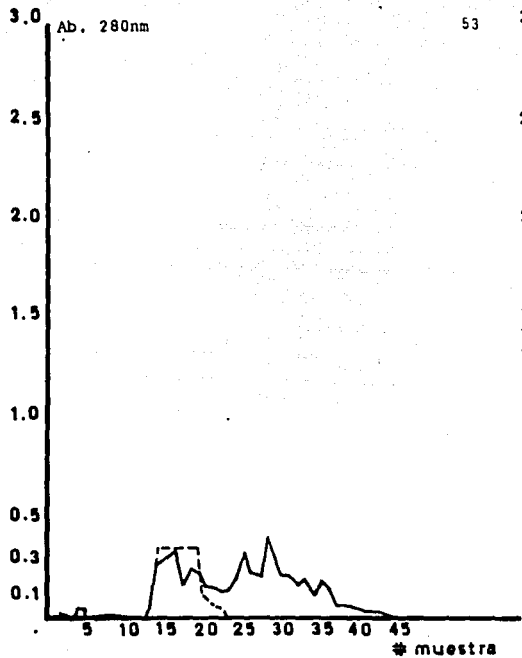
Se prepararon dializados según se describe en el capítulo de materiales y métodos, obteniéndose los siguientes resultados para la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup>.

- Título del dializado en células VERO: 1:65,536 CD<sub>50</sub>
- Concentración de proteína (LOWRY): 3.90 mg de proteína/ml
- Unidades citotóxicas en el dializado:  $2.62 \times 10^5$  U CD<sub>50</sub>/ml
- Actividad específica:  $6.71 \times 10^5$  U CD<sub>50</sub>/mg de proteína

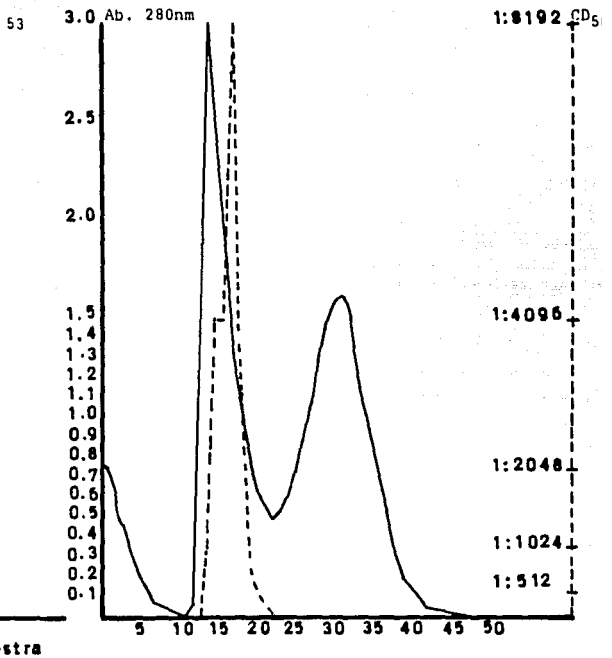
Nota: Los cálculos se describen en el capítulo de materiales y métodos.

- Con el fin de comparar el grado de similitud de las citotoxinas liberadas por las distintas cepas: P-119, 0157:H7 y CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> se prepararon dializados de cada una de ellas y se pasaron por columnas de filtración molecular (Sephadex G-50 y G-75), determinándose la actividad citotóxica CD<sub>50</sub> en células VERO de cada una de las fracciones colectadas. Como control negativo a citotoxina se procesó de la misma manera la cepa receptora CSH57r<sup>-</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas: III, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X. Los rendimientos se observan en el cuadro # 3.

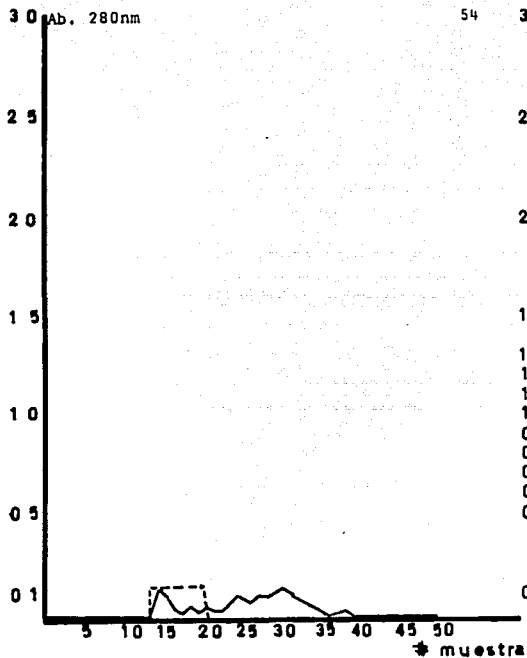
Con estos datos se puede afirmar que la(s) citotoxinas liberadas por estas cepas tienen un peso molecular superior a 50,000 (límite de exclusión de G-50) e inferior a 80,000 (límite de exclusión de G-75), ya que salen en el pico de exclusión de G-50, en tanto que son retenidas en la columna de G-75.



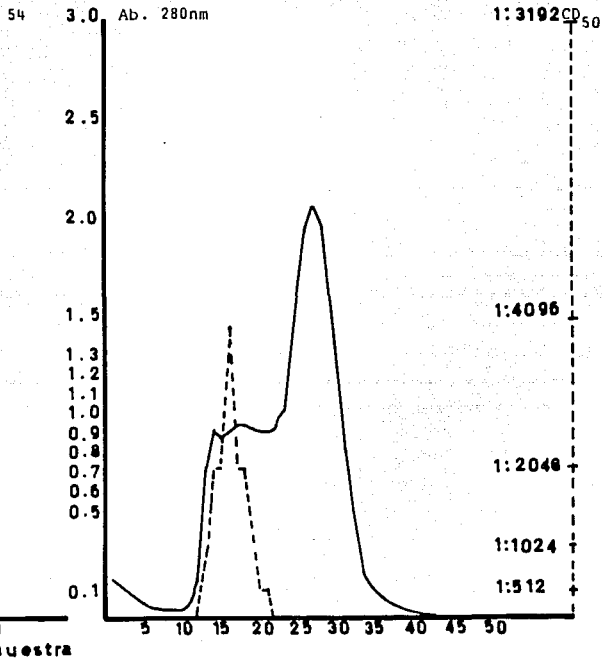
III) Dializado de  $\text{CSH57r}^-(\text{FpCh})_2^+$  pasado a través de Sephadex G-50



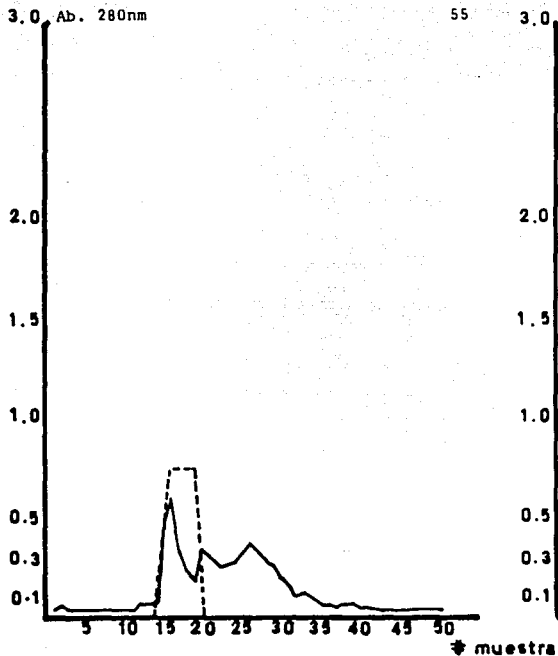
IV) Dializado de  $\text{CSH57r}^-(\text{FpCh})_2^+$  pasado a través de Sephadex G-75



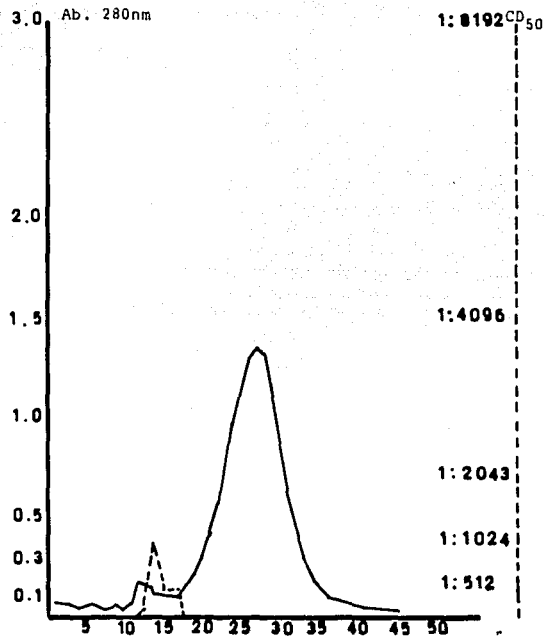
V) Dializado de P-119 pasado a través de Sephadex G-50



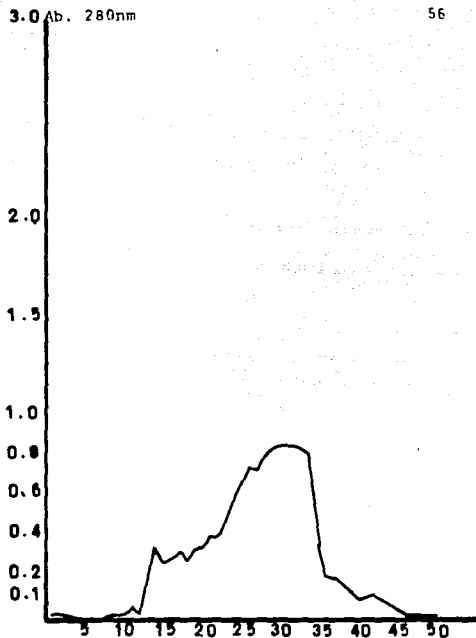
VI) Dializado de P-119 pasado a través de Sephadex G-75



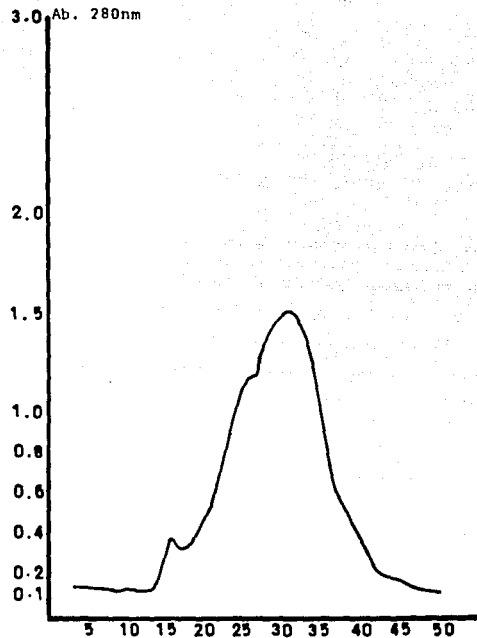
VII) Dializado de 0157:H7 pasado a través de Sephadex G-50



VIII) Dializado de 0157:H7 pasado a través de Sephadex G-75



IX) Dializado de CSH57r<sup>-</sup> pasado a través de Sephadex G-50



X) Dializado de CSH57r<sup>-</sup> pasado a través de Sephadex G-75

Cuadro 3: Rendimientos

		Actividad ci- totóxica U CD <sub>50</sub> /ml	Volumen de mues- tra	% de ren- dimiento	% de rendimien- to del paso de purificación
SN original					
CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>		6.66X10 <sup>5</sup>	1000 ml	100	
P-119		3.33X10 <sup>5</sup>	1000 ml	100	
0157:H7		3.33X10 <sup>5</sup>	1000 ml	100	
Dializado					
CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>		2.62X10 <sup>6</sup>	4 ml	1.57	1.57
P-119		1.31X10 <sup>6</sup>	4 ml	1.57	1.57
0157:H7		1.31X10 <sup>6</sup>	4ml	1.57	1.57
Columna G-50					
CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>					
Fracción	14	4.6 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0069	
	15	*	1 ml	*	
	16	*	1 ml	*	2.18
	17	*	1 ml	*	
	18	*	1 ml	*	
		<u>2.3 X 10<sup>5</sup></u>	<u>5 ml</u>	<u>0.0345</u>	
P-119					
Fracción	14	2.08X10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0069	
	15	*	1 ml	*	
	16	*	1 ml	*	1.98
	17	*	1 ml	*	
	18	*	1 ml	*	
		<u>1.04X10<sup>5</sup></u>	<u>5 ml</u>	<u>0.0345</u>	
0157:H7					
Fracción	16	8.1 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0062	
	17	*	1 ml	*	
	18	*	1 ml	*	7.72
	19	*	1 ml	*	
	20	*	1 ml	*	
		<u>4.05X10<sup>5</sup></u>	<u>5 ml</u>	<u>0.031</u>	
Columna G-75					
CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>					
Fracción	15	1.63X10 <sup>5</sup>	1 ml	0.024	
	16	1.63X10 <sup>5</sup>	1 ml	0.024	7.81
	17	3.33X10 <sup>5</sup>	1 ml	0.1	
	18	1.63X10 <sup>5</sup>	1 ml	0.024	
		<u>8.22X10<sup>5</sup></u>	<u>4 ml</u>	<u>0.172</u>	

		Actividad ci- totóxica U CD <sub>50</sub> /ml	Volumen de mues- tra	% de ren- dimiento	% de rendimien- to del paso de purificación
P-119					
Fracción	14	8.1 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.024	
	15	8.1 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.024	
	16	1.63 X 10 <sup>5</sup>	1 ml	0.048	9.29
	17	8.1 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.024	
	18	8.1 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.024	
		4.87 X 10 <sup>5</sup>	5 ml	0.1440	
0157:H7					
Fracción	14	4.16 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0125	
	15	2.8 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0084	2.38
	16	2.8 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0084	
	17	2.8 X 10 <sup>4</sup>	1 ml	0.0084	
		1.25 X 10 <sup>5</sup>	4 ml	0.0377	



Una vez determinado el pico máximo de actividad en G-75 se continuó la purificación utilizando una columna de intercambio iónico.

Se utilizó una columna de intercambio iónico con DEAE Sephadex A-50, fijándose las proteínas con buffer Tris-HCl 0.05M pH=9.0, mismo que se seleccionó por experimentos previos para determinar el pH y fuerza iónica óptimas, (ver capítulo de materiales y métodos). Se lavó exhaustivamente hasta D.O de cero a 280nm con el mismo buffer y se procedió a eluir las proteínas retenidas con un gradiente discontinuo de NaCl de 0.15 a 0.20M.

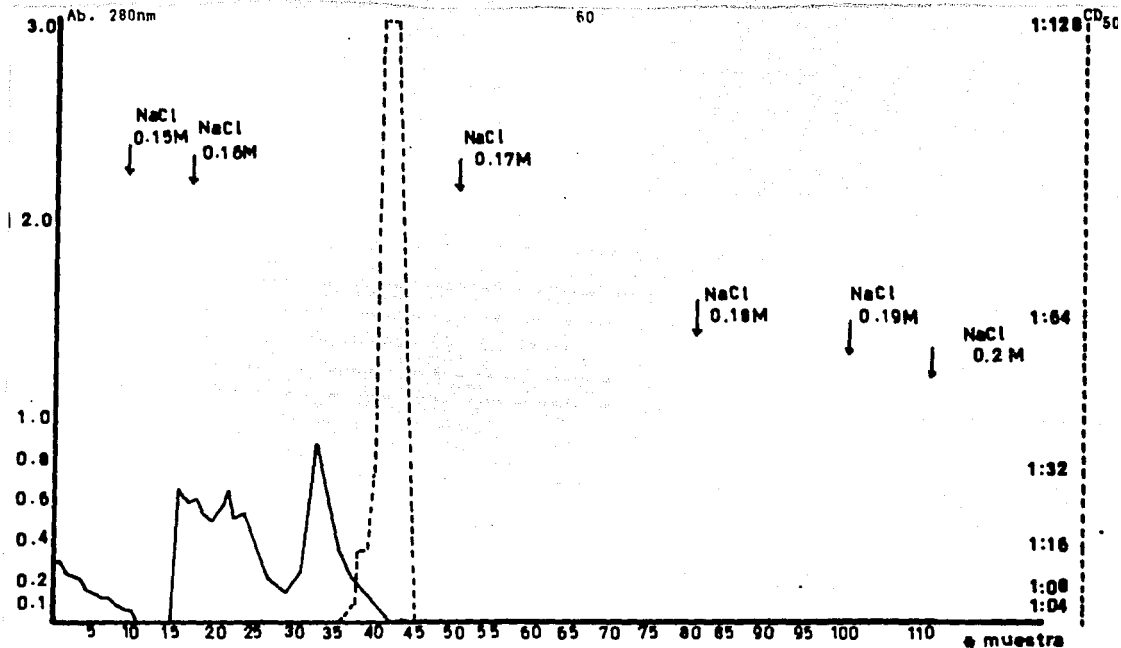
Se utilizó una mezcla de las fracciones de G-75 con mayor actividad citotóxica que correspondieron a las fracciones 15 y 18 de ambas cepas (P-119 y CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>).

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas XI y XII. Los rendimientos se presentan en el cuadro # 4.

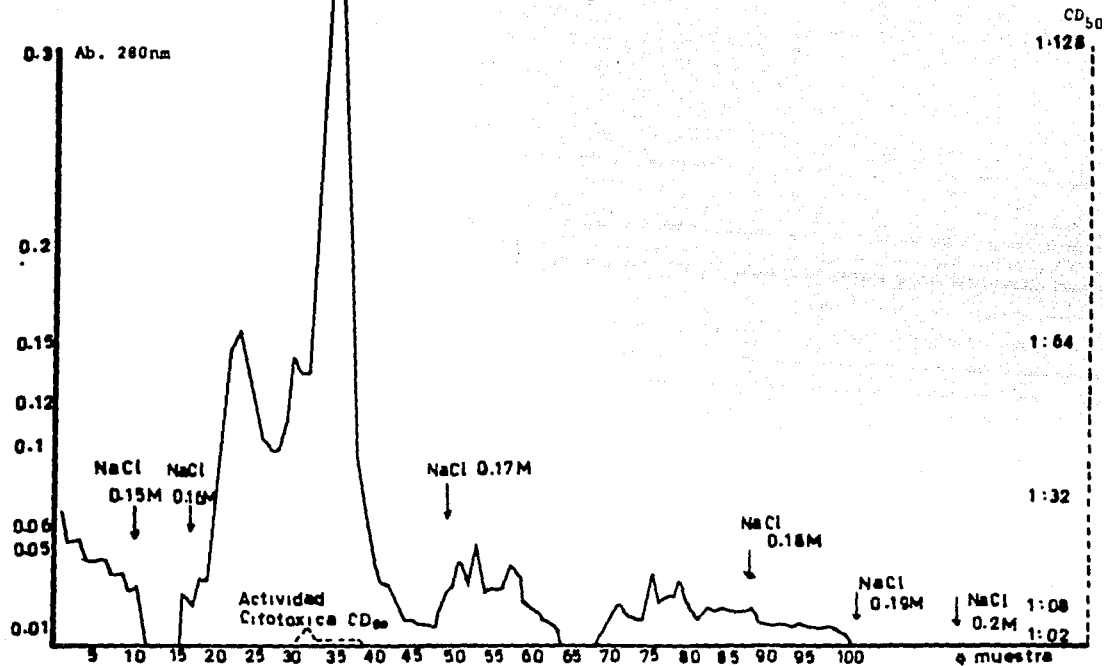
- Con el fin de determinar la actividad neutralizante del antisuero preparado contra el dializado de la cepa ---- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> (ver materiales y métodos) se hicieron ensayos de neutralización en células VERO. Simultáneamente se determinó la actividad citotóxica CD<sub>50</sub> de la cepa --- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>, obteniéndose los siguientes resultados:

- Toxina presente en el dializado de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>  
2.62 X 10<sup>6</sup> U citotóxicas/ml
- Título de neutralización del suero preinmune:0
- Título de neutralización del suero hiperinmune  
1.56 X 10<sup>6</sup> U neutralizantes de citotoxina/ml de suero

Nota: Los cálculos se describen en el capítulo de materiales y métodos.



XI) Mezcla de fracciones 15, 16, 17 y 18 de la columna G-75 de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> pasadas a través de una columna de intercambio iónico Sephadex A-50



XII) Mezcla de fracciones 15,16,17 y 18 de la columna G-75 de la cepa P-119, pasadas a través de una columna de intercambio iónico Sephadex A-50

Cuadro 4: Rendimientos

	Actividad ci- totóxica U CD <sub>50</sub> /ml	Volumen de mues- tra	% de rendi- miento	% de rendimien- to del paso de purificación
Columna DEAE Sephadex A-50				
CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>				
Fracción	31	80	1 ml	0.000012
	32	160	1 ml	0.000024
	33	80	1 ml	0.000012
	34	*	1 ml	*
	35	*	1 ml	*
	36	*	1 ml	*
	37	*	1 ml	*
	38	*	1 ml	*
		720	8 ml	0.00001
P-119				
Fracción	36	80	1 ml	0.000024
	37	160	1 ml	0.000048
	38	641	1 ml	0.00019
	39	641	1 ml	0.00019
	40	1282	1 ml	0.00038
	41	5128	1 ml	0.0015
	42	5128	1 ml	0.0015
	43	5128	1 ml	0.0015
	44	2564	1 ml	0.00076
		20752	9 ml	0.0061

0.0876

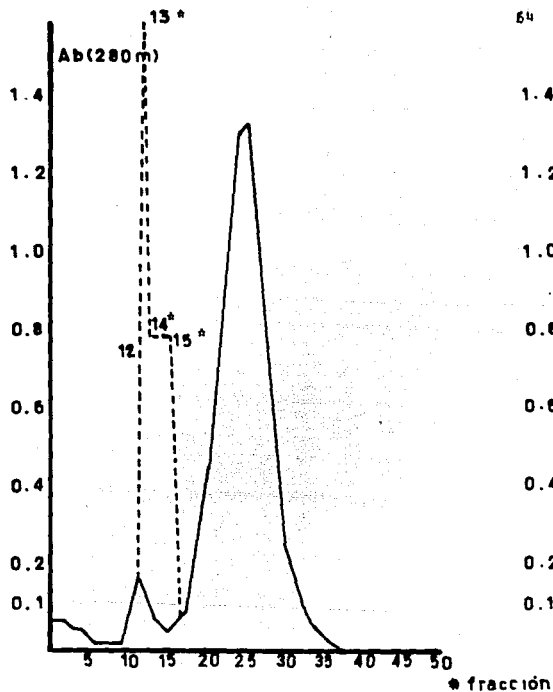
4.26

- Neutralización de las citotoxinas extracelulares producidas por las cepas P-119; 0157:H7 y CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>

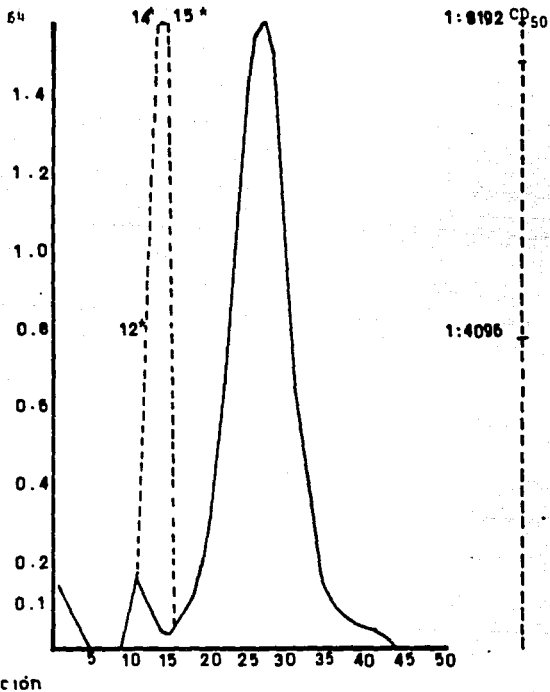
- Con el fin de comparar el grado de similitud de las citotoxinas liberadas por las cepas P-119, 0157:H7 y ----- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>, se preparó un dializado de cada una de las cepas, se pasó cada uno de los dializados a través de columnas de filtración molecular Sephadex G-75 y se procedió a neutralizar las fracciones con mayor actividad citotóxica.

La neutralización se llevó a cabo con el antisuero ya descrito preparado contra la citotoxina extracelular de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> y además contra otro suero obtenido en el laboratorio preparado contra la citotoxina intracelular de la cepa original P-119. Obteniéndose los -- resultados que se muestran en la tabla # 5.

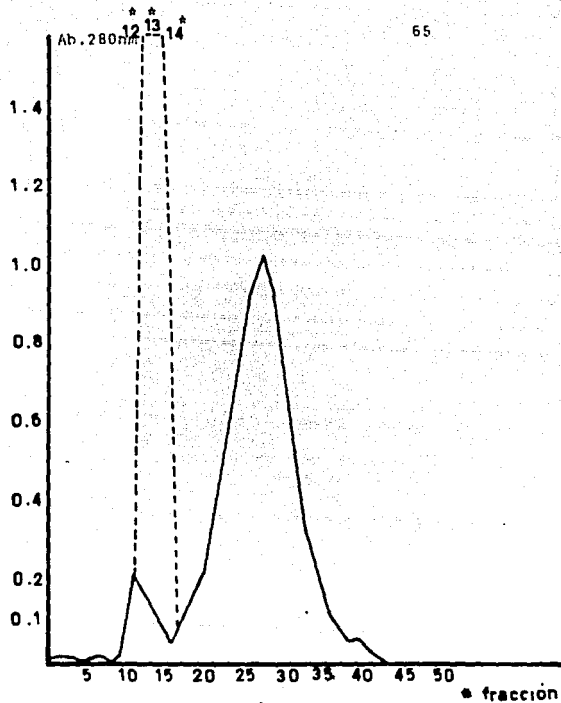
Nota: Las fracciones que se utilizaron para la neutralización se muestran en las gráficas XIII, XIV y XV.



XII) Dializado de P-119 pasado a través de Sephadex G-75. Las fracciones utilizadas para la neutralización son las marcadas con \*



XIV) Dializado de 0157:H7 pasado a través de Sephadex G-75. Las fracciones utilizadas para la neutralización son las marcadas con \*



XV) Dializado de CSH57r<sup>-</sup>(TpCh)<sup>+</sup> pasado a través de Sephadex G-75. Las fracciones utilizadas para la neutralización son las marcadas con \*

ESTÁ TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CP50

1:8192

1:4096

Tabla 5

FRACCIONES DE DIA- LIZADOS PASADOS -- POR SEPHADEX G-75 CON ACTIVIDAD CITO TOXICA MAS ALTA DE TOXINA EXTRACELU LAR	TITULO CD <sub>50</sub> DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES	U DE TOXINA NEUTRALI- ZADAS POR 1 ml DE _____	
		SUERO ANTI P-119	ANTI CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>
-CSH57r <sup>-</sup> (FpCh) <sup>†</sup>			
Fracción 12	1:8192	2.5X10 <sup>4</sup>	+ 2.6X10 <sup>6</sup>
Fracción 13	1:8192	2.5X10 <sup>4</sup>	+ 2.6X10 <sup>6</sup>
Fracción 14	1:8192	2.5X10 <sup>4</sup>	+ 2.6X10 <sup>6</sup>
Fracción 15	Contam.	---	---
- P-119			
Fracción 12	1:8192	6.66X10 <sup>5</sup>	1.32X10 <sup>6</sup>
Fracción 13	1:4096	1.66X10 <sup>5</sup>	3.33X10 <sup>5</sup>
Fracción 14	1:4096	1.66X10 <sup>5</sup>	8.3 X10 <sup>4</sup>
Fracción 15	1:4096	1.66X10 <sup>5</sup>	8.3 X10 <sup>4</sup>
-0157:H7			
Fracción 12	1:4096	1.66X10 <sup>5</sup>	1.3 X10 <sup>6</sup>
Fracción 13	Contam.	---	---
Fracción 14	1:8192	1.63X10 <sup>5</sup>	1.63X10 <sup>5</sup>
Fracción 15	1:8192	1.63X10 <sup>5</sup>	1.63X10 <sup>5</sup>



## DISCUSION DE RESULTADOS

La cepa original denominada P-119 es capaz de producir altos títulos de citotoxina intracelular y moderados títulos de citotoxina extracelular. No se tiene claro hasta el momento si estas actividades son ocasionadas por la misma toxina, asimismo hay indicaciones de que en la fracción extracelular podrían estar presentes más de una citotoxina.

Dado que se ha reportado que la(s) citotoxinas están codificadas por fagos, se procedió a lisogenizar una cepa receptora de E. coli K-12 denominada CSH57r<sup>-</sup> con un fago clonado obtenido de la cepa original P-119.

Esta cepa lisogénica: CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> fué capaz de producir bajos títulos de citotoxina detectables en sobrenadantes de cultivo, no presentando actividad citotóxica intracelular. Con el fin de concentrar la citotoxina liberada al sobrenadante se realizaron precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio dializándose con el buffer de trabajo.

Al pasar los dializados de sobrenadantes de las cepas CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup>; P-119 y 0157:H7 por columnas de filtración molecular Sephadex G-50 y G-75 se observó que el peso molecular de las citotoxinas extracelulares producidas por estas cepas es superior a 50,000 (Excluidas en G-50) e inferior a 80,000 (Retenidas en G-75). De acuerdo a los datos de % de rendimiento que se dan en el cuadro # 3 se puede observar que al pasar los dializados de CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> y P-119 a través de columnas de G-75 se obtienen mejores rendimientos que por columnas de G-50, mientras que con dializados de la cepa 0157:H7 sucede lo contrario.

Como puede observarse en el cuadro # 3 el % de rendimiento en Unidades citotóxicas CD<sub>50</sub>/ml es muy bajo, sin embargo, al calcular la actividad específica en Unidades de toxina/mg en algunos experimentos se encontró que para el caso de la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> en columnas de filtración molecular la actividad específica mejora considerablemente:

- Columnas de filtración molecular Sephadex G-50: 23.7%
- Columnas de filtración molecular Sephadex G-75: 94.0%

Por lo cual se observa que la actividad específica es alta sobre todo en columnas de filtración molecular G-75.

Utilizando columnas de intercambio iónico con DEAE Sephadex A-50 se observó que la citotoxina extracelular de las cepas CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> y P-119 se adhieren a la resina en las mismas condiciones, más al liberarlas con un gradiente discontinuo de NaCl 0.15 a 0.20M se observan diferencias entre las citotoxinas presentes.

Con CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> se obtuvieron rendimientos muy bajos 0.000024 con respecto al lisado original, la actividad de esta citotoxina se encuentra en las fracciones 31 a 38 de la columna de Sephadex A-50 (eluida con NaCl 0.16M), en cambio con P-119 se observa que el rendimiento es considerablemente mayor 0.0015, eluyéndose posteriormente de la columna en las fracciones 36 a 44 (eluida con NaCl 0.16M). La cepa 0157:H7 fué procesada de la misma manera más los resultados de D.O. fueron negativos, por lo cual no se determinó la actividad citotóxica.

Neutralizando con antisueros, preparados frente a la citotoxina extracelular de CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> y frente a la citotoxina intracelular de P-119, las tres cepas en estudio -- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>; P-119 y 0157:H7 dieron los resultados que se expresan en la tabla #5, observándose que:

- CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> es neutralizada por su suero homólogo (anticitotoxina extracelular de CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>) a un título de más de  $2.6 \times 10^6$  U de toxina/ml, mientras que el suero obtenido contra la citotoxina intracelular de P-119 sólo neutraliza  $2.5 \times 10^4$  U de toxina/ml, indicándonos que existen diferencias antigénicas entre la citotoxina producida por CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> y la citotoxina de P-119.
- Las cepas P-119 y 0157:H7 al ser neutralizadas por el suero anticitotoxina extracelular de CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> presentan el máximo título de neutralización en la primera fracción elui

da ( $1.3 \times 10^6$  U de toxina/ml), observándose una disminución en el título de neutralización en las fracciones posteriores (más retenidas).

- La neutralización de la citotoxina extracelular de estas - dos cepas con el suero anticitotoxina intracelular P-119 - es similar y no presenta estas variaciones, encontradas con el suero anti CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup>. (ver tabla #5)

Los datos anteriores parecerían indicar que la cepa original P-119 tiene dos tipos de citotoxinas extracelulares diferenciables inmunológicamente, una de estas citotoxinas es similar a la producida por la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> y la otra difiere inmunológicamente y es retenida más fuertemente en columnas de filtración molecular, lo cual podría - indicar diferencias en su peso molecular.

Al intentar determinar el peso molecular de la citotoxina liberada por CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>+</sup> por el método de Western-blot no se obtuvieron resultados ni con fracciones de columnas de filtración molecular G-75 ni con dializados de la --- muestra. Estos resultados podemos explicarlos por la cantidad de proteína presente, que parecería estar por debajo de los límites de detección de este ensayo.

## CAPITULO V

## CONCLUSIONES

- 1) La citotoxina producida por la cepa lisogénica CSH57r<sup>-</sup>--- (FpCh)<sup>†</sup> sólo se detecta en el medio extracelular.
- 2) El peso molecular de esta citotoxina de acuerdo con los datos de filtración molecular se encuentra entre 50,000 y 80,000 al igual que las citotoxinas extracelulares de la cepa original P-119 y de la cepa enterohemorrágica --- 0157:H7
- 3) En cuanto al % de rendimiento en Unidades de toxina CD<sub>50</sub>/ml se observa que es mejor en columnas de filtración molecular G-75 que en G-50 para las citotoxinas extracelulares de las cepas CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> y P-119, mientras que en la citotoxina extracelular de la cepa 0157 sucede lo contrario.
- 4) En columnas de intercambio iónico DEAE Sephadex A-50 la citotoxina de CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> se excluye tempranamente en NaCl 0.16M y se observan rendimientos muy bajos 0.000024%, en cambio la citotoxina extracelular de la cepa original P-119 tarda más en ser eluida y se observan rendimientos más altos 0.0015%
- 5) Al neutralizar la cepa CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> con su suero homólogo anticitotoxina extracelular CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup> y con el suero anticitotoxina intracelular P-119 se observa que existen diferencias antigénicas entre las citotoxinas intracelulares y extracelulares.
- 6) Conforme se van eluyendo las fracciones de las cepas P-119 y 0157:H7 de la columna de filtración molecular G-75 se observa un cambio en las unidades de toxina neutralizadas por el suero anticitotoxina extracelular CSH57r<sup>-</sup>(FpCh)<sup>†</sup>, indicando una posible variación inmunogénica en la citotoxina extracelular presente en dichas fracciones.

7) La cepa 0157:H7 se comporta igual a la cepa original P-119 en términos de neutralización.

El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de caracterizar un posible nuevo factor patógeno presente en la cepa de E. coli P-119 considerada no patógena.

Dicha cepa se vió en éste trabajo que es portadora de un factor de patogenia, el cual es una citotoxina(s) similar a la que se ha encontrado en casos de colitis hemorrágica. Esta o estas citotoxinas son codificadas genéticamente por fagos contenidos en la cepa original, lo cual abre todo un nuevo camino de transferencia de factores de patogenia entre las cepas de E. coli puesto que P-119 aún sin saber su serotipo, sí sabemos que no corresponde a ninguno de los serotipos ya establecidos como patógenos, por lo que podemos concluir que factores patogénicos como éste pueden ser transferidos a cepas consideradas normalmente no patógenas y hacerlas altamente patógenas.

## B I B L I O G R A F I A

1. TRABULSI R. LUIS, PRADO VALERIA. \* E. coli enteropatogénica \*. ADEL. Microbiol. Enf. Infecc. 1984; 3; 63-92
2. JAWETZ ERNEST. \* Manual de microbiología médica \*. 6a. Edición; Editorial El Manual Moderno S.A. México. 1975
3. R.J. GROSS \* Escherichia coli diarrhoea \*. Journal of infection 1983; 7; 177-192
4. R. BRADLEY SACK \* Human Diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli \*. Journal of infection 1975; 9; 333-353
5. JOHN L. MIDDLEBROOK AND REBECA B. DORLAND. \* Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action \*. Microbiological reviews. 1984; 10; 199-221
6. ALISON D. O'BRIEN, JOHN W HEWLAND. \* Shiga-like toxin- -- converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea \*. Science 1984; 226; 694-696
7. J. KONOWALCHUCK, N. DICIE S. STAVRIC AND J.I. SPEIRS. \* Properties of an Escherichia coli cytotoxin \*. Infection and Immunity, 1978; 20. No. 2; 575-577

8. J. ROBERT CANTY. \* Shiga toxin an expanding role in the pathogenesis of infections diseases \* Infection and Immunity; 1979; 25; 766-771
9. DAVID PRADO, THOMAS G. CLEARY, LARRY K. PICKERING. \* The relation between production of cito--- toxin and clinical features in Shigello- llosis \*. The Journal of Infections - diseases. 1986; 154; 149-154
10. GERALD T. KEUSCH, MARY JACEWICZ AND ARTHUR DONAHUE-ROLFE \* Pathogenesis of Shigella diarrhea: E vidence for an N-linked glycoprotein Shigella toxin receptor and receptor modulation by B-Galactosidase \*The - Journal of infections diseases. 1986; 153 No.2; 238-248
11. NANCY A. STROCKBINE, ALISON D.O'BRIEN Y COLS. \* Two toxin converting phages from Escherichia coli 0157:H7 strain 933 encode antigenica- lly distinct toxins with similar biolo- gic activities\* .Infection and Immunity 1986 ; 53 No.1; 135-140
12. A.D. O'BRIEN.M.R. THOMPSON. P. GEMSKY Y S.B. FORMAL \* Biological properties of Shigella -- flexneri 2a toxin and its serologi- cal relations hip to Shigella dysen- teriae 1 toxin. \* Infection and Im- munity, Mar 1977; 21; 796-798

13. A.D.O'BRIEN AND RANDALL K. HOLMES. \* Shiga and Shiga like toxins \* . Microbiological reviews 19-87 51 No.2; 206-220
14. DANIEL P. STITES , H.HUGH FUDENBERG, J. VI VIAN WELLS Y - JOHN D. STOBO. \* Inmunología básica y clínica\*. Editorial El Manual Mo -- derno S.A. de C.V. México D.F. 1985
15. J. KONOWALCHUCK J.I. SPEIRS AND S. STAVRI C. \* Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli \* . Infection and Immunity 1977 18 No. 3; 775-779
16. NANCY A. STROCKBIME AND ALISON D.O'BRIEN. \* Characterization of monoclonal antibodies against Shiga like toxins from Escherichia coli\*. Infection and Immunity 1985;--- 50. No. 3; 695-700
17. LILIAN M. MARQUES, A.D.O'BRIEN. \* Production of Shiga like toxin by Escherichia coli \*. The - Journal of infectious diseases. 1986; 154. No.2; 348-351
18. W.E. VAN HEYNINGEN \* The neurotoxin of Shigella Shigae \* University of Oxford 1952; 17; 202-216
19. DAVID FREIFELDER \* Physical Biochemistry \*. W.H. Freeman and company San Francisco 1976.
20. DAVID ABBOT Y R.S. ANDREWS \* Introducción a la cromatografía \* 2a. Edición; Editorial Alhambra . S.A. España 1970



21. PEDRO JOSEPH NATRAN. \* Separaciones cromatográficas \*  
2a. Edición; Editorial Edicol S.A.  
Méx. D.F. a 1975
  
22. ABRAHAM WHITE, PHILIP HANDLER. \* Principios de Bioquímica \*.  
3a. Edición. Editorial --  
Mc. Graw Hill. Méx. D.F. 1983