



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

“MODIFICACION DE PROPIEDADES DE VIRULENCIA
EN Escherichia coli C 600 POR CONVERSION
LISOGENICA ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A :

ELIAS PIEDRA IBARRA

MEXICO, D. F.

ABRIL 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICADO A:

MIS PADRES Y ABUELOS: quienes con su ejemplo trataron de enseñarme a vivir.

ERNESTINA Y ELIZABETH: Origen del impulso que mueve mi vida.

AGRADECIMIENTOS:

A Diego Arenas y Sergio Vaca quienes además de asesorarme y dirigir mi trabajo me han brindado su apoyo y amistad.

A Ramón, Lupita, Andrés, Joceline, Faby, Froy, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindarme su ayuda, sin la cual me hubiese sido más difícil realizar este trabajo.

A Octavio Ibarra y Antonio Piedra, cuyo apoyo hizo posible la realización de esta tesis.

A todos aquellos que en algún momento han estado conmigo.

GRACIAS

INDICE

	pag.
INTRODUCCION	1
Características generales de <i>E. coli</i>	1
Ciclo de vida de fagos temperados y virulentos	2
Características generales de Lambda	5
Efecto bactericida del suero	6
Activación de la via clásica y alterna del complemento	7
OBJETIVOS	12
MEDIOS Y SOLUCIONES	13
METODOLOGIA	14
RESULTADOS	19
DISCUSION Y CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	40

INTRODUCCION.

CARACTERISTICAS GENERALES DE *Escherichia coli*.

La especie *Escherichia coli* pertenece al grupo denominado enterobacteriaceae, que esta formado por bacilos anaerobios facultativos gram-negativos. Este grupo se encuentra en el tubo digestivo y solo excepcionalmente produce enfermedad.

Los grupos antigénicos que se agrupan en la especie *E.coli* se pueden dividir en tres categorías: Oportunista, enteropatógenas, y productoras de enterotoxina. Las patógenas oportunistas son inofensivas en su hábitat normal hasta que llegan a otros sitios o tejidos, en donde pueden producir infecciones del aparato urinario, de los pulmones, de la piel y heridas, así como también bacteremias, meningitis y absesos.

La *E.coli* enteropatógena causa gastroenteritis aguda en el tubo digestivo principalmente a recién nacidos o los niños hasta los dos años, pero rara vez a los adultos excepto cuando tienen muy disminuida su resistencia a esta bacteria.

Las *E.coli* productoras de enterotoxinas son incapaces de invadir la mucosa intestinal, pero dejan en libertad una enterotoxina que se absorbe a través de las membranas de las células epiteliales y estimula la actividad de la adenilciclase. El incremento del adenosin -3-5-monofosfato cíclico (AMP cíclico) juega un papel importante en el aumento de la secreción electrolítica del intestino (10).

CICLO DE VIDA DE LOS FAGOS TEMPERADOS Y VIRULENTOS.

Los virus que utilizan células bacterianas para su multiplicación son llamados bacteriófagos (fagos). La mayoría destruyen (lisan) a la célula que los alberga (hospedera) y han sido denominados virulentos. Algunos otros permiten la multiplicación de la célula bacteriana, llevando insertado en el genoma al del fago (5,14)

La vía lítica puede dividirse en tres pasos: Adsorción, en la que el fago se fija por el extremo de su tallo a la superficie bacteriana, mediante previo reconocimiento de sitios específicos. Periodo de latencia o vegetativo, poco después de la inyección del material genético viral se inicia la expresión de los genes "tempranos" del fago, los que codifican para proteínas involucradas en el cese de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas bacterianas además de proteínas relacionadas con la síntesis de ácido nucleico viral. Después de algunos minutos de transcripción de los genes tempranos se inicia la transcripción de los genes "tardíos" del fago, involucrados en la síntesis de proteínas estructurales fágicas. Lisis, en esta etapa se rompe la célula por acción de enzimas líticas, codificadas por genes virales tardíos, liberandose aproximadamente 100 nuevas partículas infecciosas por bacteria infectada. Todo el proceso se realiza en aproximadamente 24 minutos, a 37° C (8).

Para el establecimiento de la vía lisogénica, el ADN inyectado debe dirigir la síntesis de productos génicos que promueven la

inserción del cromosoma fágico en el ADN hospedero, inmediatamente después se expresan otros genes que producen una molécula represora que evita la replicación del ADN y la mayoría de los genes fágicos (7).

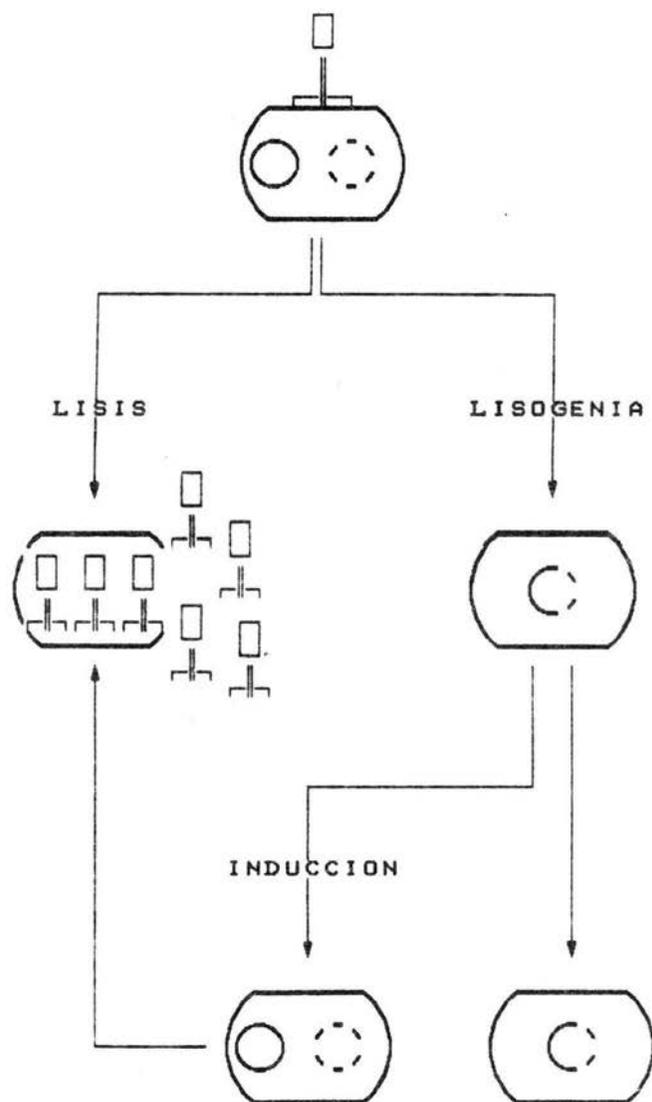
Cuando estos procesos se han realizado coordinadamente, el ADN del fago se puede insertar en un sitio específico dentro del cromosoma bacteriano, o bien, permanecer como material genético extracromosómico. El ADN viral en este estado es conocido como profago y la cepa que lo porta como lisogena, la replicación de su material genético contribuye indirectamente al desarrollo viral, ya que todas las células portadoras de profagos son un centro potencial para la producción de partículas fágicas. La lisogenia fue descubierta en 1921, pero hasta 1950 Lwoff y Gutman confirmaron que tal condición se conserva a través de las generaciones de bacterias (7).

Las cepas lisogenas comparten varias características que permiten su identificación: Son insensibles a una superinfección por fagos homólogos, producen fagos (inducción espontánea a baja frecuencia), y liberan fagos sobre un tapiz de cepa sensible.

El ciclo lisogénico puede producir variación genética en dos formas: Utilizando al fago como "acarreador" de ADN bacteriano, de una célula a otra (transducción), o bien modificando las propiedades fenotípicas de la bacteria, mediante la acción de productos de genes del profago (conversión lisogénica) (5).

La inducción de la lisogena es el proceso inverso al establecimiento. Puede darse espontáneamente, o puede ser provocada por agentes físicos o químicos, los cuales afectan a la molécula

Fig. No. 1



CICLO DE VIDA DE LOS FAGOS LITICOS Y TEMPERADOS.

represora y ocasiona que el ADN viral se escinda del bacteriano y los genes de la vía lítica se activen.

Se han reportado varios agentes que provocan la inducción como luz ultravioleta, mitomicina C, y medios pobres en timina, los cuales inhiben la replicación del genoma hospedero (5)(Fig.1).

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAMBDA

Lambda es un virus que utiliza a *E. coli* para su reproducción y puede causar la lisis de la célula, pero también puede propagarse en forma que permite la multiplicación de la célula hospedera (14).

La existencia de lambda no se advirtió hasta 1951, cuando E. Ledenberg observó que *E. coli* K12(λ) liberaba, al fago tras un tratamiento con luz ultravioleta. En 1944, Gray y Tatum, y en 1946 J. Ledenberg y Tatum habían trabajado con la misma K12(λ), sin detectar la presencia del profago.

Los fagos que forman parte de la familia lambdoide comparten tres propiedades: Se recombinan por entrecruzamiento, su ADN poseen pares idénticos en las terminaciones cohesivas, y sus profagos son inducibles por radiación ultravioleta.

Aproximadamente el 50% de la composición química de lambda corresponde a ácidos nucleicos, y el 50% restante a proteínas. El ácido nucleico se encuentra en doble cadena de ADN, encerrado en una cabeza icosaédrica, de 0.05 μm de diámetro, del cual se proyecta un tallo de 0.05 μm de longitud (7).

El mantenimiento de la lisogenia en *E. coli*(λ) se debe a la

represión de los genes de la lisis del profago por moléculas represoras producidas por los genes cI, cII y cIII del genoma fágico. La proteína producida por cI, además de reprimir la expresión de otros genes del profago, reprime también genes de fagos λ superinfectantes, por esta razón la célula lisogena es inmune específicamente a la reinfección por λ . Si la presencia del represor cesa por alguna razón, el profago entra en la vía productiva. Este proceso requiere de la excisión del profago (inducción) del cromosoma bacteriano, la replicación autónoma del DNA, producción de fagos y la lisis (7).

Muschel L.H. et. al. (9) reportaron que cuando infectaron *E. coli* K12 con lambda, y mutantes temperatura sensibles en el represor (c_{ts}) del fago, las lisógenas presentaron un notable aumento en la resistencia al suero de cobayo, respecto a K12 libre de fagos.

EFECTO BACTERICIDA DEL SUERO

El suero normal de hombre y animales en general, tiene efectos bactericida sobre gran número de cepas bacterianas, incluyendo *E. coli*. El principal componente del suero con este efecto, es el complemento, considerado como medio de defensa importante del hospedero contra invasiones bacterianas. Por lo que la resistencia al suero podría ser una propiedad importante en la virulencia para una bacteria invasiva (4, 15).

El complemento normal puede ser activado mediante dos vías, la vía Clásica (CPC), y la Alternativa (APC). Taylor (15) y Ciurana B. (2)

han reportado métodos, mediante los cuales se logra inactivar a cualquiera de estas dos vías sin afectar la función de la otra.

ACTIVACION DE LAS VIAS CLASICA Y ALTERNA DEL COMPLEMENTO

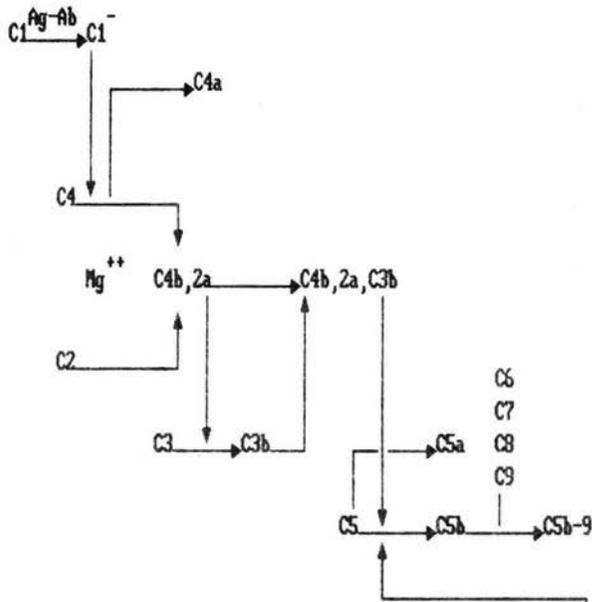
La vía Clásica del complemento se inicia con la interacción entre un complejo antígeno-anticuerpo, en el cual participan inmunoglobulinas IgG o IgM, y C1. Esta última una de las 9 proteínas del complemento, se compone de 3 unidades: C1q, C1r y C1s, las cuales en presencia de Ca^{2+} circulante, forman un complejo entre 1C1q, 2C1r y 2C1s. La unidad C1q se une a la porción Fc de las IgG o IgM formando un complejo que posee 6 sitios receptores para las inmunoglobulinas. Cambios conformacionales críticos en C1q permiten la conversión de las proenzimas C1r y C1s en serin-proteasas C1r̄ y C1s̄. El cambio de C1s a C1s̄ es catalizado por C1r̄ y culmina con la formación de dos cadenas peptídicas (PM 56,000 y 30,000 daltons) unidas por puentes disulfuro. Entonces C1s̄ transforma a C4 (PM 204,000) y a C2 (PM 98,000), generando una enzima para C3 (C4b,2a). Con el rompimiento de C4 se originan dos fragmentos; C4a y C4b, este último se une al segmento C2a, mientras que C4a es liberado y no interviene más en la activación del resto de los componentes. Mediante el rompimiento de C2 se obtienen dos fragmentos, C2a y C2b, estos pueden reunirse a menos que se encuentren rodeados por C4b y Mg^{2+} . El fragmento mayor de C2, C2a (PM 72,000) permanece unido a C4b formando el complejo "C3 convertasa". Estos C4b,2a rompen a C3 en

dos fragmentos C3a y C3b (PM 181,000); el sitio enzimático para C3 reside en la fracción C2 del complejo, C4b funciona haciendo a C3 más susceptible del ataque enzimático. C3a es un fragmento anafilatóxico (que ocasiona la liberación de histamina por las células cebadas) y es liberado, mientras que C3b se une a la superficie del complejo C4b,2a, formando de esta manera un nuevo complejo C4b,2a,3b, el cual constituye la "C5 convertasa", esta enzima rompe a C5 (PM 206.000) en dos fragmentos, uno pequeño C5a con función quimiotáctica (atrae a los leucocitos PMND), y C5b. El rompimiento de C5 inicia un proceso de autoensamblaje, el cual culmina con la formación de un complejo transmembranal estable (MAC) en el cual se involucra a C5b, C6 (PM 128,000), C7 (PM 121,000), C8 (153,000) y C9 (PM 79,000).

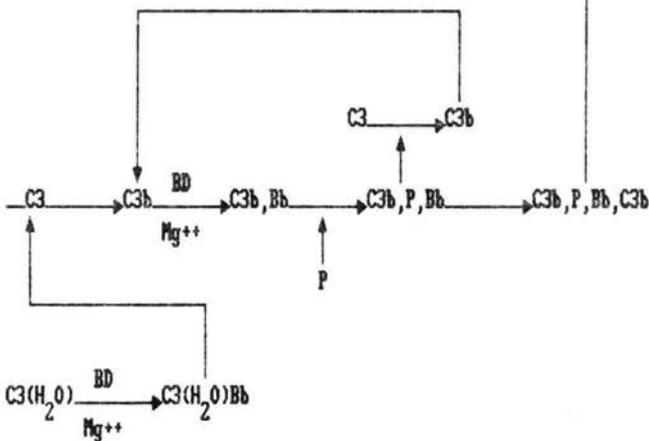
La ruta alterna del complemento se activa cuando se encuentra en la sangre el factor D activado (una serin-proteasa de PM 24,000), el cual rompe la molécula del factor B (PM 100,000), cuyo fragmento Bb en presencia de Mg^{2+} se asocia transitoriamente con C3 formando pequeñas cantidades de enzima C3,Bb, ésta cataliza la formación de fragmentos C3b, los cuales se pueden asociar transitoriamente con los fragmentos Bb originando de esta manera otra enzima (C3b,Bb), ésta en presencia de Mg^{2+} puede relacionarse con el factor P (una properdina PM 184 000) formando una "C3 convertasa" estable la cual puede ligar una molécula C3b adicional para convertirse en C3b,P,Bb,C3b constituyendo así la "C5 convertasa" de la vía alterna. En condiciones fisiológicas normales esta ruta esta sujeta a un fuerte control negativo por

Fig. No. 2

VIA CLASICA



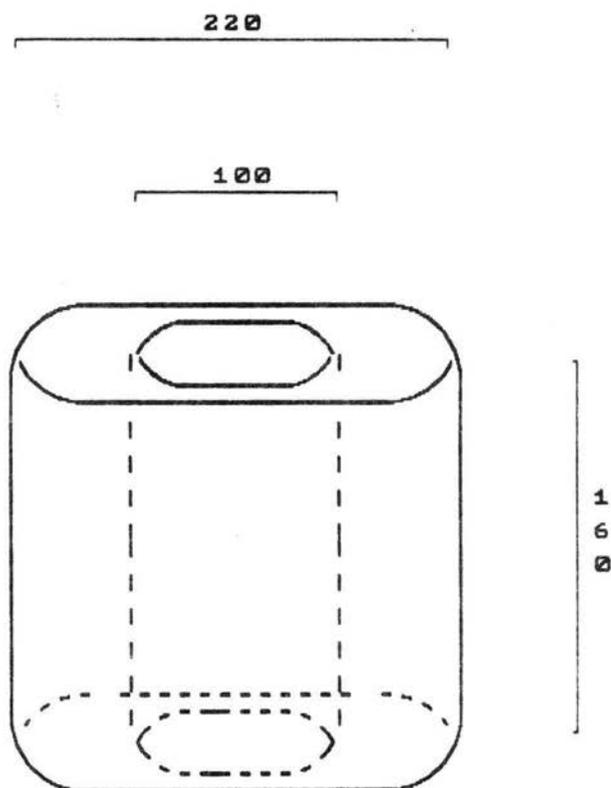
VIA ALTERNA



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ACTIUACION DE LA VIA CLASICA Y ALTERNA DEL COMPLEMENTO
TOMADO DE TAYLOR P.4. (1983)

Fig. No. 3

ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA ESTRUCTURA FORMADA POR EL MAC.



Unidades en Angstroms.

Segun datos de Taylor P.W. (1983)

las moléculas β IH (PM 150,000) y C3bINA (inactivador del C3b de PM 88,000). β IH se une estequiométricamente a C3b y evita su interacción con otras proteínas. A pesar de la presencia de estas dos moléculas se puede formar el complejo C3b,P,Bb sobre ciertas superficies bacterianas, porque la conformación de ciertas estructuras superficiales protege al complejo (15)(Fig. 2 y 3).

Algunos grupos de *E.coli* son agentes patógenos de importancia para el hombre (15). En estado lisogénico K12(λ), aumenta su resistencia al suero de cobayo, por lo tanto resulta interesante investigar: si la lisogenia en *E.coli* incrementa la resistencia al suero humano, cual es el comportamiento de las cepas (lisogena y libre de fagos) a través del tiempo que dura la incubación en presencia de suero, y cual o cuales vías del complemento son las responsables de la muerte de las cepas.

OBJETIVOS.

1. Averiguar si el fago λ disminuye la sensibilidad, al efecto bactericida del suero humano normal, de la cepa de *E.coli* C600 por conversión lisogénica.
2. Determinar la concentración óptima de suero a la que se observa la diferencia en sensibilidad entre la cepa silvestre y la lisógena.
3. Determinar la cinética de muerte por suero, a la concentración óptima, de la cepa lisógena y la silvestre.
4. Determinar la participación de las vías de activación del complemento en la reacción bactericida contra ambas cepas.

MEDIOS Y SOLUCIONES.

Caldo nutritivo (CN).

Pesar 8 gramos de CN (bioxon), disolver en 1000 ml de agua destilada, y esterilizar.

Agar Nutritivo (AgN).

Pesar 15 gramos de Agar Bacteriológico, 8 gramos de CN, disolver en 1000 ml de agua destilada, y esterilizar.

Agar Suave (AS).

Pesar 10 gramos de Peptona de Caseína, 6 gramos de Agar Bacteriológico, 2.5 gramos de Cloruro de Sodio, disolver en 1000 ml de Agua destilada, y esterilizar.

Solución Amortiguadora SM.

Pesar 5.85 gramos de Cloruro de Sodio, 0.5 gramos de Gelatina, disolver en 480.5 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.4, y esterilizar, se deja enfriar y se le agregan 5 ml de Tris 1M y 2.5 ml de sulfato de magnesio 1M.

Caldo de soya y Tripticasa.

Pesar 3.0 gramos de Caldo de soya y tripticasa (Bioxon), disolver en 100 ml de agua destilada, y esterilizar.

TRIS 0.02 M (Solucion amortiguadora).

Pesar 2.42 gramos de TRIS (MERCK), disolver en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y esterilizar.

EGTA 100 mM (en TRIS 0.02 M).

Se Agregan 0.38 gramos de EGTA a 5 ml de TRIS, calentar la mezcla a 60° C se agregan lentamente gotas de NaOH 5 N, hasta que se disuelve el EGTA. Ajustar el pH a 7.3 con HCl 1 N. Se mide el volumen de la solución y se agrega el volumen de TRIS requerido para completar 10 ml, se almacena la solución a 4° C.

NaOH 5 N.

Pesar 2 gramos de NaOH disolver en 10 ml de agua destilada, y esterilizar.

HCl 1 N.

Agregar 1 ml de HCl comercial a 9 ml de agua destilada estéril.

EDTA 100 mM (en TRIS 0.02M).

Pesar 0.38 gramos de EDTA, disolverlos en 10 ml de TRIS 0.02M, esterilizar y se almacena a 4°C.

METODOLOGIA.

Obtención de un lisado de alto título.

A partir de halos de lisis del fago lambda, sobre un tapiz de cepa sensible en cajas de Petri con AgN, se tomó un inóculo con un

palillo estéril, con el cual se trazó una línea superficial de un extremo a otro de una caja de Petri con AgN. Se vació sobre ésta 0.2 ml de cepa sensible con 3 ml de AS. La caja se incubó 12 hrs a 37° C. A partir de una placa aislada se obtuvo el lisado de lambda, mezclando esta con 0.5 ml de cepa sensible, (crecida durante 12 hrs), 10 ml de CN y 0.1 ml de maltosa 0.2 %. Se incubó el cultivo a 37° C, hasta lisis. Se centrifugó el lisado a 15000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante obtenido a un tubo estéril y se almacenó a 4° C (1).

Titulación del lisado.

Se hicieron diluciones seriadas del fago lambda, en una solución amortiguadora (SMD, se plaquearon, con 0.2 ml de bacteria sensible y 3 ml de AS, en cajas de Petri con AgN y se incubaron a 37° C durante 12 hrs. Se contó el número de placas por caja y se calculó el número de fagos en la dilución original con la siguiente fórmula (1):

$$\frac{\text{Número de placas}}{(\text{Vol de dilución})(\text{dilución})}$$

Obtención de cepas lisógenas.

Se goteó el fago lambda sobre un tapiz de *E. coli* C600 en cajas con AgN, se incubaron a 37° C durante 12 horas. A partir de los halos de lisis producidos se obtuvieron colonias aisladas, en cajas de Petri con AgN.

Confirmación de la lisogenia.

De las lisogénas aisladas, se tomó un inóculo con un palillo estéril, y se inocularon sobre dos cajas; una con cepa sensible y otra sin bacteria. Ambas fueron incubadas a 37° C durante 12 hrs.

Obtención de suero humano.

Inmediatamente después de extraída la sangre se incubó a 37° C durante 1 hora. A continuación se separó el coágulo de las paredes del tubo con un palillo estéril y se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos. El suero se extrajo con pipetas Pasteur, evitando que se mezclaran con el coágulo (4).

Ensayo de resistencia al suero.

Las cepas C600 y C600(λ) crecieron por separado, en 10 ml de caldo de soya y tripticasa, hasta el inicio de la fase exponencial (Abs = 0.3). Posteriormente fueron centrifugadas a 8000 rpm, durante 10 minutos, y se resuspendieron en el mismo volumen de una solución amortiguadora. Este proceso se repitió una vez más.

En matraces estériles de 125 ml se hicieron diferentes mezclas de suero, bacterias y solución amortiguadora, incubándose con agitación a 37° C durante 3 hrs. Una vez terminada la incubación se hizo una serie de diluciones, que se espatularon en cajas Petri con AgN. Las cajas fueron incubadas a 37° C durante 12 horas. A partir de las colonias sobrevivientes se determinó el porcentaje de sobrevivencia, usando como control las bacterias que no fueron expuestas al suero (Fig. 4).

Cinética de muerte por suero de las cepas de *E. coli* C600 y C600(λ) a una concentración letal de suero humano.

Una vez determinada la concentración de suero óptima para observar la diferencia en la sensibilidad al suero de ambas cepas se repitió el ensayo de resistencia (previamente descrito) a esa concentración, espatulando alícuotas de diferentes tiempos de exposición al suero sobre cajas Petri con AgN.

Inactivación del complemento.

a) Se calentó el suero a 56° C durante 30 min.

b) A la suspensión bacteria, suero y TRIS se agregó la cantidad necesaria de EDTA 100 mM, para que la concentración final de éste en la mezcla sea 10 mM.

Inactivación de la vía Alternativa del complemento.

Se calentó el suero a 50° C durante 20 minutos. Se utilizó inmediatamente después de terminado el periodo de calentamiento.

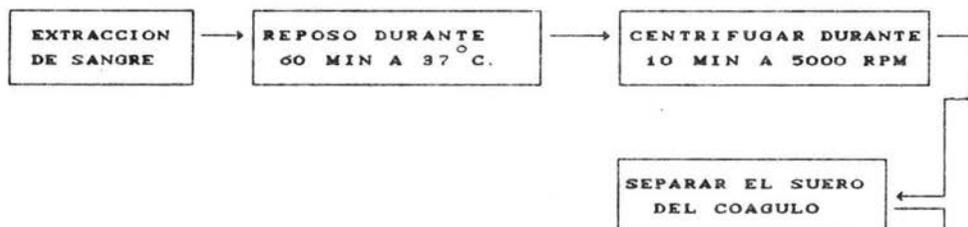
Inactivación de la vía Clásica del complemento.

A la suspensión bacteria, suero y TRIS se agregó la cantidad necesaria de EGTA 100 mM, para que la concentración final de éste en la mezcla fuera 10 mM.

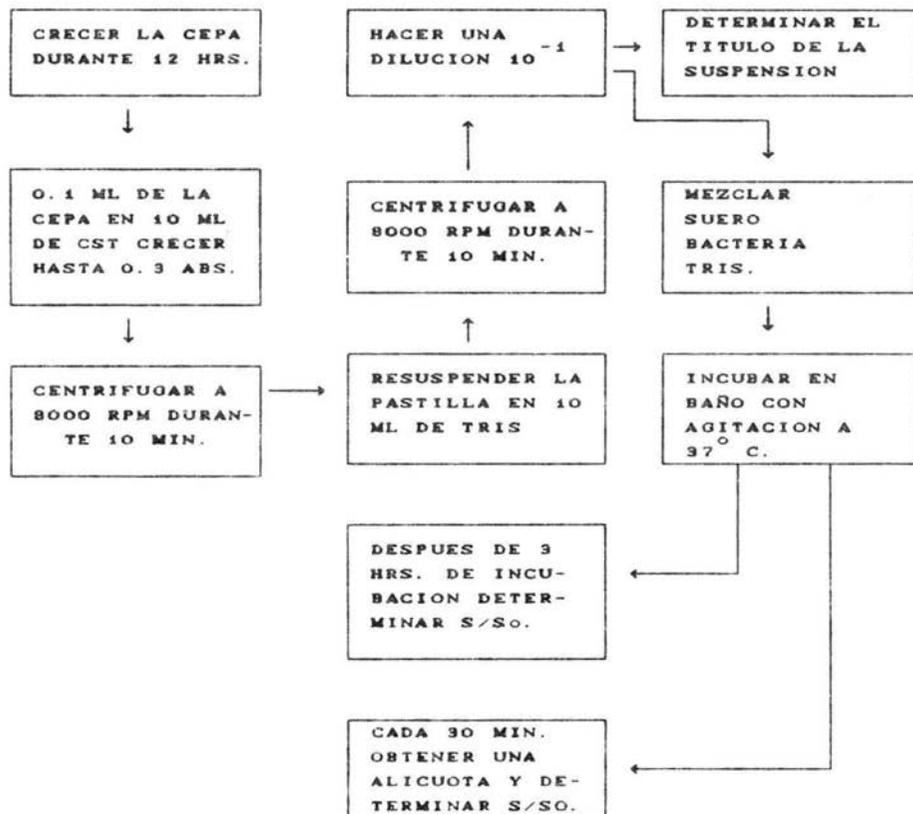
Fig. No. 4

ENSAYO DE RESISTENCIA A SUERO HUMANO

OBTENCION DE SUERO FRESCO



PREPARACION DE LA CEPA



RESULTADOS

Se obtuvo un lisado del fago lambda cuyo titulo fue de 5.4×10^{10} ufp/ml, sobre la cepa C600 de *E.coli*. Con este lisado se obtuvieron halos de lisis sobre una cepa sensible. A partir de éstos se aislaron colonias, a las cuales se les confirmó su estado de lisogenia, mediante la liberación de fagos en un tapiz de cepa sensible. Todas las colonias probadas fueron lisógenas. Con la finalidad de determinar cual de las soluciones amortiguadoras sería la más adecuada en nuestro ensayo de resistencia a suero. Se determinó el efecto de cuatro soluciones amortiguadoras en la sobrevivencia de la cepa C600. El TRIS resultó ser la solución mas adecuada para usarse en el ensayo de resistencia a suero ya que el porcentaje de sobrevivencia después de tres horas de incubación fue cercano al 100 %. Para determinar la resistencia al suero humano de las cepas utilizadas (C600 Y C600 (λ)), se montó el ensayo (descrito en metodologías) usando diferentes concentraciones de suero (2 %, 4 %, 6 %, 8 % y 10 %). En la Tabla 1 se observa que a las concentraciones de suero de 2 % y 4 % la sobrevivencia de ambas cepas es notablemente diferente; 39.4 % para C600 y 319.5 para C600(λ), al 2 % y 1.765 % para C600 y 42.5 para C600(λ) al 4 % de suero. En sí en ambas concentraciones existe una diferencia de un orden de magnitud entre la cepa control y la lisógena. A partir del 4 % de suero la sobrevivencia entre ambas cepas tiende a hacerse menos amplia. Así, podemos ver que al 6 % de suero C600 sobrevive 0.138 % mientras que C600(λ)

lo hace en un 0.405 %. Después de 3 horas de incubación en suero humano a una concentración de 8 % la cepa C600 sobrevive en un 0.055 % y C600(λ) 0.04 %, mientras que al 10 % de suero solamente sobrevive un 0.03 % de C600 y 0.027 % de C600(λ). Los valores de sobrevivencia obtenidos en el ensayo de resistencia a suero fueron el promedio de al menos tres experimentos y las desviaciones estandars correspondieron aproximadamente a un 15 % de la media de los experimentos. En la gráfica No. 1 se presentan estos valores. Las diferencias en la sobrevivencia entre ambas cepas antes mencionadas son fácilmente identificadas aquí. El eje de las abcisas corresponde a las diferentes concentraciones de suero usadas (del 2 al 10 %), y el de las ordenadas a los porcentajes de sobrevivencia observados después del periodo de incubación. La gráfica muestra que en una mezcla con 2 % de suero el número inicial de organismos de la cepa C600 disminuye, mientras que el de C600(λ) aumenta en una proporción cercana al 300 %. En la siguiente concentración el número de sobrevivientes para C600 se acerca al 2 %, y para C600(λ) el porcentaje disminuye del 300 % anterior a un 40 % aproximadamente. Para determinar la cinética del comportamiento de las cepas de *E. coli* C600 y C600(λ) se consideró como concentración adecuada para los fines del experimento la mezcla que contiene 4 % de suero humano, puesto que como indica la tabla y gráfica 1, la cepa C600 solamente sobrevive en una proporción cercana al 2 %, mientras que C600(λ) lo hace en un 40 % aproximadamente. La tabla 2 muestra los promedios, con las desviaciones estandars, de los resultados obtenidos, en al menos,

TABLA No. 1

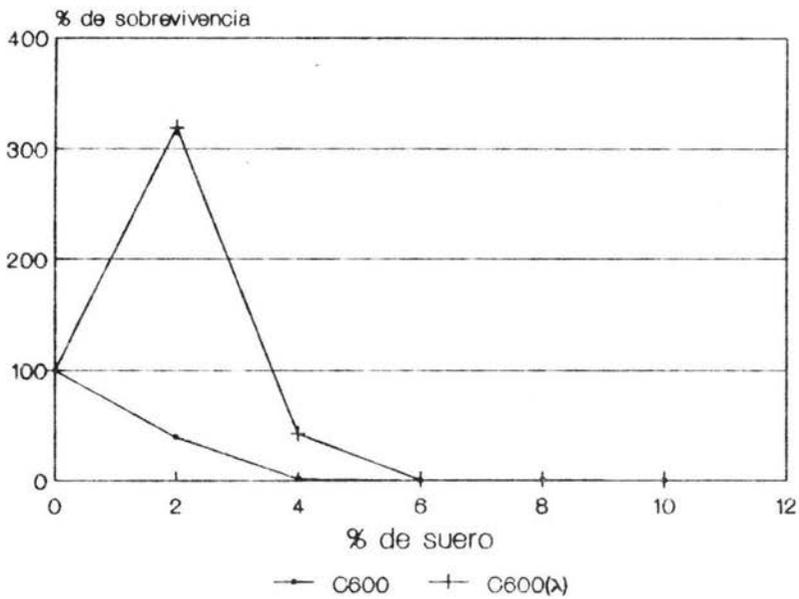
RESISTENCIA DE E. coli C600 y C600(λ)
AL SUERO HUMANO

% DE SUERO	% DE SOBREVIVENCIA	
	C600	C600(λ)
0	100	100
2	39.4 ± 4.40	319.5 ± 66.500
4	1.8 ± 0.41	42.5 ± 11.500
6	0.1 ± 0.17	0.40 ± 0.010
8	0.5 ± 0.03	0.05 ± 0.010
10	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.008

Las cepas se incubaron por separado durante 3 hrs. en agitación a 37° C y se determinó S/So al final de este periodo. Los resultados son promedio de 3 ensayos.

GRÁFICA No. 1

RESISTENCIA DE E.coli C600 y C600(λ)
AL SUERO HUMANO



Las cepas se incubaron por separado durante 3 hrs. en agitación a 37° C y se determinó S/S₀ al final de este periodo. Los resultados son promedio de 3 ensayos.

2 ensayos. Se observa que después de 30 minutos de incubación (muestra 1) las cepas C600 y C600(λ) tuvieron valores de sobrevivencia de 109 % y 107 %, respectivamente. A los 60 minutos de incubación la sobrevivencia de C600 fue de 31.5 % y la de C600(λ) de 199 %. En este tiempo se observó una diferencia entre los porcentajes de sobrevivencia de ambas cepas, que se mantuvo en el resto del ensayo aunque no con la misma magnitud. La gráfica No. 2 corresponde a los valores de las sobrevivencias de ambas cepas, obtenidos en el ensayo de la cinética del comportamiento. En el eje de las abcisas se representan los intervalos de tiempo en los cuales se tomaron las muestras, después de iniciado el periodo de incubación. En el eje de ordenadas se encuentran representados los porcentajes de sobrevivencia. En la gráfica se observa que el porcentaje de organismos de la cepa C600 durante los primeros 30 minutos aumentó ligeramente a un valor cercano al 110 %, lo mismo que la cepa C600(λ), a partir de ese momento el porcentaje de sobrevivientes de la primera cepa empieza a disminuir paulatinamente (31.5, 37, 32.5, 23 %) para ubicarse después de 180 minutos en 16 %. La curva correspondiente a C600(λ) presenta una notable diferencia de la anterior; después de los primeros 30 minutos en los cuales los valores de esta cepa son similares al de C600, el porcentaje de sobrevivencia alcanza su máximo en el intervalo siguiente (200 % aprox.), para disminuir a continuación (165, 109, 87 %) y finalizar en 65 %. En la tabla No. 3 se resumen los resultados de la cinética del comportamiento

TABLA No. 2

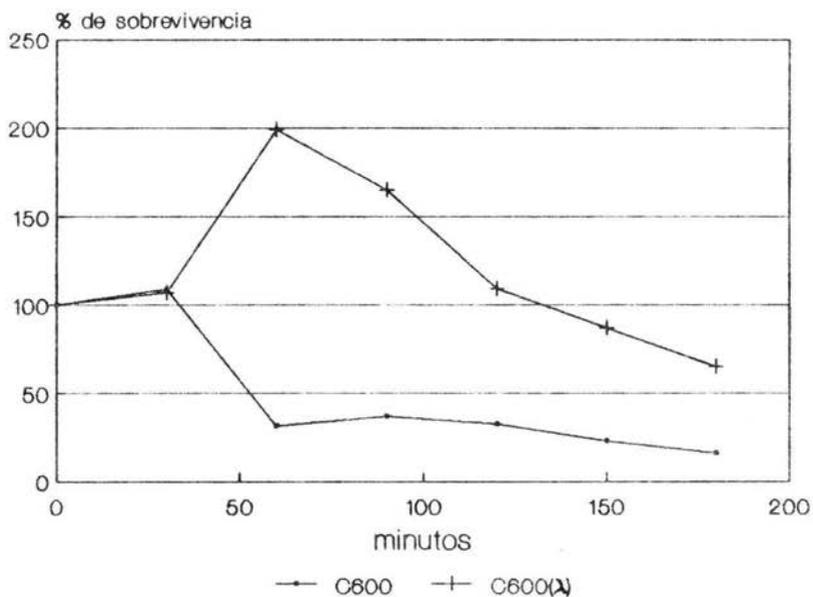
CINETICA DEL COMPORTAMIENTO DE *E. coli* C600 y C600(λ)
A CONCENTRACION LETAL DE SUERO HUMANO.

MIN.	% DE SOBREVIVENCIA	
	C600	C600(λ)
0	100	100
30	109 ±0.0	107 ± 2.0
60	31.5 ±4.5	199 ±18.0
90	37.0 ±3.0	165 ± 8.5
120	32.5 ±5.5	109.5±17.5
150	23.0 ±1.0	87 ± 7.0
180	16.0 ±2.0	65 ± 2.0

Las cepas se incubaron por separado, durante 3 hrs. en agitación a 37° C y se determinó S/So cada 30 min. Los resultados son promedio de 3 ensayos al menos. La concentración de suero en la solución es de 4%.

GRÁFICA No. 2

CINETICA DEL COMPORTAMIENTO DE *E. coli* C600 y C600(λ)
A CONCENTRACION LETAL DE SUERO HUMANO.



Las cepas se incubaron por separado, durante 3 hrs. en agitación a 37° C y se determinó S/So cada 30 min. Los resultados son promedio de 3 ensayos al menos. La concentración de suero en la solución es de 4%.

TABLA NO. 3

EFFECTO DEL CALENTAMIENTO DEL SUERO HUMANO
EN SU ACCION BACTERICIDA

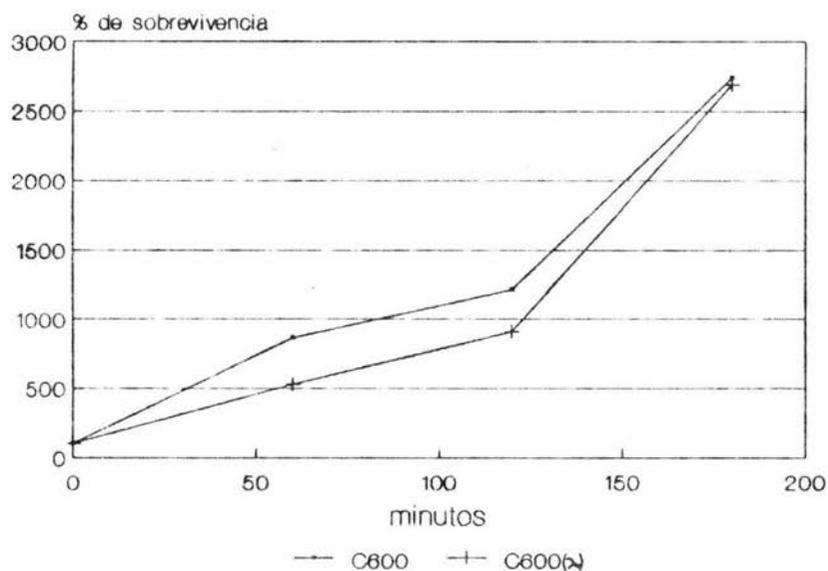
MIN.	% DE SOBREVIVENCIA	
	C600	C600(λ)
0	100	100
60	864 [±] 39	528 [±] 128
120	1215 [±] 151	910 [±] 27
180	2741 [±] 228	2693 [±] 538

El suero se calentó a 56° C durante 30 min, la concentración en las mezclas fue de 4%. Las cepas se incubaron por separado durante 3 hrs. a 37° C determinandose S/So cada 60 min. Los datos son promedio de 3 experimentos al menos.

durante 180 minutos, de ambas cepas incubadas en suspensiones con 4 % de suero humano inactivado. En la tabla puede observarse que las cepas crecen de manera similar. Encontramos que a los 60 minutos el porcentaje sobreviviente de C600 es 864 %, y el de C600(λ) es de 528 %, en el segundo muestreo (120 minutos), la fracción sobreviviente de C600 es de 1215 %, y el de C600(λ) es de 910 %, finalmente a los 180 minutos de incubación C600 ha crecido hasta alcanzar un porcentaje de sobrevivencia de 2741 % y C600(λ) 2693 %. La Gráfica No. 3 esquematiza los datos anteriores, el eje de las ordenadas corresponde a los porcentajes de la fracción sobreviviente, mientras que el de las abscisas al tiempo de incubación. Se observa que ambas cepas, después de tener un crecimiento ligeramente diferente alcanzan a los 180 minutos un porcentaje de sobrevivencia idéntico. En la tabla No. 4 se resumen los resultados de la cinética de la acción de la vía Clásica sobre las dos cepas C600 y C600(λ) de *E. coli* en suspensiones con 4 % de suero. Después de 30 minutos de iniciado el experimento encontramos que la fracción sobreviviente de la cepa C600 corresponde a un porcentaje de 132 % y el de C600(λ) a 133 %, en el siguiente muestreo (60 min), 237 % corresponde a C600 y 198 % a C600(λ), a los 90 minutos de iniciado el experimento sobreviven 462 % de la cepa control y 438 % de la lisógena, en los siguientes muestreos los porcentajes de la fracción sobreviviente de C600 son 462 % a los 120 minutos, 601 a los 150 y finalmente 927 % a los 180 minutos de haberse iniciado el experimento, en la misma secuencia para C600(λ) tenemos 814 %, 961 % y alcanza

GRAFICA NO. 3

EFFECTO DEL CALENTAMIENTO DEL SUERO HUMANO
EN SU ACCION BACTERICIDA



El suero se calentó a 56° C durante 30 min, la concentración en las mezclas fue de 4%. Las cepas se incubaron por separado durante 3 hrs. a 37° C determinandose S/So cada 60 min. Los datos son promedio de 3 experimentos al menos.

TABLA No. 4

EFFECTO BACTERICIDA DE LA VIA CLASICA SOBRE

E. coli C600 Y C600(λ)

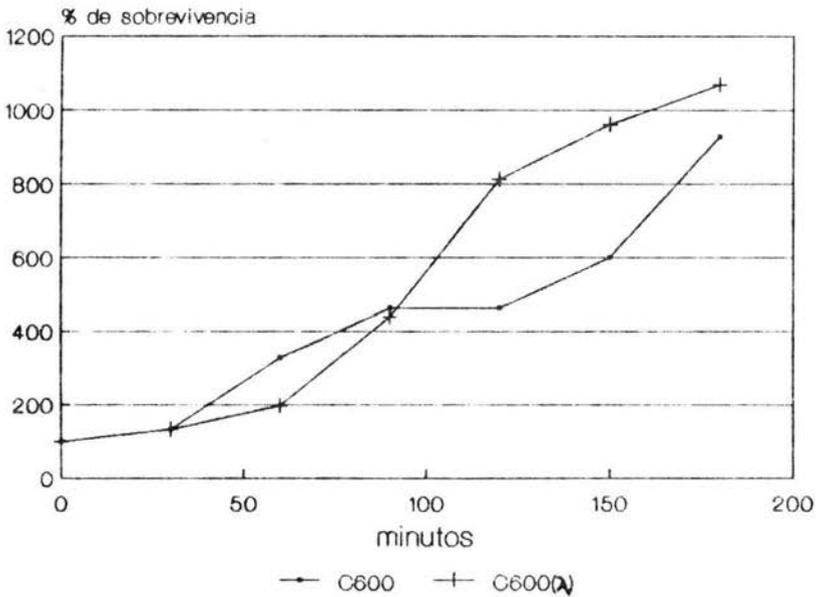
MIN.	% DE SOBREVIVENCIA	
	C600	C600(λ)
0.	100	100
30	132 [±] 20	133 [±] 7
60	237 [±] 17	198 [±] 22
90	462 [±] 52	438 [±] 28
120	462 [±] 81	814 [±] 25
150	601 [±] 106	961 [±] 162
180	927 [±] 35	1069 [±] 97

Las cepas se incubaron por separado, durante 3 hrs en agitación a 37° C y se determinó S/So cada 30 min. Los resultados son promedio de 3 ensayos al menos. La vía alterna se inactivó mediante calentamiento a 50° C durante 20 min. La concentración de suero en la mezcla fue de 4 %.

GRÁFICA No. 4

EFFECTO BACTERICIDA DE LA VIA CLASICA SOBRE

E. coli C600 Y C600(λ)



Las cepas se incubaron por separado, durante 3 hrs en agitación a 37° C y se determinó S/S₀ cada 30 min. Los resultados son promedio de 3 ensayos al menos.

finalmente 1069 %. Las ordenadas de la gráfica No. 4 corresponden a los porcentajes de la fracción sobreviviente y el de las abscisas a los tiempos de muestreo en el ensayo descrito. Observamos que después de los tres primeros muestreos donde las gráficas de las dos cepas son similares, las curvas comienzan a tener un desarrollo diferente, para finalmente ubicarse en dos puntos muy cercanos (927 y 1069%). En la cinética de la acción de la vía alterna del complemento sobre las cepas C600 y C600(λ) se obtuvieron los resultados presentados en la tabla No. 5. Los datos se tomaron a intervalos de 60 minutos. En ella se muestra que la fracción sobreviviente de C600 después del primer intervalo fue de 3.25 % y 42.0 % para C600(λ), en el siguiente resultado podemos observar una diferencia en los porcentajes de la sobrevivencia de ambas cepas, correspondiendo 0.22 % para C600 y 2.25 % para C600(λ), transcurridos 180 minutos el porcentaje de sobrevivencia de C600 fue de 0.45 % y 1.85 % el de C600(λ). La gráfica No. 5 esquematiza los resultados anteriores. En ella observamos las diferencias en el comportamiento de las cepas. La línea correspondiente a C600 cae bruscamente hasta 3.25 % durante los primeros 60 minutos de incubación, a continuación el porcentaje de la fracción sobreviviente disminuye para ubicarse al término del experimento en 0.45 %, mientras que la línea que corresponde a C600(λ) se mantiene en 42 % después de los primeros 60 minutos, para ubicarse en 2.25 al cabo de 120 minutos de haberse iniciado en ensayo y finalmente después de 180 minutos se ubica alrededor del 2 %, punto que la línea de la cepa libre de fagos alcanzó en 60 minutos.

TABLA No. 5

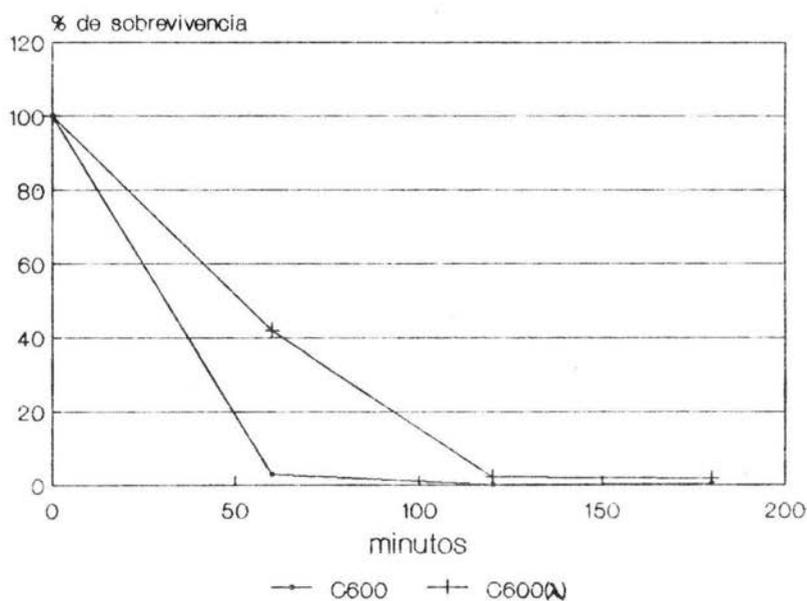
EFFECTO BACTERICIDA DE LA VIA ALTERNA
 SOBRE E. coli C600 Y C600(λ)

MIN.	% DE SOBREVIVENCIA	
	C600	C600(λ)
0	100	100
60	3.25 [±] 0.75	42 [±] 18
120	0.22 [±] 0.02	2.25 [±] 0.25
180	0.45 [±] 0.25	1.85 [±] 0.65

La via clásica se inactivó al quelar Ca^{+2} con EGTA 10mM; se adicionó $MgCl_2$ 2mM. Las cepas fueron incubadas por separado durante 3 hrs en baño con agitación a 37° y se determinó S/So cada 60 minutos. La concentración de suero fue de 4%.

GRÁFICA No. 5

EFFECTO BACTERICIDA DE LA VIA ALTERNA
SOBRE E. coli C600 Y C600(λ)



La via clásica se inactivó al quelar Ca^{+2} con EGTA 10mM; se adicionó $MgCl_2$ 2mM. Las cepas fueron incubadas por separado durante 3 hrs en baño con agitación a 37° y se determinó S/So cada 60 minutos.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En ensayos de resistencia a suero semejantes al implementado en este trabajo, se han usado una amplia gama de soluciones amortiguadoras. Se ha demostrado que algunas de estas soluciones tienen efectos significativos en la eficiencia de muerte por suero (3).

Los resultados de este trabajo indican que entre las soluciones probadas (PBSI, PBSII, MC y TRIS), el TRIS es la solución indicada para usarse en ensayos de resistencia a suero con *E.coli* puesto que además de no afectar la sobrevivencia de la bacteria tras un periodo de tres horas de incubación, es una solución que no contiene cationes, los cuales según Taylor, P.W. inhiben de manera no específica al complemento (13). Taylor y Hughes recomiendan incubar las mezclas de bacterias y suero durante al menos 3 horas, ya que antes de este tiempo los porcentajes de sobrevivencia no se han estabilizado (17). La forma más simple para determinar la actividad bactericida del suero, involucra la exposición de una suspensión de microorganismos viables a una concentración determinada de anticuerpos y complemento, incubándose la mezcla a una temperatura óptima para la actividad del complemento y determinar después de ciertos periodos de tiempo la concentración absoluta de organismos sobrevivientes (15).

Timmis N.K. y cols. mostraron que la cepa de *E.coli* C600 rif^r (rifampicina-resistente), derivada de *E. coli* C600 rif^s, tuvo un

porcentaje de sobrevivencia menor de 0.001 % cuando se le incubó en una mezcla de 6 % de suero usando PBS como solución amortiguadora (19), los resultados de nuestro trabajo indican que la cepa *E.coli* C600 incubada en una mezcla con concentración de suero idéntica a la usada por Timmis, pero sustituyendo al PBS por TRIS presenta un porcentaje de sobrevivencia de un 0.14 % (Gráfica 1). Esta diferencia puede ser atribuida al uso de soluciones amortiguadoras diferentes.

El presente trabajo muestra que el porcentaje de sobrevivencia de la cepa C600 de *E.coli* es de 1.78 % al 4 % de suero, mientras que en la cepa lisógena para el fago (λ) la sobrevivencia es del 42.5 %, a la misma concentración de suero (Gráfica 1). Estos resultados nos permiten inferir que la inclusión del genoma del fago (λ) en el cromosoma de *E.coli* C600 determinó la diferencia en la resistencia al suero humano entre ambas cepas.

Muschel L.H., en 1968, mostró que cuando *E.coli* era lisogenizada por el fago λ , presentaba una resistencia significativamente mayor que la cepa libre de fagos, al suero de cobayo (9). Estos resultados y los obtenidos en nuestro trabajo representan ejemplos de conversión lisogénica en la cual, según Echols, uno o más genes del profago cambian alguna o algunas de las propiedades fenotípicas de la bacteria hospedera (5).

Los porcentajes de sobrevivencia de las cepas C600, con y sin fago, obtenidos en la cinética del comportamiento (Tabla No. 2), parecen reconfirmar nuestra conclusión anterior.

Timmis N.K. y cols. mostraron que la presencia del plásmido

R6-5 Trat⁺ en la cepa de *E. coli* C600 rif^r, aumentó el porcentaje de sobrevivencia a un 6.7 % (19). El descubrimiento de ciertos plásmidos que confieren resistencia a algunos antibióticos, y que reducen la sensibilidad al suero en cepas de *E. coli* (11, 17, 20) han aumentado el interés en torno a este fenómeno, ya que se han encontrado cepas bacterianas resistentes al suero, en las cepas aisladas de infecciones tisulares. Esto sugiere que la resistencia al suero es un factor importante de virulencia en al menos algunas infecciones ocasionadas por gram-negativas (15), además que el indiscriminado manejo de antibióticos podría provocar que se seleccionaran propiedades indeseables en las bacterias.

Los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en los ensayos de resistencia y de la cinética del comportamiento al 4 % de suero, son diferentes entre sí (Gráfica 1 y 2), atribuimos esta diferencia a que las mezclas en el ensayo de cinética del comportamiento, tuvieron un periodo de "no agitación" cada 30 minutos mientras se tomaban las alícuotas. Taylor indica que el uso de baños con agitación puede introducir variaciones en la reproducibilidad del ensayo (18).

Se ha demostrado que en el proceso bacteriolítico del suero, se encuentra involucrado la inserción o deposición de una serie de proteínas que forman la cascada del complemento y que se unen a la membrana formando el complejo de adhesión a la membrana (MAC) (15). Existe una buena cantidad de reportes que muestran que un aumento de resistencia al suero esta relacionada con la presencia de estructuras en o cerca de la superficie bacteriana capaces de

interferir con la formación unión o activación subsecuente del MAC (15). Por lo que podemos suponer que la presencia del profago podría provoca alguna modificación en los receptores en la membrana externa de la bacteria. Se ha demostrado que las cepas lisógenas para el fago lambda presentan una nueva proteína de membrana (12), que podría ser la responsable del aumento en la resistencia al suero.

La activación del complemento por las gram-negativas puede ocurrir por dos vías, la clásica o la alterna; la forma que usualmente se requiere para la activación de ambas es el reconocimiento de los antígenos de superficie bacteriana por cierto tipo de anticuerpos, sin embargo, la vía alterna se puede activar o amplificar en ausencia de las interacciones antígeno-anticuerpo, por unas estructuras o características conformacionales de la superficie celular poco conocida (15). Ciurana B. y Tomás J.M. mostraron que tanto la vía clásica como la alterna se encuentran involucradas en la reacción bacteriolítica del complemento en *Klebsiella pneumoniae* (2). La intervención de estas vías en el proceso bacteriolítico en *E.coli* no ha sido precisado, aún cuando se supone que esta bacteria es susceptible a la acción de ambas vías (16). Con la finalidad de ver cual de las dos vías del complemento están involucradas en la muerte de las cepas de *E.coli*, se inactivaron selectivamente ambas vías (2, 6, 16). Los datos obtenidos en este trabajo muestran que solamente la vía alterna es la involucrada en la muerte de ambas bacterias. La sobrevivencia de las cepas cuando se ha quelado la vía clásica

difiere respecto a las obtenidas cuando se usó el suero normal. Es posible que esto se deba a que el EGTA bloquea la activación de la vía clásica a nivel de C1, quedando libres las proteínas que intervienen en el proceso, con la posibilidad de ser utilizadas para la activación de la vía alterna. Esto resultaría importante puesto que C3 es una molécula común para las vías. Lo que en este caso permitiría a la vía alterna matar más eficientemente a las cepas que en el ensayo de suero normal. Cuando se usa esta última buena cantidad de proteínas (C3) se van a usar para activar la vía clásica la cual como se muestra en la tabla y gráfica 4 no tiene efecto en la mortalidad de las cepas.

Está reportado que la bacteria *E. coli* lisógena para lambda presenta una proteína en la membrana externa que no existe en la cepa no lisógena, y que es codificada por un gene accesorio del profago, conocido como gene lom (12). Esta proteína podría explicar la diferencia a la sensibilidad al suero humano obtenida en este trabajo entre la cepa lisógena y no lisógena ya que podría evitar la fijación adecuada del MAC.

Existen fagos lambda que presentan deleciones en diferentes zonas de su genoma, una de ellas afecta la zona del gene lom (12). El fago con esta deleción sería un buen candidato para averiguar si la proteína lom es la responsable de la diferencia en sensibilidad al suero entre las cepas mencionadas.

Así, la presencia de elementos genéticos accesorios en las gram-negativas podrían jugar un papel significativo en el

aumento de la resistencia al suero, como lo sugiere una serie de trabajos publicados (9, 11, 17) y el presente.

BIBLIOGRAFIA

1. Arenas, A. D. (1985). "Aislamiento y caracterización de un bacteriófago transductor de *Pseudomonas aeruginosa*: construcción de un fago transductor con un marcador de resistencia a ampicilina y represor termosensible. Tesis de licenciatura en Biología. ENEP Iztacala UNAM.
2. Ciurana, B. and J. M. Tomás. (1987). Role Lipopolysaccharide and Complement in Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to Nonimmune serum. *Infect. Immun.* 55(11):2741-2746.
3. Clas, F. and M. Loos. (1980). Killing of the S and Re forms of *Salmonella minnesota* via the classical pathway complement activation in guinea-pig and human serum. *Immunology* 40:547-556.
4. Cruz, H. A. (1988). "Resistencia al efecto bactericida del suero humano normal en *Pseudomonas aeruginosa*, mediado por conversión lisogénica". Tesis de licenciatura en Biología, ENEP Iztacala UNAM.
5. Echols, H. (1979). Bacteriophage and Bacteria: Friend and foe. En *The Bacteria*. :487-560.

6. Fine, D. P., Marney Jr., S. R., Colley, D. G., Sargent, J. S. and R. M. Des Prez. (1972). C3 Shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J. Immunology*. 109(4):807-809.
7. Hershey, A. D. and W. Dove. (1983). Introduction to Lambda. En *Lambda II*. Editado por A. D. Hershey. Cold Spring Harbor Laboratory. New York p. 3-11.
8. Mathews, C. (1977). Reproduction of large virulent Bacteriophages. En *Comprehensive Virology*. 7(3):179-294.
9. Muschel, L. H, Lissa, A. Ahl. and L. S. Baron. (1968). Effect of lysogeny on Serum Sensitivity. *J. Bacteriol*. 96(6):1912-1914.
10. Pelczar, J. M, Reid, R. D. y E. C. S. Chan (1982). *Microbiología*. 2a, Edición. Mc. Graw Hill, México 825 p.
11. Reynard, A. M. and M. E. Beck.(1976). Plasmid-mediated resistance to the bactericidal effects of normal rabbit serum *Infect. Immun.* 14:848-850.
12. Reeve, J. N. and J. E. Shaw. (1979). Lambda Encodes an Outer Membrane Protein: The *lom* Gene. *Molec. Gen. Genet.* 172:243-248.
13. Stanier, R. Y, Adelberg, E. A. y J. L. Ingraham. (1984)

"Microbiologia". 4a. Edición. Ed. Reverté, Barcelona España
836 p.

14. Stent, S. G. and R. Calendar. (1978). Molecular Genetics. An. Introductory narrative. 2a. Edición. W.H. Freeman and Company, San Francisco USA 773 p.
15. Taylor, P. W. (1983). Bactericidal and Bacteriolytic Activity of Serum Against Gram-Negative Bacteria. Microbiol. Rev. 47(1):46-83.
16. Taylor, P. W. and H-P. Kroll. (1983). Killing of an Encapsulated Strain of *Escherichia coli* by Human Serum. Infect. Immun. 39(1):122-131.
17. Taylor, P. W. and C. Hughes. (1978). Plasmid carriage and The serum sensitivity of enterobacteria. Infect. Immun. 22:10-17.
18. Taylor, P. W. (1978). The effect of the growth environment on the serum sensitivity of some urinary *Escherichia coli* strains. FEMS. Microbiol. Lett. 3:119-112.
19. Timmis, K. N., Manning, P. A., Echarti, C., Timmis, J. K. and A. Moll. (1981). Serum resistance in *E. coli*. En Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids. Editado por S. B. Levy, R. C. Clowes and E. L. Koenig. Plenum Press. New York. p. 133-144.

20. Wardlaw, A. C. (1962). The complement-dependent bacteriolytic activity of normal human serum. I. The effect of pH and ionic strength and the role of lysozyme. *J. Exp. Med.* 115:1231-1248.