



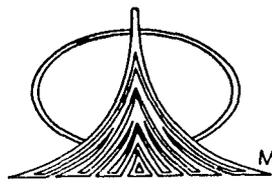
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

IMPLEMENTACION DE UN METODO INMUNOLOGICO POR HEMAGLUTINACION PASIVA PARA DETECTAR PRESENCIA DE AEROLISINA EN CULTIVO DE Aeromonas hydrophila.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: DOLORES ARANGO GUTIERREZ

DIRECTOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA ASESOR: Q.B.P. DORA ALICIA PEREZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.

2002.

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 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

Dios por la vida y la maravillosa familia que me dio, por la salud y la alegría que me ha concedido.

Mis padres por brindarme una carrera universitaria, por su amor, paciencia y ternura. Gracias papá donde quiera que estés.

La mejor amiga y confidente que tengo, que es mi mamá, gracias por ser mi refugio en los momentos de tristeza y alegría, por tu confianza y apoyo, por alentarme a seguir adelante y por ser la razón de mi vida.

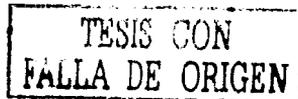
Mi hermana Sara por ser un ejemplo de constancia y superación, por tu gran corazón, por soportar mi carácter y por animarme siempre. Gracias por ser mi amiga.

Mi hermanos Alfonso y Norberto por su apoyo y paciencia.

Gracias nariz de lobito, lengüitas y Charly por su cariño, y alegría aún en los momentos difíciles.

Mis tíos Oliverio, Ángel, Alfredo, Lucha y abuelito Gregorio por su cariño y consejos.

Dolores Arango Gutiérrez



DEDICADO A

Mis amigos: Ángel Sánchez, y Enrique Escalera, Alma Lilia Mendoza, Naty Ávila, Olivia Patiño, Lidia Cruz, Lourdes Rangel y Fabiola Martínez por su apoyo, amistad y alegría compartidas. Fabi gracias por tu apoyo en la realización de este trabajo.

Carolina Jiménez por tu amistad y apoyo incondicional.

Mary Landy, por los momentos de alegría que compartimos. Por tu apoyo, franqueza y consejos, y por la sincera amistad que me brindaste.

Mis compañeras del laboratorio L-313: Eunice, Lupita, Raquel, Rosangela, Juan Pablo, Gisela, Adriana, Magda y a los señores Catalina y Toñito, por sus consejos, apoyo y compañía.

Al personal de la biblioteca de la FES Z-CII, a los señores Páramo y Chimal, Silvia Gómez, Isabel, Lina, Socorro, Anita, Noemi, Manuelita y Gisela, a Paty la secretaria, a la señora Silvia Soto. Al personal de vigilancia al señor José, Pili, Toñita y Ma. Luisa por su apoyo durante mi formación académica y cariño.

Los profesores del laboratorio de Inmunología L-313 por su apoyo, amistad y cariño, al profesor M.C. Maurilio Flores Pimentel, quién colaboro en el manejo de los animales de laboratorio empleados para la realización de esta tesis. De manera especial a los profesores Guillermina Corona, Cornelio Hernández, Ma. de los Angeles Torres, Guadalupe Miranda, Pilar Cedillo, Patricia Vivar, Margarita Chavez, Galia Martínez, Francisca Robles, Antonino¹, Gustavo Miranda, Martha Legorreta, Enrique Laguna y Ma. de los Angeles Galván. Gracias por sus consejos, amistad y cariño.

Mis sinodales Q.F.I. Leonor Aguilar Santelises, Dr. Rubén Marroquín Segura, Q.B.P. Dora Alicia Pérez González, Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán y Q.F.B. Francisco Javier Parada García por su tiempo y las sugerencias otorgados.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de aprender y disfrutar de sus servicios e instalaciones, durante mi formación académica.

A los profesores de las carreras de Q.F.B. y Biología por sus enseñanzas.

A la profesora de Recreación Elvira Ruíz por su apoyo, confianza y amistad.

Al INNSZ, por la oportunidad de haber convivido y trabajado ahí.

Al grupo Ministerio de duelo por su amistad y cariño.

Al INAMP por la alegría de convivir con ellos.

A todos mis compañeros y a quienes de una u otra manera estuvieron siempre con mígo.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Inmunología L-313 de la FES Zaragoza campus II, de la UNAM; bajo la dirección del Dr. Rubén Marroquín Segura a quién le agradezco su apoyo, paciencia y cariño.

TABLA DE CONTENIDO

1. ABREVIATURAS	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1. GÉNERO <i>Aeromonas</i>	3
3.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	4
3.3. AEROLISINA	5
3.4. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN POR GEL	7
3.5. DIÁLISIS	8
3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	9
3.7. AGLUTINACIÓN	10
3.7.1. AGLUTINACIÓN DIRECTA O ACTIVA	10
3.7.2. AGLUTINACIÓN INDIRECTA O PASIVA	11
3.7.3. INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN	12
3.8. INMUNIZACIÓN Y ADYUVANTES	13
3.9. ASA LIGADA DE CONEJO	14
3.10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	15
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4.1. OBJETIVOS	17
4.2. HIPÓTESIS	17

5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	18
TIPO DE ESTUDIO	18
POBLACIÓN	18
MATERIAL BIOLÓGICO	18
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	18
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	18
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	18
VARIABLES INDEPENDIENTES.....	18
VARIABLES DEPENDIENTES	18
6. MATERIAL	19
7. MÉTODOS	22
7.1. CULTIVO DE <i>Aeromonas Hydrophila</i> EN CALDO BHI PARA OBTENCIÓN DE LA AEROLISINA	23
7.2. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA AEROLISINA POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN POR GEL	23
7.3. DIÁLISIS PARA ELIMINAR EL SULFATO DE AMONIO	24
7.4. DETERMINACIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN DE LA AEROLISINA	24
7.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL SUERO ANTI AEROLISINA	24
7.6. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN	25
7.7. CUANTIFICACIÓN DE ENTEROTOXINA POR MÉTODO DE ASA LIGADA DE CONEJO	25
8. RESULTADOS	26
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
10. CONCLUSIONES	36
11. PROPUESTAS	37
12. ANEXOS	38

I. CARACTERÍSTICAS DE LA AEROLISINA	38
II. TÉCNICAS EMPLEADAS	40
III. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS	45
IV. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	47
13. GLOSARIO	49
14. REFERENCIAS	51

1. ABREVIATURAS

Ae6-R: pili recto de *Aeromonas hydrophila*

Ae6-W: pili ondulado de *Aeromonas hydrophila*

BDB: bisdizobencidina

BHI: infusión cerebro corazón

° C: grado centígrado

CFG: cromatografía de filtración por gel

cm: centímetros

GCH: hormona gonadotropina coriónica

hs: horas

HAI: inhibición de la hemaglutinación

KDa: Kilo Daltons

LU: unidad loop

MeOH: metanol

µg: microgramo

µL: microlitro

µm: micrómetro

mg: miligramo

mL: mililitro

nm: nanómetro

NZW: Nueva Zelanda blanco

O/129: agente vibriostático 2,4 diamino -6,7-di-isopropil pteridina

PBS: solución buffer de sales de fosfatos

PSA: persulfato de amonio

rpm: revoluciones por minuto

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

TEMED: N,N,N',N',-tetrametiletilendiamino

UH: unidad hemolítica

V_e: volumen de elusión

V₀: volumen vacío

2. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Aeromonas* son bacilos Gram negativos de vida libre que se encuentran en agua dulce y en ocasiones en reptiles, anfibios, peces y el suelo o los alimentos. Su presencia se relaciona con diarrea y a veces causan infecciones en heridas expuestas a agua dulce o en personas inmunodeficientes y rara vez, otro tipo de infecciones no intestinales.⁵

Aeromonas hydrophila es la especie más importante que causa enfermedad en el hombre. De las otras tres especies (*A. salmonicida*, *A. sobria* y *A. caviae*), *Aeromonas sobria* en ocasiones causa enfermedad. *A. hydrophila* mide de 1 a 4 μm de longitud y son móviles. La morfología de sus colonias es semejante a la de los bacilos intestinales Gram negativos y producen zonas grandes de hemólisis en agar sangre. Cultivando muestras de heces, prolifera con facilidad en los medios diferenciales usados para cultivar bacilos intestinales Gram negativos y puede confundirse con éstos. Las especies de *Aeromonas* se distinguen de las bacterias intestinales Gram negativas, por la reacción positiva a la oxidasa en las colonias obtenidas en placas de agar base sangre. Las especies de *Aeromonas* se diferencian de los vibriones por la resistencia que muestran al compuesto O/129 y porque no proliferan en caldo de NaCl al 6%. Las cepas de *Aeromonas* son susceptibles a tetraciclinas, amino glucósidos y cefalosporinas.²⁶

El presente ensayo se propone como prueba tamiz para determinar la actividad de hemolisina, de *Aeromonas hydrophila* en medios de cultivo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. GÉNERO *Aeromonas*

El género *Aeromonas* está ubicado taxonómicamente en la familia Vibrionaceae, se reconocen tres especies móviles que infectan al hombre: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*. Actualmente se propone que las *Aeromonas* deben pertenecer a una familia independiente, la familia *Aeromonadaceae*, que cuenta con diversas especies y características genéticas y fenotípicas propias.^{21.D}

El género *Aeromonas* ha sido reportado en la literatura científica internacional como agente causal de infecciones intestinales y extraintestinales, tanto en humanos como en una gran variedad de vertebrados e invertebrados; siendo las especies *A. hydrophila* y *A. sobria* las que se reportan con mayor frecuencia en muestras extraintestinales en las infecciones por *Aeromonas*, ya que *A. caviae* con frecuencia es reportada como enteropatógena asociada con gastroenteritis.

La gastroenteritis es la presentación más común de infección en niños y en adultos, la cual es usualmente autolimitada. Estudios de laboratorio han demostrado la patogenicidad de estas especies de *Aeromonas*, principalmente *A. hydrophila* y *A. sobria*, productoras de toxinas extracelulares y enzimas durante su crecimiento, factores virulentos potenciales.^A

Las *Aeromonas* son bacilos cortos, los cuales miden 0.3-1.0 µm de diámetro y 1.0-3.5 µm de longitud, son Gram negativos; presentan un flagelo polar, los cultivos jóvenes pueden formar flagelos peritricos en medios sólido; son anaerobios facultativos, quimiorganotróficos, su metabolismo es de tipo respiratorio y fermentativo, la temperatura óptima de crecimiento es de 22° C a 28° C, catabolizan carbohidratos como la D-glucosa con producción de ácido y gas; son oxidasa y catalasa positivas, arginina hidrolasa positivos y ornitina descarboxilasa negativos, ureasa y fenilalanina desaminasa negativas, gelatinasa y DNAsa son positivas. Reducen nitratos, fermentan carbohidratos como maltosa, D-galactosa y trehalosa. Son resistentes al agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina (O/129).

Las enfermedades causadas por *Aeromonas sp.* en el hombre, pueden dividirse en dos grupos: a) infecciones localizadas (gastroenteritis) y b) infecciones invasivas (bacteremia, otitis, meningitis, pericarditis, endocarditis, septicemia e infecciones urinarias y de heridas). Las diarreas provocadas por *Aeromonas sp.* son debidas frecuentemente a cepas toxigénicas las cuales pueden ser investigadas por diferentes pruebas *in vitro* (células adrenales Y-1 y células Vero) o *in vivo* (inoculación intragástrica en ratones lactantes y de ileon ligada de conejo o rata). El mecanismo por

el cual los enteropatógenos causan enfermedades diarreicas es por una adhesión al epitelio intestinal, colonización y secreción de toxinas.^A

Aeromonas ha sido reconocido como un enteropatógeno en humanos ya que desde 1970 hay un mayor interés de las investigaciones en años recientes hacia este género por lo que hay una frecuencia de enfermos con una variedad de síntomas. El índice de aislamiento de este enteropatógeno es relativamente nuevo, varía de reporte a reporte, tal como un 33% en Bangladesh, 1-2% en Filipinas, aproximadamente un 10% en E.U.A. y Japón, 30-50% en Perú.²²

3.2. *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila ha sido relacionada con un gran número de condiciones clínicas en hombres y otras especies de vertebrados. En contraste a la mayoría de las bacterias Gram negativas, *A. hydrophila* libera muchas proteínas, algunas de las cuales han sido implicadas como factores de virulencia, éstas incluyen las hemolisinas, proteasas, fosfolipasas, aciltransferasas, leucocidinas, y enterotoxinas. *A. hydrophila* produce dos hemolisinas, designadas como al α y β - hemolisinas (formalmente aerolisina o proteína citotóxica) y una enterotoxina. Estas toxinas son separadas y purificadas por isoelectroenfoque y cromatografía de tamices moleculares.^{11,30}

La naturaleza de sus efectos líticos sobre eritrocitos y efectos tóxicos sobre el cultivo de células de tejido difiere significativamente. La α -hemolisina es inactivada por agentes reductores y activada por oxígeno, entretanto la β - hemolisina no se inactiva por agentes reductores y es más resistente que la α -hemolisina a enzimas proteolíticas pero es inactivado por gangliósidos crudos.³⁰

Cuando separamos las dos hemolisinas, la enterotoxina da reacción positiva en la prueba de asa intestinal de conejo, la piel de conejo y la prueba de células adrenales Y1; la sensibilidad de las células Y1 es baja comparada con la toxina del cólera y la toxina LT de *E. coli*. No se obtienen efectos citotóxicos en células Hela.

A. hydrophila (Ae6) tiene dos clases morfológicamente diferentes de pilis. Uno de apariencia rígida acanalado y recto con un diámetro de 9 nm (pili Ae6-R) y el otro, flexible, ondulado y tiene una estructura helicoidal, con un diámetro de 7 nm (pili Ae6-W).

El pili Ae6- R consiste de una subunidad proteica con peso molecular de 18 kDa estimado por SDS -PAGE y contiene 42-3% de aminoácidos hidrofóbicos y un residuo de cisteína. Los pilis son solubilizados a subunidades proteicas de 18 kDa por 2-mercaptoetanol, ditrioteitol, ácido clorhídrico, o calentamiento a 120° C por 5 minutos.

A. hydrophila Ae6 se adhiere fuertemente a intestino de conejo, así como el intestino del humano y aglutina eritrocitos.²²

El anticuerpo anti-pili (fracción Fab) no bloquea la adhesión. El pili Ae6 purificado no se adhiere al intestino a los eritrocitos. Sin embargo, el anti-pili Fab inhibe la formación de película de los organismos cultivados en medio líquido y también inhibe la aglutinación con sales de sulfato de amonio. El pili Ae6-R probablemente juega un papel de autoagregación de los organismos.²²

3.3. AEROLISINA

Bernheimer y Avigad (1974) aislaron una proteína hemolítica, combinando fraccionamiento en sal y tamices a la cual llamaron aerolisina. Es una toxina proteica extracelular producida por la bacteria Gram-negativa *Aeromonas hydrophila*. La toxina es sintetizada como un precursor de alto peso molecular y se encuentra en el sobrenadante del cultivo de *A. hydrophila*.^{11,23}

La aerolisina es una de un gran grupo de proteínas bacterianas que pueden atacar células blanco por formación de un canal en su membrana plasmática. La toxina tiene muchas propiedades en común con las porinas de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, incluyendo una gran cantidad de estructura β , y una alta proporción de cadenas laterales de aminoácidos hidrofílicos y no hidrofóbicos unidos en estructura primaria. Esta también es oligomerizada para producir un estado de inserción-competente.³⁶

Es secretada como un dímero por miembros del género *Aeromonas* y tiene alta afinidad para adherirse a células blanco que recientemente se ha demostrado que es una glicosil-fosfatidil inositol anclada a una glicoproteína. De la adhesión se sigue una heptamerización para formar una estructura que proponen contiene un tubo con conformación β la cual puede insertarse en la membrana y producir un canal. La aerolisina es una hemolisina que es sensible al calor, liberada durante la fase estacionaria de crecimiento.³⁶

La hemolisina cruda es inactivada por calentamiento a 56° C durante 10 minutos y es insensible a la tripsina. Fue separada en dos componentes de baja actividad específica (puntos isoeléctricos de 5.5 y 4.3) por isoelectro enfoque.¹¹

El producto purificado contiene actividad de fosfolipasa A y fosfolipasa C (las proteasas no fueron medidas) y por esta razón los autores no involucran la actividad de fosfolipasa en el mecanismo hemolítico. Esta aerolisina fue analizada de su contenido de aminoácidos y tiene 8 residuos de histidina / mol. Tiene un peso molecular de

49,000 Daltons. Los eritrocitos de diferentes especies de animales difieren grandemente en la sensibilidad a la acción lítica de aerolisina, las membranas de los eritrocitos se adhieren a la toxina, y la eficiencia de pegado está en función de la sensibilidad a la lisis. La adhesión es independiente de la temperatura, no es dependiente de la presencia del ácido siálico en la membrana y ésta disminuye con el tratamiento previo con fosfolipasa C y proteasas.^{9,11}

La enterotoxina citotóxica causa acumulación de líquido en intestino de ratones jóvenes y en el asa ileal de conejo y produce efectos citotóxicos a células Vero.⁹

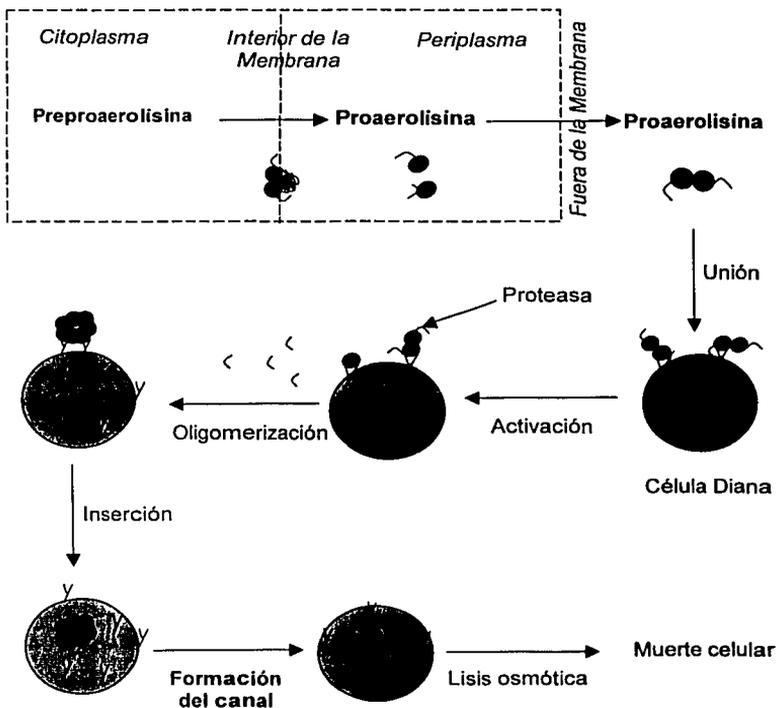


Figura 1. Mecanismo de acción de la aerolisina.

3.4. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN POR GEL

Conocida también como cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de tamiz molecular. Las moléculas se separan de acuerdo con sus tamaños y formas. La fase estacionaria está constituida por gránulos de un material esponjoso hidratado que contiene poros que comprenden un intervalo de tamaño reducido, de dimensiones moleculares.⁵⁰

Si por una columna que contenga estos "tamices moleculares" se hace pasar una disolución acuosa que contenga molécula de varios tamaños, las moléculas que son demasiado grandes para atravesar los poros quedarán excluidas del volumen de disolvente contenido en el interior de los gránulos del gel. Estas moléculas más grandes atravesarán, por lo tanto, la columna más rápidamente, es decir, en un volumen de eluyente menor que las moléculas que circulan a través de los poros.⁵⁰

La masa molecular de la molécula más pequeña que penetra en los poros de un gel determinado es el "límite de exclusión" del gel. Esta cantidad está en función de la forma molecular ya que las moléculas alargadas, como consecuencia de su radio de hidratación mayor, es menos probable que penetren homogéneamente en un poro de gel, como lo harían las moléculas esféricas del mismo volumen molecular.⁴⁷

El volumen de elución de un soluto determinado V_e , es el volumen de disolvente que se necesita para eluir, el soluto desde la columna después que ha establecido su primer contacto con gel. El volumen vacío de una columna se mide fácilmente como volumen de elución de un soluto cuya masa molecular es mayor que el límite de exclusión del gel. El comportamiento de un soluto "x" sobre un gel específico se caracteriza por la relación V_e/V_0 , que es el volumen de elución relativo (es una cantidad independiente de la columna particular que se emplea). Las moléculas con masas moleculares comprendidas por debajo del límite de exclusión de un gel se eluirán desde el gel en el orden, de sus masas moleculares siendo las de mayor masa las que eluyen en primer lugar. Los tamaños del poro en cualquier gel varían en un intervalo limitado de manera que las moléculas mayores disponen de un menor volumen en el interior del gel que las moléculas menores. Este efecto es la base de la cromatografía de filtración en gel. La CFG se emplea para determinar masas moleculares ya que puede aplicarse a muestras muy impuras (suponiendo que la molécula que interesa pueda identificarse) y, a que puede efectuarse con rapidez empleando un equipo sencillo.^{47,50}

La filtración por gel se emplea con frecuencia para "desalar" una disolución de proteína (por ejemplo, una proteína precipitada por sulfato de amonio puede liberarse con facilidad un volumen mínimo de tampón adecuado) y aplicando esta disolución a una columna de gel con un límite de exclusión inferior al de la masa molecular de la proteína. Por elución de la columna con el tampón la proteína saldrá antes de que el sulfato de amonio a través de la columna.⁴⁷

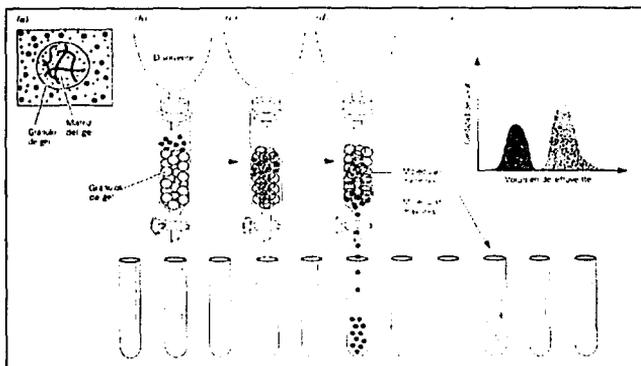


Figura 2. Cromatografía de filtración por gel. (a) gránulo del gel, (b)-(d) elución de la muestra y (e) diagrama de la elución, indicando la separación de los componentes.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3.5. DIÁLISIS

La diálisis es un proceso que separa moléculas de acuerdo con su tamaño mediante el empleo de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones inferiores a las macromoleculares. Estos poros permiten que moléculas pequeñas tales como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, se difundan a través de la membrana pero bloqueen el tránsito de moléculas mayores. La cefalona (acetato de celulosa) es el material de diálisis que se emplea más corrientemente, aunque se emplean de modo semejante nitrocelulosa y colodión.⁵⁰

La diálisis (a la que no se considera una forma de cromatografía), se emplea rutinariamente para cambiar el disolvente en el que se encuentran disueltas las macromoléculas. Una disolución macromolecular se introduce en un **saco de diálisis** (que se confecciona habitualmente anudando tubo de membrana para diálisis por ambos extremos), que se sumerge en un volumen, relativamente grande, de disolvente nuevo. Después de agitar la disolución interior durante varias horas, se alcanzará el equilibrio entre ambas disoluciones pero las moléculas permanecerán en el interior del saco de diálisis. El proceso puede repetirse varias veces a fin de sustituir completamente un sistema disolvente por otro. La diálisis puede emplearse para concentrar una disolución macromolecular, empaquetando un saco de diálisis lleno en

un desecante polimérico tal como el polietilenglicol $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$, que no puede penetrar a través de la membrana. La concentración se consigue porque el agua se difunde a través de la membrana y es absorbida por el polímero.⁵⁰

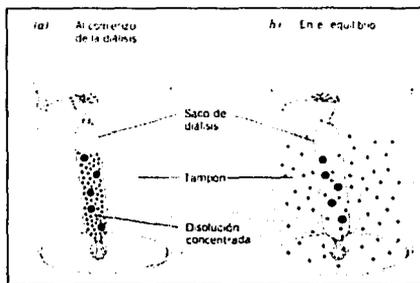


Figura 3. Separación de moléculas pequeñas y grandes por diálisis.

3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

En 1912, Folin & Denis comprobaron que un reactivo de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico daba color azul con diversas sustancias poseedoras de un radical fenólico.

El tratamiento previo de las proteínas con una solución de cobre alcalina aumentaba la sensibilidad de la reacción del fenol de tres a quince veces. El color producido de esta forma resulta de la reducción del ácido fosfotúngstico y del fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno efectuada por el complejo proteína-cobre y por el triptófano y la tirosina de las moléculas proteicas. Estas dos últimas sustancias dan también color en ausencia de Cu^{++} , en tanto el resto de la proteína no da color sino existen esos iones en el medio; aproximadamente el 75 % del color que se forma depende de la presencia de Cu^{++} .¹⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.7. AGLUTINACIÓN

La aglutinación es el agrupamiento y sedimentación del antígeno particulado luego de su reacción primaria con el anticuerpo. Fue observada por primera vez como una reacción bacteriana tras la incubación con suero de pacientes infectados. La aglutinación de los eritrocitos por incubación con suero, condujo al descubrimiento de los grupos sanguíneos ABC. La aglutinación ha sido usada ampliamente como prueba de laboratorio por su fácil realización y versatilidad; sin embargo es sólo un procedimiento semicuantitativo.²⁷

Los anticuerpos aglutinantes (aglutininas) pueden estar dirigidos contra antígenos naturales de la superficie celular (aglutinación activa o directa) o contra sustancias que han sido aplicadas a la superficie de células o partículas inertes (aglutinación pasiva o indirecta)²⁷.

Las reacciones de aglutinación dependen de la formación de puentes entre los anticuerpos bivalentes (IgG) o multivalentes (IgM) y las partículas de antígeno con múltiples determinantes antigénicos. Las grandes partículas como eritrocitos y bacterias, contienen muchos antígenos diferentes, como también antígenos que aparecen cientos de veces en la superficie de la célula o partícula. Es posible que las moléculas de anticuerpo se fijen a más de un sitio de una partícula o bien a sitios equivalentes de diferentes partículas, a esto se le denomina "unión cruzada". Los antígenos con un sólo determinante antigénico no permitirían la unión cruzada y por lo tanto no se aglutinarían. El anticuerpo puede fijarse a determinantes antigénicos de la misma partícula o de partículas diferentes, creando una red de elevado peso molecular que se aglutina o cae de la suspensión. Debido a su tamaño y multivalencia, se dice que la IgM es 750 veces más eficiente en la aglutinación que la IgG. La efectividad de la IgM en la aglutinación es la razón por la cual las moléculas de IgM se denominan "anticuerpos completos". Las moléculas de IgG, debido a que algunas veces no son efectivas en las uniones cruzadas, se designan como "anticuerpos incompletos". Entre los factores que influyen sobre la reacción de aglutinación se encuentran: la carga de las partículas, concentración de electrolitos y viscosidad, tipo de anticuerpo, determinantes antigénicos, temperatura y tiempo de incubación.

3.7.1 AGLUTINACIÓN DIRECTA O ACTIVA

Puede ser cualitativa o cuantitativa. La reacción cualitativa se efectúa en portaobjetos o en tubo, enfrentando un antisuero conocido a una suspensión de antígeno desconocido. Se usa para la identificación de bacterias y la determinación de grupos sanguíneos, la lectura de los resultados se hace a los 3-5 minutos. La reacción cuantitativa permite una estimación aproximada de los anticuerpos presentes en el suero, mediante la

determinación del título de seroaglutinación. Se realiza en una batería de tubos, en los que se colocan diluciones crecientes del suero problema y una cantidad constante de la suspensión antigénica. La máxima dilución del suero que muestra todavía aglutinación expresa el título del suero. Se usa para el diagnóstico serológico de las infecciones por *Salmonella* –reacción de Widal- (fiebres tiroideas y paratiroideas), en cuyo caso se pueden diferenciar los anticuerpos anti-O y anti-H de diferente significación diagnóstica, y por *Brucella* –reacción de Huddleson. En la aglutinación cuantitativa se presenta con frecuencia el fenómeno de prozona, que consiste en que no aparece aglutinación en los tubos que contienen las concentraciones mayores de suero y sí en los siguientes. Se debe a inhibición de la reacción en exceso de anticuerpo, favorecida por la presencia de anticuerpos no aglutinantes.²⁷

3.7.2 AGLUTINACIÓN INDIRECTA, PASIVA O CONDICIONADA

La reacción de aglutinación pasiva puede servir para el estudio de antígenos solubles y de sus correspondientes anticuerpos; esta reacción se basa en que los antígenos solubles pueden fijarse por diversos procedimientos sobre partículas inertes, tales como hematíes (de humanos, ovinos y de pavo), colesterol, bentonita (arcilla), látex (polímero de poliestireno, 0.81 μm de diámetro), polisacáridos y algunos antígenos proteicos (albúmina), y el derivado proteico purificado (DPP); estos transportadores sirven de aglutinógeno, indicando la interacción específica de antígeno y anticuerpo; son fácilmente adsorbidos a la superficie de la partícula. Estas partículas carecen de carácter antigénico; ó si lo poseen (hematíes), éste no desempeña ningún papel en la reacción. Con respecto a la aglutinación directa, la aglutinación pasiva es una técnica más delicada, es cuatro veces más sensible que la aglutinación directa y mucho más que la precipitación, esto es resultado del tamaño de las partículas antigénicas que intervienen en la reacción.^{27,32}

Otros antígenos requieren pretratamiento de partículas para su adsorción. Métodos especiales para unir químicamente antígenos con células ;

- ⇒ Por exposición suave de los eritrocitos a la acción de tripsina, ácido tánico u otros agentes similares, aumenta la proporción de uniones célula-antígeno.
- ⇒ Las proteínas que no se adsorben a los eritrocitos, o que son desadsorbidas durante el intento de llevar a cabo la aglutinación directa simple, deben unirse químicamente a las membranas de los eritrocitos por unión covalente del antígeno a la superficie celular mediante moléculas bifuncionales como la bisdizobencidina (BDB) o el glutaraldehído. Estas moléculas se fijan a la superficie celular y luego fijan el antígeno.

⇒ Empleando iones metálicos tales como cloruro de cromo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil), carbodiimida, 1,3-difluor-4,6-dinitrobenzoceno para combinar antígeno con eritrocitos.

Cuando se utilizan hematies como soporte, la reacción se denomina hemaglutinación pasiva. Los hematies frescos marcados se conservan poco tiempo, pero este puede prolongarse mediante la formalización de los eritrocitos.

Las reacciones de Coombs (prueba de antiglobulina) son en esencia aglutinaciones pasivas en las que el antígeno fue fijado por un método inmunológico. Las reacciones de aglutinación pasiva se usan extensamente en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, por ejemplo, mediante microaglutinación en portaobjetos con partículas de colesterol sensibilizadas con cardiopina se realiza el diagnóstico de la sífilis (técnica de VDRL y Kline), para el diagnóstico de poliartritis crónica (determinación del factor reumatoide o anticuerpo antiglobulina, utilizando partículas de látex sensibilizadas con IgG humana) o el lupus eritematoso diseminado (determinación de anticuerpos anticuerpos antinucleares con látex sensibilizado con ADN-proteínas).²⁷

3.7.3 INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN

La inhibición de la hemaglutinación pasiva por el antígeno soluble permite cuantificar los antígenos. Se emplea principalmente para la dosificación de hormonas plasmáticas o urinarias, por ejemplo, la de la GCH urinaria en el diagnóstico de embarazo; se incubaba un antisuero estándar con la orina que se quiere dosificar, luego el antisuero se incubaba con eritrocitos o con partículas recubiertas de la orina de que se trate. No hay aglutinación cuando la prueba es positiva, es decir cuando la orina contiene la hormona. En efecto, entonces la hormona presente en la orina neutralizó los anticuerpos aglutinantes y de esta manera suprimió la aglutinación, que suele observarse cuando no se encuentra la hormona.³²

3.8. INMUNIZACIÓN Y ADYUVANTES

La inmunización es la inducción de una respuesta inmune en un individuo competente, como resultado del contacto con un determinado antígeno, en forma natural o artificial. La respuesta inmune puede ser humoral (mediada por anticuerpos), celular (en la cual participan linfocitos timo dependientes), o una combinación de ambas.³²

La formación de anticuerpos depende tanto de la respuesta del receptor, como de la antigenicidad del material inoculado. Existen varios factores que aumentan la antigenicidad como son:

- a) La polaridad de los grupos determinantes.
- b) La rigidez de estos grupos.
- c) Alto peso molecular del material inoculado.
- d) Capacidad del material inoculado para estimular la fagocitosis y la multiplicación de las células linfoides.
- e) La acción de los adyuvantes.

El adyuvante más usado en la actualidad es el llamado adyuvante de Freud, que consiste en una emulsión de agua en aceite, y puede ser completo e incompleto. El adyuvante completo de Freud es una mezcla del antígeno en solución salina y aceite mineral (Drakeoil, Bayol, Nujol), con un detergente neutro como emulsificante (Falba, Aquafor, Arlancel), y una micobacteria (*Mycobacterium tuberculosis* u otra) muerta por calor. El adyuvante incompleto carece de la micobacteria.

La utilización de adyuvantes afecta en cierta medida el tipo de anticuerpos que se obtienen en la respuesta inmune; cuando se inocula ovoalbúmina en ausencia de adyuvante, se obtienen anticuerpos en la fracción gamma 1 de las globulinas; pero si se adicionan micobacterias, se obtienen principalmente anticuerpos de tipo gamma 2, que en electroforesis presentan una velocidad de migración anódica menor que las globulinas gamma 1.^{18,45}

El animal más usado en estudios inmunológicos es el conejo, debido a varias ventajas:

- a) Disponibilidad de estos animales durante todas las épocas del año, fácil manejo y mantenimiento en jaulas.
- b) Producción de niveles adecuados de anticuerpos.
- c) Posibilidad de administrar dosis múltiples de antígeno por vía intravenosa, y de sangrar varias veces al animal utilizando la vena marginal de la oreja.

En estudios inmunológicos el antígeno se administra siempre por vía parenteral, ya sea intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, pero no se utiliza la vía oral nunca, pues la mayoría de los antígenos son hidrolizados por las enzimas del tracto gastrointestinal, y pierden su antigenicidad. La velocidad de absorción del antígeno depende de la vía de inoculación; si se utiliza la vía intravenosa, intracardiaca

o intraperitoneal, el antígeno se absorbe más rápidamente que si se inocula por las vías subcutánea, intradérmica o intramuscular.⁴⁵

3.9. ASA LIGADA DE CONEJO

Las enterotoxinas causan una alteración de la actividad metabólica de las células del epitelio intestinal que provoca una liberación de electrolitos y líquido en el lumen. Actúan principalmente en el yeyuno y primera porción del íleon donde se produce la mayor parte del transporte de líquido. Las heces de los pacientes con un proceso diarreico causado por una enterotoxina que compromete al intestino delgado son profusas y acuosas y los neutrófilos polimorfonucleares y la sangre son características prominentes.⁷

Es una prueba clásica para detección de enterotoxina, para esta prueba se anestesia un conejo y se extrae a través de una incisión de la pared abdominal una sección larga del íleon. Con hilo para suturar se ligan diversos segmentos del íleon de unos 10 cm de longitud, de modo que parezca una ristra de chorizos. Mediante una jeringa y aguja se inyectan en el lumen de distintas secciones volúmenes iguales de filtrado de cultivo en estudio, un filtrado positivo conocido y un control negativo con solo el medio de cultivo. El íleon es reintroducido en el abdomen del conejo y se cierra la incisión.⁷

Luego de un período de varias horas se sacrifica el conejo y se examinan las asas intestinales. Aquellas que han recibido enterotoxina se encuentran distendidas con líquido que ha sido secretado al interior del asa, mientras que las que no han recibido toxina, se mantienen, como los controles, sin presentar ninguna distensión. En un mismo conejo pueden probarse varios materiales diferentes.⁷

3.10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

El término electroforesis se refiere al transporte de partículas a través de un solvente por un campo eléctrico. Es un método de alto poder resolutivo que combina la migración de un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida.^{25,32}

Los gels de poliacrilamida resultan de la polimerización en largas cadenas de la acrilamida monomérica ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y de su entrecruzamiento por medio de la N,N-metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), llamada

comúnmente bisacrilamida. El poro del gel formado dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos durante la polimerización.³²

La polimerización de la acrilamida necesita de un iniciador del proceso. Los más comúnmente usados son el persulfato de amonio y la riboflavina. Se añade además como acelerador, N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED). En el sistema persulfato de amonio-TEMED, este último cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato, lo que inicia la polimerización, en este mecanismo interviene la base libre TEMED, por lo que la acidificación retarda la polimerización.

La electroforesis en gel de poli(acrilamida) puede desarrollarse usando sistemas buffer continuos o discontinuos; en los primeros donde los iones que constituyen el buffer durante todo el recorrido de la muestra (gel, reservorios) son los mismos y el pH es constante, cuando se usan estos sistemas, las muestras a analizar se siembran directamente en el gel de resolución. En los sistemas discontinuos, el buffer de los geles y el de los reservorios de los electrodos son diferentes. Normalmente el pH de ambas soluciones buffer son también distintos. Las muestras a analizar se siembran en un gel de poro grueso (gel de paso rápido, apilamiento o stacking) en buffer Tris-HCl, pH 6.8, al que se ha hecho polimerizar sobre el gel de corrida (pH 8.8). El buffer del recipiente que contiene el cátodo es Tris-glicina pH 8.3. Esto permite que volúmenes apreciables de muestras diluidas de proteínas puedan ser analizadas, ya que al ser sembrados en un gel de este tipo en el que los iones y el pH de los buffer son diferentes, las moléculas se desplazarán a través del gel y se concentrarán en una zona estrecha, en el límite correspondiente al gel de corrida, previo a su separación en éste. La separación está influida por el pH del gel (sólo en caso de electroforesis de proteínas nativas) y por la concentración del gel.^{25,32}

Es importante destacar que la relación entre el log₁₀ del peso molecular y la movilidad relativa de las proteínas es lineal en un rango limitado de peso molecular. Como regla general para la SDS-PAGE la relación se mantiene en los siguientes rangos: 15% acrilamida para 12-45 kDa; 10% acrilamida 15-70; 5% acrilamida, 60-200kD.³²

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado al género *Aeromonas* como agente causal de infecciones intestinales y extraintestinales, tanto en humanos como en una gran variedad de vertebrados e invertebrados; siendo las especies *A. hydrophila* y *A. sobria* las que se reportan con mayor frecuencia. La gastroenteritis es la presentación más común de infección en niños y en adultos, la cual es usualmente autolimitada. Estudios de laboratorio han demostrado la patogenicidad de estas especies de *Aeromonas*, principalmente *A. hydrophila* y *A. sobria*, productoras de toxinas extracelulares y enzimas durante su crecimiento, y de factores virulentos potenciales. Las cepas toxigénicas pueden ser investigadas por diferentes pruebas *in vitro* (células adrenales Y-1, células Vero) o *in vivo* (inoculación intragástrica en ratones lactantes y asa ileal ligada de conejo), debido a que no se cuenta con un método comercial para saber si la cepa de *A. hydrophila* es o no toxigénica y el grado de toxigenicidad de ésta, se propone un método inmunológico por microhemaglutinación pasiva para determinar si está presente o no la toxina aerolisina en una cepa de *A. hydrophila* aislada de una muestra de agua potable.

4.1. OBJETIVOS

1. Obtener la toxina aerolisina cultivada en caldo BHI en condiciones específicas de temperatura, tiempo y agitación; partiendo de una cepa pura de *Aeromonas hydrophila*.
2. Purificar parcialmente la toxina aerolisina, por medio de cromatografía de filtración por gel y diálisis.
3. Cuantificar por micro técnica la capacidad de lisis de la toxina aerolisina sobre eritrocitos de rata.
4. Obtener un antisuero anti-aerolisina por medio de una inmunización (aplicando un esquema de 45 días) con aerolisina en un conejo NZW adulto.
5. Cuantificar el título de hemaglutinación de la aerolisina por medio de microaglutinación en placa.
6. Cuantificar el título de hemaglutinación del antisuero por medio de microaglutinación en placa.
7. Evaluar el efecto de la aerolisina (enterotoxina) en un conejo Nueva Zelanda blanco, por medio de la prueba asa ileal ligada de conejo.

4.2. HIPÓTESIS

La detección de aerolisina producida por *A. hydrophila* y su cuantificación medida por inhibición de la hemaglutinación pasiva deberá correlacionar con el ensayo biológico.

5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

Prospectivo, descriptivo, transversal y observacional.

POBLACIÓN

Para aplicar a un cultivo de *Aeromonas hydrophila* aislada de una muestra de agua potable.

MATERIAL BIOLÓGICO

Cultivo de *Aeromonas hydrophila* aislada de una muestra de agua potable.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cultivo puro de *Aeromonas hydrophila* caracterizada previamente.
- De las fracciones de aerolisina parcialmente purificada tomar sólo los picos más altos de la determinación de proteínas a 280 nm para continuar con la investigación.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Se excluirán todos aquellos cultivos que no posean las características fenotípicas y la morfología colonial y microscópica de *Aeromonas hydrophila*.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Toda cepa de *Aeromonas hydrophila* contaminada.

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Condiciones de incubación de *Aeromonas hydrophila* para obtención de aerolisina.
- Purificación parcial de toxina aerolisina.
- Inmunización de conejo para obtención de antisuero.
- Eritrocitos de pollo y rata no deberán estar hemolisados.
- Preparación de soluciones.
- Manejo de pipetas automáticas

VARIABLES DEPENDIENTES

- El número de ensayos.

6. MATERIAL

EQUIPO	MARCA
Agitador Vortex-Genie	Scientific Industries, NC.
Balanza analítica. máx. 160g d=0.1 g	Mettler H80
Balanza granataria. Triple Beam Balance con capacidad hasta de 2610 g	OHAUS
Cámara para electroforesis	Owl Scientific Inc.
Centrifuga para tubos de ensayo	Solbat. Aparatos científicos
Incubadora con agitación y temperatura controladas	New-Brunswick scientific
Ultracentrifuga B-20A	Damon IEC division
Fuente de poder BRL	Life Technologies, Inc
Incubadora	RIOSSA
Incubadora con sistema de circulación -253	Precisión
Microscopio óptico	Zeizzer
Placa de calentamiento y agitación Nuova II	Sybron Thermolyne
Carrusel recolector de fracciones Redirac mod. 2112	LKB Bromma
Plataforma de agitación	Bellco Glass Inc.
Espectrofotómetros UV/VIS Lambda 1 y 2	Perkin-Elmer

MATERIAL DE VIDRIO	MARCA
Cajas Petri	Pyrex & Kimax
Matraces Erlenmeyer de 500 mL	Pyrex
Matraces volumétricos de 50, 100 y 1000 mL	Pyrex
Pipetas graduadas de 1,5 y 10 mL	Pyrex
Porta objetos	Corning
Tubos de ensayo de 12x75, 13x100 y 18x150 mm	Pyrex & Kimax
Vasos de precipitado de 20, 100, 250, 500 y 1000 mL	Pyrex

MATERIAL DE PLÁSTICO	MARCA
Camisas para centrifuga IEC B-20 A	
Columna de cromatografía	Pharmacia Fine Chemical
Membrana de nitrocelulosa	Bio Rad
Placas de poliestireno y de polivinilo de alta adherencia de 96 pocillos con fondo en U	Inter-Med Nunc y Corning
Puntas tipo Eppendorf para carga de muestras en geles	Sigma-Eppendorf
Puntas desechables de 200 µL y 1000 µL para pipetas automáticas	Sigma-Eppendorf
Tubos Eppendorf de 100 µL	Sigma-Eppendorf

MATERIAL BIOLÓGICO*Aeromonas hydrophila* cepa origen previamente caracterizada

ANIMALES DE LABORATORIO	Especie
Ratas	Winstar
Conejos	Nueva Zelanda – Blanco
Pollo	Leghorn X Rode Island

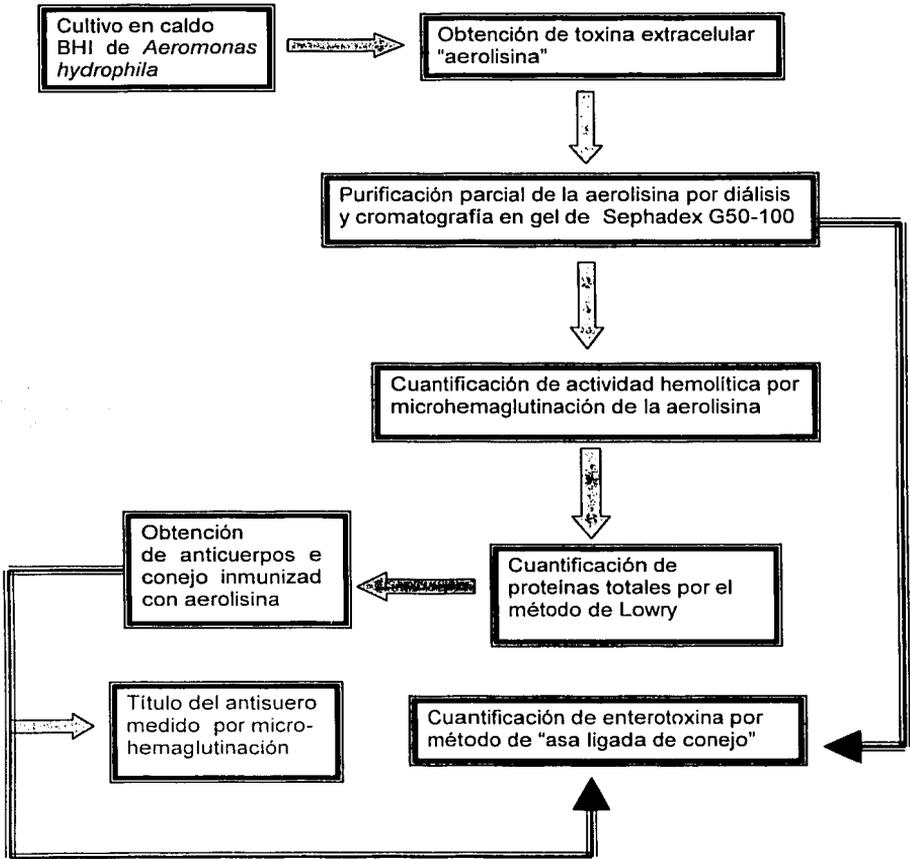
MATERIAL ESTÉRIL	MARCA
Filtros estériles de plástico	Nalgene
Frascos de plástico estéril (para cultivo celular) de 30 y 250 mL	Nunclon
Jeringas de plástico desechables de 1, 3 y 10 mL	Plastipack
Tubos de plástico estériles de 12x75 con tapón	Qfalcon.Becton Dickinson

MATERIAL ESPECIAL	MARCA
Pipeta automática tipo Eppendorf de 5-40 µL	Finnpipette
Pipetas automáticas tipo Eppendorf de 40-200 µL y 200-1000 µL	Labsystems
Pipeta automática tipo Eppendorf de 50 µL para 8 puntas	Costar
Cristales de 12x11 y 12x10 cm para electroforesis	OWL Scientifics, Inc.
Peine para geles de 12x3 cm	Bio Rad
Empacadores de teflón de 0.5 cm de ancho	Bio Rad

MATERIAL Y EQUIPO DE DISECCIÓN	
Hoja para bisturí estéril y desechable	Mango para bisturí No. 4
Pinza de disección de 14.5 cm	Tabla de disección
Tijeras de disección con punta roma	Tijeras porta aguja de 18 cm Mayo-Hegar
Pinza de disección con dientes de ratón de 14 cm	TIPO
AGUJA ATRAUMÁTICA ½ CIRCULO REDONDA- HILO (CARACTERÍSTICAS)	
B-5 26 mm – Hilo seda american negra trenzada tratada con silicón, estéril no absorbible calibre 00 75 cm	Seda American
T-5 - Hilo quirúrgico estéril crómico calibre 00 67 cm	CatGut Davis & Geck
3/8 19 mm – Hilo monofilamento azul 3-0 nylon estéril no absorbible calibre 00 45 cm	Atramat

REACTIVOS		MARCA
Aceite Mineral		Sigma
Acido acético	CH_3COOH	Baker Analyzed Reactivo
Acido bórico	H_3BO_3	Técnica Quimica S.A.
Acido cítrico	$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker Analyzed
Acido clorhídrico	HCl	EM Science
Acrilamida	$\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$	Sigma
Arlacel A detergente		Sigma
Azida de sodio bis	NaN_3	J.T. Baker Analyzed
Azul de bromofenol	$\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$	Merck
Azul de Coomassie		Sigma
Bisacrilamida	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	Sigma
Borato de sodio	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker Analyzed
BSA Albúmina Bovina, Fraction V		J.T. Baker Analyzed
Carbonato de sodio	Na_2CO_3	J.T. Baker Analyzed
Citrato de sodio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Técnica Quimica S.A.
Cloruro de bario	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker Analyzed
Cloruro de cromo	CrCl	Mallinkrodt
Cloruro de potasio	KCl	Técnica Quimica S.A.
Cloruro de sodio	NaCl	Técnica Quimica S.A.
Dextrosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	J.T. Baker Analyzed
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$	Sigma
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker
Formaldehído solución al 37%	HCHO	J.T. Baker ACS
Fosfato de sodio dibásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker Analyzed
Fosfato de sodio monobásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker Analyzed
Gelatina U.S.P.		J.T. Baker Analyzed
Glicerol 100 %	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$	Baker Analyzed Reactivo
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Sigma
Hidrosulfito de sodio		Laboratorios Beli S.A
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck
Inhibitor Protease cocktail		Sigma
2-β-mercaptoetanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Sigma
Metanol	CH_3OH	Merck
N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenyldiamina	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2$	Merck
Persulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Sigma
Sephadex G50-100		Sigma
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
Sulfato de cobre	CuSO_4	J.T. Baker Analyzed
Tartrato de sodio y potasio	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
TEMED	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Sigma
Tris-hidroximetil-amino-metano (HOCH ₂) ₃ CN	CH_2	Sigma grado reactivo

7. MÉTODOS



7.1. CULTIVO DE *Aeromonas hydrophila* EN CALDO BHI PARA OBTENCIÓN DE LA AEROLISINA

1. Sembrar tres placas para crecimiento masivo de *Aeromonas hydrophila* en agar BHI; incubando a 35° C durante 24 horas.
2. Cosechar el cultivo masivo de las placas de agar BHI e inocular con ésta 3 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de caldo BHI cada uno. Incubar a 22° C con agitación de 150 rpm durante 19 horas.
3. Separar el sobrenadante de la biomasa del cultivo de caldo BHI, centrifugando a 10,000 rpm durante 30 minutos. Adicionar sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al sobrenadante (336 g /600 mL) dejar toda la noche en refrigeración.
4. Centrifugar a 6,000 rpm durante 20 minutos. Desechar el sobrenadante y tratar el precipitado disolviéndolo en una solución de 7.5 mL de borato de sodio 0.3 M y centrifugar a 6,000 rpm durante 10 minutos.
5. Realizar un segundo lavado ahora con 4 mL de borato de sodio 0.3 M a 6000 rpm durante 10 minutos. Separar el sobrenadante que es donde se encuentra la aerolisina.
6. Purificar la aerolisina obtenida, pasándola por diálisis o bien por cromatografía en gel de Sephadex G50-100.

7.2. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA AEROLISINA POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN POR GEL.

1. La muestra se aplica a una columna de Sephadex G50-100, previamente calibrada. Colectar fracciones de 2 mL de todo el volumen que se desplace en la columna.
2. Medir actividad biológica (cuantificación del titulo de lisis por microhemaglutinación) de las fracciones colectadas que dieran mayor absorción a 280 nm.

7.3. DIÁLISIS PARA ELIMINAR EL SULFATO DE AMONIO.

1. Hacer una diálisis en PBS a la aerolisina obtenida, , colocando la disolución en un saco de membrana para diálisis. Sumergir el saco de diálisis en un volumen de 500 mL aproximadamente de solución buffer de sales de fosfato (PBS), y dejar reposar toda la noche en refrigeración.

-
2. Sacar el saco de diálisis que contiene a la aerolisina parcialmente purificada y guardar en un frasco ámbar perfectamente etiquetada. Cuantificar proteínas por el método de Lowry a esta aerolisina parcialmente purificada para conocer su concentración.

7.4. DETERMINACIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN DE LA AEROLISINA.

1. Colocar 50 μL de amortiguador (Tris –gelatina-cloruro de sodio) en cada uno de los pozos de la placa de micro titulación.
2. Adicionar 50 μL de aerolisina (concentrada), al primer pozo de las filas, y hacer diluciones mezclando bien 5 veces hasta llegar al pozo 11.
3. Agregar 50 μL de una suspensión de glóbulos rojos de rata en amortiguador (Tris –gelatina-cloruro de sodio) ajustados a 0.8 de densidad óptica, a todos los pozos incluyendo los testigos que son los pozos No. 12 de cada fila.
4. Incubar a 35° C por 30 minutos y leer el título de aglutinación, reportar el título de lisis como la inversa de la dilución.

7.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL SUERO ANTI AEROLISINA.

1. Colocar una gota de 50 μL de buffer (Tris –gelatina-cloruro de sodio) en cada uno de los pozos de la placa de micro titulación.
2. Adicionar 50 μL del suero (suero de conejo inmunizado, diluido), al primer pozo de la fila A y se va diluyendo, mezclando bien 5 veces hasta llegar al pozo 9 de la fila B.
3. Adicionar a todos los pozos 50 μL de la dilución de la aerolisina que haya dado el título de 2 Unidades Hemolíticas, incluyendo los testigos que son los pozos 9-12 de la fila B. Incubar a 37° C por 30 minutos.
4. Adicionar 50 μL de una suspensión de glóbulos rojos de rata en amortiguador (Tris –gelatina-cloruro de sodio) ajustados a 0.8 de densidad óptica a todos los pozos de las filas.
5. Incubar a 35° C por 30 minutos y leer el título de aglutinación, reportando el título como la inversa de la dilución.

7.6. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN.

1. Colocar 50 μ L de solución PBS en cada pozo de la microplaca de aglutinación.
2. Adicionar 50 μ L de suero de conejo inmunizado con aerolisina al primer pozo e ir diluyendo (mezclar bien 5 veces en cada pozo) desde el pozo 1 al pozo 11, el pozo 12 será testigo.
3. Adicionar 50 μ L de suspensión de eritrocitos de pollo pegados con cloruro de cromo a la aerolisina a todos los pozos (desde el 1 hasta el 12).
4. Incubar a 35 ° C durante 60 minutos. Refrigerar toda la noche y leer el título de inhibición.

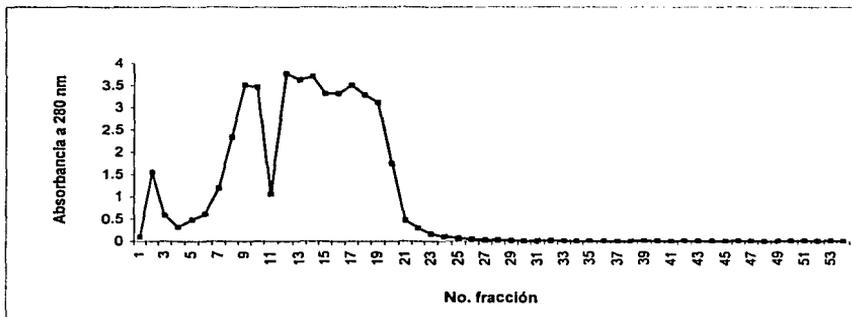
7.7. CUANTIFICACIÓN DE ENTEROTOXINA POR MÉTODO DE ASA LIGADA DE CONEJO.

1. Se realiza en un conejo Nueva Zelanda blanco que tengan un peso corporal entre 1.3 – 2.3 Kg.
2. Aplicar como anestésico general pentobarbital sódico a una dosis de 1 mL por cada 2.5 Kg de peso por vía intravenosa. Extraer intestino delgado para localizar íleon.
3. Del tramo que se va a ligar se hacen cinco segmentos transversales de aproximadamente 5-8 cm cada uno. Inocular en los segmentos elegidos: 1 mL de aerolisina parcialmente purificada en PBS, 1 mL de aerolisina-antisuero y 1 mL de solución PBS por separado en cada segmento; dejando un espacio igual de 5-8 cm entre cada segmento inoculado.
4. Una vez terminada la técnica se procede a cerrar la cavidad abdominal suturando. Desinfectar la región suturada y dejar al conejo en recuperación.
5. Sacrificar el conejo después de 16-18 horas aplicando una sobredosis de anestésico (2 mL/2.5 Kg de peso). Proceder a retirar todos los puntos de sutura, extraer el intestino delgado y localizar las asas ligadas.
6. Medir el volumen del líquido acumulado; una acumulación de 0.5 mL/cm o más se reporta como prueba positiva, un fluido sanguinolento indica probable destrucción de la mucosa.

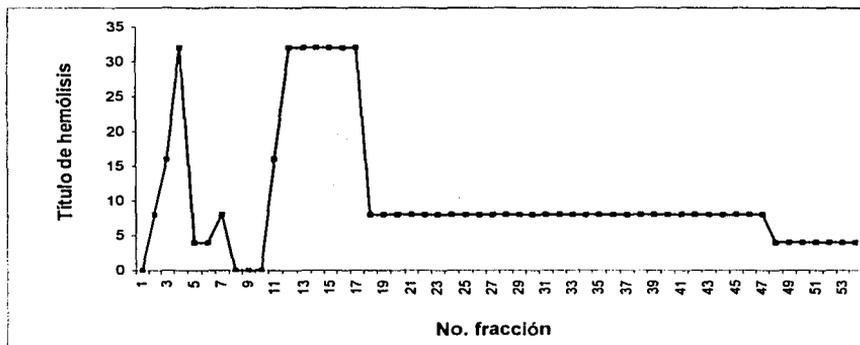
8. RESULTADOS

Tabla 1. Medición de la absorbancia a 280 nm de las fracciones colectadas de la purificación de aerolisina por medio de cromatografía en columna con Sephadex G50-100.

No. de FRACCIÓN	ABSORBANCIA A 280 nm	No. de FRACCIÓN	ABSORBANCIA A 280 nm	No. de FRACCIÓN	ABSORBANCIA A 280 nm
1	0.100	19	3.117	37	0.002
2	1.542	20	1.738	38	0.001
3	0.581	21	0.470	39	0.005
4	0.315	22	0.298	40	0.005
5	0.481	23	0.162	41	0.001
6	0.613	24	0.102	42	0.003
7	1.187	25	0.067	43	0.006
8	2.335	26	0.046	44	0.006
9	3.515	27	0.029	45	0.004
10	3.462	28	0.021	46	0.005
11	1.058	29	0.016	47	0.006
12	3.768	30	0.011	48	0.003
13	3.623	31	0.011	49	0.005
14	3.697	32	0.012	50	0.000
15	3.316	33	0.003	51	0.008
16	3.322	34	0.006	52	0.009
17	3.505	35	0.001	53	0.009
18	3.289	36	0.002	54	0.005



Gráfica 1. Absorbancia a 280 nm de las diferentes fracciones de aerolisina purificada por columna de cromatografía de columna de Sephadex G50-100.



Gráfica 2. Actividad hemolítica (título de hemólisis) de la aerolisina de las diferentes fracciones colectadas de la purificación por cromatografía de columna con Sephadex G50-100.

Tabla 2. Actividad hemolítica (título de hemólisis) de la aerolisina de las diferentes fracciones colectadas de la purificación por cromatografía de columna con Sephadex G50-100.

No. de fracción	Título de hemólisis	No. de fracción	Título de hemólisis	No. de fracción	Título de hemólisis
1	0	19	8	37	8
2	8	20	8	38	8
3	16	21	8	39	8
4	32	22	8	40	8
5	4	23	8	41	8
6	4	24	8	42	8
7	8	25	8	43	8
8	0	26	8	44	8
9	0	27	8	45	8
10	0	28	8	46	8
11	16	29	8	47	8
12	16	30	8	48	4
13	16	31	8	49	4
14	16	32	4	50	4
15	16	33	8	51	4
16	32	34	8	52	4
17	32	35	8	53	4
18	8	36	8	54	4

Y Título de hemólisis de la aerolisina obtenida del segundo cultivo purificada por diálisis. Prueba por duplicado

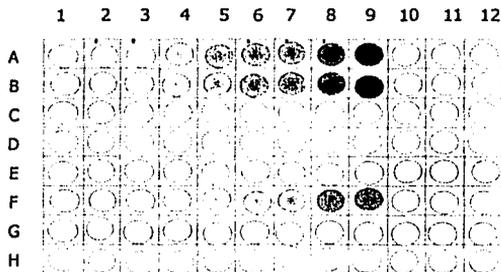
Filas A-B

lisis total = pozos 1-3

Título 2UH = 8

lisis parcial = pozo 4

testigos negativos = pozos
10-12 de las filas A-B



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 4. Título de hemólisis de la aerolisina obtenida del tercer cultivo

Y Título de hemólisis de la aerolisina obtenida del tercer cultivo purificada por diálisis.

Filas E-F

lisis total = pozo 1

Título 1UH = 2

lisis parcial = pozos 2- 4

testigos negativos = pozos
10-12 de la fila F

Se cuantificó el contenido proteico de la aerolisina parcialmente purificada, bien sea, por cromatografía en gel de Sephadex o por diálisis; por el método de Lowry. Se eligieron las fracciones 11, 14 y 16 debido a que la aerolisina está presente en dichas fracciones como se observa en ambas gráficas y la actividad lítica de la fracción 11 (título de 16) es diferente con respecto a las fracciones 14 y 16, teniendo estas dos últimas el mismo título de lisis.

Tabla 3. Concentración de proteína (aerolisina) medida por el método de Lowry en los dos cultivos.

Cultivo	No. de fracción	($\mu\text{g} / \text{mL}$) de proteína
I	11	638.25
	14	999.99
	16	610.50
III	Alicuota	1,526.37

➤ Título del antisero. (por neutralización)

Filas A-B

Título = 32

lisis total = pozos 1-4

lisis parcial = pozos 5-8

testigos negativos = pozos 9-12 de la fila B

Antisero concentrado y Antígeno (1:8) prueba sencilla, se repitió y se observó que era reproducible.

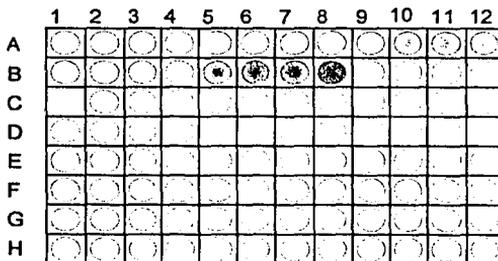


Figura 5. Título del antisero.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

➤ Inhibición de la hemaglutinación.

Título de aerolisina (se va diluyendo) con antisuero (1:4) y eritrocitos sensibilizados.

Filas A y B Título = 8

antisuero (1:4) y Antígeno concentrado. Prueba por duplicado.

testigos = pozo 12 de la fila A y B

➤ Inhibición de la hemaglutinación.

Título de aerolisina (se va diluyendo) con antisuero (1:32) y eritrocitos sensibilizados.

Filas D Título = 4

antisuero (1:32) y Antígeno concentrado. Prueba sencilla.

testigos = pozo 12 de la fila D

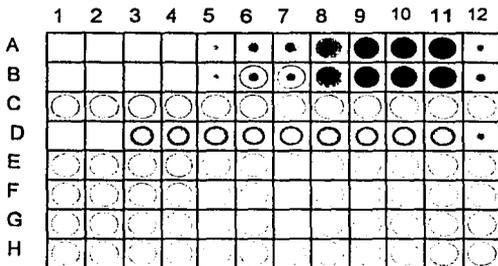


Figura 6. Inhibición de hemaglutinación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 7. Muestra una asa ligado del ileon de conejo inmediatamente después de ser inoculado

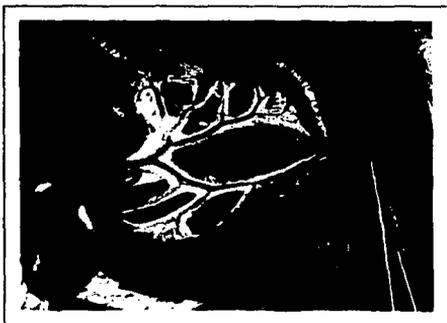


Figura 8. Muestra los diferentes segmentos del ileon de conejo ligado después de 18 horas de haber sido inoculado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

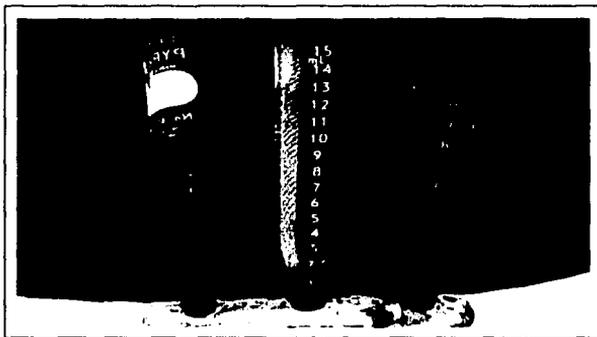


Figura 9. Líquido acumulado extraído de las asas de ileon ligado de conejo después de 18 horas de inoculado, con aerolisina a la izquierda, solución PBS en el centro y aerolisina con antisuero a la derecha.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 4. Actividad de la enterotoxina en asa de ileon ligada de conejo.

No. Segmento / material inoculado (1 mL)	16-18 horas después de la inoculación	
	Grosor de asa	Volumen de líquido acumulado
1° / Aerolisina	1.49 cm	6 mL
3° / Aerolisina-antisuero	1.52 cm	7.5 mL
5° / PBS	1.06 cm	1.9 mL

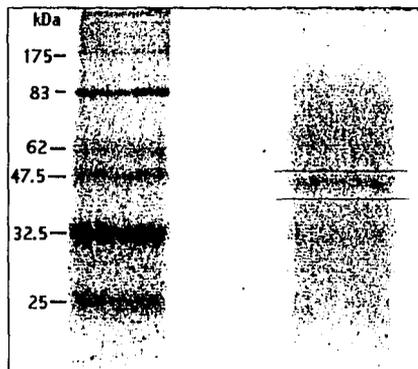


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida con gel concentrador al 5 % y gel separador al 12%. La columna de la derecha corresponde al marcador de peso molecular y la columna de la izquierda corresponde a la muestra de aerolisina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De la gráfica 1 "Fracciones eluidas (No. de tubo) vs. absorbancia a 280 nm", se observa un conjunto de tres picos, esto indica que la purificación (separación) fue adecuada y que la proteína de interés se encontraba en éste último pico. De igual forma en la gráfica 2 "Fracciones eluidas vs. título de hemólisis", aparecen dos picos máximos con actividad lítica y éstos mismos corresponden a los observados en la gráfica 1, por lo que se confirma que la aerolisina se encuentra en estas fracciones.

En lo referente al título del antisuero, se probaron varias diluciones (1:25, 1:10, 1:4 y sin diluir) y se probaron contra 2 UH de aerolisina. Se observó que el antisuero neutralizó a una dilución 1:32.

El efecto de la enterotoxina evaluado *in vivo*, por medio de la prueba de asa ligada de ileon de conejo, no fue neutralizado por el antisuero; sin embargo se observó un efecto facilitador del anticuerpo sobre la actividad de la toxina, como se pudo observar al incrementar casi el triple el edema de la toxina sola y cuatro veces este efecto con respecto al fragmento que funcionó como testigo negativo del ensayo. El efecto facilitador de algunos anticuerpos sobre enzimas que incrementan su actividad biológica se ha observado en varios sistemas enzimáticos, en donde se propone que el anticuerpo induce cambios conformacionales en las enzimas que producen un aumento en su actividad (Arnon 1973).

Finalmente para la identificación parcial de la toxina por medio de una SDS-PAGE, se emplearon diferentes concentraciones del gel de poliacrilamida, siendo al 5 % el gel concentrador y al 12 % el gel separador la mezcla que dio mejores resultados. Al comparar en el gel el corrimiento tanto del marcador de peso molecular como de la muestra se observa un corrimiento uniforme de ambos, la banda de la muestra se corresponde con una banda del marcador de peso molecular correspondiente a 50 KDa como lo refiere la literatura, lo cual nos indica que la aerolisina obtenida tiene una pureza muy aceptable, ya que no se detectan otras bandas cercanas que puedan indicar impurezas.

10. CONCLUSIONES

Se alcanzaron los objetivos planteados al obtener la toxina extracelular "aerolisina" a partir de una cepa silvestre de *Aeromonas hydrophila*, así como la purificación parcial de la toxina por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de columna con Sephadex G50-100.

Con la toxina purificada se obtuvo un antisuero de conejo capaz de neutralizar la aerolisina *in vitro* por técnicas de hemaglutinación. Este antisuero resultó útil para elaborar una prueba de hemaglutinación pasiva.

De la prueba de asa ligada de conejo se concluye que el antisuero también va dirigido contra la enterotoxina, a la que no neutraliza; pero el anticuerpo tiene la capacidad de potenciar su efecto biológico. Esto nos indica que la hemolisina y la enterotoxina están estrechamente unidas; pero que son dos proteínas diferentes, con actividades biológicas también diferentes.

11. PROPUESTAS

Probar el antisuero con otras cepas de *Aeromonas* para detectar la presencia de aerolisina y/o enterotoxina y poder identificar así a la especie *A. hydrophila*.

Verificar el efecto *in vivo* con otras cepas (por ejemplo de *E. coli* y *V. cholerae*) empleadas como testigos positivos y comparar los efectos.

Usar otras técnicas de separación, como podrían ser, resinas de intercambio iónico, isoelectroenfoque etc., con la idea de separar la aerolisina de la enterotoxina y poder preparar anticuerpos específicos con cada una de ellas y usarlos con fines de detección.

12. ANEXOS

I. CARACTERÍSTICAS DE LA AEROLISINA (BETA-HEMOLISINA)



Estructura tridimensional de la proaerolisina

PROPIEDADES

Rendimiento óptimo: a las 24 hs a 37° C

Peso molecular 50- 51 KDa.

Puntos isoelectricos: 5.5 y 4.2 o 5.56 y 5.39.

Inactividad a 56° C, 10 minutos a pH 7.0 y a 37° C 1h a pH 8.2.

Estable en presencia de tripsina y pronasa

Inactivada por Fe⁺², DDT y Cisteína.

EFFECTOS BIOLÓGICOS

Actividad hemolítica: los eritrocitos de rata son los más sensibles

Inhibición: por gangliosidos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Citotoxicidad una gran variedad de células son susceptibles al efecto de ésta cuya acción es irreversible uniéndose a la membrana celular de 0 a 37° C liberando marcadores de bajo peso molecular en fibroblastos, llenando el citoplasma con vacuolas.

Receptores de membrana: glicoproteínas

Dosis dermonecrotica: 0.1 µg

Dosis letal: 0.4 µg por vía intravenosa en ratón

Prueba de asa de conejo: 30 µg induce la acumulación de pequeñas cantidades de fluido sanguinolento.

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	[µM]	RESIDUOS DE HISTIDINA=1	INTEGRACIÓN APROXIMADA A 8 RESIDUOS / HISTIDINA
Ácido aspártico	2.232	8.36	67
Treonina	1.200	4.49	36
Serina	1.320	4.94	40
Ácido glutámico	1.776	6.65	53
Prolina	1.128	4.22	34
Glicina	1.896	7.10	57
Alana	1.560	5.84	47
Balía	1.140	4.27	34
Meticon	0.144	1	8
Izo leucina	0.717	2.69	22
Leucina	1.224	4.58	37
Tirosina	0.645	2.42	19
Fenilalanina	0.594	2.22	18
Lisina	0.867	3.25	26
Histidina	0.267	1.00	8
Arginina	0.573	2.14	17

II. TÉCNICAS EMPLEADAS

❖ CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

No. tubo	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solin Stock de BSA	0.0 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL	0.6 mL	0.7 mL	0.8 mL	0.9 mL	1.0 mL	-----
H ₂ O destilada	1.0 mL	0.9 mL	0.8 mL	0.7 mL	0.6 mL	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL	0.0 mL	0.9 mL
Muestra	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	0.1 mL
Reactivo C	3.0 mL											
Dejar reposar 10 minutos												
Reactivo D	0.1 mL											
Dejar reposar 30 minutos												

Leer la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm, graficar los datos de absorbancia vs concentración y reportar en mg/mL la concentración de la muestra.

Solución Stock de BSA			
mL	Concentración equivalente (µg/mL)	mL	Concentración equivalente (µg/mL)
0.1	25	0.6	150
0.2	50	0.7	175
0.3	75	0.8	200
0.4	100	0.9	225
0.5	125	1.0	250

❖ ESQUEMA PARA INMUNIZACIÓN DE CONEJO CON AEROLISINA

DÍA	ACTIVIDAD
0 1ª inmunización	1 mg de aerolisina en 1 mL de solución salina + 1 mL de adyuvante completo de Freud. Administrar en sitios múltiples a lo largo del lomo por vía intradérmica.
14 2ª inmunización	1 mg de aerolisina en un mL de solución salina + 1 mL de adyuvante incompleto de Freud. Administrar en sitios múltiples a lo largo del lomo por vía intradérmica.
35 3ª inmunización	0.5 mg de aerolisina en un mL de solución salina. Administrar en sitios múltiples a lo largo del lomo por vía intradérmica.
40 4ª inmunización	0.5 mg de aerolisina en un mL de solución salina. Administrar en sitios múltiples a lo largo del lomo por vía intradérmica.
45	Sangrar al conejo para obtención del suero.

❖ PEGADO DE AEROLISINA A GLÓBULOS ROJOS DE POLLO CON CLORURO CROMICO.

1. La proteína (aerolisina) debe de estar dializada con solución salina 0.85% para eliminar todo el fosfato, de la diálisis previa con PBS. Realizar tres lavados a los eritrocitos de pollo (eritrocitos nucleados en solución de Alsever), a 2000 rpm durante 5 minutos con solución salina isotónica al 0.85% para eliminar los eritrocitos que estén lisados.
2. Ajustar la proteína (aerolisina) al 0.1% con solución salina isotónica. De los eritrocitos de pollo lavado tomar 0.1 mL del paquete y adicionarle 0.2 mL de aerolisina ajustada al 0.1 %.
3. Agitar manualmente el tubo durante cinco minutos sin rebotar. Agregar gota a gota 0.2 mL de solución de cloruro crómico (CrCl) en solución salina isotónica al 0.1% recién preparada (10 mg/ 10 mL).
4. Sin dejar de agitar manualmente cuidando de no producir espuma, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Lavar 4 veces con solución salina isotónica de la siguiente manera: el primer lavado se hace centrifugando a 1500 rpm durante 7 minutos, los otros tres lavados se realizan centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos.
5. Llevar a 10 mL con solución de PBS, quedando de esta manera tanizados los eritrocitos. Comprobar si se realizó bien el pegado de los eritrocitos de pollo a la aerolisina, mediante una prueba de inhibición de la hemaglutinación.

❖ ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Gel de separador o de corrimiento de poliacrilamida al 12 % (10 mL)

Agua bidestilada	3.3 mL
Acrilamida-bisacrilamida (solución A)	4.0 mL
Amortiguador Tris pH= 8.8 (solución B)	2.5 mL
SDS al 10 % (solución D)	100.0 µL
PSA al 10 % (solución E)	100.0 µL
TEMED (solución F)	8.0 µL

Gel concentrador de poliacrilamida al 5 % (5 mL)

Agua bidestilada	3.4 mL
Acrilamida-bisacrilamida (solución A)	830.0 µL
Amortiguador Tris pH= 6.8 (solución C)	630.0 µL
SDS al 10 % (solución D)	50.0 µL
PSA al 10 % (solución E)	50.0 µL
TEMED (solución F)	7.0 µL

PROCEDIMIENTO

1. Montar el soporte donde se forma el gel de poliacrilamida. El material deberá estar perfectamente limpio, seco y libre de grasa.
2. Sellar el soporte de los lados con ayuda de pinzas y la parte inferior con agarosa al 2 %.
3. Preparar el gel de corrimiento y vaciarlo al armazón a un nivel aproximado de 4 cm del borde superior.
4. Una vez polimerizado el gel. Preparar el gel concentrador.
5. Llenar el armazón con el gel concentrador y colocar inmediatamente el peine cuidando de no generar burbujas bajo los dientes de éste.

6. Dejar reposar el gel aproximadamente cinco minutos y retirar el peine teniendo cuidado para no romper los pozos.
7. Tratamiento de la(s) muestra(s): Combinar cuatro partes de la muestra con una parte del amortiguador de muestra 4x (solución G), en un tubo Eppendorf, el cual se coloca en un baño de agua hirviendo durante dos minutos.
8. Colocar la (s) muestra (s) y el marcador de peso molecular cada una en un pozo diferente del gel. Colocar el armazón en su posición dentro de la cámara de electroforesis.
9. Llenar la cámara con amortiguador de corrimiento (solución H).
10. Conectar la cámara de electroforesis cargada con el gel y la(s) muestra (s) a la fuente de poder aplicando corriente eléctrica de 80 volts, hasta que llegue al gel separador a partir del cual se aumenta el voltaje a 120 volts de corriente constante.
11. Suspender el suministro de corriente cuando el colorante de la (s) muestra (s) quede aproximadamente a 0.5 cm del límite inferior de los cristales.
12. Desensamblar el armazón del gel (separar los vidrios).
13. Colocar el gel en la solución de azul de Coomassie para su tinción. Decolorar hasta que el gel tenga el color deseado.
14. Secar el gel a 50° C durante una hora en el secador de geles.

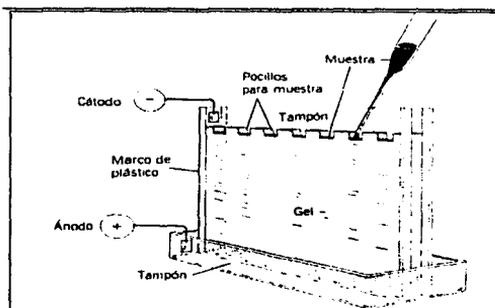


Figura en la que se observa la colocación de la muestra para la electroforesis

III. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

♦ **Agua Peptonada 10 X** pH 9.0 para preparar 200 mL

Peptona de caseína	20 g
Cloruro de sodio	20 g
Agua destilada	200 mL

Ajustar el pH con hidróxido de sodio

Repartir 50 mL a un matraz de 500 mL con tapón de rosca más 450 mL de la muestra

♦ **Agar bacteriológico** al 1.8 %

Se usó para solidificar el caldo BHI.

♦ **Caldo BHI** (Infusión Cerebro Corazón) fórmula por litro

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón	250 g
Peptona proteasa Bacto	10 g
Dextrosa Bacto	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato de sodio	2.5 g

Disolver 37 g en 1000 mL de agua destilada, esterilizar a 121° C por 15 min. pH final 7.4 ± 0.2 a 25 ° C

♦ **Todd Hewitt Broth** Fórmula por litro

Infusión de 450 g carne de res libre de grasa	10 g
Triptona	20 g
Dextrosa	2 g
Bicarbonato de sodio	2 g
Cloruro de sodio	2 g
Fosfato de sodio	0.4 g

Disolver 36.4 g en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por autoclave a 115° C por 10 min. pH final 7.8 ± 0.2 a 25 ° C

◆ **Agar CASO (Soya-Tripticaselina) Fórmula por litro**

Peptona de caseína	15 g
Peptona de harina de soya	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar-agar	15 g

Disolver 40 g en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por autoclave a 121° C por 15 min.
pH final 7.3 ± 0.2 a 25 ° C

◆ **Base para agar sangre** Fórmula por litro

Infusión de músculo cardiaco	375 g
Peptona de carne	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar-agar	15 g

pH final 7.3 ± 0.2 a 25 ° C

Rehidratar 40 g en 1000 mL de agua destilada, calentar hasta punto de ebullición y completa disolución del medio; esterilizar por autoclave a 121° C por 20 min.

Enfriar a 45-50° C y agregar de 5-10% de sangre desfibrinada de borrego o camero estéril girando suavemente el matraz para evitar la formación de burbujas, homogenizar y vaciar en cajas de Petri estériles.

◆ **Peptona de caseína (digerido pancreático)** Fórmula por litro

Nitrógeno total	12.8 %
Nitrógeno amínico /nitrógeno total	37.5 %
Sodio	3.6 %
Cloruros	0.3 %
Hierro	< 30 ppm
Humedad	3.7 %
Solubilidad (30° C)	25g/1000 mL
PH (al 2% de solución)	7.0 ± 0.2

IV. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

❖ **Solución de Alsever** fórmula para 100 mL

Dextrosa	2.05 g
Citrato de sodio (2H ₂ O)	0.80 g
Ácido cítrico (H ₂ O)	0.055 g
Cloruro de sodio	0.420 g
Agua destilada	100 mL

Nota: No deberá usarse pasadas cuatro semanas de su recolección.

Esterilizar esta solución en autoclave a 10 lbs de presión/15 min. El pH deberá ser de 6.1ajustar con ácido cítrico al 10% o con NaOH 0.1N.

La sangre de carnero se recibe en esta solución volumen a volumen y se deja durante una semana en refrigeración antes de usarse para que se estabilice.

❖ **Buffer TRIS 0.01M pH 7.2 - NaCl 0.145 M - Gelatina al 2%.**
fórmula para 1000 mL

TRIS (hidroximetilaminometano)	1.21 g
Cloruro de sodio	8.41 g
Gelatina	20.00 g

Disolver la gelatina en 100 mL de agua destilada y calentar hasta punto de ebullición y completa disolución. Disolver el TRIS y el NaCl en agua destilada y adicionarle la gelatina disuelta y aforar a 1000 mL con agua destilada.

❖ **Borato de sodio 0.3 M pH 8.2** fórmula para 100 mL

Borato de sodio 11.4426 g

Ajustar el pH con ácido clorhídrico gota a gota

❖ **Solución de Cloruro de cromo al 0.1 %**

Cloruro de cromo 0.1 g

Disolver en 10 mL de solución salina 0.85%

❖ **Solución salina de Fosfatos** fórmula para preparar 2000 mL

Cloruro de potasio 0.4 g

Cloruro de sodio 16 g

Fosfato de sodio dibásico (12H₂O) 5.8 g

Fosfato de sodio monobásico 0.4 g

Disolver y aforar con agua destilada a 2000 mL

❖ **Para determinación de proteínas por el método de Lowry**

Reactivo	Fórmula	Preparación
A	Solución al 2% de Na ₂ CO ₃ -Tartrato de sodio y potasio 0.02% en NaOH 0.1N	Disolver 20 g de Na ₂ CO ₃ y 0.5 g de Tartrato de sodio y potasio en un litro de NaOH 0.1N
B	Solución al 0.5% de CuSO ₄ .5H ₂ O en agua destilada	Disolver 0.05 g de CuSO ₄ .5H ₂ O en 10 mL agua destilada.
C	_____	50 mL del reactivo A + 1 mL del reactivo B
D	_____	Reactivo de Folin Cicalteu diluido 1:2 con agua destilada
Solución patrón de BSA (albúmina sérica bobina)	250mg/mL	Disolver 12.5 mg de BSA en 50 mL de agua destilada.

❖ **Solución Salina isotónica al 0.85 %**

Cloruro de sodio 8.5 g

Agua destilada 1000 mL

13. GLOSARIO

Adherencia (adhesión, fijación): proceso por el cual la bacteria se "pega" a la superficie de las células del huésped. Una vez que la bacteria entra al cuerpo; la adherencia es un paso inicial principal en el proceso infeccioso.

Adherencia y esfacelamiento (A/E): lesión caracterizada por la eliminación y destrucción de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado acompañada por un acumulo de actina celular debajo del sitio de la lesión.

Adyuvante de Freud: el adyuvante completo de Freud es una emulsión de antígeno acuoso en aceite mineral que contiene micobacterias muertas por calor. El adyuvante incompleto carece de las micobacterias.

Adyuvante: cualquier sustancia que intensifica de manera inespecífica la respuesta inmunitaria frente a un antígeno.

Antígeno: cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor celular T.

Citotoxicidad: capacidad de las toxinas para destruir células *in vitro*, proceso destructivo tiempo y dosis dependiente y que puede ser neutralizada con un tiempo de preincubación con el antisuero específico contra la toxina.

Dominios: son unidades independientes, desde el punto de vista estructural cada una de las cuales posee las características de una proteína globular pequeña. La mayoría están constituidas por 100-200 restos de aminoácidos.

Edema: tumefacción causada por la acumulación excesiva de líquido en los espacios tisulares debido a un aumento de la trasudación de líquido a partir de los capilares sanguíneos.

Efecto prozona: la falta de inmunoprecipitación o inmunoaglutinación que se comprueba cuando la concentración de anticuerpo aumenta en grado tal que el exceso de éste ya no permite el ligamento cruzado eficaz del antígeno. Un fenómeno similar ocurriría con el exceso de antígeno.

Endotoxina: lipopolisacáridos patógenos asociados con la pared celular de las bacterias Gram negativas.

Enterotoxigenidad: es la capacidad de las toxinas para inducir la secreción de fluido in vivo en un segmento ligado de ileon de conejo.

Equivalencia: la proporción entre anticuerpo y antígeno en la que prácticamente se han completado las reacciones de inmunoprecipitación.

Exotoxina: proteína patógena secretada por las bacterias.

Hemaglutinina: cualquier molécula que aglutina los eritrocitos.

Hemolisinas: son sustancias que liberan hemoglobina de los glóbulos rojos. Son producidas por varias clases de bacterias.

Infección: multiplicación de un agente infeccioso dentro del cuerpo. La multiplicación de bacterias que son parte de la flora normal de vías gastrointestinales, piel, etc., por lo general no se considera infección.

Lipopolisacárido (LPS): endotoxina derivada de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas que tiene acciones inflamatorias y mitógenas.

Necrosis: cuando las células degeneran hasta el punto en que los tejidos se lesionan en forma irreversible; muerte patológica de una célula o grupo de células en contacto con células vivientes.

Oligómero: son proteínas con subunidades idénticas.

Protómeros: se denomina así a las subunidades idénticas. Un protómero puede por lo tanto estar constituido por una cadena polipeptídica o por varias cadenas polipeptídicas diferentes, por ejemplo, la hemoglobina es un dímero (Oligómero con dos protómeros) constituido por protómeros α y β .

Título: medida de la "fuerza" (una combinación entre cantidad y avidéz) relativa de un anticuerpo o antisuero, por lo general dada como la dilución más alta que todavía es operativamente detectable en, por ejemplo, una prueba de aglutinación.

Toxicidad: se presenta cuando la toxina entra a los sistemas sanguíneos o linfáticos y en esa forma se disemina por todo el organismo.

Toxigenicidad: capacidad de un microorganismo para producir una toxina que contribuye al desarrollo de enfermedad.

Toxinas: las toxinas son producidas por bacterias, por lo general, se clasifican en dos grupos, exotoxinas y endotoxinas.

Toxoide: toxina modificada química o físicamente que ya no es nociva pero retiene la inmunogenicidad.

Unidad loop por mL (LU/mL): se define como la dilución recíproca de toxina causante de la acumulación de fluido de al menos 1 mL/cm de intestino.

14. REFERENCIAS

1. Alexander A. Técnica quirúrgica en animales y temas de terapéutica quirúrgica. México: Interamericana Mc Graw-Hill; 1989. p. 168-173.
2. Anderson & Cockayne. Química clínica. México: Interamericana McGraw-Hill; 1995. p. 190-195.
3. Arnon R. Inmunochimistry of encimes. In the antigens. Editor Sela M. New York: Academic Press Inc; 1973 (I). p. 92.
4. Asao T, Kozaki S, Kato K, Konishita Y, Otsu K, Uem T, et al. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* haemolysin. J. Clin Microbiol 1986; 24: 228-232.
5. Austin B, Alwegg M. The genus *Aeromonas*. England: Wiley; 1996.
6. Bach Jean francois. Inmunología. México: Ediciones ciencia y técnica, S.A.; 1989: vol 2: 288-290.
7. Bailey Finegold – Scott. Diagnóstico microbiológico.7ª Ed. Argentina: Médica Panamericana;1989: 260-63.
8. Bernheimer AW, Avigad LS, Avigad G. Interaction between aerolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes. Infect Immun 1975; 11: 1312-1319.
9. Bernheimer AW, Avigad LS. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun 1974; 9: 1016-1021.
10. Bonnie SD. Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. London: Plenum Press; 1987. p. 211-230.
11. Buckley JT, Halasa LN, Lund KD, MacIntyre S. Purification and some properties of the haemolytic toxin aerolysin. Can J Biochem 1981; 59: 430-435.
12. Buckley JT. Crossing three membranes channel formation by aerolysin. FEBS 1992; 307 (1): 30-33.
13. Cañedo DL. Investigación clínica. México: Nueva editorial interamericana; 1987. p. 35-70, 197-260.
14. Clitri N, and Zyk N. Biochim Biophys Acta 1965; 99: 427.

-
15. Donta ST, Haddow AD. Cytotoxic activity of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun 1978; 11: 989-993.
 16. Fehrenbach FJ, Freer JH, Jeljaszewics Alouf JE. Bacterial protein toxins. FEMS Symposium No. 24. Londres: Academic Press Inc 1984: 309-315.
 17. Gruber HJ, Wilmsen HU, Cowell S, Schindler H, Buckley JT. Partial purification of the rat erythrocyte receptor for the channel-forming toxin aerolysin and reconstitution into planar lipid bilayers. Molec microbiol 1994; 14 (5): 1093-1101.
 18. Harlow & Lane D. Antibodies a laboratory manual. U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988: 56,98,125.
 19. Henry JR, Cannon DC, Winkelman MD. Química clínica, principios y técnicas. 2ª Ed. España: JIMS; 1980. p. 420-423.
 20. Hicks JJ. Bioquímica. México: Mc Graw-Hill; 2001. p. 85, 96-107, 116.
 21. Holt JG, Krieg NR, Sneath Peter HA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9ª. Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 1994. p. 190-192, 254-256.
 22. Honna Y, Nakasone N. Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization and biological role. Microbiol Immunol 1990; 34 (2): 83-98.
 23. Howard SP, Buckley JT. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. J Bacteriol 1985; 161: 336-340.
 24. Howard SP, Buckley JT. Protein export by a Gram-negative bacterium: production of aerolysin by *Aeromonas hydrophila*. J Bacteriol 1985; 161: 1118-1124.
 25. Hudson L, Hay Fc. Practical Immunology. Kemp Hall, Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1976. p. 8-10.
 26. Jawetz, Melnick & Adelberg. Microbiología médica. 14ª Ed. México: El manual moderno; 1992. p. 125-127, 663-64.
 27. Kaplan Lawrence. Química clínica, técnicas de laboratorio, fisiopatología y métodos de análisis. Buenos Aires: Médica panamericana; 1988. p. 227-230.
 28. Lehmann F.G. Immunochemistry. U.S.A. 1970; 7: 864.
 29. Ljungh A, Kronevi T. *Aeromonas hydrophila* toxins-intestinal fluid accumulation and mucosal injury in animal models. Toxicon 1982; 20 (2): 397-407.
-

-
30. Ljungh A, Wretling B, Möllby R. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. Acta Pathol Microbiol Scand 1981; 89: 387-397.
 31. Louisot. Pierre. Bioquímica estructural. Madrid, España: A.C. Libros científicos y técnicos; 1977. p. 412-27.
 32. Margni AR. Inmunología e inmuoquímica, fundamentos. 5ª Ed. Argentina: Médica Panamericana; 1996. p. 379-91.
 33. Marroquín SR, Flores PM. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. FES Zaragoza, UNAM. Carrera de QFB 8º semestre; 1998. p. 13-19, 39-43.
 34. Martínez RF. Purificación de antígenos específicos de *Leishmania mexicana mexicana* usando una columna de intercambio iónico, reconocidos por sueros de pacientes con leishmaniasis. México, Tesis y Encuadernación, Tesis rápidas, 2000: 20-42, 52-62.
 35. Méndez RI, Namihira GD, Moreno AL, Sosa MC. El protocolo de investigación. 2ª Ed. México: Trillas; 1990. p. 11-40.
 36. Parker MW, Vandergoot FG., Buckley JT. Aerolysin- the ins and outs of a model channel- forming toxin. Molec Microbiol 1995: 205-212.
 37. Parker MW, Buckley T, Postma JPM, Tucker DA, Leonard K, Pattus F, et al. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. Nature 1994; 367: 292-294.
 38. Pollock MR, Fleming J, and Petrie S. In antibodies to biologically active molecules. Pergamon, Oxford: B. Cinader; 1967. p. 139.
 39. Pugsley AP. The complete general secretory pathway in Gram -negative bacteria . Microbiol Rev 1993; 57(1): 50-108.
 40. Pumarola A. Microbiología y parasitología médica. Barcelona, España: Salvat; 1984. p. 173-177, 273-275.
 41. Roitt Ivan M. Inmunología fundamentos. 9ª Ed. Madrid, España: Médica Panamericana; 1998. p. 480-86.
 42. Rose Noel R. El laboratorio en inmunología clínica. 2ª Ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 1984. p. 48-54.
 43. Sela M. The antigens. New York, U.S.A.: Academic Press Inc; 1973; vol I:91-93.

-
44. Sánchez ChL. Utilización del conejo como modelo animal en el SUH. México, ENCB. IPN. Tesis y Encuadernación; 1998. p. 16-20.
 45. Steinsberg NC. Comparación en la eficiencia de tres adyuvantes en la inmunización de conejos con suero humano total. México, ENCB. IPN. Tesis y encuadernación, 1979: 1-7.
 46. Stites PD. Inmunología básica y clínica. 7ª Ed. México: El manual moderno; 1993. p. 281-83.
 47. Stryer Lubert. Bioquímica. 3ª Ed. T-1. España: Reverté; 1988. p. 44 - 49.
 48. Tequianes BL. Aislamiento y caracterización de *Aeromonas* a partir de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM. México, Tesis y Encuadernación, Tesis rápidas, 2001: 2-75.
 49. Van der Goot FG, Lakey J, Pattus F, Kay CM, et al . Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel – forming toxin aerolysin : identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* 1992, 31: 8566-8570.
 50. Voet Donald. Bioquímica. España: Omega; 1992. p. 87 - 95.
 51. Weir M.D. Handbook of Experimental Immunology., in three volumes. Third edition. London: Blackwell Scientific Publications 1978; vol 2: 20.1-20.16.
 52. Zyk N. and Citri N. *Biochim Biophys Acta* 1968b; 159: 327.

REFERENCIAS ELECTRONICAS.

- A. Bravo Farinas L., San German Suárez S., et al. Marcadores fenotípicos en cepas de *Aeromonas* aisladas en Cuba de niños con enfermedad diarreica aguda. [consultado 19/10/01] http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol47_2_95/mtr07295.htm.
- B. Francis-Floyd R. *Aeromonas* Infections. [consultado 19/10/01] http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_FA042.
- C. Monge R. Arias-Echandi ML, Utzinger D. Presencia de *Aeromonas* citotóxicas y *Plesiomonas shigelloides* en vegetales frescos. [consultado 19/10/01] <http://www.imbiomed.com.mx/Uay/Yuv09n3/español/WYyu83-05.html>
- D. Pérez Peña S., Tamayo Curró E., et al. Primer reporte en Cuba de aislamiento de *Aeromonas* en muestras extraintestinales. [consultado 19/10/01] http://bvs.sld.cu.revistas/mil/vol26_1_97/mil07197.htm.
- E. Base de Datos de estructuras Proteicas. <http://www.pdb.rcsb.org/pdb/>