



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA DE
Enterococcus faecium

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

FLORES MORENO KAREN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D. F. Octubre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme las herramientas para desarrollarme académicamente.

A la Dra. Yolanda López Vidal por permitirme formar parte de su grupo de investigación, brindarme el apoyo y asesoría para el desarrollo de este proyecto.

Al Comité Tutor Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez y al Dr. Rafael Saavedra Durán, por sus contribuciones y comentarios para el desarrollo de éste proyecto.

A los miembros del Jurado de Tesis, Dr. Marco A. Cerbón Cervantes, Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez, Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez, Dra. Ma. Magdalena Aguirre García y Dra. Gohar Gevorgyan Markosian por las observaciones y correcciones realizadas al presente escrito.

Al Dr. Johannes Hubner de la Universidad de Freiburg, Alemania; por la donación de la cepa *E. faecium* E155, su colaboración con el proyecto.

A la Dra. Diana Laverde por su apoyo para la realización de los ensayos de opsonofagocitosis.

A la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal y la Dra. Patricia Orduña Estrada por sus observaciones y comentarios en el manuscrito de la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. De becario 419849) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría; así como por la beca proporcionada: Beca Mixta 2012-2013 de Movilidad en el extranjero (290674), para la realización de una estancia de investigación en Freiburg, Alemania.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado, UNAM; por el apoyo con la Beca Complementaria para la compra del boleto de avión para la realización de la estancia académica en Freiburg, Alemania.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico para realizar una estancia académica en Freiburg, Alemania.

El presente trabajo fue desarrollado en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD2010-C01-140998, Presupuesto operativo 2014 y 2015.

DEDICATORIAS

A mis papas por todo su amor, apoyo incondicional, comprensión, enseñanzas, por ser un ejemplo de sacrificio, esfuerzo y lucha por la vida. Gracias por todo lo que me han dado, los amo.

A Olivia, Samanta y Sarai por ser mis mejores amigas, críticas, confidentes y por empujarme hacia adelante en todo momento.

A Raúl Flores Pablo por todo el amor que me dio y por haber sido un gran ejemplo luchando por cada momento de su vida, fuiste un gran tío.

A Ubaldo, Viridiana, Gabriela, Stephanie y Sebastian por ser los amigos con los que he compartido esta gran experiencia, buenos y malos momentos han fortalecido nuestra amistad, les agradezco todo su apoyo.

To Diana, Felipe, Melanie and Patrick thank you for sharing your invaluable friendship with me; you made my stay in Germany an amazing experience in my life.

To Dr. Hubner, Maxi, Isa, Janna, Annika, Ann-Kristine, Frie, Ronja, Marie and Dominike for your kindness and sympathy during my time in Germany.

A Mary, Paty, Dr. Gonzalo, Dra. MariToña, Eduardo, S. Gabriel, Kenia, Rubén, Claudia Mayoral, Claudia Ivette, José C., Raúl, Iván, D. María, Marianela, Arturo, Kathia, Yajuan Fu, Xavier, Tania D., Mirna y Maya por ser los compañeros que hace del laboratorio un lugar amigable y divertido.

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
Agradecimientos	II
Dedicatorias	IV
Índice general	V
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	IX
Abreviaturas	X
Resumen	XIII
Antecedentes	
1. Infecciones nosocomiales (IN)	1
2. Generalidades de enterococos	4
3. Factores de virulencia de enterococos	6
4. Importancia clínica de los enterococos	9
5. <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (EFRV)	10
5.1 Mecanismo de resistencia a vancomicina	12
6. Tratamiento de EFRV en IN	15
6.1. Terapia antimicrobiana	15
6.2 Bacteriófagos	16
6.3 Probióticos	17
6.4 Vacunación	17
6.5 Inmunidad pasiva	18
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Métodos	22

Estrategia experimental	22
1. Obtención de las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155	22
1.1 Identificación de la cepa EFRV E155	22
1.2 Curva de crecimiento	23
1.3 Obtención de las fracciones de pared y membrana celular de la cepa EFRV E155	23
1.4 Perfil electroforético de las fracciones celulares de pared y membrana celular de la cepa EFRV E155	24
2. Inmunización de ratones BALB/c	25
3. Producción de anticuerpos monoclonales contra EFRV E155	25
3.1 Líneas celulares y fusión	25
3.2 Selección y clonación de hibridomas	27
3.3 Determinación del isotipo de anticuerpos monoclonales (AcMo)	28
4. Ensayo de Opsonofagocitosis (EOF)	28
5. Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales a polisacáridos asociados a la pared celular de diferentes especies grampositivas por los AcMo	30
5.1 Extracción de la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de enterococos y estafilococos	30
5.2 Inmunodot-Blot	31
Resultados	32
1. Identificación de la cepa EFRV E155	32
2. Curva de crecimiento de la cepa EFRV E155	33
3. Perfil electroforético de las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155	35
4. Producción de hibridomas	36
5. Selección de los AcMo contra la cepa EFRV E155	37
6. Isotipo de los anticuerpos monoclonales	38

7. Ensayo de Opsonofagocitosis (EOF)	39
8. Reactividad cruzada del AcMo contra la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de enterococos y estafilococos	40
Discusión	41
Conclusiones	45
Perspectivas	46
Referencias	47
Anexo I. Técnicas	50
Anexo II. Resultados del análisis por MicroScan	52
Anexo III. Medios y soluciones	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
1. Prevalencia de las IN en el mundo en el periodo 1995-2011.	2
2. Modelo de la pared celular de enterococos.	9
3. Mecanismo de acción de la vancomicina.	13
4. Transposón 1546.	14
5. Estrategia experimental	22
6. Esquema de inmunización en ratones hembras BALB/c entre 6 a 8 semanas de edad con las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155	25
7. Vista esquemática de un ratón, en un corte longitudinal	26
8. Tinción de Gram de la cepa EFRV E155	33
9. Curva de crecimiento de la cepa EFRV E155	34
10. Perfil electroforético de las proteínas de la cepa EFRV E155	36
11. Porcentaje de muerte bacteriana de la cepa EFRV E155 en el ensayo de opsonofagocitosis	39
12. Inmunodot-Blot del reconocimiento del AcMo 11AM contra la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de enterococos y estafilococos	40

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
1. Cepas grampositivas empleadas para la extracción de la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular	31
2. Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa EFRV E155	32
3. Susceptibilidad de la cepa EFRV E155 a antibióticos	32
4. Unidades formadoras de colonias determinadas en la curva de crecimiento de la cepa EFRV E155	35
5. Valores de luminiscencia de las clonas productoras de los anticuerpos monoclonales seleccionadas en un segundo escrutinio	38
6. Isotipo de los anticuerpos monoclonales contra la fracción de pared y membrana celular de la cepa EFRV E155	38

ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpos Monoclonales
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Atm	Atmósferas
AS	Sustancia de agregación (por sus siglas en inglés)
BSA	Albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés)
CBB G-250	Azul brillante de Coomassie G-250
CDC	Centros para el control y la prevención de enfermedades
CO ₂	Dióxido de carbono
CST	Caldo Soya Trypticaseína
DMEM	Medio modificado Dulbecco Eagle
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EOF	Ensayo de Opsonofagocitosis
EFRV	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina
Esp	Proteína de superficie de enterococos
G	Gravedades
G	Gramo
H	Hora
HAT	Hipoxantina Aminopterina Timidina
HT	Hipoxantina Timidina
HRP	Peróxidasa de rábano
IACS	Infecciones asociadas a los cuidados de la salud
IgG	Inmunoglobulina subclase G

IgM	Inmunoglobulina subclase M
IN	Infección nosocomial
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Concentración molar
MIC	Concentración mínima inhibitoria
Min	Minuto
mM	Milimolar
MM	Masa molecular
µg	Microgramo
µl	Microlitro
mL	Mililitro
Mg	Miligramo
Nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial hidrógeno
PVC	Policloruro de vinilo
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
RPMI	Medio del Instituto Roswell Park
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SSI	Solución salina isotónica
SS	Secretaría de Salud
TA	Temperatura ambiente
Tn1546	Transposón 1546
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	Volt
°C	Grados Celsius

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales (IN) son un problema de salud pública en el mundo; la presión selectiva producida por el uso indiscriminado de antimicrobianos, ocasiona que microorganismos resistentes emerjan como causantes de éstas infecciones. Los principales microorganismos causantes de IN a nivel mundial, son el grupo denominado como ESKAPE, acrónimo derivado por las bacterias que lo conforman: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de Enterobacterias.

El interés en la investigación del patógeno oportunista *Enterococcus faecium*, es su alta capacidad de adquisición de factores de virulencia y la resistencia a diversos antibióticos de amplio espectro; como la vancomicina, antibiótico empleado para el tratamiento de bacterias grampositivas resistentes a múltiples fármacos. El amplio uso dado a la vancomicina propició el surgimiento de la cepa *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFRV), por lo que el tratamiento terapéutico es limitado. Es de interés, el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento y/o prevención de las infecciones causadas por EFRV y una opción es la inmunoterapia pasiva con anticuerpos dirigidos contra estructuras específicas de la bacteria.

En este proyecto se generaron anticuerpos monoclonales contra la cepa EFRV E155 aislada de un brote nosocomial, obteniendo las fracciones de pared y membrana celular de la bacteria. Con estas fracciones celulares, se realizó la inmunización a un grupo de ratones hembras BALB/c, para generar anticuerpos específicos contra los determinantes antigénicos de las fracciones celulares. De los ratones, se realizó la extracción del ganglio poplíteo para la obtención de los linfocitos productores de anticuerpos, mismos que fueron fusionados con células de mieloma; obteniendo hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (AcMo). De los AcMo se determinó el isotipo, la capacidad de opsonizar a la bacteria para inducir fagocitosis en polimorfonucleares (PMNs) en un modelo *in vitro* y el reconocimiento que presentan hacia la fracción de polisacáridos asociados a pared celular de la cepa EFRV y de diferentes aislados clínicos de bacterias grampositivas.

Se obtuvieron 39 clonas productoras de AcMo contra las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155. El AcMo 11AM generado contra la fracción de membrana celular, reconoce determinantes antigénicas expuestas en la superficie de la bacteria e inducen su muerte a través del ensayo de opsonofagocitosis; además de reconocer la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de EFRV E155 y de diferentes aislados clínicos de *E. faecium*, *E. faecalis* y *S. aureus*. Por lo que, el AcMo 11AM es un candidato para la evaluación de una inmunoterapia pasiva contra infecciones ocasionadas por enterococos y estafilococos.

ANTECEDENTES

1. Infecciones nosocomiales (IN)

Las infecciones nosocomiales (IN) ó infecciones asociadas al cuidado de la salud (IACS) son las infecciones adquiridas durante las 48 a 72 horas posterior a la admisión hospitalaria del paciente y son consideradas el evento adverso más frecuente en el mundo asociada a los cuidados de la salud. Los trabajadores de la salud, personal auxiliar y familiares también son susceptibles de contraer infecciones nosocomiales (Collins 2008; WHO 2011).

Su impacto resulta en la prolongación de la estancia hospitalaria, discapacidad a largo plazo, riesgo a infección por microorganismos resistentes a antibióticos, gasto financiero adicional para familiares y los sistemas de salud e incremento de la morbilidad y mortalidad del paciente (WHO 2011). La alta frecuencia de las IN es asociada al uso prolongado e inapropiado de antibióticos y dispositivos invasivos como catéteres urinarios y ventiladores.

Los factores de riesgo asociados a las IN son por el paciente, el hospital ó centro de salud de admisión y el área de hospitalización; éstos factores de riesgo difieren entre países desarrollados y en vías de desarrollo. En países en vías de desarrollo los factores asociados a la adquisición de IN son mala higiene y sanidad, falta ó escasez de equipo básico, infraestructura inadecuada, entorno social desfavorable, población afectada por desnutrición u otro tipo de infecciones ó enfermedades; lo cual se ve reflejado en un incremento de la prevalencia (Collins 2008; WHO 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó la prevalencia de IN en el 2011, para países desarrollados de 3.5-12% y en países en vías de desarrollo de 5.4-19.1% en el periodo de 1995-2010 (Figura 1); éstas diferencias son asociadas al incremento de factores de riesgo en países en vías de desarrollo, mencionados previamente. Además, la

OMS reportó que de cada 100 pacientes hospitalizados, siete en países desarrollados y 10 en países en vías de desarrollo adquirirán al menos una IN; las infecciones más frecuentes son las de tracto urinario y en el sitio de cirugía respectivamente (WHO 2011).

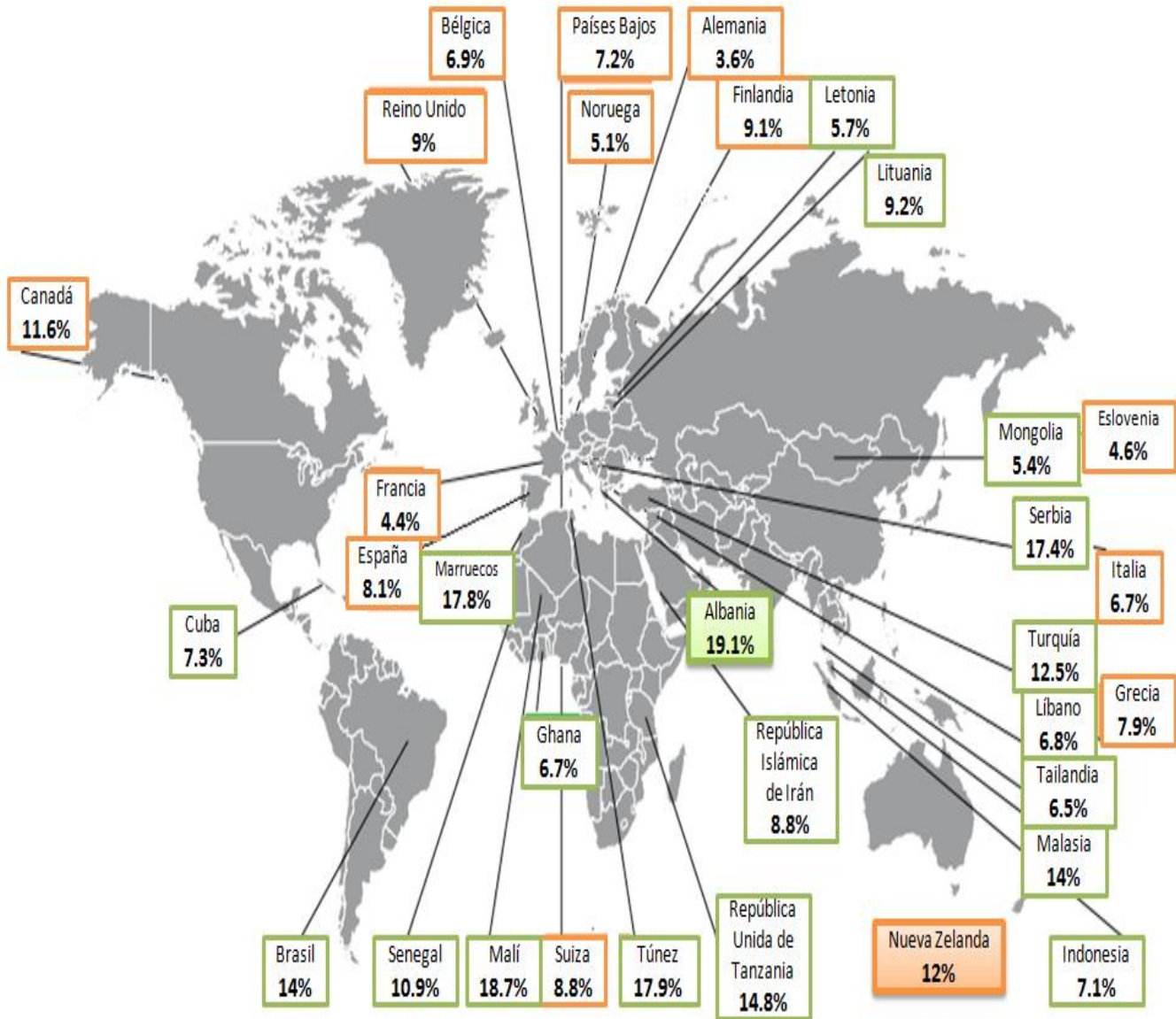


Figura 1. Prevalencia de las IN en el mundo dentro del periodo de 1995-2011. Los cuadros color verde resaltan la prevalencia en países en vías de desarrollo y los cuadros color anaranjado la prevalencia en países desarrollados. Modificado de: ©World Health Organization, Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Clean care and safer care, 2011.

En México en el 2011, la Secretaría de Salud (SS) determinó la prevalencia de hospitales generales de las principales instituciones de salud pública, reportando una prevalencia en IN del 21%, dato obtenido de la revisión de pacientes y expedientes. La prevalencia fue superior a la reportada por la OMS para países en vías de desarrollo, lo que se asocia al diagnóstico clínico condicionado por la falta de recursos de laboratorio de microbiología para la confirmación de las IN, mientras que las cifras internacionales se basan en el diagnóstico microbiológico confirmado; además, de los hospitales evaluados solo el 49% reporta los casos de IN a la Red Hospitalaria para la Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), red que recopila la información de los sectores de salud y generar los datos epidemiológicos de IN y otras enfermedades en México de acuerdo a la NOM-045-SSA2-2005 (NOM-045 2005; Pública 2011; WHO 2011). Con esta información se sugiere que la prevalencia de IN en México está subestimada por la OMS.

Para el 2014 se calculó que alrededor de 30 muertes por cada 100 000 habitantes en México se atribuyen a las IN, siendo la cuarta causa de mortalidad nacional, muy por encima de los accidentes ó el crimen organizado, por lo que el control de las IN debe ser una prioridad para los sectores de salud pública en el país (Ponce-de-León-Rosales 2014).

Las IN son causadas por agentes infecciosos provenientes de fuentes exógenas o endógenas. Las fuentes exógenas son ajenas al paciente, provenientes de los trabajadores de la salud, visitas, equipo de atención al paciente, dispositivos médicos ó del ambiente en el sitio de atención. Mientras que las fuentes endógenas provienen de la microbiota que coloniza diferentes sitios del cuerpo como la piel, el tracto gastrointestinal, vagina, nariz, boca, etc.; estos microorganismos causan infecciones bajo condiciones favorables al patógeno y/ó cuando colonizan sitios estériles, la transmisión a estos sitios ocurre a través de las manos de los trabajadores de la salud ó por cambio del microorganismo comensal a patógeno oportunista (Collins 2008; WHO 2011).

Los principales patógenos asociados a las IN son el grupo conocido como ESKAPE, acrónimo dado por el grupo de especies que lo conforman: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de Enterobacterias; éste grupo se caracteriza por resistencia a antibióticos de consideración terapéutica empírica hasta la resistencia a antibióticos de opciones alternativas de tratamiento. Al grupo ESKAPE se les atribuye más del 40% de las IN (Rice 2010; Ye, Zhao et al. 2014).

Siendo *E. faecium* una bacteria de interés en su estudio por su alta tasa de resistencia a un amplio repertorio de antibióticos, lo que ocasiona opciones terapéuticas limitadas para el tratamiento de infecciones causadas por éste; como es el caso de *E. faecium* resistente a vancomicina (EFRV), la cual actualmente es causa importante de brotes nosocomiales en el mundo y es una cepa resistente al antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas resistentes a múltiples fármacos (Arias and Murray 2012).

El incremento de IN por *E. faecium* es consecuencia de la resistencia que éste presenta contra antibióticos de uso común y de amplio espectro como la ampicilina y la vancomicina. Actualmente, el 80% del total de cepas de *E. faecium* recuperadas de muestras clínicas en EUA son resistentes a vancomicina (EFRV) y el 90% son resistentes a ampicilina (Koch 2004; Fisher and Phillips 2009; Arias and Murray 2012). El incremento asociado a las IN causadas por cepas EFRV hace relevante el estudio de éste patógeno, así como la búsqueda de nuevas opciones para su tratamiento.

2. Generalidades de enterococos

Los enterococos son cocos grampositivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos, no formadores de esporas y su agrupación característica es en cadenas cortas, en pares ó de forma individual. Este género es identificado por el bajo contenido de guanina-citosina

que presenta en su ADN genómico (<50% mol). Los enterococos tienen la capacidad de crecer en un amplio intervalo de temperatura (5-50°C) y de pH (4.5-9.9), con un crecimiento óptimo a 37°C y pH 7.5; además toleran la presencia de concentraciones altas de sales biliares [40% (m/v)] y hasta un 6.5% de NaCl.

Estas bacterias sobreviven al calentamiento a 60°C por 30 min lo que hace a las especies de enterococos distinguibles del género más cercanamente relacionado que son los estreptococos; también se distinguen por su capacidad de hidrolizar la L-pirridonil-3-naftilamina (PYR). Existen características bioquímicas que diferencian a las especies más cercanamente relacionadas como son *E. faecium* y *E. faecalis*, estas son: la inhibición por telurito de potasio, reacciones de fermentación e incapacidad en reducir el tetrazolio a formazan (Murray 1990; Gilmore 2002; Fisher and Phillips 2009).

Se estima que al menos el 25% del genoma de los enterococos está compuesto de elementos genéticos móviles y de ADN exógeno, incluyendo transposones de conjugación, islas de patogenicidad, genes de plásmidos integrados, regiones de fagos y un alto número de secuencias de inserción (IS). El 6.4% del genoma está asociado a proteínas de superficie y el 22.6% de los genes marcan la diferencia entre *E. faecium* y *E. faecalis*; se considera que estos genes están implicados en la evasión de la respuesta inmune en cada especie (Giridhara Upadhyaya, Ravikumar et al. 2009).

Los enterococos muestran resistencia intrínseca a antibióticos, como característica presente en casi todas las especies, y también presentan resistencia adquirida. Los enterococos tienen resistencia intrínseca a penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, bajos niveles de aminoglucósidos y clindamicina. La resistencia ó tolerancia a los beta-lactámicos es una de las principales características de estos organismos, debido a la baja afinidad que presentan a las proteínas de unión a penicilina. Con respecto a la resistencia adquirida, las cepas de enterococos son resistentes a cloranfenicol, eritromicina, altas

concentraciones de clindamicina y aminoglucósidos, tetraciclina, penicilina, fluoroquinolonas y vancomicina (Murray 1990; Arias and Murray 2012).

3. Factores de virulencia de los enterococos

Los diferentes factores que determinan la virulencia del enterococo, le permiten la adherencia a células del hospedero y a la matriz extracelular, facilitan la invasión de tejidos, tienen efecto en la inmunomodulación en el hospedero y causan daño mediado por toxinas (Jett, Huycke et al. 1994). Entre los principales factores de virulencia del enterococo se encuentran:

- Factores secretados

Gelatinasa y el sistema de dos componentes *fsr*. La gelatinasa es una proteasa de secreción bacteriana capaz de hidrolizar colágeno, caseína y hemoglobina, además está relacionada a la formación de biopelículas y con la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Giridhara Upadhyaya, Ravikumar et al. 2009). Su producción es asociada con el sistema de dos componentes *fsr*, mismo que está conformado por cuatro genes *fsr* (A, B, D y C) y responde a la acumulación extracelular de lactona, codificada por *fsrD*. El locus *fsr* activa la expresión de otros genes involucrados en la virulencia y el metabolismo de la bacteria (Sava, Heikens et al. 2010).

Hemolisina-citolisina. Es una proteína citolítica capaz de lisar eritrocitos, células retinales, neutrófilos y macrófagos. Está codificada en islas de patogenicidad o en plásmidos de respuesta a feromonas (Sava, Heikens et al. 2010).

- Determinantes en la superficie celular

Sustancia de Agregación (AS). Grupo de proteínas de superficie ancladas a la membrana celular y asociadas a la pared celular de la bacteria, su expresión es inducida por

plásmidos de respuesta a feromonas ó por factores del hospedero durante su crecimiento *in vivo* (Arias and Murray 2012).

Dentro de este conjunto de proteínas Asa I, Asp I y Acs 10 son las más estudiadas y muestran más del 90% de identidad en su secuencia de aminoácidos entre ellas. La AS se une a receptores de las células eucariotas como integrinas, incrementando la adhesión de la bacteria a células intestinales, renales tubulares (Asa I), así como la adherencia y sobrevivencia en macrófagos (Asa I). También incrementan la internalización y sobrevivencia intracelular en PMNs (Asc 10). En los enterococos promueven la conjugación por agregación o aglutinación; y además facilitan el intercambio de plásmidos que contienen genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Murray 1990; Sava, Heikens et al. 2010).

Proteína de superficie de enterococos (Esp). Es una proteína de alrededor de 200kDa, anclada a la pared celular de la bacteria, codificada dentro de una isla de patogenicidad (Arias and Murray 2012); se considera un factor asociado a virulencia en modelo animal, formación de biopelícula y varios otros tipos de fenotipos relacionados a patogenicidad, por lo que está involucrada en la colonización del tracto urinario y endocarditis. Esta proteína está ampliamente distribuida entre las cepas de *E. faecalis*, mientras que en *E. faecium* solo se encuentra en aislados provenientes de hospital (Sava, Heikens et al. 2010).

Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs). Son considerados elementos importantes en los estados tempranos de la infección de la bacteria, ya que pueden unirse a componentes extracelulares de la matriz del hospedero. En los genomas de *E. faecium* y *E. faecalis* se identificaron 15 y 17 MSCRAMMs respectivamente, de las cuales siete han sido caracterizados: Ace (adhesina de colágeno de *E. faecalis*), Fss1, Fss2 y Fss3 (proteína de superficie de *E. faecalis*), Acm (adhesina de colágeno de *E. faecium*), Scm (segunda adhesina de colágeno *E. faecium*) y

EcbA (proteína A de unión a colágeno *E. faecium*). Los MSCRAMMs han sido identificados en aislados clínicos y no clínicos (Giridhara Upadhyaya, Ravikumar et al. 2009).

Pili. Está asociado a la adhesión de los enterococos a células humanas y a la formación de biopelículas. *E. faecium* alberga cuatro grupos de genes asociados a la expresión del pili, sin embargo, en aislados clínicos solo se encontró la expresión de dos tipos (PiliA y PiliB) por cada célula bacteriana por lo que aún no se determina si ambos pilis contribuyen a la patogenia de *E. faecium* (Sava, Heikens et al. 2010).

Polisacáridos capsulares. La pared celular de los enterococos está constituida por peptidoglicano, proteínas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas y varios glicoconjugados (Figura 2) (Hancock, Murray et al. 2014); los polisacáridos contribuyen a la evasión del sistema inmune del hospedero previniendo la activación del complemento y/o reconocimiento bacteriano por fagocitos y estimulación de citocinas (Arias and Murray 2012). Las especies de *E. faecalis* se agrupan en cuatro serotipos capsulares (A-D), siendo los serotipos C y D los resistentes a opsonofagocitosis. Para *E. faecium* no hay clasificación publicada de los polisacáridos capsulares, sin embargo, hay evidencia de que uno de cada tres aislados clínicos es eliminado eficientemente por anticuerpos anti-ácido lipoteicoico sugiriendo la ausencia de cápsula (Sava, Heikens et al. 2010). Un polisacárido antigénico de enterococos (Epa) anclado a la pared celular, es un factor de virulencia de la bacteria, que contribuye a la formación de biopelícula, traslocación a enterocitos así como mayor resistencia a PMNs (Sava, Heikens et al. 2010; Arias and Murray 2012).

Glicolípidos. Son moléculas que participan en la formación de una pared permeable entre la membrana celular y el microambiente; asociados con formación de biopelículas y reconocen matrices extracelulares de las células humanas por lo que están implicados en la adhesión bacteriana (Sava, Heikens et al. 2010). Los glicolípidos más abundantes son el

ácido teicoico y el ácido lipoteicoico, los cuales se encuentran anclados a la pared y membrana celular respectivamente (Figura 2) (Hancock, Murray et al. 2014).

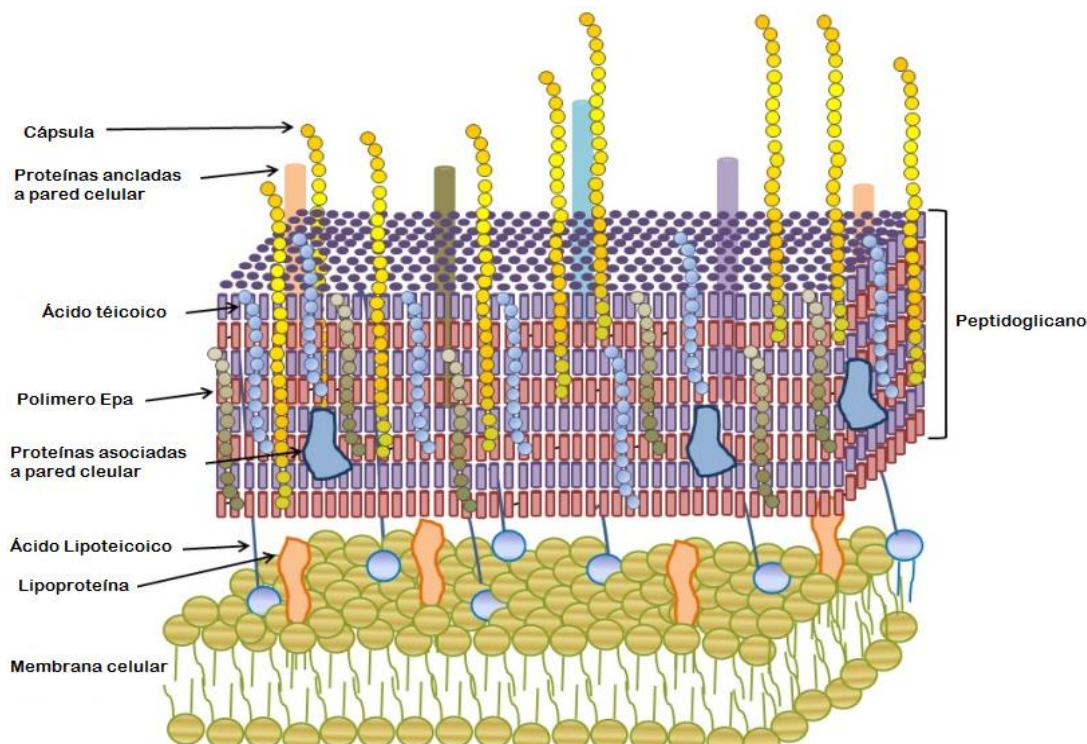


Figura 2. Modelo de la pared celular de enterococos. Modificado de “Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection. Capítulo 5. Enterococcal cell wall components and structures” por Hancock, L.E., B.E. Murray, et al (2014) bajo licencia internacional de CC BY-NC-ND 4.0.

4. Importancia clínica de los enterococos

Los enterococos son parte esencial de la microbiota animal y humana, siendo *E. faecalis* y *E. faecium* las especies más comunes en el tracto gastrointestinal humano (10^8 UFC/g heces) (Gilmore 2002). A pesar de que estas bacterias son comensales fisiológicos en los humanos, son considerados patógenos oportunistas ya que cuando se interrumpe la relación comensal-hospedero el enterococo es capaz de causar endocarditis, bacteriemia, meningitis, infecciones intra-abdominales y del tracto urinario (Murray 1990; Koch 2004).

El mecanismo por el cual el enterococo pasa de comensal a patógeno no está bien definido; se sugiere que cuando el enterococo coloniza el intestino está bajo el control del mecanismo inmune del hospedero, pero en algún momento la bacteria desarrolla la capacidad de evadirlos y ocupar nuevos nichos ó aprovechar un estado debilitado del sistema inmune del hospedero lo que permite su translocación del lumen intestinal y al torrente sanguíneo, lo que eventualmente resulta en una diseminación sistémica (Murray 1990; Gilmore 2002).

E. faecalis es la especie más aislada de muestras clínicas humanas, seguida por *E. faecium*; sin embargo, el incremento de IN causadas por *E. faecium* indujo a un reemplazamiento parcial de éste como causa principal de IN por enterococos, debido a que es intrínsecamente resistente a más antibióticos, limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones, lo cual impacta en una mayor mortalidad para el paciente (Murray 1990).

5. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFRV)

La vancomicina es un antibiótico de la familia de los glucopéptidos que es empleado como última línea de tratamiento, contra estreptococos y enterococos multidrogo resistentes (Patel, 2003); el surgimiento de la resistencia de los enterococos a la vancomicina se atribuye al incremento en el uso oral de vancomicina para el tratamiento documentado o presunción de enterocolitis causada por *Clostridium difficile*, causando una presión selectiva en las cepas de enterococos que forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal en humanos; otro factor relacionado fue el uso de la avoparcina (glucopéptido estructuralmente similar a la vancomicina) como promotor de crecimiento en ganado (Moellering 1998).

El primer aislamiento reportado de EFRV fue a finales de 1980 en Reino Unido y su aislamiento se vio incrementado desde 1990 en EUA y Europa; por ejemplo en el 2000 se presentaron 9,820 aislamientos de EFRV en hospitales de EUA, mientras que en el 2006 fueron 21,352 aislamientos. En Europa existió una fuerte relación con el uso de avoparcina en ganado y el surgimiento de las cepas EFRV; aunque actualmente esta distribución geográfica no es exclusiva de países desarrollados (Arias and Murray 2012; Ochoa, Escalona et al. 2013).

En México existen dos reportes de aislamientos de EFRV, el primer reporte fue realizado en el periodo del 2004- 2005 en un Hospital de Tercer Nivel; en éste se demostró un incremento de 23 veces en los aislamientos clínicos causados por EFRV. El segundo reporte fue realizado en el periodo 2009- 2011 en un Hospital Infantil de Tercer Nivel, periodo en el que se documentaron 12 aislamientos de EFRV (Cuellar-Rodríguez, Galindo-Fraga et al. 2007; Ochoa, Escalona et al. 2013). Actualmente, existe un estudio en desarrollo por Volkow- Fernández y *col.* en el cual se realiza el seguimiento de las IN en el área de Hemato-oncología durante el período 2001 – 2013 en un Hospital Oncológico de Tercer Nivel en México, en éste hospital se reportó el primer aislamiento de una cepa EFRV en el 2008, asociado al uso de vancomicina para el tratamiento de un brote de infecciones causadas por *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR); a partir del 2008 y hasta el término del reporte la tasa de aislamientos causantes de IN por EFRV es considerablemente elevada (Volkow- Fernández y cols, manuscrito en preparación).

Los factores de riesgo asociados a la colonización o infección por EFRV son: neutropenia, estancia prolongada en hospital, tratamiento con antibióticos de amplio espectro, terapia previa con agentes activos contra anaerobios, insuficiencia renal, hospitalización en un servicio de trasplante hematológico de médula ósea y uso parenteral de vancomicina con cefalosporinas de tercera generación (Cetinkaya, Falk et al. 2000). No existen diferencias significativas en la mortalidad asociada a infecciones por enterococos resistentes o

susceptibles a vancomicina; ya que no hay evidencia de que las cepas de EFRV sean más virulentas que las cepas sensibles de la misma especie de enterococos, la diferencia radica en el tratamiento al que deben ser sometidos los pacientes (Papadimitriou-Olivgeris, Drougka et al. 2014).

El modo más común de transmisión en hospitales es a través de las manos de los trabajadores de la salud, aunque también se transmite por equipo médico contaminado, por contacto de paciente-paciente ó por superficies contaminadas. No hay prueba de que el enterococo se propague por vía aérea, aunque existen evidencias de trasmisión por alimentos contaminados en algunas zonas geográficas de Europa (Murray 1990; Arias and Murray 2012).

5.1 Mecanismo de resistencia a vancomicina

La vancomicina es un glicopéptido que se une con a alta afinidad a los precursores del peptidoglicano con terminación D-Ala-D-Ala, formando un complejo que bloquea su incorporación a la pared celular (Figura 3) (Arthur, Reynolds et al. 1996; Cetinkaya, Falk et al. 2000). La resistencia a vancomicina se genera a partir de la producción de precursores del peptidoglicano de baja afinidad, resultado de la modificación de las terminaciones D-Ala por serina (D-Ala-D-Ser) o lactato (A-Ala-D-Lac); debido a la acción de un conjunto de enzimas codificadas por genes organizados en un operón.

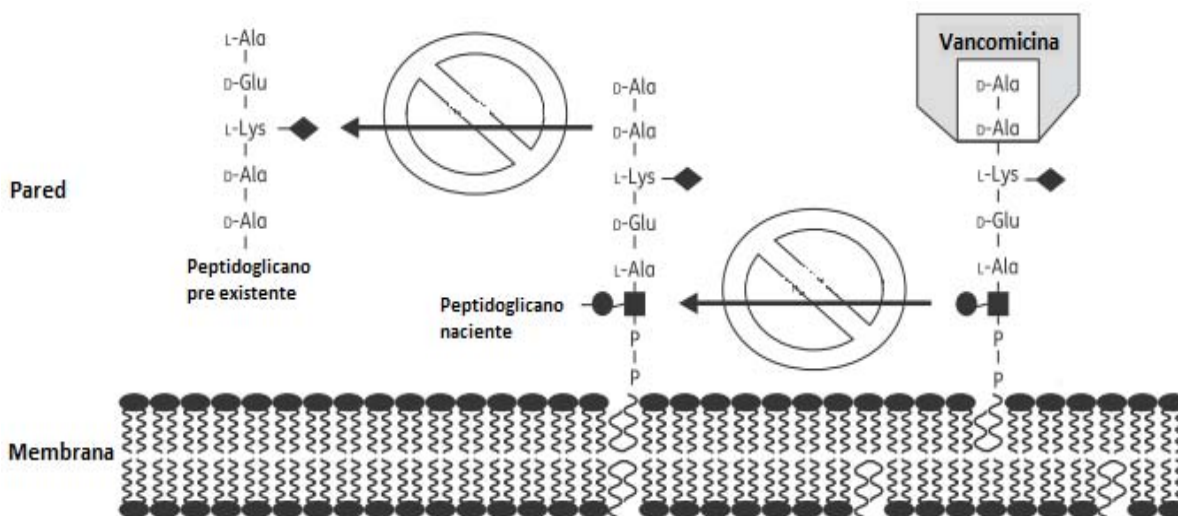


Figura 3. Mecanismo de acción de la vancomicina. La síntesis del peptidoglicano comienza en el citoplasma de la bacteria con la formación de los precursores, los cuales son transportados a través de la membrana celular al exterior. Los precursores del peptidoglicano tienen terminaciones D-Ala-D-Ala, a los cuales se une la vancomicina con alta afinidad bloqueando la unión de estos precursores al peptidoglicano, inhibiendo la formación de la pared celular. Modificado de Cattoir V. and Leclercq R. "Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?" J. Antimicrob Chemother. 2013; 68: 731-742; con permiso de Oxford University Press.

Existen a la fecha, ocho tipos de resistencia adquirida a la vancomicina con base a criterios fenotípicos y genotípicos: VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN; además hay un tipo de resistencia intrínseca: VanC, la cual es exclusiva de algunas especies de enterococos. Estos tipos de resistencia se localizan en elementos genéticos móviles ó en el cromosoma. Los tipos de resistencia VanA y VanB son los más frecuentemente detectados en enterococos y a los cuales están asociados a los brotes nosocomiales en el mundo, además son encontrados ocasionalmente en cepas de estafilococos (Courvalin 2006; Cattoir and Leclercq 2013).

El principal tipo de resistencia a vancomicina es el VanA, el cual consiste en la resistencia inducible a altos niveles de vancomicina (MIC 64->1000 mg/L) y teicoplanina (MIC 16-512 mg/L); este genotipo de resistencia esta codificado en el transposón 1546 (Tn1546) y en

elementos cercanamente relacionados (Figura 4). El Tn1546 contiene 7 genes, los cuales codifican para: un sistema de regulación de dos componentes (VanR y VanS), una deshidrogenasa (VanH) que reduce el piruvato a D-Lac, una ligasa (VanA) que cataliza la formación del enlace D-Ala-D-Lac, una dipeptidasa (VanX) que hidroliza los enlaces D-Ala-D-Ala eliminando los precursores con terminación D-Ala y un grupo de proteínas accesorias (VanY y VanZ) las cuales no son esenciales para la resistencia a la vancomicina (Arthur, Reynolds et al. 1996; Courvalin 2006).

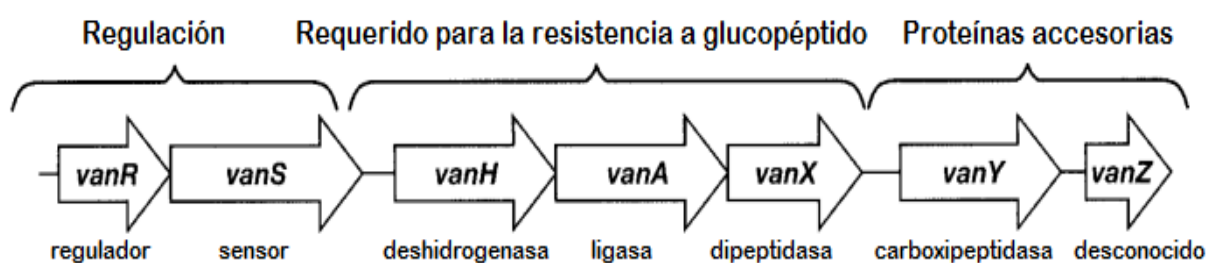


Figura 4. Transposón 1546. El Tn1546 codifica para la resistencia a vancomicina VanA, en la imagen se muestran los genes que codifican para el sistema de regulación (VanR y VanS), los requeridos para la resistencia a vancomicina (VanH, VanA y VanX) y para proteínas accesorias (VanY y VanZ). Modificado de Courvallin, P. "Vancomycin resistance in gram-positive cocci". Clin Infect Dis. 1996; 42 Suppl 1 S25-34; con permiso de Oxford University Press.

Las cepas que presentan el fenotipo VanB son resistentes a niveles variables de vancomicina (MIC 4-1,024 mg/L) y sensibles a teicoplanina (MIC <0.5 mg/L), este tipo de resistencia adquirida es debida a la síntesis de precursores de peptidoglicano con terminaciones D-Ala-D-Lac, conferido por el Tn1547, cuya organización y funcionalidad es muy similar al Tn1546 (resistencia VanA) pero difiere en su regulación ya que solo la vancomicina induce los genes del operón, no así la teicoplanina (Courvalin 2006).

El fenotipo VanC confiere resistencia intrínseca a bajos niveles de vancomicina (MIC 2-32 mg/L) y sensible a teicoplanina; los genes están codificados en el cromosoma de todos los *E. casseliflavus*, *E. gallinarium* y *E. flavescens* y estos genes no son transferibles. La ligasa VanC favorece la formación de precursores con terminaciones D-Ala-D-Ser, modificación

que induce una unión débil de la vancomicina a los precursores de peptidoglicano (Cetinkaya, Falk et al. 2000).

Es importante señalar que las cepas de enterococos resistentes a vancomicina son genéticamente diversas, los brotes nosocomiales pueden ser monoclonales, oligoclonales o policlonales; y que ciertas clonas se establecen como cepas endémicas. Además, la epidemiología molecular de EFRV impacta dentro de una institución individual conforme el tiempo (Cetinkaya, Falk et al. 2000; Patel 2003)

6. Tratamiento de EFRV en IN

El incremento en el porcentaje de IN causadas por EFRV se asocia a un aumento en la mortalidad del paciente, así como a opciones terapéuticas limitadas (Koch, Hufnagel et al. 2004). Existen diferentes opciones preventivas y terapéuticas contra las infecciones por enterococos que son empleadas y/o evaluadas para su uso; estas se describen a continuación.

6.1 Terapia antimicrobiana

La resistencia a antibióticos es desarrollada por el uso y mal uso de éstos, ya que causan una presión selectiva sobre las bacterias permitiendo el surgimiento de cepas multidrogo resistentes; aunado a esto, los enterococos adquieren resistencia a antibióticos a través de genes codificados en plásmidos, islas de patogenicidad ó transposones; además de que tienen la habilidad de transferir estos determinantes a otras bacterias más virulentas, como es el caso de *S. aureus* (Koch, Hufnagel et al. 2004).

Solo dos antibióticos están aprobados por la FDA (Administración de fármacos y alimentos en EUA) para el tratamiento de las infecciones causadas por EFRV: linezolid y quinupristina-dalfopristina, que son eficaces para el tratamiento de bacterias grampositivas multidrogo resistentes, sin embargo, el reporte aislados o brotes por cepas

resistentes a estos antibióticos fue descrito. (Chow, Donahedian et al. 1997; Seedat, Zick et al. 2006; Patel, Memari et al. 2013).

Existen otros antibióticos clínicamente disponibles como: daptomicina, oxazolidinonas y estreptograminas; que se usan en combinación con otros antibióticos; sin embargo, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro genera efectos secundarios en el paciente, afectando la microbiota normal fisiológica. La restricción del uso de antibióticos y las guías de su uso ayuda a disminuir la generación de cepas resistentes a múltiples fármacos (Koch, Hufnagel et al. 2004).

6.2 Bacteriófagos

Los bacteriófagos se usan exitosamente en el tratamiento de infecciones causadas por una variedad de patógenos humanos. La terapia con bacteriófagos provee ciertas ventajas como especificidad a patógenos resistentes, evita el daño a la microbiota normal y la capacidad de reproducirse en el sitio de infección paralela al comportamiento cinético del patógeno. Los resultados generados en el tratamiento de infecciones causadas por EFRV en modelo murino son favorables, con resultados de 100% de supervivencia aún con dosis letales de enterococos (Biswas, Adhya et al. 2002).

No obstante existen desventajas en el uso de bacteriófagos, ya que la producción y los controles de seguridad de un bacteriófago nuevo son un proceso largo, se debe identificar la fuente de infección previo a la terapia ya que existe el riesgo de una reacción anafiláctica y neutralizarlos con anticuerpos del hospedero, generando una terapia ineficaz (Sulakvelidze, Alavidze et al. 2001; Koch, Hufnagel et al. 2004).

6.3 Probióticos

Una opción para la prevención de las IN es el uso de probióticos, es decir, la administración de cepas no virulentas al hospedero (como bacterias ácido lácticas), lo que lleva a la colonización del tracto gastrointestinal y la formación de una barrera bacteriana en la mucosa que evitará que las bacterias patógenas como EFRV colonicen ó proliferen e infecten al hospedero. Cabe señalar que la administración de bacterias probióticas puede generar enfermedades de riesgo mortal, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, por lo que su administración debe ser monitoreada (Isolauri 2001; Koch, Hufnagel et al. 2004).

6.4 Vacunación

La vacunación es empleada para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas. Para el caso de los enterococos se describen que la mayoría de los aislados clínicos presentan cápsula (Koch, Hufnagel et al. 2004) por lo que se realizaron la búsqueda de antígenos capsulares que sean blancos para el desarrollo de vacunas.

En 1999, Huebner y col. describieron la estructura de un serotipo capsular de enterococos, compuesto de kojibiosa, que está asociado a los ácidos teicoicos de la pared celular (Huebner, Wang et al. 1999). Éste polisacárido capsular fue empleado para inmunizar a un grupo de ratones Swiss-Webster y posteriormente retarlas con una cepa de enterococos. Cinco días posteriores al reto, los ratones fueron sacrificados para determinar el número de bacterias presentes en diferentes órganos y compararlos con un grupo control inmunizado con un polisacárido de *P. aeruginosa*. El número de bacterias presentes en los ratones inmunizados con el polisacárido capsular de enterococos fue significativamente menor comparado con el grupo control; con estos resultados demostraron la inmunidad protectora conferida por el polisacárido frente el reto con enterococos, en un modelo murino (Huebner, Quaas et al. 2000).

Estos hallazgos resultan muy prometedores, aún se requiere investigar si estos resultados son similares en otros modelos animales más cercanamente relacionados al humano así como evaluar los efectos adversos y la viabilidad de su uso en pacientes inmunocomprometidos (Huebner, Wang et al. 1999).

6.5 Inmunoterapia pasiva

Actualmente el surgimiento de patógenos resistentes a los antibióticos disponibles, genera la necesidad de buscar otras opciones terapéuticas como la inmunoterapia pasiva; la cual es empleada contra muchos microorganismos responsables de enfermedades en el humano como virus, hongos, parásitos y bacterias; los anticuerpos fueron efectivos contra los antígenos microbianos o sus productos, como toxinas. (Oral, Ozakin et al. 2002; Casadevall, Dadachova et al. 2004). El mecanismo de eficacia de la terapia con anticuerpos está relacionado con la presencia ó previa estimulación de la respuesta inmune celular y conferir protección frente a enfermedades infecciosas en pacientes inmunocomprometidos.

En infecciones causadas por enterococos la inmunización pasiva mostró resultados exitosos en modelos animales como ratón y conejo, por lo que parece ser una buena alternativa para seguir investigando (Huebner, Quaas et al. 2000; Koch, Hufnagel et al. 2004). Aunque los mecanismos de patogenicidad de los enterococos son poco conocidos, se conocen factores de virulencia asociados a la membrana y a la pared celular involucrados en la adhesión y virulencia de la bacteria que serían blancos para el desarrollo de anticuerpos específicos.

La inmunoterapia pasiva con inmunoglobulinas contra estructuras específicas de enterococos, genera un uso adicional ó alternativo para la prevención y/ó tratamiento de infecciones causadas por enterococos en pacientes susceptibles; los cuales requieren protección durante la hospitalización (Koch 2004; Koch, Hufnagel et al. 2004).

JUSTIFICACIÓN

El creciente predominio de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFRV) como causante de infecciones nosocomiales en México y en el mundo, aunado a las limitadas opciones terapéuticas que existen para el control de la infección; genera la necesidad de alternativas para la prevención y tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria. Una propuesta, es el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos contra estructuras antigénicas de las fracciones de membrana y pared celular de una cepa de EFRV, los cuales podrían ser empleados en terapias de inmunización pasiva.

HIPÓTESIS

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra estructuras antigénicas de la membrana y pared celular de una cepa de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina serán capaces de inducir la eliminación de la bacteria por polimorfonucleares.

OBJETIVO GENERAL

Generar y caracterizar anticuerpos monoclonales opsonizantes dirigidos contra estructuras antigénicas de las fracciones de membrana y pared celular de una cepa de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFRV).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155.
- Generar una respuesta inmune humoral en ratones BALB/c contra las fracciones de membrana y pared de la cepa EFRV E155.
- Producir y seleccionar anticuerpos monoclonales que reconozcan las fracciones de membrana y pared de la cepa EFRV E155.
- Seleccionar los anticuerpos monoclonales opsonizantes de la cepa EFRV E155 a través de ensayos de fagocitosis.
- Determinar el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales hacia la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de la cepa EFRV E155 y de diferentes patógenos nosocomiales.

MÉTODOS

- Estrategia experimental

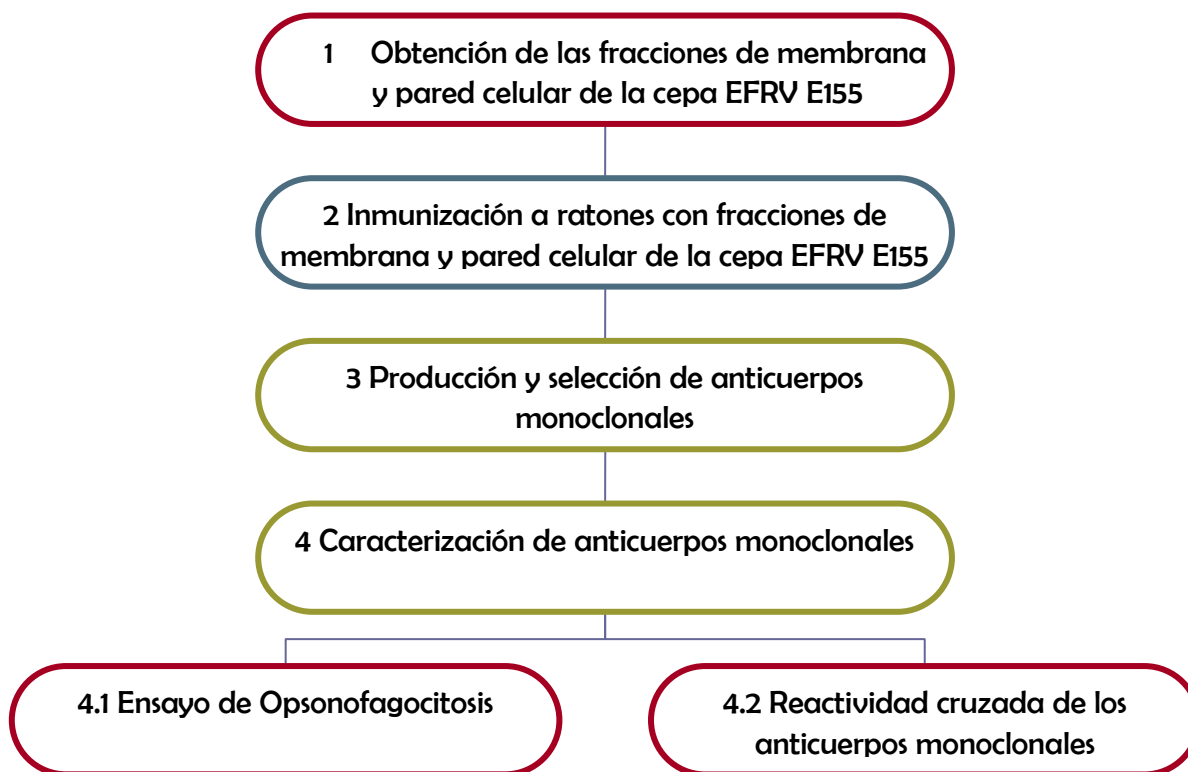


Figura 5. Estrategia experimental. El proyecto de investigación fue dividido en una secuencia de cuatro etapas principales, representadas en el esquema.

1. Obtención de las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155

1.1 Identificación de la cepa EFRV E155

La cepa EFRV E155 fue donada por el Dr. Johannes Hubner de la Universidad de Freiburg, Alemania. La identidad de la cepa y su perfil de resistencia a antibióticos fue realizada, para ello, las microplacas MicroScan se utilizaron, las cuales permiten evaluar 23 pruebas bioquímicas y 21 pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

La cepa se cultivó en medio sólido agar sangre a 37°C por 24 h, del cultivo se tomó una colonia aislada y se diluyó en solución amortiguadora salina; de esta dilución se adicionó

150 μ L por pozo a una microplaca MicroScan, la cual se incubó a temperatura ambiente (TA) por 48 h; los resultados obtenidos fueron evaluados de forma manual y automática con el equipo MicroScan AutoScan-4.

1.2 Curva de crecimiento

Con la curva de crecimiento se determinaron los tiempos de las diferentes fases de crecimiento de la cepa EFRV E155; para su determinación se realizó un cultivo de la cepa en agar soya tripticaseína (AST, BD) a 37°C por 24 h. Una colonia aislada se transfirió a 50 mL de caldo soya tripticaseína (CST, BD) para la elaboración de un precultivo, el cual fue incubado bajo las condiciones descritas previamente. Para verificar la pureza del cultivo se realizó una tinción de Gram.

Del precultivo se tomó 1 mL y se inoculó en 100 mL de CST por triplicado, la DO_{600nm} se midió cada hora comenzando en el tiempo cero hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento, en cada tiempo se tomaron 100 μ L del cultivo y se diluyeron en 900 μ L de agua realizando las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . De las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se tomaron 10 μ L por duplicado e inocularon en AST; las placas se incubaron por 24 h a 37°C y se cuantificó el número de colonias por dilución para obtener el valor de UFC/mL, el cual fue relacionado con la DO_{600nm} determinada en cada una de las fases de crecimiento bacteriano.

1.3 Obtención de las fracciones de pared y membrana celular de la cepa EFRV E155

El cultivo de EFRV E155 se realizó en 2 L de CST, el cual fue cosechado en la fase media logarítmica por centrifugación a 5000 g por 15 min a TA, el botón celular se resuspendió en PBS y posteriormente en solución amortiguadora suplementada con lisozima (Sigma) (10 mM Tris-HCl pH=8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% sacarosa, 10 mg/mL lisozima) se incubó toda la noche a 37°C, con agitación moderada. Para separar la fracción de pared

celular de la muestra, el cultivo se centrifugó a 8,823 g por 10 min a 4°C; se obtuvo el sobrenadante que corresponde a la fracción de pared celular y en el sedimento los protoplastos, los cuales fueron diluidos en PBS.

Posteriormente, los protoplastos se lisaron por sonicación, con pulsos de 20 segundos (con inhibidor de proteasas), durante el proceso de sonicación se realizó tinciones de Gram para establecer el momento de la lisis total de los protoplastos. El lisado celular fue separado por ultracentrifugación a 210,000 g por 2.5 h a 4°C, se obtuvo el sobrenadante con la fracción de membrana celular y en el sedimento la fracción citoplasmática, la cual se resuspendió en Tris-HCl 20 mM. Las fracciones de pared, membrana y citoplasma obtenidas fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

1.4 Perfil electroforético de las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155

En cada fracción celular se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Anexo I Técnicas) y las muestras se ajustaron a una cantidad de 25 µg de proteína para cada fracción.

Las muestras se mezclaron con buffer Tris-base (1:1) y se incubaron por 10 min en agua a 96°C. Las muestras se colocaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y el gel se corrió a 100 V por 2 h. El gel fue teñido con azul de Coomassie coloidal (Silver blue) y la imagen fue capturada con el densitómetro Molecular Imagen GS-800 (BIO-RAD), empleando el programa Quantity One (BIO-RAD).

2. Inmunización de ratones BALB/c

Un grupo de 9 ratones hembras BALB/c de entre 6-8 semanas fue inmunizado vía subcutánea en el muslo trasero derecho de la siguiente forma: 3 ratones con la fracción de pared celular, 3 ratones con la fracción de membrana celular y 3 ratones con solución salina isotónica (SSI). Se realizaron seis inmunizaciones locales durante un periodo de 17 días, con el esquema de inmunización de la Figura 6 (Niebuhr 1998). Al finalizar el esquema de inmunización se midió el grado de inflamación local para seleccionar el ratón con mayor inflamación por grupo.

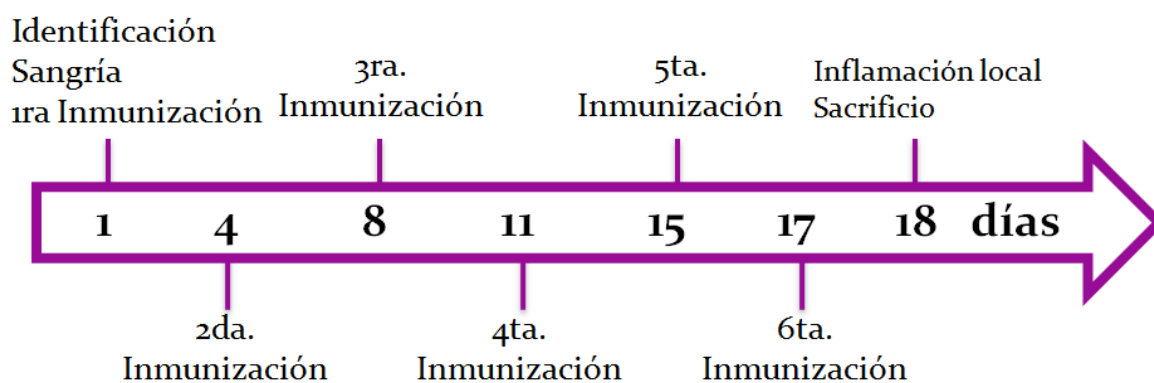


Figura 6. Esquema de inmunización en ratones hembras BALB/c de entre 6 a 8 semanas de edad con las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155.

3. Producción de anticuerpos monoclonales contra la cepa EFRV E155

3.1 Líneas celulares y fusión

Para realizar la fusión de las células de mieloma con células del ganglio de ratón, se requiere la preparación de la línea de mieloma con una a dos semanas previas a la fusión. En este trabajo se utilizó la línea de células de mieloma Sp2/0-Ag14 (ATCC, CRL-1581), la cual se cultivó en medio DMEM-10% SFB (Gibco) hasta alcanzar una densidad entre 5×10^4 y 5×10^5 células/mL. Para la fusión, las células de mieloma se concentraron en un botón

celular por centrifugación a 300 g, 10 min a 37°C y se determinó la viabilidad celular con azul de tripano.

Por otra parte, el ratón seleccionado fue sacrificado por dislocación cervical para la obtención del ganglio poplíteo derecho (Figura 7), el cual fue disgregado y resuspendido en medio DMEM, la suspensión celular se concentro en un botón celular a 400 g por 10 min a 37°C y se cuantificó la densidad celular.

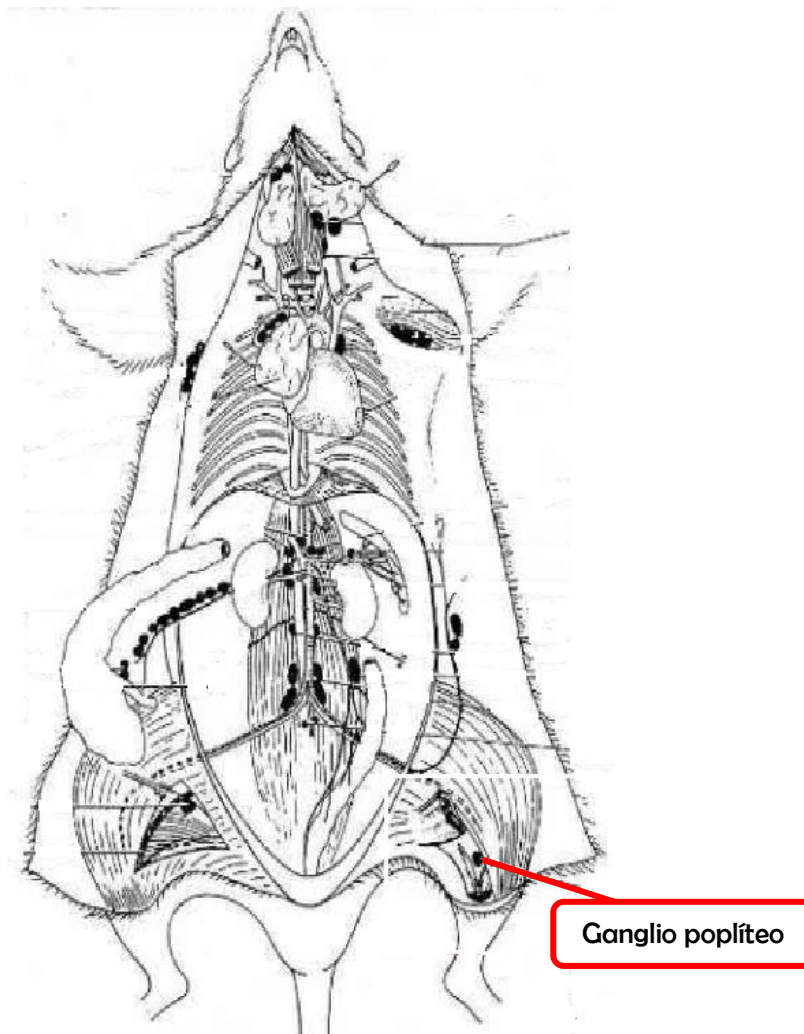


Figura 7. Vista esquemática de un ratón, en un corte longitudinal. En el recuadro se muestra el ganglio poplíteo trasero derecho. Imagen sin autor (sin fecha). "Separación de poblaciones celulares" Recuperado el 4 de Junio del 2015 de: <http://es.slideshare.net/amicoguzman/cmo-hacer-referencias-bibliograficas-9155932>

Tomando como base la cantidad de células obtenidas de ganglio, se calculó una relación de 1:5 (células de ganglio: células de mieloma). Para la fusión celular ambas líneas celulares se mezclaron en un tubo cónico de 50 mL y se concentraron en un botón celular a 400 g por 10 min a 37°C; inmediatamente se adicionó 1 mL de polietilenglicol (PEG, 4000 al 50% en DMEM; StemCell Technologies), gota a gota por un periodo de 1 min, sin agitación y después las células se resuspendieron por 1 min manualmente.

A esta suspensión celular se le adicionaron 4 mL de medio DMEM con agitación suave durante 4 min y posteriormente se adicionaron 10 mL de medio DMEM. Al término, la muestra se incubó en un baño de agua por 15 min a 37°C y se llevó a un volumen final de 45 mL con medio DMEM-10% SFB. La suspensión celular contiene a las células que fueron fusionadas, éstas fueron concentradas en un botón celular a 400 g, 7 min a 37°C y resuspendidas en 30 mL de medio DMEM-10% SFB. En seguida, las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h.

3.2 Selección y clonación de hibridomas

Después de las 24 h de incubación, las células se concentraron en un botón celular a 400 g por 10 min a 37°C, se resuspendieron en 10 mL de medio DMEM-10% SFB y se llevaron a un volumen final de 100 mL con medio HAT (Hipoxantina, Aminopterina y Timidina; Sigma). La suspensión celular se dividió en placas de 96 pozos estériles, colocando 60 µL por pozo, y se incubó durante un periodo de 8 días bajo las condiciones mencionadas previamente. Al finalizar éste periodo se adicionaron 150 µL de medio HT (Hipoxantina y Timidina; Gibco) por pozo y la placa se incubó 4 días más bajo las mismas condiciones.

Después del periodo de incubación, las clonas provenientes de una fusión celular de mieloma con linfocitos B productor de anticuerpos específicos contra la cepa EFRV E155 fueron seleccionadas, a través del análisis de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes del cultivo de hibridomas por la técnica de ELISA. Estas clonas se

transfirieron a placas de 24 pozos con 1 mL de medio HT, el cual fue reemplazado gradualmente con medio DMEM - 10% SFB.

Un segundo escrutinio de las clonas fue realizado de acuerdo a la proliferación celular de los hibridomas y el reconocimiento de sus anticuerpos a la cepa EFRV E155 mediante la técnica de ELISA, los anticuerpos con mayor reconocimiento a los antígenos expuestos de la cepa, fueron seleccionados para proseguir con su caracterización.

3.3 Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales (AcMo)

El isotipo de los AcMo se determinó con el “Kit Beadlyte Mouse Immunoglobulin Isotyping (Millipore)”, con los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas.

En una placa de 96 pozos se adicionaron 50 μ L del sobrenadante de los hibridomas a cada pozo, posteriormente se agregaron 25 μ L de una solución con perlas acopladas a anticuerpos que reconocen los diferentes isotipos de inmunoglobulinas de ratón, la placa se incubo por 15 min en la oscuridad a TA con agitación baja. La placa fue tratada con el amortiguador de ensayo por vacio, y posteriormente se reveló con 25 μ L del anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón contra la cadena κ (1:100) se incubó bajo las condiciones descritas en el paso anterior, los resultados fueron obtenidos con el equipo Luminex (BIORAD).

4. Ensayo de Opsonofagocitosis (EOF)

El ensayo de opsonofagocitosis requiere de cuatro elementos principales: bacteria (EFRV E155), polimorfonucleares (PMN's), fuente de complemento y anticuerpos. A continuación se describe como se preparó cada elemento.

- Bacteria

La bacteria EFRV E155 se creció en una placa de AST, la cual fue incubada toda la noche a 37°C. Se tomó una colonia del cultivo en placa y se sembró en CST se ajustó a una DO_{650nm} 0.1, el cual se incubó a 37°C hasta llegar a una DO_{650nm} 0.375. Al término, se tomó 1 mL cultivo y se centrifugó a 13,000 g por 5 min, el botón bacteriano se disolvió en 1 mL de RPMI +15% SFB y se diluyó 1:200 en el mismo medio (2×10^7 UFC/mL). La bacteria se mantuvo en hielo hasta su uso.

Polimorfonucleares (PMN's)

Se recolectaron 25 mL de sangre periférica de un adulto sano y se mezclaron con 25 mL de heparina-dextrán e incubaron de 30-45 min a 37°C. La fracción del plasma sanguíneo fue separada y centrifugada a 2700 rpm por 10 min a 10°C; los glóbulos rojos remanentes en el botón celular fueron lisados con 10 mL de solución amortiguadora de lisis (NH_4Cl 1%) durante 20 min a TA. Los glóbulos blancos obtenidos en el botón celular fueron disueltos en un volumen final de 3 mL de RPMI+15% SFB (2×10^7 células/mL); se empleará el término polimorfonucleares (PMN's) para referir a los neutrófilos, considerando que son los glóbulos blancos más abundantes en sangre periférica (50 a 70%, (Kolaczowska and Kubes 2013)). La muestra se mantuvo en hielo hasta su uso.

- Complemento

Como fuente de complemento, se ocupó proteínas de complemento de conejo "Baby rabbit complement (Cedarlane)" a una dilución 1:15 en RPMI+15% SFB; previo a su uso el complemento se incubó a 4°C durante 1 h con la cepa EFRV E155, para eliminar anticuerpos presentes contra la cepa. Para eliminar la bacteria la muestra se centrifugó a 2700 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 μ . La muestra se mantuvo en hielo hasta su uso.

- Anticuerpos

A partir de los sobrenadantes del cultivo de las clonas productoras de AcMo generados contra la fracción de pared y membrana celular de la cepa EFRV E155 se realizaron

diluciones 1:50, 1:100 y 1:200 en medio RPMI+15% SFB y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Una vez que los cuatro elementos estuvieron preparados, se realizó la mezcla de éstos tomando 100 µL de cada uno de los cuatro elementos, incubando a 37°C por 90 min bajo agitación (Roto Shake Genie, Scientific Industries, Inc.). De la mezcla se realizaron diluciones seriada en CST (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y se sembraron 10 µL de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} por duplicado en AST. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y se cuantificaron las colonias obtenidas. El porcentaje de muerte bacteriana se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{muerte bacteriana: } [(\text{promedio UFC al } T_0 - \text{promedio UFC al } T_{90\text{min}}) / \text{promedio UFC al } T_0] \times 100$$

5 Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales a polisacáridos asociados a la pared celular de diferentes especies grampositivas

5.1 Extracción de la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de enterococos y estafilococos

Treinta y ocho cepas de enterococos y estafilococos provenientes de una colección de cepas de aislados clínicos (Tabla 1) se cultivaron en AST y se incubaron a 37°C toda la noche, para posteriormente realizar un cultivo en medio CST bajo las mismas condiciones. Los cultivos fueron concentrados en un botón bacteriano a 8000 rpm por 10 min; al término se lavaron con solución Tris-Sucrosa (Tris-HCl 10mM, 25% sucrosa, pH 8) y se resuspendieron en la misma solución suplementada con 200 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, lisozima y mutanolisina (0.1 mg/mL, cada una) y 0.05% NaN₃; las muestras se incubaron a 37°C toda la noche con agitación.

La fracción de pared celular se separó por centrifugación a 8000 rpm, 10 min; el sobrenadante fue colectado y tratado con RNAsa y DNAsa (100 µg/mL, cada una),

posteriormente se incubó a 37°C por 6 h. Al finalizar la incubación, se realizó la digestión de proteínas agregando Proteinasa K (100 µg/mL) a 40°C, toda una noche con agitación. La fracción de polisacárido capsular fue precipitada con etanol al 75% y resuspendido en agua inyectable.

Tabla 1 Cepas grampositivas empleadas para la extracción de la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular.

<i>E. faecalis</i> 12030	<i>E. faecalis</i> FA2-2	<i>E. faecium</i> E1636	<i>E. faecium</i> 1.231.501
<i>E. faecalis</i> Type 7	<i>E. faecalis</i> R19-001	<i>E. faecium</i> U0317	<i>E. faecium</i> 1.231.502
<i>E. faecalis</i> 12107	<i>E. faecalis</i> Type 12	<i>E. faecium</i> E980	<i>E. faecium</i> 1.231.410
<i>E. faecalis</i> OG1RF	<i>E. faecalis</i> Type 14	<i>E. faecium</i> COM12	<i>S. aureus</i> LAC
<i>E. faecalis</i> Type 1	<i>E. faecalis</i> Type 21	<i>E. faecium</i> 1071	<i>S. aureus</i> Newman
<i>E. faecalis</i> Type 10	<i>E. faecalis</i> Type 5	<i>E. faecium</i> E155	<i>S. aureus</i> 194
<i>E. faecalis</i> Type 16	<i>E. faecalis</i> Type 18	<i>E. faecium</i> 1162	<i>S. aureus</i> 193
<i>E. faecalis</i> Type 20	<i>E. faecalis</i> 68114	<i>E. faecium</i> 1.231.733	<i>S. aureus</i> MW2
<i>E. faecalis</i> Type 2	<i>E. faecalis</i> Type 6	<i>E. faecium</i> 1.231.933	<i>S. aureus</i> SF8300
<i>E. faecalis</i> V583		<i>E. faecium</i> 1.231.408	

5.2 Inmunodot-Blot

En una membrana de nitrocelulosa (MILLIPORE) se colocó 1 µL de la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de cada cepa de la Tabla 1, la membrana fue bloqueada con 3% de leche descremada en PBS a 4°C, toda una noche. La membrana fue lavada con PBS-Tween y en seguida se adicionó el anticuerpo monoclonal 11AM a una dilución 1:100, incubando 1 h a TA con agitación. La membrana se lavó e incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma) bajo las condiciones descritas anteriormente. Al finalizar, la membrana se lavó y se reveló con el sustrato BCIP/NBT (BIORAD) hasta la aparición de color (2-5 min).

RESULTADOS

1. Identificación de la cepa EFRV E155

La identidad de la cepa fue confirmada con el sistema semiautomatizado MicroScan. Con el perfil bioquímico obtenido, se identificó a la cepa como *Enterococcus faecium* (Tabla 2); mientras que, la prueba de susceptibilidad mostró que la cepa es resistente a antibióticos de primera línea (ampicilina y cefalosporina) y de segunda línea (vancomicina) (Tabla 3). Los resultados completos se encuentran en el Anexo II.

Tabla 2 Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa EFRV E155.

Género				Grupo II			Especie		
Catalasa	Bilis Esculina	Pirrolidonil β naftalina	NaCl 6.5%	Manitol	Sorbosa	Arginina	Arabinosa	Teluritos	Piruvato
-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Tabla 3 Susceptibilidad de la cepa EFRV E155 a antibióticos.

	Ampicilina	Penicilina	Gentamicina	Cefalozina	Vancomicina
$\mu\text{g/mL}$	>8	>8	>8	>16	>16

La información bibliográfica de EFRV E155 indica que es una cepa proveniente de un aislado clínico de un brote nosocomial en Estados Unidos en 1995, además es una cepa utilizada como cepa de referencia en diferentes estudios y cuyo genoma está secuenciado y próximo a liberarse (Willems, Top et al. 2003).

2. Curva de crecimiento de la cepa EFRV E155

La morfología y la pureza del cultivo de la cepa EFRV E155 se verificó microscópicamente realizando una tinción de Gram, en la cual se observaron cocos grampositivos, con agrupación en pares y cadenas, sin contaminación por bacterias gramnegativas (Figura 7). A nivel macroscópico se observaron colonias mucoides, pequeñas, convexas y blancas en AST.

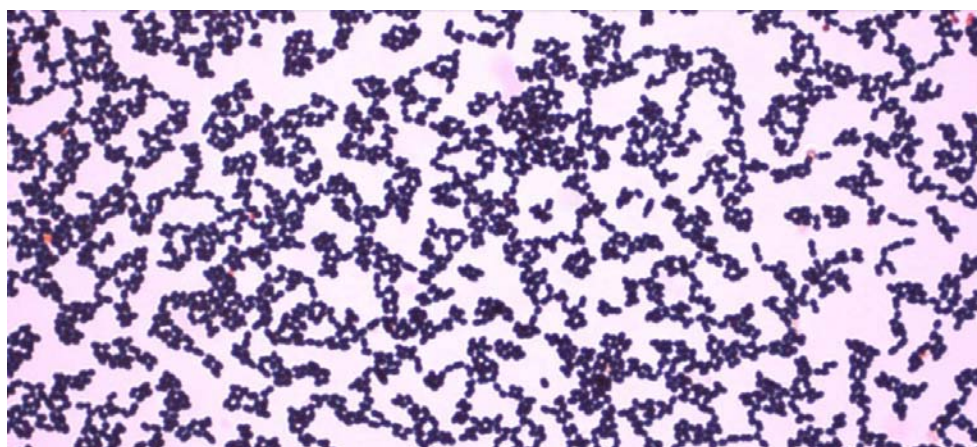


Figura 8. Tinción de Gram de la cepa EFRV E155. Resolución 100X.

La curva de crecimiento de la cepa EFRV E155 se determinó por triplicado durante un periodo de 8 h, hasta alcanzar la fase estacionaria. En la cinética de crecimiento obtenida se distingue las diferentes fases del crecimiento bacteriano (Figura 9), la fase lag ó de adaptación de la bacteria al medio tuvo un periodo aproximado de 2 h; la fase exponencial ó logarítmica, donde la bacteria incrementa su crecimiento duplicando su población a una velocidad constante, tuvo una duración aproximada de 3 h; y la fase estacionaria fue determinada durante 2 h.

Curva de crecimiento de la cepa EFRV E155

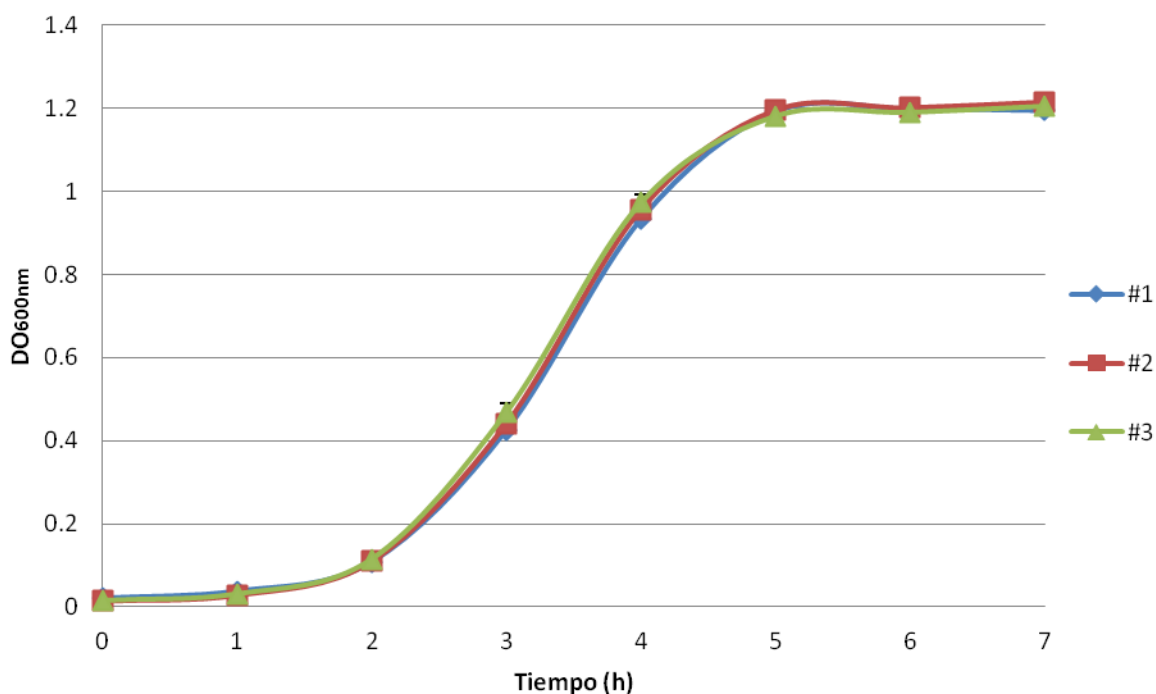


Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa EFRV E155. El ensayo fue realizado por triplicado.

La fase media logarítmica se alcanzó a una DO_{600nm} 0.7 alrededor de las 4 h de crecimiento, esta fase fue empleada para concentrar a la bacteria y realizar la extracción de las fracciones de membrana y pared celular; ya que es la fase de crecimiento donde se tiene la mayor actividad metabólica y expresión de proteínas de la bacteria.

Los resultados de las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas en cada punto de la curva de crecimiento se muestran en la Tabla 4; en la fase media logarítmica alrededor de las 4 h se obtienen 3.3×10^8 UFC/mL, este es el número de bacterias que se concentraron por mililitro para la extracción de las fracciones de membrana y pared celular de la cepa de EFRV E155.

Tabla 4 Unidades formadoras de colonias determinadas en la curva de crecimiento de la cepa EFRV E155

Tiempo (h)	DO _{600nm}	UFC/mL
0	0.02	1.8 x 10 ⁷
1	0.03	1.2 x 10 ⁷
2	0.11	2.3 x 10 ⁷
3	0.44	8.7 x 10 ⁷
4	0.95	3.3 x 10 ⁸
5	1.19	8.0 x 10 ⁸
6	1.20	7.9 x 10 ⁸
7	1.21	6.8 x 10 ⁸

3. Perfil electroforético de las fracciones de membrana y pared celular de la cepa EFRV E155

En la Figura 10, se muestran los perfiles electroforéticos de las diferentes fracciones celulares obtenidas a través de un método enzimático y físico de la cepa EFRV E155. En el carril 2 se representa el perfil de proteínas de la bacteria completa, el cual fue comparado con los perfiles de las fracciones separadas. Observando en el carril 3 el perfil de la fracción de pared celular, el cual tiene un enriquecimiento de dos bandas de masa molecular aproximada de 40 y 70 kDa (representadas con †); mientras que en el carril 4 el perfil de la fracción de membrana celular tiene un enriquecimiento de dos bandas de masa molecular aproximada de 25 y 50 kDa (representadas con ★), entre otras. En el carril 5 se representa la fracción de citoplasma, la cual fue obtenida por el proceso de separación de membrana celular y presenta un patrón electroforético diferente a ésta; sin embargo, no fue empleada en experimentos posteriores.

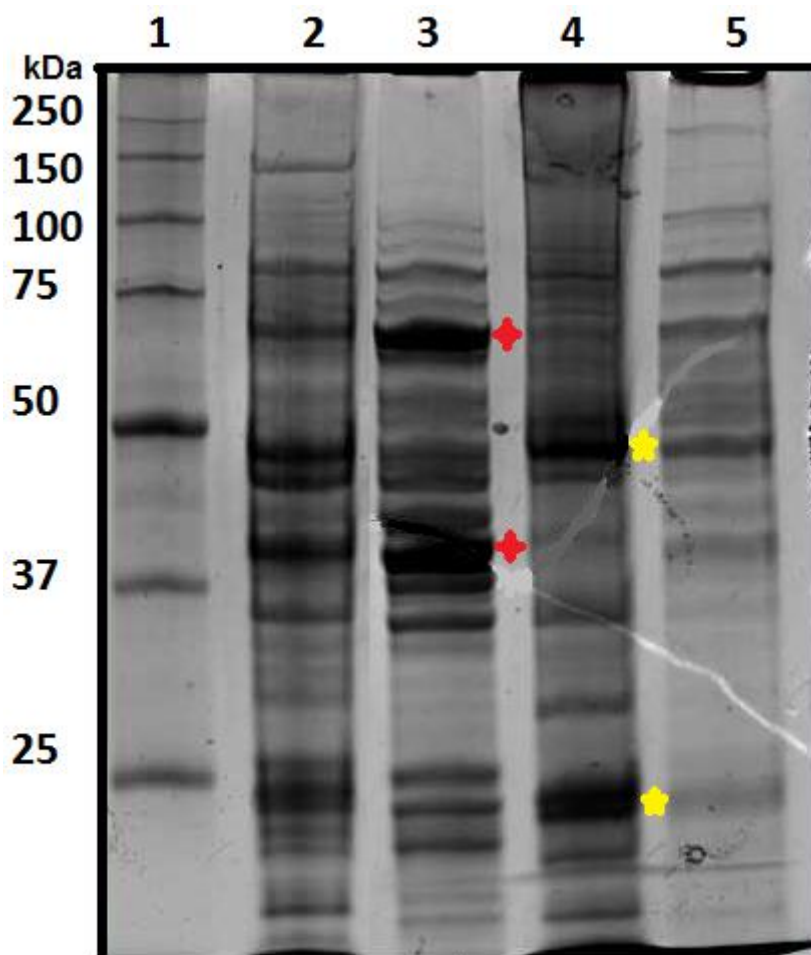


Figura 10. Perfil electroforético de las proteínas de la cepa EFRV E155. En el carril 1. Marcador de peso molecular (MPM), 2. Bacteria completa EFRV E155, 3. Fracción de pared celular, 4. Fracción de membrana celular y 5. Fracción de citoplasma. Gel al 12% SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie coloidal.

4. Producción de hibridomas

Un grupo de tres ratones BALB/c fue inmunizado con las fracciones de pared y membrana celular siguiendo un esquema de inmunización de 17 días (Niebuhr, et al. 1998), al finalizar la inmunización se seleccionó el ratón que tuviera el mayor grado de inflamación local, en el sitio de la infección (muslo trasero derecho); seleccionando un ratón inmunizado con la fracción de pared celular y un ratón con la fracción de membrana celular de EFRV E155.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó la extracción del ganglio poplíteo derecho trasero, para la posterior obtención de las células del ganglio. Las células del ganglio se cuantificaron y se calculó la relación 5:1 con las células de mieloma para la fusión. Del total de células fusionadas se realizó el cálculo de número de células por pozo, para tener una clona por pozo, para lo cual se eligieron 10,000 células por pozo.

De la fusión celular se obtuvieron un total de 119 posibles hibridomas productores de anticuerpos contra las fracciones celulares de EFRV E155, 72 hibridomas de la pared celular y 47 hibridomas de membrana celular.

5. Selección de los AcMo contra la cepa EFRV E155

La selección de los hibridomas productores de anticuerpos IgG contra las fracciones celulares de pared y membrana celular de EFRV E155 se realizó por la técnica de ELISA. En esta selección se eligieron las clonas que presentaron un valor de luminiscencia mayor al del control negativo (medio de cultivo); bajo este criterio 22 clonas de pared celular (30.5%) y 17 clonas de membrana celular (36.2%) fueron seleccionadas. A partir de éstos hibridomas, se realizó una segunda selección con base en la confluencia celular y el reconocimiento que presentan los anticuerpos hacia cada fracción celular (Tabla 5).

Del segundo escrutinio 9 clonas (5 de pared y 4 de membrana) tuvieron una confluencia igual o superior al 80% y presentaron la mayor reactividad hacia su respectiva fracción celular; lo que representa el 7% del total de las clonas de pared y el 8.5% del total de las clonas de membrana celular. Estas clonas fueron proliferadas para la posterior caracterización de sus anticuerpos.

Tabla 5 Valores de luminiscencia de las clonas productoras de anticuerpos monoclonales seleccionadas en un segundo escrutinio.

Pared celular		Membrana celular	
Clona	Luminiscencia (UR)	Clona	Luminiscencia (UR)
2AP	195	1AM	407.5
8AP	192.5	5AM	389
9BP	226	6AM	407.5
3EP	185	11AM	489
4FP	200	Medio	342
Medio	162	Suero (+)	515
Suero (+)	261		

6. Isotipo de los anticuerpos monoclonales

En la Tabla 6 se representan los resultados obtenidos de la determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.

Tabla 6 Isotipo de los anticuerpos monoclonales contra la fracción de pared y membrana celular de la cepa EFRV E155

Pared celular		Membrana celular	
Clona	Isotipo	Clona	Isotipo
2AP	IgG1	1AM	IgG3
3EP	IgG1/IgG3	5AM	IgG1/IgG2b
8AP	IgG1/IgG3	6AM	IgG3
4FP	IgG1	11AM	IgG2b
9BP	IgG2a/IgG3		

7. Ensayo de Oponofagocitosis (EOF)

Para determinar si los anticuerpos monoclonales obtenidos son capaces de opsonizar a la bacteria e inducir su fagocitosis por polimorfonucleares (PMNs) se realizó el EOF. Para ello previamente se determinó la concentración óptima de los anticuerpos monoclonales a través de EOF (datos no mostrados); en este ensayo el mayor porcentaje de muerte bacteriana se obtuvo a la dilución de 1:100, por lo que ésta dilución fue empleada para probar los 9 anticuerpos monoclonales en el EOF, descritos en la Tabla 5 (Figura 11).

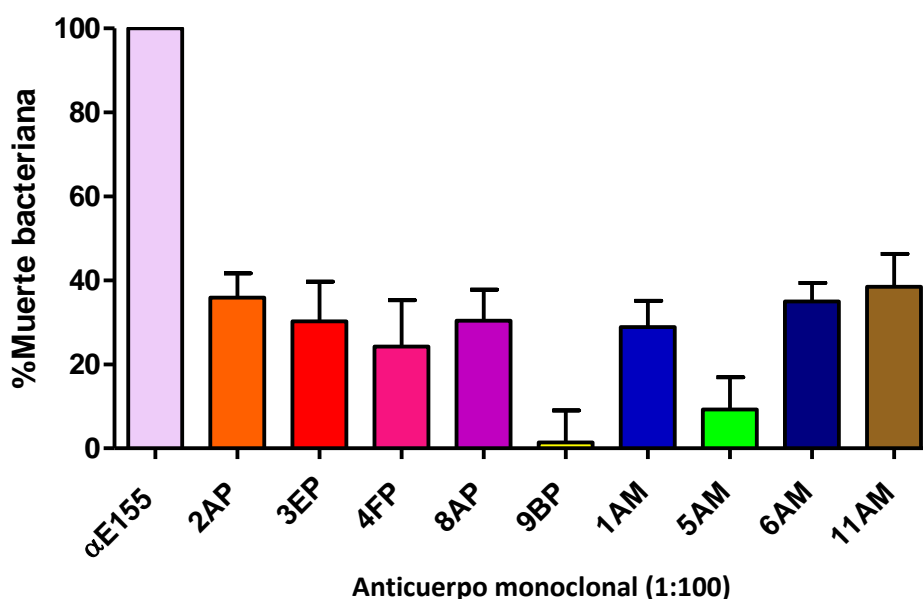


Figura 11. Porcentaje de muerte bacteriana de la cepa EFRV E155 en el ensayo de oponofagocitosis. La primera columna muestra el valor dado por el control positivo, anticuerpos policlonales de conejo contra la cepa EFRV E155; mientras que las siguientes nueve columnas muestran los resultados de los nueve anticuerpos monoclonales generados; los cuales fueron empleados a una dilución 1:100

En la Figura 11 se observa que los valores obtenidos de porcentaje de muerte bacteriana están entre 1% (AcMo 9BP) y 39% (AcMo 11AM), con este ensayo se demostró que 8 anticuerpos monoclonales inducen la fagocitosis de la bacteria a través de PMNs, lo que implica que estos anticuerpos son opsonizantes de la bacteria y que reconocen estructuras superficiales o expuestas a ésta.

8. Reactividad cruzada del AcMo contra la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de enterococos y estafilococos

Los anticuerpos monoclonales que mostraron inducir el mayor porcentaje de muerte bacteriana en el EOF, fueron empleados para determinar si reconocían la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de la cepa EFRV E155 y de 13 cepas de *E. faecium*, 19 cepas de *E. faecalis* y 6 cepas de *S. aureus*.

De los anticuerpos evaluados, el anticuerpo monoclonal 11AM tuvo reconocimiento a la fracción de polisacáridos asociados a pared de la cepa EFRV E155 y cerca del 55% de las cepas evaluadas, reconociendo al 69% de las cepas de *E faecium*, 47% de *E. faecalis* y el 50% de *S aureus* (Figura 12).

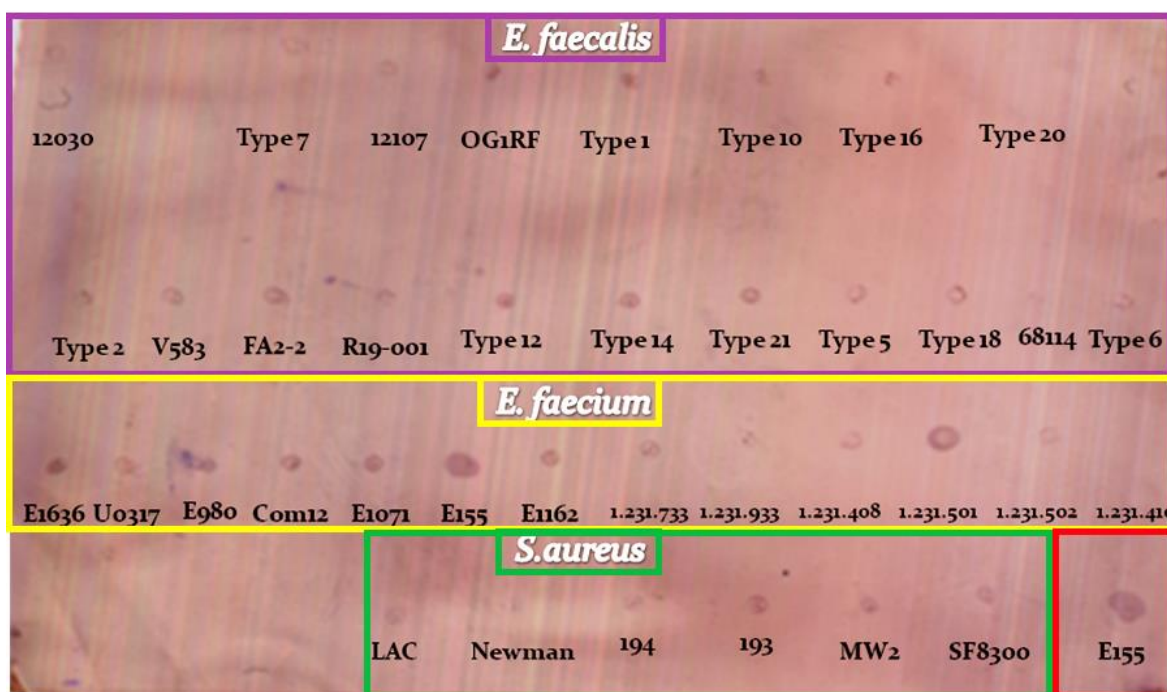


Figura 12. Inmunodot-Blot del reconocimiento del AcMo 11AM contra la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de enterococos y estafilococos. En el recuadro morado se muestran las cepas empleadas de *E. faecalis*, en el amarillo las cepas de *E. faecium*, en el verde las cepas de *S. aureus* y en rojo la cepa control EFRV E155.

DISCUSIÓN

Enterococcus faecium es un patógeno oportunista causante de infecciones nosocomiales. Las cepas multiresistentes a antibióticos son emergentes en este tipo de infecciones y son aisladas con alarmante regularidad (Lebreton, Willems et al. 2014); como *E. faecium* resistente a vancomicina (EFRV). El tratamiento de las infecciones causadas por las cepas resistente es limitado, por lo que nuevas opciones profilácticas y/o terapéuticas están en desarrollo (Arias and Murray 2012).

La eliminación del enterococo en el humano ocurre principalmente a través de los neutrófilos (PMNs), dependiente de la activación del complemento; sin embargo, este mecanismo no es eficiente para la eliminación de todas la cepas de *E. faecium* ya que algunas cepas presentan resistencia a la fagocitosis asociada a la presencia de cápsula en estas bacterias (Arduino, Jacques-Palaz et al. 1994). La fagocitosis mediada por PMNs en cepas capsuladas es favorecida por la presencia de anticuerpos específicos hacia determinantes expuestos en la bacteria (Rakita, Quan et al. 2000).

Debido a ello se busca generar anticuerpos contra estructuras asociadas a la superficie celular bacteriana de los enterococos, principalmente hacia carbohidratos capsulares que estén implicados en la resistencia a la fagocitosis (Huebner, Quaas et al. 2000; Rakita, Quan et al. 2000). A la fecha, la composición de los polímeros asociados a la pared celular de *E. faecium* aún no es esclarecida como en *E. faecalis*.

Dadas estas evidencias el objetivo del presente trabajo fue generar anticuerpos monoclonales específicos contra la cepa de *E. faecium* E155 resistente a vancomicina (EFRV E155), aislada de un brote nosocomial y que tiene resistencia a la fagocitosis por su presencia de cápsula.

En este trabajo se generaron 9 clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra las fracciones de pared (5 clonas) y membrana celular (4 clonas) de la cepa EFRV E155. Los anticuerpos monoclonales de cada clona fueron caracterizados de acuerdo a su isotipo, la inducción de fagocitosis por opsonización a la bacteria y por su reconocimiento a la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular.

Es de interés el conocimiento del isotipo de los AcMo, ya que se busca que los anticuerpos sean opsonizantes para estimular la fagocitosis e inducir la muerte bacteriana a través del reconocimiento de su fracción constante (Fc) por receptores (FcγR) del neutrófilo; el principal receptor fagocítico (FcγR1) en neutrófilos reconoce con alta afinidad los isotipos de anticuerpos IgG1 e IgG3 en humanos y los isotipos IgG2a e IgG2b en ratones; por lo que son más eficientes para estimular la fagocitosis de la bacteria (Abbas, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos la mayoría de los AcMo presentan el isotipo IgG1 e IgG3 siendo únicamente el AcMo 11AM el que presenta un isotipo IgG2b; sin embargo, para que se favorezca la fagocitosis es necesario que estos AcMo sean opsonizantes.

La inducción de muerte bacteriana producida por el AcMo se evaluó determinado por la opsonización de la bacteria con el ensayo de opsonofagocitosis, ya que este ensayo es representativo de una respuesta inmune protectora contra patógenos bacterianos (Hufnagel, Koch et al. 2003). Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que de los 5 AcMo generados contra pared celular de EFRV E155, cuatro inducen la muerte de la bacteria. A pesar de que la clona 9BP tuvo los AcMo con mayor reactividad a la fracción de pared en el ensayo de ELISA, fue incapaz de inducir la muerte bacteriana, lo cual está relacionado al reconocimiento de una molécula antigénica abundante en la pared; sin embargo los anticuerpos generados no opsonizan a la bacteria. De los 4 AcMo generados de la fracción de membrana, tres inducen el mayor porcentaje de muerte bacteriana, lo cual implica que los AcMo reconocen estructuras inmunogénicas asociadas ó ancladas a

membrana celular y que son estructuras que presentan motivos antigénicos que son reconocidos en la superficie de la bacteria.

Existen diferentes estructuras antigénicas o factores de virulencia asociados a pared y membrana celular del enterococo que podrían ser reconocidos por los AcMo. Previamente fue demostrado que existen estructuras de carbohidratos responsables de la resistencia a la fagocitosis que presentan las cepas capsuladas de enterococos (Huebner, Quaas et al. 2000), por lo que la generación de anticuerpos contra éstas estructuras favorecerá la fagocitosis de la bacteria. Es por ello, que en este trabajo se identificó si los AcMo que inducían el mayor porcentaje de muerte bacteriana reconocían polisacáridos asociados a pared celular de la bacteria.

Los anticuerpos de la clona 2AP, 8AP, 6AM y 11AM en contacto con el extracto crudo de polisacáridos asociados a pared celular, siendo los AcMo de las clonas 8AP, 6AM y 11AM los que reconocieron la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de la cepa EFRV E155 (dato no mostrado), lo cual sugiere que estos AcMo reconocen estructuras antigénicas que presentan carbohidratos asociados. Entre las estructuras más abundantes con carbohidratos presentes en la pared de bacterias grampositivas se encuentran los polisacáridos capsulares, ácidos teicoicos o glicolípidos (Weidenmaier and Peschel 2008).

Adicionalmente, se evaluó el reconocimiento de los AcMo a la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de cepas de *E. faecium*, *E. faecalis* y *S. aureus*. De los AcMo únicamente los anticuerpos de la clona 11AM presentaron reconocimiento cruzado a diferentes cepas, siendo relevante el reconocimiento a cepas de *E. faecium* capsuladas (E155), cepas de *E. faecalis* capsuladas (FA2-2, type 12, 14 21) y un bajo reconocimiento a cepas de *E. faecalis* sin capsula (OG1RF) y a *S. aureus* (193).

El bajo o nulo reconocimiento del AcMo 11AM a polisacáridos de pared en cepas de *E. faecium*, cepas sin capsula de *E. faecalis* y cepas de *S. aureus* se relaciona con la baja o nula presencia del antígeno reconocido por el anticuerpo, ya que estas cepas tienen un contenido de polisacáridos distinto al de las cepas capsuladas.

En resumen, el AcMo de la clona 11AM es capaz de inducir la muerte bacteriana y de reconocer la fracción de polisacárida asociada a la pared celular de la cepa EFRV E155. Además reconoce polisacáridos asociados a la pared de cepas de *E. faecium* y cepas capsuladas de *E. faecalis*, lo que sugiere que el anticuerpo es capaz de eliminar a bacterias capsuladas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a fagocitosis, también se infiere que en un modelo de infección murino este anticuerpo favorecerá la eliminación de la bacteria al inducir su fagocitosis.

Con base en los resultados obtenidos, sugerimos que el AcMo 11AM es un candidato para ser evaluado en ensayos de inmunidad pasiva de infecciones causadas por bacterias grampositivas. Además, resulta de interés identificar el antígeno que fue reconocido por el AcMo y la frecuencia con que este antígeno está presente en bacterias grampositivas.

CONCLUSIONES

- Nueve clonas productoras de anticuerpos monoclonales obtenidas fueron capaces de reconocer estructuras antigénicas de la pared y membrana celular de la cepa EFRV E155.
- Los anticuerpos monoclonales generados tienen predominantemente los isotipos IgG1 e IgG3.
- Siete AcMo fueron capaces de inducir la reducción del número de bacterias de la cepa EFRV E155 a través del ensayo de opsonofagocitosis; siendo el AcMo 11AM el que induce el mayor porcentaje de muerte bacteriana.
- El AcMo 11AM reconoce la fracción de polisacáridos asociados a la pared celular de la cepa EFRV E155 y de diferentes aislados clínicos de bacterias grampositivas.
- El AcMo 11AM es un candidato para ser evaluado en estudios de inmunoterapia pasiva contra infecciones causadas por enterococos.

PERSPECTIVAS

- Evaluación del AcMo 11AM EFRV en un modelo murino de infección para evaluar la inmunidad pasiva contra aislados clínicos de *E. faecium* y *E. faecalis*.
- Identificación y caracterización del polisacárido antigénico reconocido por el AcMo 11AM en EFRV E155.
- Determinación de la frecuencia del polisacárido antigénico en una colección de cepas clínicas de enterococos de distintas regiones geográficas.

REFERENCIAS

- Abbas, A. K. and Litchman, A. H. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 6th ed, ELSEVIER, Barcelona, España.
- Arduino, R. C., K. Jacques-Palaz, et al. (1994). "Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis." *Infect Immun* 62(12): 5587-5594.
- Arias, C. A. and B. E. Murray (2012). "The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance." *Nat Rev Microbiol* 10(4): 266-278.
- Arthur, M., P. Reynolds, et al. (1996). "Glycopeptide resistance in enterococci." *Trends Microbiol* 4(10): 401-407.
- Biswas, B., S. Adhya, et al. (2002). "Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." *Infect Immun* 70(1): 204-210.
- Casadevall, A., E. Dadachova, et al. (2004). "Passive antibody therapy for infectious diseases." *Nat Rev Microbiol* 2(9): 695-703.
- Cattoir, V. and R. Leclercq (2013). "Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?" *J Antimicrob Chemother* 68(4): 731-742.
- Cetinkaya, Y., P. Falk, et al. (2000). "Vancomycin-resistant enterococci." *Clin Microbiol Rev* 13(4): 686-707.
- Collins, A. S. (2008). *Preventing Health Care-Associated Infections. Patient Safety and Quality: An Evidence-Based Handbook for Nurses*. R. G. Hughes. Rockville (MD).
- Courvalin, P. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci." *Clin Infect Dis* 42 Suppl 1: S25-34.
- Cuellar-Rodriguez, J., A. Galindo-Fraga, et al. (2007). "Vancomycin-resistant enterococci, Mexico City." *Emerg Infect Dis* 13(5): 798-799.
- Chow, J. W., S. M. Donahedian, et al. (1997). "Emergence of increased resistance to quinupristin/dalfopristin during therapy for *Enterococcus faecium* bacteremia." *Clin Infect Dis* 24(1): 90-91.
- Fisher, K. and C. Phillips (2009). "The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*." *Microbiology* 155(Pt 6): 1749-1757.
- Gilmore, M. S. (2002). *The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*. Washington, CD. EUA.
- Giridhara Upadhyaya, P. M., K. L. Ravikumar, et al. (2009). "Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen." *Indian J Med Microbiol* 27(4): 301-305.
- Hancock, L. E., B. E. Murray, et al. (2014). *Enterococcal Cell Wall Components and Structures. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar. Boston.
- Huebner, J., A. Quaas, et al. (2000). "Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant enterococci." *Infect Immun* 68(8): 4631-4636.
- Huebner, J., Y. Wang, et al. (1999). "Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." *Infect Immun* 67(3): 1213-1219.

- Hufnagel, M., S. Koch, et al. (2003). "Opsonophagocytic assay as a potentially useful tool for assessing safety of enterococcal preparations." Int J Food Microbiol 88(2-3): 263-267.
- Isolauro, E. (2001). "Probiotics in human disease." Am J Clin Nutr 73(6): 1142S-1146S.
- Jett, B. D., M. M. Huycke, et al. (1994). "Virulence of enterococci." Clin Microbiol Rev 7(4): 462-478.
- Koch, S., M. Hufnagel, et al. (2004). "Treatment and prevention of enterococcal infections-- alternative and experimental approaches." Expert Opin Biol Ther 4(9): 1519-1531.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner (2004). "Enterococcal infections: host response, therapies and prophylactic possibilities." Vaccine 22: 822-830.
- Kolaczkowska, E. and P. Kubes (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." Nat Rev Immunol 13(3): 159-175.
- Lebreton, F., R. J. L. Willems, et al. (2014). Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar. Boston.
- Moellering, R. C., Jr. (1998). "Vancomycin-resistant enterococci." Clin Infect Dis 26(5): 1196-1199.
- Murray, B. E. (1990). "The life and times of the Enterococcus." Clin Microbiol Rev 3(1): 46-65.
- Niebuhr, K., Lingnau, A., Frank, R., and Wehland, J. (1998). Rapid procedures for preparing monoclonal antibodies and identifying their epitopes. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook. A. Press. 2: 398-403.
- NOM-045 (2005). NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. .
- Ochoa, S. A., G. Escalona, et al. (2013). "Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City." BMC Microbiol 13: 291.
- Oral, H. B., C. Ozakin, et al. (2002). "Back to the future: antibody-based strategies for the treatment of infectious diseases." Mol Biotechnol 21(3): 225-239.
- Papadimitriou-Olivgeris, M., E. Drougka, et al. (2014). "Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients." Infection.
- Patel, R. (2003). "Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci." J Antimicrob Chemother 51 Suppl 3: iii13-21.
- Patel, S. N., N. Memari, et al. (2013). "Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* isolated in Ontario, Canada." Diagn Microbiol Infect Dis 77(4): 350-353.
- Ponce-de-León-Rosales, S. (2014). El problema de las infecciones hospitalarias. Manual para la prevención y el control de infecciones asociadas al cuidado de la salud. Intersistemas. México: 268.
- Pública, S. d. S. (2011) "MEDICIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES EN HOSPITALES GENERALES DE LAS PRINCIPALES INSTITUCIONES PÚBLICAS DE SALUD. Informe documental en extenso."
- Rakita, R. M., V. C. Quan, et al. (2000). "Specific antibody promotes opsonization and PMN-mediated killing of phagocytosis-resistant *Enterococcus faecium*." FEMS Immunol Med Microbiol 28(4): 291-299.
- Rice, L. B. (2010). "Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens." Infect Control Hosp Epidemiol 31 Suppl 1: S7-10.

- Sava, I. G., E. Heikens, et al. (2010). "Pathogenesis and immunity in enterococcal infections." Clin Microbiol Infect 16(6): 533-540.
- Sava, I. G., E. Heikens, et al. (2010). "Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection." J Med Microbiol 59(Pt 9): 1001-1004.
- Seedat, J., G. Zick, et al. (2006). "Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection." Antimicrob Agents Chemother 50(12): 4217-4219.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, et al. (2001). "Bacteriophage therapy." Antimicrob Agents Chemother 45(3): 649-659.
- Weidenmaier, C. and A. Peschel (2008). "Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions." Nat Rev Microbiol 6(4): 276-287.
- WHO (2011). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Clean care and safer care.
- Willems, R. J., J. Top, et al. (2003). "Mutations in the DNA mismatch repair proteins MutS and MutL of oxazolidinone-resistant or -susceptible *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother 47(10): 3061-3066.
- Ye, Q. F., J. Zhao, et al. (2014). "Frequency and clinical outcomes of ESKAPE bacteremia in solid organ transplantation and the risk factors for mortality." Transpl Infect Dis.

ANEXO I

Técnicas

- **Tinción de Gram**

El frotis es fijado con calor durante 30 min y se adiciona cristal violeta durante 1 min, el exceso se elimina con agua. A continuación se agrega lugol por 1 min y se decolora con acetona-etanol por 1 min. Como colorante de contraste se agrega safranina por 1 min y se enjuaga con agua.

- **Lisis de bacterias por sonicación**

Los cultivos bacterianos fueron concentrados por centrifugación, el paquete celular fue lavado 3 veces con agua desionizada estéril y fue ajustado a una concentración de 0.1 g/mL.

De la suspensión obtenida se lisó con ultrasonido (sonicador Vibra Cell), dando 15 pulsos de 20 s con intervalos de 1 min entre éstos, se adicionó PMSF como inhibidor de proteasas a una concentración final de 20 mM. Al finalizar la muestra se centrifugo a 5000 rpm durante 3 min, se hizo alícuotas y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para verificar que las bacterias hayan sido lisadas se realiza un frotis, el cual se tiñe por Gram y en el microscopio se observa que no haya presencia de bacterias completas.

- **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Se elabora una curva estándar utilizando BSA (1 mg/mL) por duplicado:

µL de BSA	0	1	2	3	4	5	6	8	10
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	----

$\mu\text{L H}_2\text{O}$	50	49	48	47	46	45	44	42	40
---------------------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Para la muestra a cuantificar se toma 1 μL de ésta y se adicionan 49 μl de H_2O , por duplicado, enseguida se adicionan 200 μl del reactivo de Bradford (CBB G-250 0.01%, Etanol 5%, H_3PO_4 10%), se incuba 5 minutos en la oscuridad y se mide a $\lambda=595\text{nm}$ y $\lambda=450\text{nm}$.

- **ELISA**

Sensibilizar placas de 96 pozos de PVC blancas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína de la cada fracción celular en buffer de carbonatos a 4°C durante toda una noche.

Las placas fueron lavadas con PBS en agitación continua por 1 min y enseguida se bloquearon con una solución PBS-albúmina al 1%, incubando a 37°C por 1 h 30 min. Al término las placas se lavaron con PBS-Tween en agitación continua por 1 min. Como anticuerpo primario se utilizaron los sobrenadantes del cultivo celular, incubando a 37°C por 1 h.

Las placas fueron lavadas cinco veces con PBS-Tween en agitación continua por 1 min, con el fin de eliminar completamente el anticuerpo no unido y evitar interferencias. Se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG2a de ratón acoplado a HRP (INVITROGEN) a una dilución 1:2000 en PBS, incubando a 37°C por 1 h.

Se realizaron 5 lavados, para el revelado de las placas se empleó el sustrato HRP Quimioluminiscente (Santa Cruz) incubando por 5 min protegiendo las placas de la luz; al finalizar se dio lectura a las placas por luminiscencia utilizando el equipo Genios Plus con el software Magellan.

ANEXO II

Resultados del análisis por MicroScan

Prueba bioquímica	+/-	Susceptibilidad a antibióticos	[I]
Cristal violeta (CV)	+c	Ampicilina	>8
Análisis de micrococos (MS)	-	Penicilina	>8
Nitratos	-	Clindamicina	>2
Novoviocina (NOV)	-	Cefazolina	>16
Glucosidasa (PGR)	-	Eritromicina	>4
Indoxil fosfatasa (IDX)	+	Gentamicina	>8
Vogues proskaer (VP)	+	Linezolid	1
Optoquinona (OPT)	+	Oxacilina	>2
Fosfatasa alcalina (PHO)	-	Piperacilina / tazobactam	>8
Bilis esculina (BE)	+	Vancomicina	>16
Pirrolidonil b nanftalina (PYR)	+	Ciprofloxacino	>2
Arginina (ARG)	+	Levofloxacina	4
Glucosidasa (PGT)	+	Cloranfenicol	<8
Ureasa (URE)	-	Tetraciclina	<4
Manitol (MAN)	+	Synercid	0.5
NaCl	+	Imipenem	>8
Sorbitol (SOR)	+	Trimetropim / sulfametoxazol	<2/38
Arabinosa (ARA)	+	Nitrofurantoina	-
Ribosa (RBS)	+	Rifampicina	-

Inusitol (INU)	-	Análisis sinergismo gentamicina	+
Rafinosa (RAF)	-	Análisis sinergismo estreptomina	+
Bacitracina (BAC)	+c	Control negativo	Correcto
Piruvato (PRV)	-	Control crecimiento	Correcto

(+) Positivo

(-) Negativo

(c) Crecimiento

ANEXO III

MEDIOS Y SOLUCIONES

MEDIOS

- **Caldo Soya Trypticaseína**

Caldo Soya Trypticaseína 30 g
Ajusta a un pH y llevar a un volumen de 1 L. Esterilizar por calor.

- **Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

DMEM (GIBCO) 13.5 g
NaHCO₃ 3.7 g
HEPES 25 mL

Ajustar a pH 7.3 y llevar a un volumen final de 1 L, filtrar en membrana de 0.22 µm.

- **Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% SFB**

DMEM 900 mL
SFB (GIBCO) 100 mL

Adicionar suero fetal bovino (SFB) al 10% y filtrar por una membrana de 0.22 µm. Guardar 4°C.

- **Medio Hipoxantina Aminopterin Timidina (HAT)**

Medio DMEM 10% SFB 500 mL
Suplemento de medio HAT 50X (SIGMA) 1 vial

Tomar 10 mL del medio y reconstituir un liofilizado del suplemento de medio HAT 50X (SIGMA), filtrar por una membrana de 0.22 µm y transferir al medio DMEM 10% SFB. Almacenar a 4°C, protegido de la luz.

- **Medio Hipoxantina Timidina (HT)**

DMEM 10% SFB 495 mL
Suplemento líquido HT 100X (GIBCO) 5 mL

Adicionar el suplemento HT al medio DMEM 10% SFB y filtrar por una membrana de 0,22 µm. Guardar a 4°C.

SOLUCIONES PARA TÉCNICA DE ELISA POR QUIMIOLUMINISCENCIA

- **PBS**

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Ajustar a pH 7.4 y llevar a un volumen final de 1 L.

- **Buffer de carbonatos**

Na ₂ CO ₃	0.159 g
NaHCO ₃	0.293 g

Ajustar a pH 9.6 y llevar a un volumen final de 100 mL.

- **PBS-Tween 0.05%**

Tween 20	0.5 mL
----------	--------

Adicionar tween a un volumen final de 1 L de PBS.

SDS-PAGE

Buffer de corrida 5X

Glicina	72 g
Tris base	15 g
SDS	5 g

Llevar a un volumen final de 1 L.

- **Gel acrilamida 12%**

H ₂ O desgasificada	16.4 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	20 mL
Tris pH 8.8, 1.5M	12.5 mL

SDS 10%	500 µL
PSA 10%	500 µL
TEMED	20 µL

Solución que polimeriza en 1 h.

SOLUCIONES PARA LA TINCIÓN CON COOMASSIE (SILVER BLUE)

- **Solución de Coomasie coloidal (silver blue)**

Ácido fosfórico	14.8 mL
Sulfato de amonio	25 g
Metanol	50 mL
CBB-G250	0.3 g

Disolver y llevar a un volumen final de 250 mL; solución coloidal.