

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

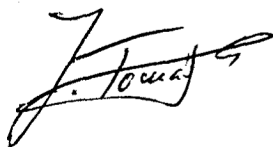
FACULTAD DE BIOLOGIA

MECANISMOS MOLECULARES DE LA PATOGENICIDAD

DE AEROMONAS HYDROPHILA

V. B.
El Director de la Tesis

Memoria presentada por
Susana Merino Montero
para optar al grado de
Doctor en Biología.



Dr. Joan Tomás Magaña

Barcelona, Septiembre 1990

A mis padres y hermana

INDICE

0.- AGRADECIMIENTOS.	
1.- INTRODUCCION.	1
1.1.- EL GENERO <u>AEROMONAS</u> .	2
1.1.A.- AEROMONAS NO MOTILES: <u>AEROMONAS SALMONICIDA</u> .	3
1.1.B.- AEROMONAS MOTILES.	7
1.2.- UTILIZACION DE BACTERIOFAGOS EN RECEPTORES CONOCIDOS COMO MARCADORES DE ESTRUCTURAS DE LA SUPERFICIE BACTERIANA.	12
1.3.- PATOGENICIDAD.	18
1.3.A.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO: COMPLEMENTO.	24
1.4.- PRECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.	38
2.- MATERIAL Y METODOS.	40
2.1.- CEPAS BACTERIANAS, BACTERIOFAGOS Y MEDIOS DE CULTIVO.	41
2.1.A.- CEPAS BACTERIANAS.	41
2.1.B.- BACTERIOFAGOS.	45
2.1.C.- MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES.	45
2.2.- EXPERIMENTOS CON BACTERIOFAGOS.	47
2.2.A.- AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS.	47
2.2.B.- PROPAGACION DE BACTERIOFAGOS.	47
2.2.C.- PURIFICACION DE BACTERIOFAGOS.	48
2.2.D.- CARACTERIZACION DE BACTERIOFAGOS.	49
2.2.D.1.- DETERMINACION DEL ESPECTRO DE HUESPEDES.	49
2.2.D.2.- CRECIMIENTO EN UNA SOLA ETAPA.	49
2.2.D.3.- CALCULO DE LA DENSIDAD DE LOS BACTERIOFAGOS.	50
2.2.D.4.- DETERMINACION DEL TIPO DE ACIDO NUCLEICO.	51
2.2.E.- EXPERIMENTOS DE INACTIVACION DE BACTERIOFAGOS.	51
2.3.- OBTENCION DE MUTANTES.	54
2.3.A.- MUTANTES ESPONTANEOS.	54
2.3.A.1.- POR RESISTENCIA A BACTERIOFAGOS.	54
2.3.A.2.- POR RESISTENCIA A SUERO NO INMUNE DE CONEJO Y HUMANO.	54
2.3.B.- MUTANTES OBTENIDOS MEDIANTE D.E.S.	54

2.4.- METODOS INMUNOLOGICOS.	57
2.4.A.- OBTENCION DE SUERO INMUNE.	57
2.4.B.- ENSAYOS DE NIVELES DE ANTICUERPOS.	58
2.4.C.- E.L.I.S.A.	58
2.4.C.1.- NO COMPETITIVO.	58
2.4.C.2.- COMPETITIVO.	60
2.4.D.- WESTERN-BLOTTING.	60
2.4.E.- COLONY-BLOTTING.	62
2.5.- CARACTERISTICAS SUPERFICIALES.	63
2.5.A.- AUTOAGLUTINACION.	63
2.5.B.- MOTILIDAD.	64
2.5.C.- TEST DE ADHESION DE HIDROCARBUROS.	64
2.6.- PRODUCCION DE TOXINAS.	66
2.7.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.	67
2.7.A.- TINCION NEGATIVA.	67
2.7.B.- PROTEINA-A LIGADA A ORO COLOIDAL.	67
2.7.B.1.- MARCAJE SIMPLE.	67
2.7.B.2.- MARCAJE DOBLE.	68
2.8.- AISLAMIENTO DE ESTRUCTURAS SUPERFICIALES BACTERIANAS.	69
2.8.A.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS.	69
2.8.B.- AISLAMIENTO DE LAMINA-S.	70
2.8.C.- AISLAMIENTO DE FLAGELOS.	70
2.8.D.- AISLAMIENTO DE LIPOPOLISACARIDO.	71
2.9.- ANALISIS QUIMICO.	72
2.9.A.- ANALISIS DE CARBOHIDRATOS.	72
2.9.B.- ANALISIS DE LIPIDOS.	73
2.10.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.	75
2.10.A.- GELES DE PROTEINAS.	75
2.10.B.- GELES DE LIPOPOLISACARIDO.	76
2.11.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.	77
2.11.A.- RESISTENCIA DE LAS CEPAS A LA ACCION BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.	77
2.11.B.- DETERMINACION DE LA VIA DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.	78
2.11.C.- EXPERIMENTOS DE INACTIVACION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.	79
2.11.D.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL LPS.	80

2.12.- VALORACION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS DEL COMPLEMENTO.	81
2.12.A.- VALORACION DE LAS PROTEINAS EXISTENTES EN EL SOBRENADANTE: C1q.	81
2.12.B.- VALORACION DE LAS PROTEINAS DEL COMPLEMENTO DEPOSITADAS EN LA MEMBRANA CELULAR: C3b Y C5b-9.	81
2.13.- SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.	83
2.14.- DOSIS LETALES 50.	84
2.14.A.- EN RATONES.	84
2.14.B.- EN PECES.	84
3.- RESULTADOS.	85
3.1.- CARACTERIZACION Y DETERMINACION DEL RECEPTOR PARA ALGUNOS BACTERIOFAGOS QUE INFECTAN A AEROMONAS HYDROPHILA.	86
3.1.A.- AISLAMIENTO Y PROPAGACION DE LOS BACTERIOFAGOS.	86
3.1.B.- MORFOLOGIA DE LAS CALVAS.	89
3.1.C.- ESPECTRO DE HUESPEDES.	90
3.1.D.- CARACTERIZACION DE LOS BACTERIOFAGOS.	93
3.1.D.1.- CRECIMIENTO EN UNA SOLA ETAPA.	93
3.1.D.2.- DETERMINACION DE LA DENSIDAD.	96
3.1.D.3.- DETERMINACION DEL MATERIAL GENETICO.	98
3.1.D.4.- CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS CONSTITUYENTES DE LOS VIRIONES.	100
3.1.D.5.- MORFOLOGIA DE LOS BACTERIOFAGOS: PM1, PM2 Y PM3.	104
3.1.E.- DETERMINACION DEL RECEPTOR DE LOS BACTERIOFAGOS : 18, PM1, PM2 Y PM3.	107
3.1.E.1.- OBTENCION DE MUTANTES POR RESISTENCIA A BACTERIOFAGOS.	107
3.1.E.2.- INTERACCION DE LOS BACTERIOFAGOS CON LA SUPERFICIE DE AEROMONAS HYDROPHILA.	111
3.2.- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE CELULAR DEL SEROTIPO O34 DE AEROMONAS MESOFILAS.	119
3.2.A.- CARACTERIZACION DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS CEPAS DE SEROTIPO O:34.	119
3.2.A.1.- PROTEINAS DE MEMBRANA.	119
3.2.A.2.- LIPOPOLISACARIDO.	121
a) CARACTERIZACION POR SDS-PAGE.	121
b) FRACCIONAMIENTO.	123
c) COMPOSICION QUIMICA.	125
d) CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DEL LPS.	127

3.2.B.- VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE SEROTIPO O34.	129
3.2.B.1.- DOSIS LETAL 50.	129
3.2.B.2.- DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE LPS.	130
3.2.B.3.- VARIACION DE LA COMPOSICION DE LOS LIPIDOS.	134
a) LIPIDOS TOTALES.	134
b) LIPIDOS DEL LPS.	139
3.2.C.- SENSIBILIDAD A LOS BACTERIOFAGOS DE LAS CEPAS DE SEROTIPO O34.	144
3.2.D.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES ISOGENICOS PARA CEPAS DE SEROGRUPO O34.	146
3.2.D.1.- OBTENCION DE MUTANTES POR RESISTENCIA A BACTERIOFAGOS.	146
3.2.D.2.- PROTEINAS DE MEMBRANA.	148
3.2.D.3.- LIPOPOLISACARIDO.	150
a) CARACTERIZACION POR SDS-PAGE.	150
b) COMPOSICION QUIMICA.	152
3.2.D.4.- DOSIS LETAL 50.	156
3.2.E.- PRODUCCION DE TOXINAS.	157
3.2.F.- SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.	158
3.2.G.- ESTUDIO DE LA ACCION DEL SUERO NO INMUNE SOBRE CEPAS DE SEROGRUPO O34.	160
3.2.G.1.- RESISTENCIA DE LAS CEPAS A LA ACCION BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.	160
3.2.G.2.- VIA DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.	168
3.2.G.3.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE CON LPS.	171
3.2.G.4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL LPS.	174
3.2.H.- VALORACION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS DEL COMPLEMENTO.	175
3.2.H.1.- NIVELES DE C1q EXISTENTES EN SUERO NO INMUNE TRATADO CON CEPAS DE SEROGRUPO O34.	175
3.2.H.2.- NIVELES DE C3b Y C5b-9 DEPOSITADOS EN LA MEMBRANA DE CEPAS DE SEROGRUPO O34 TRATADAS CON SUERO NO INMUNE.	176
3.3.- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE CELULAR DEL SEROTIPO O11 DE AEROMONAS MESOFILAS.	181
3.3.A.- CARACTERIZACION DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS CEPAS DE SEROGRUPO O11.	181
3.3.A.1.- PROTEINAS DE MEMBRANA.	181
3.3.A.2.- LAMINA-S.	184
3.3.A.3.- LIPOPOLISACARIDO.	186
a) CARACTERIZACION POR SDS-PAGE.	186
b) FRACCIONAMIENTO.	188
c) COMPOSICION QUIMICA.	190
d) CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.	192

3.3.B.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES PARA ESTRUCTURAS SUPERFICIALES DE CEPAS DE SEROGRUPO O11.	194
3.3.B.1.- OBTENCION DE MUTANTES O Y LAMINA-S	194
3.3.B.2.- OBTENCION DE MUTANTES FLAGELO	199
3.3.B.3.- CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES.	199
3.3.C.- SENSIBILIDAD A LOS BACTERIOFAGOS.	208
3.3.D.- CARACTERISTICAS SUPERFICIALES.	211
3.3.D.1.- AUTOAGLUTINACION.	211
3.3.D.2.- HIDROFOBICIDAD.	214
3.3.D.3.- MOTILIDAD.	215
3.3.E.- PRODUCCION DE TOXINAS.	217
3.3.F.- SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS.	218
3.3.G.- ESTUDIO DE LA ACCION DEL SUERO NO INMUNE SOBRE CEPAS DE SEROGRUPO O11.	220
3.3.G.1.- RESISTENCIA DE LAS CEPAS A LA ACCION BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.	220
3.3.G.2.- VIA DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.	229
3.3.G.3.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.	232
3.3.G.4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA.	235
3.3.H.- VALORACION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS DEL COMPLEMENTO.	236
3.3.H.1.-NIVELES DE C1q EXISTENTES EN SUERO NO INMUNE TRATADO CON CEPAS DE SEROGRUPO O11.	236
3.3.H.2.- NIVELES DE C3b Y C5b-9 DEPOSITADOS SOBRE LAS MEMBRANAS DE CEPAS DE SEROGRUPO O11, TRATADAS CON SUERO NO INMUNE.	237
3.3.I.- DOSIS LETAL 50.	242
4.- DISCUSION.	243
5.- CONCLUSIONES.	256
6.- BIBLIOGRAFIA.	260

0.- AGRADECIMIENTOS.

Finalizado este trabajo he de reconocer la participación en él de mucha gente, sin la cual probablemente no se hubiera llevado a cabo, por ello quiero expresarles mi agradecimiento.

He de reconocer la estima que me merece el Dr. Juan Tomás por haberme acogido en su grupo de investigación, por su dirección y estímulo.

También quiero agradecer a Silvia Camprubí su amistad y apoyo incondicional en todo momento, que ha contribuido a paliar momentos difíciles.

Quiero agradecer asimismo a los Dr. Miguel Regué, Antonio Juárez y Miguel Viñas su ayuda desde el inicio de este trabajo, así como sus comentarios y estímulo.

Al Dr. Javier Benedí quiero agradecerle su apoyo y colaboración científica en este como en otros temas.

Al Dr. Ramón Parés por aceptarme en su Departamento permitiendo que llevase a cabo la redacción de esta memoria.

Agradezco a sí mismo, la ayuda prestada por el Dr. Paco Congregado de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y por la Dra. Carmen Paniagua de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, la obtención de algunos datos.

Al Profesor Williams Kay de la Universidad de Victoria (Canada) sus consejos y comentarios científicos sobre el tema.

Al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona la colaboración prestada en la obtención de alguna de las imágenes que forman parte de esta tesis.

A todos los compañeros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología con los que tantos ratos buenos y malos he pasado y sobre todo, a todas aquellas personas que en uno u otro momento han formado parte de nuestro grupo de trabajo.

Finalmente, agradezco a mis padres y hermana su apoyo incondicional y especialmente, a Tony todos los momentos que hemos pasado juntos.



1.-INTRODUCCION

1.1.- EL GENERO AEROMONAS.

El género Aeromonas pertenece a la familia Vibrionaceae, englobada dentro de la sección de los bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos, según el manual de Bergey's (171).

Morfológicamente son bacilo-cocos de 0.1-0.3 μm . de diámetro y 1.0-3.5 μm . de longitud, que forman parejas o cadenas cortas, no dan lugar a formas de resistencia y generalmente son mótils mediante un flagelo polar, aunque existe una especie no mótil.

Metabólicamente son quimiorganotrofos, catalasa y oxidasa positivos, emplean numerosos azúcares y ácidos orgánicos como fuente de carbono, y reducen los nitratos a nitritos, pudiendo oxidar y fermentar la glucosa.

Las características bioquímicas del género Aeromonas fueron estudiadas por Eddy (33, 34), Ewing (41), Smith (145), Popoff (120), McCarthy (89) y Popoff y Véron (121), los cuales determinaron que producen ácido, o bien ácido y gas (CO_2 y H_2) a partir de glucosa y maltosa, pero no a partir de xilosa, dulcitol, inositol, aditol, malonato y muconato; poseen gelatinasa, deoxyribonucleasa, ribonucleasa, y tween 80 esterasa; y ninguna produce sulfito de hidrógeno a partir de tiosulfato.

Todas las especies de este género son resistentes al agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridina (0/129), tienen una relación de guanina-citosina (G + C) en su

DNA de 57-63% y su habitat mas común es agua de rio y mar.

Dentro del género Aeromonas podemos diferenciar dos grandes grupos: uno formado por microorganismos psicrófilicos y no mótiles, en el cual sólo hallamos la especie Aeromonas salmonicida y otro grupo formado por microorganismos mesófilicos y mótiles, en el cual se hallan las especies Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria y Aeromonas caviae (120, 121).

1.1.A.- AEROMONAS NO MOTILES: AEROMONAS SALMONICIDA.

Las células de A. salmonicida son coco-bacilos cuya longitud es el doble de su anchura, forman cadenas ó agrupaciones (145), no son mótiles y su temperatura óptima de crecimiento se halla entre 22-25°C, pudiendo crecer desde 5°C hasta 35°C. En agar nutritivo a 22°C durante 48 h., dan lugar a colonias elevadas, redondas, enteras y translúcidas; en condiciones aeróbicas con 0.1% de tirosina o fenilalanina producen un pigmento marrón hidrosoluble (172), aunque se ha hallado alguna cepa no pigmentada (145); y en agar sangre producen rápidamente hemólisis, volviéndose las colonias de color verdoso en 7 días.

Esta especie fermenta arabinosa, trehalosa, galactosa, manosa y dextrina; es negativa para las pruebas de crecimiento en KCN, en caldo nutritivo con 7.5% de NaCl, urea, ornitina decarboxilasa (ODC) y tetrionato reductasa; acidifica el medio a partir de rhamnosa, sorbosa, sorbitol, lactosa, rafinosa y celobiosa; y la arginina es catabolizada vía

arginina dihidrolasa (ADH). Además, en sus extractos hallamos arginina desaminasa, ornitina transcarbamilasa, carbamil fosfoquinasa, carbamil fosfatasa, adenosin tri- di- y monofosfatasas (143).

A. salmonicida es un patógeno primario en condiciones naturales, siendo un importante patógeno de peces. Dicha especie se ha aislado en aguas naturales, observándose que su tiempo de permanencia, en las mismas, es breve (90).

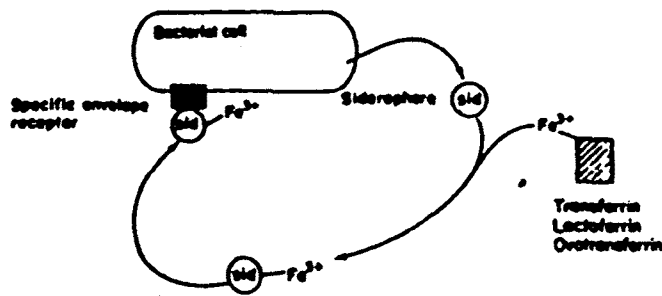
La notoriedad de esta especie bacteriana se estableció en 1894, cuando por primera vez se describió en Alemania la furunculosis en las truchas (161). Esta enfermedad, es todavía hoy el principal problema en piscifactorías de salmones. Sin embargo, A. salmonicida no queda restringida a un único tipo de peces (88), sino que también se ha reconocido como el agente etiológico causal de la eritrodermatitis en las carpas (14) y de ulceraciones en diferentes especies piscícolas (38, 150). Las cepas más comúnmente aisladas de peces no salmónidos, crecen muy lentamente y manifiestan diferentes características bioquímicas (cepas atípicas), aunque recientemente también se han podido aislar de salmónidos procedentes del Atlántico (116).

La virulencia de A. salmonicida, para su mejor comprensión, debe considerarse a nivel molecular. El factor de virulencia más importante de este organismo es una estructura proteica en forma de lámina S, denominada lámina A, que presenta una simetría tetragonal (103). Los análisis bioquímicos e inmunológicos de esta estructura superficial, así como el aislamiento del monómero de proteína A, demuestra que este factor de virulencia esta

altamente conservado en todas las cepas virulentas. Esta estructura superficial protege claramente a A. salmonicida de los mecanismos de defensa de su huésped natural (peces), por consiguiente confiere patogenicidad al microorganismo.

Otra propiedad importante, en la virulencia bacteriana de esta especie, es la capacidad que posee para secuestrar el ión férrico mediante el sistema de alta afinidad lactoferrina-transferrina (19). Esto permite al patógeno crecer en condiciones limitantes de hierro, que son las que normalmente se hallan en los tejidos de los peces.

Representación esquemática del sideróforo:



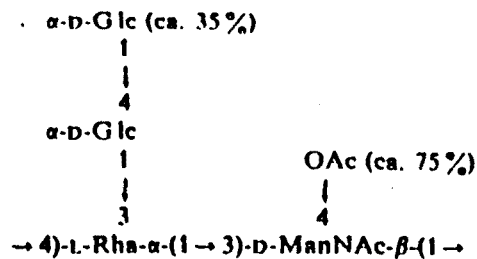
El papel de las toxinas en la virulencia de A. salmonicida permanece poco claro. Este microorganismo produce enzimas proteolíticos (142), enzimas con actividad hemolítica (152) y otros enzimas activos sobre las membranas celulares (81). A temperaturas de 13°C o parecidas posee una elevada capacidad necrótica, patente en tejidos de peces infectados, concomitante con la actividad de los enzimas anteriormente citados. Además, se ha descrito una actividad leucotóxica (48) que podría producir parte de los síntomas de la

furunculosis. Sin embargo, existe una grave problemática a nivel molecular debida a que las células que poseen lámina A no presentan, en dicha lámina, poros de suficiente tamaño para permitir la salida al exterior de las citadas proteínas. Este hecho, no es único en A. salmonicida, pues en diferentes especies de Clostridium ocurre algo similar (167). Debe tenerse presente que la estructura tetragonal de la lámina de A. salmonicida recuerda a la lámina S de bacterias Gram positivas, pues en las Gram negativas las láminas S poseen una estructura hexagonal (4).

La endotoxina (lipopolisacárido) de esta especie bacteriana no es tóxica para salmónidos, a pesar de exhibir una toxicidad normal en ratón, con una dosis letal 50 (DL₅₀) de 21.6 mgr. de endotoxina por kilogramo de peso (115). Tanto serológicamente como por su composición y estructura química, las diferentes cepas bacterianas pertenecientes a esta especie se manifiestan totalmente homogéneas, constituyendo un único grupo serológico (67).

Característicamente, el lipopolisacárido (LPS) de A. salmonicida presenta, en gel de poliacrilamida, un antígeno O en forma de doble banda y una estructura química que se mantiene idéntica en diferentes cepas de origen geográfico diverso.

Estructura del LPS de A. salmonicida :



Conviene también destacar que dicha especie bacteriana presenta la propiedad de la autoaglutinación, que se halla asociada a virulencia (147).

1.1.B.- AEROMONAS MOTILES.

Las células englobadas en este grupo son bacilos de tamaño variable que poseen un flagelo polar de 1.7 μm . de longitud, en cultivos jóvenes producen flagelos laterales más cortos que el polar y su temperatura óptima de crecimiento son 28°C, pudiendo crecer desde 5°C hasta 41°C. En agar nutritivo dan lugar a colonias elevadas, redondas y lisas, cuyo olor varía notablemente, desde extremadamente fuerte hasta inapreciable. No producen pigmento, aunque Ross (134) aisló una cepa que producía un pigmento rojo-marrón oscuro, indistinguible en apariencia al sintetizado por las cepas de A. salmonicida (no mótil).

Todas las cepas fermentan manitol, trehalosa, fructosa, galactosa y dextrina. Son positivas para las pruebas de lecitinasa, fosfatasa, ADH, hidrólisis del O-nitrofenil- β -D-

galactopirenósido (ONPG) y crecimiento en caldo nutritivo sin NaCl; son negativas para las pruebas de pectinasas, ODC, triptófano, fenilalanina deaminasa, crecimiento en caldo nutritivo con 5% de NaCl y producción de ácido a partir de sorbosa, eritritol y rafinosa.

Como se ha dicho anteriormente, dentro de este grupo se hallan tres especies: A. hydrophila, A. sobria y A. caviae; de entre los cuales, sólo A. hydrophila y A. sobria son patógenos de una amplia variedad de animales, entre los que se incluye la especie humana (113). Dichas especies de Aeromonas son mesófilas saprofíticas y, normalmente, pueden encontrarse en aguas de lagos, estuarios y áreas costeras, así como en un amplio número de vertebrados e invertebrados, como por ejemplo: moluscos, crustáceos, peces (40), anfibios (26), reptiles (84), aves y mamíferos. Estas especies son altamente importantes como patógenos de peces, pues producen típicamente, una fulminante septicemia hemorrágica, a pesar de formar parte de la flora autóctona de dichos vertebrados. Por consiguiente actúan como patógenos primarios y oportunistas (26). Al mismo tiempo, estas especies bacterianas presentan manifestaciones clínicas en humanos como gastroenteritis, infecciones tisulares superficiales, septicemias y meningitis (47, 52).

Recientemente se ha demostrado que existe una relación importante entre el grado de virulencia de las Aeromonas móviles y las características superficiales que presentan (99).

Mediante métodos inmunológicos, se ha descrito un grupo de Aeromonas perteneciente tanto a A. hydrophila como a A. sobria, que actúa característicamente como patógeno primario en peces (99). Cepas similares a nivel molecular, de ambas especies, han

sido descritas como de elevada virulencia en ratón (60) y probablemente, en clínica. Este grupo de cepas presenta características moleculares similares a las de A. salmonicida y se hallan englobadas dentro de un serogrupo único denominado O11.

Las Aeromonas mesófilas pertenecientes al serogrupo O11 se caracterizan por presentar las siguientes propiedades:

1.- Poseen una lámina proteínica extraperiférica a la célula bacteriana, formada por una única proteína denominada proteína S (52 Kd.), que constituye la denominada lámina S. Dicha lámina, presenta similitudes y diferencias con la lámina A de Aeromonas salmonicida.

2.- Presentan en su superficie un antígeno O del LPS que se muestra homogéneo, dando lugar a una doble banda en su análisis en geles de SDS-PAGE. Forma parte de este trabajo el análisis bioquímico e inmunológico de dicho antígeno O. Esta estructura se correlaciona positivamente con la presente en cepas de Aeromonas salmonicida que presentan lámina A, ya que estas cepas también presentan un antígeno O del LPS homogéneo que da origen a una doble banda en SDS-PAGE, aunque presenta una movilidad electroforética relativa menor que el de las Aeromonas mesófilas de serogrupo O11.

3.- Todas las Aeromonas pertenecientes a este serogrupo son mótils por flagelación monopolar y presentan la propiedad de la autoaglutinación. Esta última propiedad también es inherente a A. salmonicida.

4.- Las Aeromonas mesófilas de serogrupo O11 son las de mayor virulencia tanto en peces como en ratones, tal como se ha estudiado en esta tesis. A lo largo de esta tesis queda demostrado su papel en los dos tipos de procesos infecciosos humanos como son las septicemias generalizadas debidas al género Aeromonas y los procesos de gastroenteritis aguda, también atribuidos a dicho género.

Otro grupo de Aeromonas mesófilas, formado característicamente por cepas de Aeromonas hydrophila, se ha descrito como de intermedia virulencia en diferentes procesos patológicos en poiquiloterms y homeoterms. Este grupo de A. hydrophila pertenece al serotipo O34, descrito por Sakazaki (137).

Las principales características moleculares a nivel de la superficie bacteriana, de los microorganismos que constituyen este grupo, son :

1.- Ausencia de la estructura denominada lámina S.

2.- Presencia de un antígeno O del LPS extremadamente heterogéneo en cuanto a su movilidad electroforética relativa en SDS-PAGE, pero homogéneo en cuanto a su composición química y antigenicidad.

3.- A pesar de la gran variabilidad en cuanto a los perfiles proteínicos de la membrana externa de A. hydrophila descritos anteriormente (91), dicho serogrupo presenta idéntico perfil en proteínas de membrana externa en SDS-PAGE aunque las cepas tengan un origen tremendamente variado, tal como se indica en esta tesis.

4.- La problemática de la virulencia intermedia de estas cepas se pondrá de manifiesto a lo largo de esta tesis, intentando relacionar la temperatura de crecimiento de las cepas con la propiedad de la virulencia bacteriana.

Este último serogrupo (O34) presenta un elevado interés desde el punto de vista ecológico, biotecnológico y económico, pues frecuentemente se localizan en diferentes muestras y tienen una incidencia elevada a nivel de la producción masiva de peces de agua marina o dulce cultivados. También es importante su influencia en la alteración de productos alimentarios, debido a su posterior efecto en una patología gastroenterítica.

1.2.- UTILIZACION DE BACTERIOFAGOS EN RECEPTORES CONOCIDOS, COMO MARCADORES DE ESTRUCTURAS DE LA SUPERFICIE BACTERIANA.

Los bacteriófagos son virus bacterianos y en consecuencia, su ciclo biológico depende de su capacidad para infectar a la célula huésped.

El primer paso en el proceso infeccioso es la unión de un virión del fago a lugares específicos de la célula bacteriana, que reciben el nombre de receptores. A este proceso de unión se le denomina adsorción. Seguidamente, se produce la penetración del ácido nucleico en el interior de la célula bacteriana, para dar lugar a una nueva progenie de fagos.

La interacción fago-receptor se explica como una relación de primer orden en lo que respecta a la concentración de bacterias y al tiempo requerido por un bacteriófago para entrar en contacto con la bacteria (3). Aunque esto sirve como explicación general, debe tenerse en cuenta que en ambientes naturales los fagos tienen un efecto sobre la población bacteriana sólo cuando esta alcanza una elevada concentración (170). Además la cinética de adsorción depende de la concentración relativa de bacteriófagos y bacterias, del pH, de la concentración iónica, temperatura y factores ambientales.

La habilidad de los bacteriófagos para unirse a su receptor depende de que la bacteria presente el citado receptor y de la accesibilidad del mismo.

Un aspecto importante en la interacción fago-bacteria es la utilización, por parte de los bacteriófagos de estructuras macromoleculares de la superficie bacteriana como receptores (104).

La membrana externa constituye la cubierta superficial de las bacterias Gram negativas. Esta membrana es una importante barrera frente a antibióticos y otras sustancias tóxicas y simultáneamente, permite la entrada más o menos selectiva de nutrientes y solutos procedentes del medio. Se halla constituida básicamente por lipopolisacárido (LPS), fosfolípidos y proteínas. Algunas de las proteínas constituyentes de esta membrana se hallan ancladas al peptidoglicano permitiendo de este modo la fijación de la membrana externa a la superficie bacteriana. Otras proteínas son responsables de las propiedades de permeabilidad de la membrana controlando el acceso de solutos al periplasma y a la membrana citoplasmática. Las proteínas de este último grupo presentan diferente grado de especificidad en su función.

La interacción fago-receptor suele ponerse en evidencia mediante experimentos en los que se incuban fagos con el supuesto receptor purificado y a intervalos de tiempo determinados se titulan los fagos libres y los adsorbidos en el receptor. Otro sistema empleado para estudiar esta interacción es mediante mutantes que han perdido la capacidad de adsorber los bacteriófagos e identificar por comparación con la cepa salvaje y el mutante, cual de sus estructuras ha variado.

Para numerosos bacteriófagos de bacterias Gram negativas existe una correlación directa entre el lugar de adsorción del fago a la bacteria y la capacidad de inactivar al bacteriófago mediante LPS purificado de la citada cepa bacteriana (75).

Este hecho, pone de manifiesto que el LPS es un receptor frecuente para numerosos bacteriófagos. Así, de los seis grupos morfológicos de fagos descritos por Bradley (16), cuatro de ellos contienen fagos cuyo receptor es el LPS. En el grupo A de Bradley se hallan englobados fagos que contienen como material genético DNA de doble cadena y poseen cola larga contráctil, como los colifagos T2, T4, T6, P1 y P2 y los fagos FO y C21 de Salmonella. En el grupo B hallamos fagos con DNA de doble cadena, que poseen una cola larga no contractil, como el colifago T5 (16). El grupo C esta formado por bacteriófagos que poseen una cola corta no contráctil, como el P22 de Salmonella anatum, el e¹⁵, e³⁴ y g₃₄₁ de Salmonella y los colifagos T3, T7 y Ω_3 . El grupo D esta formado por bacteriófagos carentes de cola que se adhieren mediante capsómeros apicales a sus receptores, como el ØX 174 y el 6SR de Salmonella.

Todos estos grupos contienen fagos que interaccionan de forma irreversible con el LPS, provocando la eyección del material genético.

El LPS se halla formado por unas regiones poco variables, que son el lípido A y el nucleo y por otra altamente variable, que es la cadena polisacáridica o antígeno O (79). A causa de esto, los bacteriófagos cuyo receptor es el nucleo del LPS poseen un amplio espectro de huéspedes, mientras que los que poseen el antígeno O, suelen ser fagos muy

específicos.

Entre los bacteriófagos que poseen como receptor el LPS, podemos diferenciar dos grupos: 1) aquellos que poseen como receptor el núcleo del LPS, y 2) aquellos que poseen como receptor el antígeno O del LPS.

Dentro de los fagos cuyo receptor son las cadenas polisacáridas de antígeno O hallamos los fagos englobados dentro del grupo C de Bradley (174, 59). En este grupo la interacción fago-receptor es de tipo enzimático, así los fagos ϵ^{15} , ϵ^{34} , Ω_8 y P22 contienen una endoglicosidasa que hidroliza un disacárido específico de la cadena polisacárida del LPS y el fago g_{341} posee una esterasa que realiza esta función. Debido a que las interacciones son enzimáticas y a que el antígeno O es una molécula muy variable, estos bacteriófagos presentan un espectro de huéspedes muy limitado. Algunos experimentos de inactivación con LPS purificado han demostrado que la actividad enzimática requiere únicamente la presencia del antígeno O específico. Sin embargo, la introducción del material genético requiere la presencia de la molécula completa de LPS.

Entre los bacteriófagos cuyo receptor es el núcleo del LPS hallamos los grupos A, B y C de Bradley. Los bacteriófagos del grupo A y B interactúan con el núcleo del LPS mediante su larga cola, pudiendo establecer su unión con el receptor incluso en presencia del antígeno O (74). Los bacteriófagos del grupo D también interactúan con el núcleo, aunque en este caso la unión se establece mediante los capsómeros, pues no poseen cola. Este último grupo de bacteriófagos no puede unirse a su receptor (núcleo) en presencia del

antígeno O (76), pues esta estructura hace que el receptor les sea inaccesible.

Algunos bacteriófagos pertenecientes al grupo A, como el T2 y el T6 presentan sus receptores asociados a proteínas de la membrana externa (168). Se observó que el LPS aislado no inactivaba a los citados bacteriófagos, sino que para llevarse a término la inactivación se necesitaba la presencia de una proteína de 44 Kd existente en la membrana externa. Este hecho, demostraba que esta proteína era el componente portador del receptor.

Algunas bacterias se hallan recubiertas por estructuras que se definen como cápsulas (8, 70). Estas cápsulas bloquean el acceso de los bacteriófagos a sus receptores presentes en los componentes de la superficie de la membrana externa de la bacteria. Además, también son receptores de algunos bacteriófagos incapaces de atacar a células no capsuladas.

En general, la interacción de los fagos con la cápsula no provoca la eyección del material genético (77) en el interior de la bacteria. Esto, indica que la interacción es posiblemente reversible.

Además del LPS, las proteínas y la cápsula, también existen otras estructuras superficiales que pueden actuar como receptores de bacteriófagos. Entre estas estructuras hallamos a los pilis y flagelos.

El flagelo es una estructura superficial existente en la membrana externa de bacterias tanto Gram positivas como negativas, que se halla constituido por tres componentes: el corpúsculo basal, mediante el cual se ancla en la célula; la curvatura y el filamento (27). El filamento esta formado por una estructura helicoidal de subunidades de flagelina.

La mayoría de los fagos cuyo receptor es el flagelo se hallan englobados dentro del grupo B de Bradley. Este tipo de fagos se unen generalmente al filamento del flagelo, estableciendo una unión reversible a causa de lo cual, no pueden introducir su material genético. Únicamente podran introducir su material genético en el interior de la bacteria cuando su unan de forma irreversible al corpúsculo basal (95). Estos datos hacen que los bacteriófagos de flagelo se asemejen en cierto modo a los bacteriófagos de cápsula.

Como se ha dicho anteriormente, inicialmente el receptor del flagelo es el filamento y por consiguiente, variaciones en la composición y estructura del mismo hacen que no pueda reconocerse como tal.

Los pilis son estructuras filamentosas existentes en la superficie de algunas bacterias Gram negativas, los cuales actuan en ocasiones como receptores de bacteriófagos del grupo E y F de Bradley (16). En el grupo E hallamos bacteriófagos cuyo material genético en RNA y en los del grupo F, poseen DNA de una sola cadena.

1.3.- PATOGENICIDAD.

De todos es conocido, que animales tanto homeotermos como poiquilotermos presentan en la superficie de las mucosas numerosos microorganismos a lo largo de toda su vida. Estos microorganismos que forman biofilms en determinados tejidos del huésped, reciben el nombre de flora autóctona y constituyen una protección ante posibles infecciones por patógenos externos (25).

Es sorprendente la coexistencia presente entre flora y huésped ya que, los microorganismos que la forman son potencialmente patógenos para el huésped, pues de rebasar las áreas en que se hallan ubicados y llegar hasta otros tejidos, puede provocar enfermedades infecciosas (157).

Todos los microorganismos capaces de originar enfermedades infecciosas reciben el nombre de patógenos. Diferenciándose entre ellos dos tipos: los patógenos primarios u obligados, cuyo único modo de vida es mediante colonización del huésped y patógenos facultativos u oportunistas, cuya forma habitual de vida no es colonizando al huésped; sino que únicamente lo coloniza si las condiciones son propicias para ello. Un ejemplo de patógeno oportunista, es el de Pseudomonas aeruginosa pues habitualmente se halla en agua y en tierra, presentando únicamente patogenicidad en individuos quemados. Otro caso similar es el de Aeromonas hydrophila, ya que su habitat característico se localiza en aguas y (104) únicamente, genera enfermedades infecciosas en individuos inmunosuprimidos o bien, que presentan algún otro tipo de enfermedad.

La patogenicidad de los agentes infecciosos se halla ligada a la especie bacteriana, aunque no todas las cepas de una misma especie tienen la misma capacidad para producir una enfermedad infecciosa.

El grado de virulencia o patogenicidad que presenta una especie bacteriana se halla ligado, básicamente tres factores:

- Cepa bacteriana.
- Niveles de defensa del huésped.
- Cantidad de microorganismo inoculado.

Los cambios genotípicos o fenotípicos de una especie bacteriana pueden hacer que esta aumente o disminuya su capacidad para producir una enfermedad infecciosa. Así, un ejemplo de cambio genotípico es el que se produce en algunas cepas de Streptococcus pneumoniae, lo que da lugar a la existencia de cepas tipo S (capsuladas lisas) y R (capsuladas rugosas) que difieren en su virulencia, ya que las de tipo R son fagocitadas y las de tipo S no lo son (73).

Los cambios fenotípicos son producidos por factores ambientales no hereditarios, pudiendo aumentar o disminuir el grado de virulencia. Así, la limitación de hierro hace que se produzca un aumento en la virulencia de Corynebacterium (135) y Clostridium tetani a causa de la aparición, en sus membranas externas, de unas estructuras capaces de secuestrar moléculas de hierro, las cuales reciben el nombre de sideróforos.

Otro caso de variación fenotípica es la producción de fimbrias en determinadas condiciones de crecimiento, como en el caso de Neisseria.

Los niveles de defensa del huésped influyen notablemente en la virulencia de una determinada especie bacteriana, ya que niveles de defensa bajos hacen al huésped más susceptible a la entrada de microorganismos, lo cual produce un aumento en el grado de virulencia del patógeno.

En la determinación del grado de virulencia debemos tener en cuenta la cantidad de agentes patógenos requeridos para generar la enfermedad infecciosa. Esto se debe a que el grado de virulencia es menor, cuanto mayor sea la cantidad de patógenos que se necesiten.

En función de todo esto, podemos decir que la relación huésped-parasito en las enfermedades infecciosas comprende por un lado, las propiedades del microorganismo agresor y por otro, la respuesta del huésped.

Los microorganismos producen procesos patológicos mediante invasión de los tejidos del huésped o por toxigenicidad de los mismos.

La invasión de los tejidos del huésped por parte de los agentes patógenos, puede realizarse mediante parasitismo intracelular o extracelular, capsulas antifagocitarias, adaptación al microambiente, producción de enzimas extracelulares, adherencia y colonización.

Numerosas bacterias son altamente selectivas con respecto a los tejidos que invaden, así meningococos y pneumococos se hallan frecuentemente en la nasofaringe humana, siendo únicamente los pneumococos capaces de invadir el aparato respiratorio inferior y producir la neumonía. La causa de ello, son las características del medio, pues en determinadas ocasiones la localización de un patógeno en un tejido se debe a que en él se sintetiza algún elemento necesario para este. Un ejemplo típico es el caso de las infecciones producidas en el útero bovino por Brucella, ya que en él se sintetiza eritrol que es un factor de crecimiento para el citado microorganismo.

Las bacterias patógenas, tras invadir a su huésped, pueden multiplicarse en el interior de sus células, originando un parasitismo intracelular que habitualmente da lugar a enfermedades crónicas, como la tuberculosis; o bien pueden multiplicarse en el exterior de las células produciendo un parasitismo extracelular.

Los parásitos extracelulares únicamente pueden lesionar los tejidos del huésped mientras se mantengan fuera de las células fagocíticas o fagocitos y generalmente, producen enfermedades agudas y breves ya que, al hallarse en los tejidos estimulan el sistema del complemento y la producción de anticuerpos opsonizantes, que les hacen susceptibles a los fagocitos.

Algunas bacterias que actúan como parásitos extracelulares deben su virulencia a componentes antifagocitarios presentes en su superficie. Estas estructuras superficiales consisten en geles hidrofílicos que protegen a los parásitos de ser ingeridos por los

fagocitos. Representantes de estas estructuras son la cápsula de Klebsiella pneumoniae (57) y Bacillus anthracis, así como la llamada lámina A de Aeromonas salmonicida (83).

Otro de los mecanismos que utilizan los patógenos para invadir al huésped es la exposición, en su superficie, de macromoléculas que intervienen en la adherencia a receptores específicos presentes en algunas células del huésped. Estos elementos adhesivos, permiten una colonización localizada y una invasión más efectiva, ya que el patógeno se unirá a los receptores y se multiplicará activamente en ellos, con lo cual será más difícil de eliminar. Ejemplo de este tipo de estructuras son las fimbrias existentes en algunas cepas de Neisseria gonorrhoea, las cuales le permiten unirse a la mucosa del útero y del ureter y las estructuras adhesivas presentes en cepas enteropatógenas de Klebsiella pneumoniae y Escherichia coli.

En ocasiones, algunas especies bacterianas elaboran enzimas extracelulares responsables de sus propiedades invasivas. Así, Clostridium perfringens sintetiza hialuronidasa que despolimeriza el ácido hialurónico de la sustancia intersticial, lo cual facilita su difusión a través del tejido conjuntivo; y los Staphylococos producen coagulasas que coagulan el plasma mediante un mecanismo trombocinásico.

En 1884 se observó que determinados microorganismos eran patógenos no por un efecto invasivo sobre los tejidos del huésped, sino por un efecto tóxico. El citado efecto, se debe a toxinas (endotoxinas o exotoxinas) sintetizadas por el microorganismo.

Las exotoxinas son toxinas difundibles y termolábiles, excretadas por bacterias Gram positivas, que se hallan en filtrados de cultivos en crecimiento. Ocasionalmente, son sintetizadas por algunas bacterias Gram negativas. Cada exotoxina posee una actividad patológica específica y distinta, clasificándose como poco difusibles y muy difusibles. Un ejemplo de exotoxina es la sintetizada por Clostridium botulinum.

Las endotoxinas son producidas por bacterias Gram negativas. Se trata de macromoléculas complejas que contienen fosfolípidos y lipopolisacáridos, son termoestables, forman parte de la pared bacteriana y sólo se liberan de ella si esta pierde su integridad. Son toxinas menos potentes que las exotoxinas, cuya toxicidad se halla localizada en la región fosfolipídica y su antigenicidad en la región polisacárida.

Como se ha dicho anteriormente, en la relación huésped-parasito no solo influyen las características del patógeno, sino también la respuesta inmune generada por el huésped.

Cuando un agente patógeno entra en contacto con un posible huésped, se desencadenan en este último una serie de reacciones enfocadas a evitar la entrada y proliferación del patógeno. Estas reacciones constituyen los mecanismos de defensa del huésped y reciben el nombre de sistema inmune. Este sistema, engloba dos tipos de respuesta:

- respuesta inmune innata o inespecífica.
- respuesta inmune adquirida o específica.

Como uno de los componentes humorales influido por ambos tipos de respuesta que se activa espontaneamente por la superficie de algunos microorganismos, así como por complejos antígeno-anticuerpo, es el sistema del complemento del suero.

El sistema de complemento consta de veinte proteínas séricas circulantes en el fluido de los compartimentos extracelulares, las cuales interaccionan en una precisa secuencia de reacciones y dan lugar a la formación de fragmentos biológicamente activos, como el C3b, que actúan como promotores de la opsonización y fagocitosis (7, 87). También, originan fragmentos con capacidad para atraer a los fagocitos, como el C5a y complejos que provocan la lisis bacteriana, como el complejo de ataque C5b-9.

1.3.A.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO: COMPLEMENTO.

El descubrimiento del complemento ocurrió entre 1880 y 1890 (17, 108), a partir de estudios sobre la capacidad del suero sanguíneo para matar a ciertos microorganismos. En estos estudios, se observó que numerosas bacterias Gram negativas descendían su viabilidad al entrar en contacto con suero normal y por el contrario, no sucedía lo mismo si el citado suero se calentaba a 56°C. Esto se debe, a que dicha acción se lleva a cabo por unión a las membranas celulares del complejo terminal de ataque (MAC), que se halla formado por proteínas del complemento. Todos estos datos determinan que las células invasoras son atacadas por el sistema del complemento y que el anticuerpo tiene como misión identificar la célula invasora como organismo extraño y activar al complemento (50).

La activación del sistema del complemento por parte de anticuerpos representa una serie de amenazas no sólo para el microorganismo invasor, sino también para las propias células del huésped. Esta actividad autodestructora se halla muy rebajada porque el anticuerpo fija el complemento en la superficie de la célula invasora. El anticuerpo tiene tres funciones específicas con respecto al complemento: 1) identificación del invasor extraño, 2) activación del sistema de complemento, y 3) fijación del complemento en las células invasoras.

El sistema de complemento ha de satisfacer, a su vez, otros tres requisitos. Debe tener una unidad de reconocimiento propia, de modo que pueda reconocer a las moléculas del anticuerpo que han detectado un invasor extraño. Debe tener receptores que le permitan combinarse con la superficie de la célula extraña cuando este activada. Y, para reducir al mínimo el daño a las propias células del huésped, su actividad debe estar limitada en el tiempo. Esta limitación se consigue en parte mediante la descomposición espontánea del complemento activado, y en parte, por la interferencia de enzimas inhibidores y destructores. Sin embargo, el control del complemento no es perfecto y hay veces que resultan dañadas células del huésped (56). La inmunidad es por tanto, un arma de doble filo.

Las proteínas del sistema del complemento se designan con la letra C y un número: C1, C2, C3, y así sucesivamente hasta el C9. Estas proteínas se activan mediante dos vías interconectadas, denominadas vía clásica y vía alternativa. Ambas vías, confluyen en la ruptura de la proteína denominada C3, convirtiéndose en la partícula clave de la cadena del

complemento.

La vía clásica se activa generalmente, por la unión de anticuerpos (IgG ó IgM) a antígenos de la superficie celular, aunque en algunas ocasiones, determinadas estructuras de algunas especies bacterianas son capaces de activarla (22). Proporciona al individuo inmunidad adaptativa . Se inicia mediante la proteína C1, que es en realidad un conjunto de subunidades desiguales como: C1q, C1r y C1s las cuales, se hallan unidas entre sí por enlaces diferentes a los enlaces covalentes normales y son dependientes de la presencia de Ca^{2+} , pues si se extrae este ión mediante agentes quelantes, las partículas se desarticulan.

La unidad de reconocimiento para la activación de la vía clásica del complemento es la molécula C1q. Esta molécula, se une al fragmento Fc de los complejos antígeno-anticuerpo que se hallan en la membrana celular, produciéndose en ella cambios conformacionales que harán que las proenzimas C1r y C1s se transformen en enzimas activos C1r y C1s con actividad serina proteasa (128). La transformación de la subunidad C1 en C1s es catalizada mediante C1r.

El enzima activo C1s actúa sobre dos componentes del complemento: C4 y C2, para generar el enzima C4b,2a con actividad C3-convertasa. Al actuar C1s sobre C4 da lugar a un fragmento pequeño denominado C4a, que queda en la fase fluida y no toma parte en la cadena del complemento, y un fragmento grande denominado C4b, que se une covalentemente a la membrana celular. Por otro lado, el C1s actúa sobre C2 originando dos fragmentos grandes C2a y C2b. El fragmento denominado C2a se une al C4b, dando lugar

al complejo C4b,2a, que posee actividad C3-convertasa. En consecuencia, el enzima C1s proporciona gran cantidad de complejos C4b,2a con actividad C3-convertasa, cuyo sustrato es el factor C3 del complemento.

Al actuar C4b2a sobre C3 se produce la excisión de C3 en dos fragmentos, uno de los fragmentos C3a, es una anafilotoxina que se libera a la fase líquida y desempeña un papel de mediador en la inflamación; el otro, C3b, se une covalentemente a un receptor de la membrana celular, que si se halla junto al enzima C4b,2a podrá establecer una unión no covalente con C4b y formar el complejo C4b,2a,3b, con actividad C5-convertasa.

La vía alternativa del complemento se activa con algunas estructuras presentes en la superficie de los microorganismos, como son polisacáridos capsulares, lipopolisacárido (LPS), etc., en ausencia de anticuerpos específicos. A causa de ello, posee gran importancia en la defensa inmune (43) y proporciona inmunidad innata. Se inicia por acción de un enzima con actividad serina proteasa, presente en la sangre en forma activa, denominado factor D, que actúa rompiendo las moléculas de factor B, asociadas temporalmente al factor C3 del complemento, en presencia de Mg^{2+} . Esto, da lugar a pequeñas cantidades del complejo C3,Bb con actividad C3-convertasa.

El enzima C3Bb actúa sobre el factor C3 y origina un fragmento pequeño, C3a, que queda en la fase fluida y otro grande, C3b que se asociará con el factor B, sobre el cual ha actuado el factor D de la sangre, y dará lugar al complejo C3b,Bb. Este último complejo (C3b,Bb) es muy inestable e interacciona en presencia de Mg^{2+} con el factor P o

properdina, para dar lugar al complejo estable C3b,P,Bb, con actividad C3-convertasa.

Finalmente, el C3b,P,Bb fragmentará al factor C3 y se unirá al fragmento C3b, para dar lugar a C3b,P,Bb,C3b con actividad C5-convertasa. La interacción de C3 y C3b con los factores B,D y P amplifica la acción del complemento, así como la unión de C3b a la superficie celular se regula mediante inhibidores como B1H y C3B1NA.

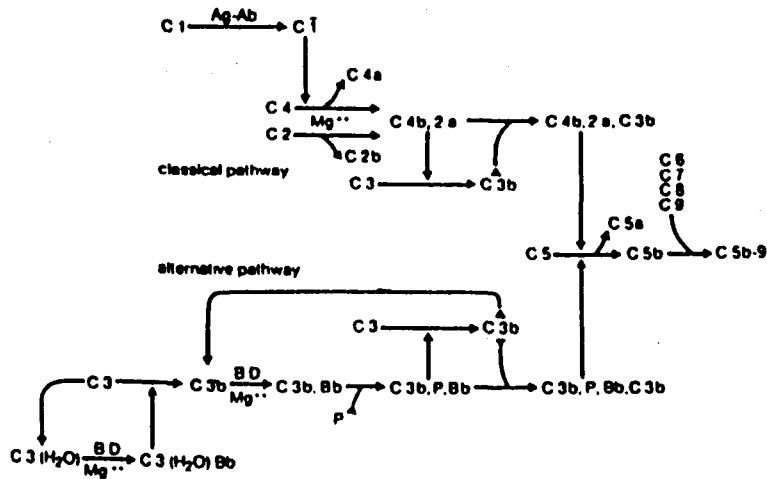
Una vez llegado al complejo con actividad C5-convertasa (C4b,2a,3b en la clásica y C3b,P,Bb,C3b en la alternativa), ambas vías de actuación del complemento siguen igual. La proteína C5, mediante el complejo con actividad C5-convertasa, se transforma en un fragmento pequeño, C5a, que permanece en la fase fluida y tiene actividad quimiotáctica y en otro fragmento mayor, C5b, que se ancla en la membrana celular. Seguidamente, se produce el acoplamiento espontaneo de los factores C6 y C7 al C5b, para formar un complejo trimolecular, C5b-7, que se inserta en los hidrocarbonos de la membrana (119). La unión del factor C8 al complejo C5b-7 genera canales transmembrana (123) y finalmente, el complejo C5b-8 cataliza la polimerización del factor C9, que se une al complejo C5b-8 y actúa sobre las membranas celulares originando agujeros que ponen en contacto a las moléculas del interior y el exterior de la célula bacteriana. Esta abertura existente en la membrana, hace que penetren hacia el interior agua e iones (12) que desestabilizan la osmolaridad y provocan la lisis del microorganismo (13).

El complejo C5b-9 aparece, en observaciones al microscopio electrónico, como una estructura cilíndrica que aparentemente, posee un canal central hidrofílico y una zona

hidrofóbica en contacto con la bicapa lipídica de la membrana celular. Este canal posee 150-160 Å de largo, un diámetro interno de 100 Å, un diámetro externo de 200-220 Å y una superficie apolar de 40 Å en contacto con el interior hidrofóbico de la membrana.

Estudios realizados sobre la unión del complejo de ataque del complemento a las membranas muestran que es el responsable de la muerte bacteriana mediada por el suero y que un requisito para llevar a cabo la bacteriolisis es la presencia de lisozimá (mucopéptido N-acetylmuramoylhidrolasa), que degrada el peptidoglicano hasta monómeros o unidades polisacáridas (138). Se ha observado que si se extrae el citado enzima mediante bentonita o bien se neutraliza mediante anticuerpos, no se produce bacteriolisis, sino que únicamente aparecen bacterias muertas no lisadas (150, 58).

Esquema de la cascada del complemento:



Las bacterias GRAM negativas pueden activar el complemento por la vía clásica y/o la alternativa. El funcionamiento de la vía clásica y la amplificación de la vía alternativa requiere la participación de IgG o IgM. La vía clásica generalmente requiere la presencia de anticuerpos, aunque también puede activarse directamente mediante el núcleo de algún LPS ó el lípido A. Sin embargo, a la vía alternativa pueden activarla polisacáridos capsulares independientemente de anticuerpo.

La actividad del complemento, en presencia de anticuerpos, es el factor principal que contribuye a los efectos bactericidas y opsonizadores en los mutantes "rough" para el LPS.

Los anticuerpos se requieren en tan poca cantidad que generalmente no son un factor limitante. Se ha demostrado que tanto en suero inmune como no inmune existen suficiente anticuerpos para activar al complemento, sobre todo para los determinantes antigénicos existentes en el LPS (148).

Las dianas de los anticuerpos son diversas: LPS, proteínas de membrana externa y polisacáridos capsulares. Los anticuerpos contra fimbrias y flagelos, generalmente no activan al complemento pues estas estructuras están alejadas de la membrana externa y, en consecuencia, los anticuerpos al interactuar con los determinantes antigénicos respectivos, no entran en contacto con los componentes lipídicos de la membrana.

Morrison y Kline (101) observaron que el LPS activa la vía clásica y la alternativa del complemento. Estudios posteriores, demostraron que las cepas sin antígeno O activan el

complemento por la vía clásica y sin embargo, las cepas con un LPS completo activan la vía alternativa.

Cuando el LPS activa la vía clásica, la molécula de C1q se une al núcleo del LPS mediante fuerzas iónicas bajas. Sin embargo, cuando activa la vía alternativa, sin presencia de anticuerpos, puede realizarlo: por presencia de antígeno O específico, que bloquea la inactivación de C3b por parte de los factores H e I (30); o bien, por accesibilidad de los determinantes del núcleo del lipopolisacárido, concretamente del monosacárido L-glicero-D-manoheptosa.

Existen diferencias sustanciales en la vía de activación del complemento por las diferentes regiones que constituyen el LPS: lípido A, núcleo del LPS y antígeno O. Así, el lípido A (24) y el núcleo del LPS de algunas especies bacterianas, como Aeromonas hydrophila, no activan la vía alternativa, sino la clásica por acción directa sobre el C1q. Por el contrario, la región del antígeno O, rica en polisacáridos de elevado peso molecular (101), activa la vía alternativa, siendo el prototipo de activador de esta vía en ausencia de anticuerpos.

También se han observado diferencias sustanciales en la activación del complemento por diferentes moléculas de antígeno O, en función de su grado de agregación en el LPS (173).

Las cápsulas de las bacterias GRAM negativas suelen ser homopolímeros de ácido siálico que generalmente, no activan directamente la vía alternativa, aunque por medio de anticuerpos específicos pueden llegar a activarla, ya que posiblemente estos interfieren con los mecanismos inhibidores de la vía (36).

El complemento, al unirse a la superficie celular, realiza su acción tanto sobre la membrana externa como la citoplasmática, ya que su efecto produce la liberación espontánea de numerosos marcadores. Se liberan compuestos macromoleculares de fósforo, predominantemente fosfolípidos y LPS (48), debido a la acción detergente del complejo terminal de ataque (MAC) C5b-9 sobre la pared celular y la membrana citoplasmática. Algunos autores creen que el citado complejo, podría actuar sobre los denominados puntos de adhesión de Bayer (151), aunque esto parece improbable debido a que por sus medidas (16 nm) es difícil que pueda atravesar la membrana externa, interna, el periplasma y el peptidoglicano.

Hay que tener en cuenta que la acción del complemento no solamente afecta a las estructuras superficiales de las bacterias, sino también al metabolismo bacteriano, pues provoca disminución en el transporte de azúcares y otros compuestos (53).

Algunas cepas bacterianas resisten la actividad bactericida del suero mediante la producción de proteasas y productos extracelulares que neutralizan o destruyen la integridad funcional de los componentes del complemento existentes en la fase fluida (63).

Las bacterias Gram negativas poseen propiedades únicas para la resistencia a la acción del suero generadas por su membrana externa y los antígenos asociados a ella, básicamente: polisacáridos, LPS y proteínas. Esto, se halla confirmado por el hecho de que protoplastos derivados de cepas resistentes al suero son rápidamente lisados por acción del complemento (130) y tratamientos con Tris, EDTA o polimixina B provocan una disminución en la impermeabilidad de la membrana externa a diferentes solutos, sensibilizando las cepas resistentes a la acción del suero. Todos estos datos determinan la importancia de la membrana externa como principal barrera ante la muerte celular.

La resistencia a la acción del suero puede deberse, en consecuencia a: 1) que el microorganismo emita sustancias que destruyan los factores del complemento, 2) que las estructuras más externas no activen la acción del complemento, o bien 3) que el complejo terminal de ataque (MAC) no pueda anclarse adecuadamente a la superficie del microorganismo y en consecuencia, no pueda desarrollar su actividad bactericida (64).

Algunas cepas resistentes de Escherichia coli y Salmonella typhimurium (129) opsonizan grandes cantidades de C3b en sus membranas, pero no forman asociaciones estables de C5b-9 (MAC). Esto se debe a que determinadas estructuras superficiales de las bacterias GRAM negativas no permiten que el complejo C5b-9 se intercale entre la membrana externa ya que, frecuentemente, el enzima con actividad C5-convertasa se halla situado en lugares alejados de las zonas hidrofóbicas de la superficie y no puede insertarse efectivamente entre los núcleos de hidrocarbóno de las dianas existentes en la membrana. En numerosas ocasiones, este efecto se debe a las largas cadena de antígeno O que

forman parte del LPS.

Uno de los factores importantes para el adecuado anclaje del MAC es la integridad de las membranas. En consecuencia, los factores que reducen la fluidez de las membranas externas e internas son cruciales como determinantes de la resistencia al suero (144). A causa de esto, la fluidez de la membrana es obligatoria para la formación de cualquier lesión del complemento.

Las preparaciones de LPS con cadenas largas de antígeno O son menos fluidas que las que contienen la misma cantidad de LPS sin antígeno, lo que convierte a estas últimas en más sensibles a la acción del complemento.

De las estructuras superficiales implicadas como mediadores de la resistencia al suero, el LPS y las proteínas pueden afectar la viscosidad de las membranas, mientras que los antígenos K pueden funcionar modulando las estructuras hidrofílicas.

El LPS es en principal constituyente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, esta formado por una subunidad que contiene el lípido A unido covalentemente a cadenas cortas, bastante conservadas, de oligosacáridos que constituyen el núcleo y un antígeno O único, formado por unidades repetidas de una a cuarenta veces. Es el factor decisivo en la impermeabilidad y en la virulencia (107), pues a causa de él moléculas gruesas no pueden interactuar con la membrana externa. La barrera física de esta estructura se halla constituida por el antígeno O, el cual juega un papel importante en la interacción

de las células con el ambiente, pues bloquea el acceso de los anticuerpos al núcleo y determina la susceptibilidad de las bacterias al complemento. Se ha sugerido que el antígeno O enmascara algunos lugares de la superficie celular y es el antígeno más expuesto.

Algunos autores han observado que la unión de LPS aislado a bacterias sensibles a la acción del complemento, genera protección de las mismas a dicha acción (5). Esto, hace pensar que el LPS es una molécula diana del complemento y en consecuencia protege a las bacterias de su acción.

Existen numerosos estudios en los que aparecen variaciones en la activación del complemento al emplear cepas genéticamente idénticas (65) que únicamente difieren en el LPS. Se ha observado que las cepas con un LPS tipo "smooth" suelen ser resistentes a la acción del complemento y por el contrario, las de tipo "rough" suelen ser sensibles. Todos estos datos, indican que la activación del complemento tiene lugar en las cadenas largas de antígeno O y a ellas se une el C3b. Por consiguiente el complemento se deposita en lugares alejados de la superficie celular en los cuales no es letal. Según esto, la cadena polisacárida del antígeno O puede ser determinante para los microorganismos invasores, a causa de su interacción con el complemento. Un dato importante que confirma esta idea es que la transferencia del locus rfb, que codifica para el antígeno O, en mutantes cortos de Escherichia coli confiere resistencia a la acción del complemento de la cepa receptora (149).

También se ha observado que el aumento de susceptibilidad al suero va acompañado de una reducción en los residuos azucarados de las cadenas de antígeno O (164), como ocurre en las cepas de Serratia marcescens (62), Klebsiella pneumoniae (154) y Campylobacter fetus (117).

La longitud de la cadena de antígeno O, así como su grado de sustitución se hallan sujetos a variaciones fenotípicas y genotípicas. Existe la posibilidad de que la resistencia al suero sea un reflejo de este parámetro, aunque parece improbable que dicha resistencia únicamente se halle determinada por la longitud y el número de unidades repetidas del antígeno O. Algunos estudios, demuestran que en Escherichia coli lo determinante en la resistencia al suero no es la longitud de la cadena, sino la cantidad de LPS (18). Por otro lado, también se ha observado que en algunas especies como Aeromonas hydrophila y Aeromonas salmonicida (102) la resistencia al suero no depende de la longitud del antígeno O del LPS, sino de la composición química y estructura de su núcleo.

Podemos concluir diciendo que tanto la heterogeneidad de las subunidades, como la estructura físico-química del LPS contribuyen en la capacidad de activación del complemento. Estando implicadas en ello la estructura primaria y cuaternaria y siendo la estructura terciaria del lípido A (165) un parámetro significativo.

Se ha descrito, que en las bacterias capsuladas Gram negativas el antígeno K puede contribuir a la resistencia al complemento y a la fagocitosis (32). Apesar de ello, existe una gran controversia (149), pues cápsulas como la K27 no confieren resistencia a las

cepas sensibles de Escherichia coli que presentan un LPS de tipo "rough". Sin embargo, las cápsulas de tipo K1 presentes en algunas cepas de Escherichia coli y muy similares a las de los meningococos del grupo B, constituyen una barrera antifagocitaria (57) y son el prototipo de estructura superficial no activante de la vía alternativa del complemento por inhibición de la unión del C3b mediante el factor I (35). Esta inhibición se debe a que este grupo de cápsulas están formadas por homopolímeros de ácido siálico, que provocan el aumento de afinidad del factor I por el C3b.

A pesar de todo esto, la evidencia indica que las cápsulas no representan una barrera de difusión, permeabilidad o adsorción.

Respecto a las proteínas de la membrana externa, existen autores que les atribuyen cierto papel, básicamente ligado a plásmidos y a los genes tra, en la resistencia a la acción del complemento. Otros autores, no atribuyen a las proteínas ningún papel (114), sino que creen que los cambios que se producen en ellas son debidos a la necesidad de restaurar la membrana después de cambios importantes en el LPS.

Recientes investigaciones han sugerido la asociación de la presencia de una proteína específica existente en la membrana externa de algunas bacterias, como Yersinia enterocolítica y Aeromonas salmonicida (83), con la resistencia a la acción del complemento.

1.4.- PRECEDENTES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.

El genero Aeromonas se ha caracterizado por la gran diversidad a todos los niveles estudiados de las cepas que lo integran. En dicho género, se encuentran cepas completamente avirulentas hasta cepas altamente virulentas, cepas que a nivel molecular presentan estructuras de superficie altamente dispares; por ejemplo a nivel de su perfil proteínico de membrana externa; hasta cepas que presentan una gran homogeneidad; como es el caso del serogrupo O11.

De todo ello podría inferirse la necesidad de realizar un trabajo tendente a la agrupación, que por supuesto, en nuestros días, debe basarse en el nivel molecular, a causa de la amplia variedad de cepas existentes pertenecientes al género Aeromonas.

Es por consiguiente el objetivo fundamental, aunque no único de esta tesis, el agrupar de forma lógica basándose en propiedades moleculares, las cepas de Aeromonas que han permitido hasta el momento dicha agrupación. De ello se desprende la clasificación de las cepas de Aeromonas, no por criterios taxonómicos cuya validez se pone en entredicho en este género bacteriano sino por criterios moleculares, en dos grandes grupos anteriormente mencionados.

Soy plenamente consciente de otras posibles agrupaciones en otros serogrupos, sin connotaciones taxonómicas, que puedan plantearse en el futuro, pero en este trabajo se plantea el objetivo de agrupar a las cepas con características moleculares estudiadas por mí

en las agrupaciones que son objeto de esta tesis. Dichas agrupaciones se han realizado después de un estudio a nivel molecular de la superficie de dichas cepas, de fenómenos inherentes a la misma, como la virulencia bacteriana o algunas propiedades, como la resistencia al suero. Además, se han utilizado marcadores biológicos de moléculas de la superficie bacteriana como bacteriófagos y marcadores químicos (composición química) para la agrupación de las cepas de Aeromonas mesófilas móviles.

Las agrupaciones realizadas, presentan homogeneidad en todas estas características dentro del grupo y heterogeneidad con respecto a otros grupos.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- CEPAS BACTERIANAS, BACTERIOFAGOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

2.1.A.- CEPAS BACTERIANAS

El aislamiento de bacteriófagos se realizó en las cepas AH-3 y TF7 de Aeromonas hydrophila y su posterior caracterización, se efectuó empleando diferentes cepas bacterianas de las especies A. hydrophila, A. sobria y A. salmonicida.

Para el estudio del serogrupo O34 de A. hydrophila se empleó la cepa AH-3 y sus mutantes isogénicos.

En el estudio del serogrupo O11 de A. hydrophila se utilizó la cepa TF7 y sus mutantes isogénicos.

El origen y las características más relevantes de las cepas utilizadas se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1: Cepas bacterianas utilizadas.

CEPAS	CARACTERISTICAS	ORIGENES
<u>A. hydrophila</u>		
<u>Serogrupo 034</u>		
AH-3	O34, mótil	Peces moribundos (91).
AH-8	Derivada de AH-3 resistente al F18.	Nuestro laboratorio (94).
AH-22	Derivada de AH-3 resistente al PM1.	"
AH-53	Derivada de AH-3 resistente al PM2.	" (93).
AH-34	Derivada de AH-8 resistente al suero.	"
AH-35	Derivada del AH-22 resistente al suero.	"
Ba5	O34, mótil	Peces moribundos (99).
AH-9	Derivada de Ba5 resistente al F18.	Nuestro laboratorio (94).
AH-54	Derivada de Ba5 resistente al PM2.	" (93).
AH-23	Derivada de la Ba5 resistente al PM1.	"
AH-101	O34, no mótil.	Obtenida en el rio Besos (91).
AH-151	Derivada de AH-101 resistencia al F18.	Nuestro laboratorio (94).
AH-199	Derivada de AH-101 resistente al PM2.	" (93).
AH-161	Derivada de AH-101 resistente al PM1.	"
AH-203	O34, no mótil.	"
AH-10	O34, no mótil.	Pacientes con diarrea C. Sanyal, India (91).
AH-102	O34, mótil	Aislada en el rio Besos (91).
AH-103	O34, mótil	Aislada en el rio Llobregat (91).
<u>Serogrupo O22</u>		
AH-50	O22, mótil	Pacientes con diarrea C. Sanyal, India (91).

CEPAS	CARACTERISTICAS	ORIGENES
<u>Serogrupo O11</u>		
TF7	O11:S ⁺ , mótil	Peces moribundos (29).
AH-45	Derivada de TF7 O ⁺ :S ⁻ , mótil.	Nuestro laboratorio
AH-21	Derivada de TF7 O ⁺ :S ⁺ , mótil.	"
AH-24	Derivada de TF7 O ⁺ :S ⁻ , mótil.	"
AH-25	Derivada de TF7 O ⁺ :S ⁻ , mótil, S ^S .	"
AH-26	Derivada de TF7 O ⁺ :S ⁻ , mótil, S ^S	"
AH-27	Derivada de AH-26 O ⁺ :S ⁻ , S ^R .	"
AH-28	Derivada de TF7 lámina S ⁺ , no mótil.	Nuestro laboratorio (92).
AH-55	Derivada de TF7 lámina S ⁺ , no mótil.	" (92).
LL1	O11:S ⁺ , mótil	" (29).
ATCC9071	O11:S ⁺ , mótil	ATCC
AH-49	Derivada de ATCC7091 O ⁺ :S ⁺ .	Nuestro laboratorio
AH-51	Derivada de ATCC9071 O ⁺ :S ⁻ .	"
AH-205	O11:S ⁺ , mótil	" (61)
AH-121	O11:S ⁺ , mótil	" (61).
<u>No serotipadas</u>		
ATCC7966	No serotipada, S ⁻ , mótil.	ATCC
24830	No serotipada, S ⁺ , mótil.	Clínica
24963	"	"
25616	"	"
2911	"	"
17577	"	"
8973	"	"
38589	"	"
C-1	Cepa huésped del bacteriófago Aeh-1.	Ackermann et a. (1).

CEPAS	CARACTERISTICAS	ORIGENES
-------	-----------------	----------

A. sobria

AS-28	O11:S ⁺ , mótil	Janda (60).
AH-48	Derivada de AS-28, O ⁺ :S ⁻ :	Nuestro laboratorio.
18975	O11:S ⁻ :	Clínica.
AS-76	O11:S ⁺ , mótil.	Janda (60).

A. salmonicida

A450	Lámina A'	Munn et al. (102).
A450-3	Derivada de A450, LPS corto:Lámina A:	" (102).
A450-1	Derivada de A450, LPS largo:Lámina A:	" (102).

2.1.B.- BACTERIOFAGOS.

Los bacteriófagos empleados en este trabajo fueron: 18, 24, 69 y 145 obtenidos a 37°C en la cepa Ba5 de Aeromonas hydrophila, cedidos todos ellos por T.J. Trust (159); Aeh-1 aislado en la cepa Her-1209 de A. hydrophila a 37°C, cedido por Ackermann (1); PM1, PM2, PM4 y PM5 aislados en la cepa AH-3 de A. hydrophila a 20°C. (93); y PM3 aislado en la cepa TF7 de A. hydrophila a 37°C. (92).

2.1.C.- MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES.

El aislamiento de Aeromonas sp., a partir de muestras de agua, se realizó según el método descrito por Mishra et al. (98).

Los crecimientos en medio líquido de las diferentes cepas de Aeromonas sp. y la propagación de los bacteriófagos se realizó en caldo de triptona y soja (T.S.B.).

El mantenimiento de las cepas bacterianas y los crecimientos en medio sólido se realizaron sobre placas de T.S.A. Las titulaciones e inactivaciones se llevaron a cabo según la técnica de la doble capa de agar descrita por Adams (2), para la cual, se empleó T.S.B. con un 0'6 % de agar-agar (T.S.B. blando).

Para el recuento de bacterias no infectadas, se empleó agar ordinario sin sal:

Extracto de levadura..... 5 gr/l.

Peptona.....10 gr/l.

Agar-agar.....15 gr/l.

Los test de autoaglutinación se realizaron en "brain-heart-infusion" (B.H.I.) y la motilidad se determinó, en algunas ocasiones, en placas semisólidas de T.S.B. suplementadas con 0.3 % de agar-agar y con un 8 % de gelatina (110).

Las diluciones de los cultivos bacterianos se realizaron en Ringer 1/4 (Oxoid) o en P.B.S. (NaCl 0.15 M a pH 7.4); las de los bacteriófagos en tampón para fagos descrito por Clowes y Hayes (23); y las del agente mutagénico (D.E.S.) en medio mínimo Davis (97).

2.2.- EXPERIMENTOS CON BACTERIOFAGOS.

2.2.A.- AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS.

Para el aislamiento de bacteriófagos, se tomaron muestras de agua en ríos con elevada carga orgánica, se les adicionó unas gotas de cloroformo y se centrifugaron a baja velocidad para eliminar la materia orgánica en suspensión. Una vez tratadas, se pusieron en contacto con crecimientos en fase exponencial de las cepas AH-3 y TF7 de A. hydrophila, incubándose durante toda la noche con agitación a 20°C y/o 37°C (80). Luego, fueron centrifugadas a baja velocidad y filtrados sus sobrenadantes a través de filtros Millipore 0.2 µm. de diámetro de poro. Posteriormente, los filtrados se titularon sobre la cepa de A. hydrophila empleada para el aislamiento, según la técnica de la doble capa de agar descrita por Adams (2) y las calvas que aparecieron se resemebraron y purificaron mediante dos pasos sucesivos en las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendieron en pequeños volúmenes de tampón para bacteriófagos y con ellos, se propagaron (los bacteriofagos) en la misma cepa bacteriana utilizada para el aislamiento.

2.2.B.- PROPAGACION DE BACTERIOFAGOS.

La propagación de los bacteriófagos se efectuó mediante lisis en medio líquido. Se inocularon, a partir de cepas crecidas "overnight", erlenmeyers con 30 ml. de T.S.B. y se esperó que se hallasen en fase exponencial. En este momento, se les adicionó 10⁶ p.f.u./ml. de bacteriófago y se incubaron a 20°C y/o 37°C, según temperatura de obtención del

bacteriófago, durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 8.000 x g durante 15 min. para eliminar las bacterias; se recogieron los sobrenadantes y se titularon sobre la cepa bacteriana utilizada, según la técnica de la doble capa de agar descrita por Adams (2). Dichos sobrenadantes, fueron guardados con unas gotas de cloroformo a 4°C.

2.2.C.- PURIFICACION DE BACTERIOFAGOS.

Para la purificación de bacteriófagos se procedió a la obtención de lisados en medio líquido, de un volumen de 2 l. y su posterior concentración y purificación.

La concentración de las partículas fágicas, se realizó por adición al sobrenadante de polietilenglicol 6.000 y NaCl (concentración final de polietilenglicol al 10 % y NaCl 0.5 M), agitación hasta su total disolución, sedimentación a 4°C durante 24 h. y centrifugación a 9.000 r.p.m. durante 45 min. a 4°C. Con esto, se obtuvo un sedimento que contenía la mayoría de las partículas fágicas (110, 155), el cual, se resuspendió en 20-30 ml. de tampón para bacteriófagos y se dializó frente a agua desionizada durante 48 h., para eliminar el polietilenglicol.

La purificación se realizó mediante centrifugación en gradiente de CsCl hasta el equilibrio a 35.000 r.p.m. durante 24 h. (49). De este modo, se obtuvo una banda de bacteriófagos que una vez recogida mediante punción del tubo de nitrocelulosa, con una aguja hipodérmica, se dializó durante 24 h. para eliminar el CsCl, guardándose finalmente a 4°C.

2.2.D.- CARACTERIZACION DE BACTERIOFAGOS.

2.2.D.1.- CARACTERIZACION DEL ESPECTRO DE HUESPEDES.

Para determinar el espectro de huéspedes de los diferentes bacteriófagos, se realizaron crecimientos confluentes de cada una de las cepas bacterianas a ensayar y se depositaron sobre ellos 0.01 ml. de suspensión de bacteriófago, con un título aproximadamente de 10^9 p.f.u./ml. Las placas se incubaron a 20°C ó 37°C (según temperatura de obtención del bacteriófago) durante 24 h. para determinar la existencia o no de lisis.

2.2.D.2.- CRECIMIENTO EN UNA SOLA ETAPA.

Los crecimientos en una sola etapa, nos permitieron conocer el tiempo empleado por el bacteriófago en las diferentes etapas de su ciclo lítico, como: tiempo de latencia, periodo de explosión y tamaño de la explosión de los bacteriófagos (23).

Para llevar a cabo este tipo de experimentos, se obtuvieron cultivos de la cepa huésped (1 ml. en T.S.B.) en fase exponencial, los cuales se infectaron con 1 ml. de partículas fágicas. Luego, se dejaron estáticos 10 min. a 37°C o 20°C, según el bacteriófago, para que se efectuase la adsorción y se realizaron diluciones adecuadas para asegurarnos que los bacteriófagos que se liberasen en el ensayo, no infectasen ninguna bacteria no infectada previamente. Finalmente, 1 ml. de la mezcla fago-bacteria se colocó en un erlenmeyer con 10 ml. de T.S.B. a 37°C o 20°C, con agitación y se tomaron muestras a diferentes

intervalos de tiempo para determinar:

- Bacteriofagos no adsorbidos: A 300 μ l. de muestra se les añadió cloroformo, para eliminar las bacterias, y se titularon sobre placas de T.S.A.
- Bacterias no infectadas: Se tomaron alícuotas de 100 μ l. y se plaquearon en L.B. sin sal.
- Bacterias infectadas: Se tomaron 100 μ l., de mezcla y se plaquearon en T.S.A.

Todas las placas se incubaron a 37°C o 20°C durante 24 h.

2.2.D.3.- CALCULO DE LA DENSIDAD DE LOS BACTERIOFAGOS.

La determinación de la densidad de las partículas fágicas se realizó mezclando 7 ml. de CsCl a una densidad final de 1.51 gr/ml. con 1×10^8 p.f.u./ml. de bacteriófago muestra purificado y con 2×10^8 p.f.u./ml. de bacteriófago P22, que se empleó como marcador de densidad. Una vez mezclados los tres componentes, se centrifugaron a 35.000 r.p.m. hasta el equilibrio (24 h.). Finalmente se recogieron fracciones cada cinco gotas, por punción con una aguja hipodérmica en la base del tubo, en las cuales, se determinó el índice refracción y el título tanto del bacteriófago P22, como del bacteriófago muestra (126).

El índice de refracción se empleó para determinar la densidad de cada fracción, según:

$$d = 10 \times 8601 \times n_o - 13'4974$$

La densidad del bacteriófago muestra se determinó mediante representación gráfica.

2.2.D.4.- DETERMINACION DEL TIPO DE ACIDO NUCLEICO.

La determinación del tipo de material genético, presente en cada uno de los bacteriófagos de A. hydrophila estudiados, se realizó según el método de Bradley (15).

Además, se extrajo el material genético de cada uno de ellos (82) y se digirió con diferentes endonucleasas de restricción (11).

2.2.E.- EXPERIMENTOS DE INACTIVACION DE BACTERIOFAGOS.

En los experimentos de inactivación se pusieron en contacto durante 20 min. a 20°C ó 37°C (según temperatura de obtención del bacteriófago), 10^3 p.f.u. del bacteriófago correspondiente, con:

- 10^7 células bacterianas.
- 200 µgr. (contenido en proteínas) de membranas totales (WM).

- 200 μ gr. de membranas externas (OM) solubilizadas con un 1% de deoxicolato (DOC) (10).
- 200 μ gr. de OM solubilizadas con 1% de DOC y tratadas con fenol (9) ó con proteinasa K (10 mgr/ml.) durante 2 h. a 45°C (153).
- 100 μ gr. de flagelos purificados.
- 100 μ gr. de flagelos purificados con igual volumen de suero anti-flagelo (dilución 1/10).
- 200 μ gr. de lipopolisacárido (LPS) purificado.
- 200 μ gr. de LPS con igual volumen de anti-LPS (dilución 1/10).
- 100 μ gr. de un "pool" formado por fracciones de bajo peso molecular del LPS (LMW-LPS) (nucleo y lípido A).
- 100 μ gr. de otro "pool" formado por fracciones de elevado peso molecular del LPS (HMW-LPS) (antígeno O).

Transcurrido este tiempo se añadieron tres o cuatro gotas de cloroformo y se agitó durante 60 s. Finalmente, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. a 4°C quedando las células y el cloroformo sedimentadas en el fondo y los bacteriófagos en el sobrenadante.

La concentración de bacteriófagos existentes en el sobrenadante se determinó mediante la técnica de la doble capa de agar (2) en cultivos confluentes de la cepa correspondiente de Aeromonas hydrophila.

2.3.- OBTENCION DE MUTANTES.

2.3.A.- MUTANTES ESPONTANEOS.

2.3.A.1.- POR RESISTENCIA A BACTERIOFAGOS

Los mutantes espontáneos por resistencia a bacteriófagos se obtuvieron a partir de cultivos, de A. hydrophila, a una concentración de 10^8 cel./ml., sembrados en T.S.A. según el método de la doble capa de agar (2). Una vez solidificados, se colocaron sobre ellos gotas de bacteriófago, previamente filtrado por $0.22 \mu\text{m}$. de poro, a una concentración de 10^9 p.f.u./ml. y se incubaron 24-48 h. a temperatura adecuada.

Transcurrido este periodo de tiempo, aparecieron en las zonas de lisis producidas por los bacteriófagos, colonias bacterianas las cuales se purificaron mediante estrias en placa de T.S.A. Finalmente, se comprobó la resistencia de los mutantes obtenidos al bacteriófago empleado.

2.3.A.2.- POR RESISTENCIA A SUERO NO INMUNE DE CONEJO Y HUMANO.

Los mutantes espontáneos por resistencia al suero no inmune se obtuvieron manteniendo en contacto durante 3 h. diferentes cepas sensibles de A. hydrophila, con el citado suero.

Se obtuvieron cultivos en fase exponencial (1 ml. T.S.B.) de las citadas cepas de A. hydrophila, se centrifugaron y los precipitados se resuspendieron en 100 μ l. de P.B.S. estéril. Una vez resuspendidos se tomaron 10 μ l. de los mismos, se mezclaron con 90 μ l. de suero no inmune de conejo, previamente filtrado por 0.45 μ m. de poro, y se incubaron a 37°C con agitación durante 3 h. Finalmente, se plaquearon en T.S.A y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo aparecieron colonias que se purificaron mediante estrias y se confirmó su resistencia al suero no inmune de conejo y humano.

2.3.B.- MUTANTES OBTENIDOS MEDIANTE D.E.S.

Se obtuvieron crecimientos estacionarios de 1 ml., en T.S.B., de cepas de serogrupo O11 de A. hydrophila y se mezclaron con igual volumen de dimetil sulfóxido (D.E.S), diluido 1/26 en medio mínimo Davis. La mezcla se colocó a 37°C. con agitación (200 r.p.m.) y se fueron tomando alicuotas de 200 μ l. a diferentes tiempos (10, 20, 30, 40 y 50 min.).

Cada una de estas alicuotas se colocó en un tubo que contenía 1.8 ml. de T.S.B. y se mantuvo a 37°C con agitación durante 24 h.

Al día siguiente se tomaron 100 μ l. del crecimiento, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en 100 μ l. de:

a) suero anti-LPS O11 adsorbido con una cepa O⁻S⁺, para eliminar los posibles anticuerpos existentes contra el núcleo del lipopolisacárido y de este modo preseleccionar mutantes isogénicos que presentasen antígeno O el LPS.

b) suero anti-LPS O11 sin adsorber para preseleccionar mutantes sin antígeno O del LPS.

Y se incubaron durante 1 h. a 37°C con agitación.

Luego se centrifugaron a 1.900 r.p.m. durante 10 min. y el precipitado se resuspendió en 100 µl. de T.S.B. Con esto, se inoculó un tubo que contenía 2 ml. de T.S.B., el cual se incubó a 37°C con agitación durante 24 h.

Posteriormente se tomaron 100 µl. del crecimiento, se centrifugaron (1.900 r.p.m.) y el precipitado se resuspendió en 100 µl. de suero anti-lámina-S, previamente adsorbido en una cepa O⁻S⁺. se incubaron durante 1 h. a 37°C con agitación, se centrifugaron, se resuspendieron en 100 µl. de TSB y con ello se inoculó un tubo de 2 ml. de TSB, el cual se incubó a 37°C 24 h. con agitación.

Finalmente, se plaqueó el cultivo y los mutantes se seleccionaron mediante la técnica de colony-blotting.

2.4.- METODOS INMUNOLOGICOS.

2.4.A.- OBTENCION DE SUERO INMUNE.

La obtención de suero inmune (anticuerpos policlonales) se consiguió inmunizando machos adultos de conejo blanco tipo Neozelandes de 1'5 Kgr. de peso (Biocenter), con :

- 50 μ gr. de LPS purificado de la cepa AH-3 de A. hydrophila, para la obtención de suero anti-LPS serogrupo O34.

- 50 μ gr. de LPS purificado de la cepa TF7 de A. hydrophila, para la obtención de suero anti-LPS serogrupo O11.

- 100 μ gr. de lámina-S purificada de la cepa TF7, para la obtención de suero anti-lámina-S.

- 100 μ gr. de flagelos purificados de la cepa TF7, para la obtención de suero anti-flagelo.

En cada uno de los casos el antígeno se inyectó vía subcutánea dos veces sucesivas, a intervalos de dos semanas, emulsionado con igual volumen de adjuvante completo de Freund en la primera inyección e incompleto en la segunda.

El sangrado de los conejos se realizó dos semanas después de la última inyección y el suero obtenido se mantuvo a -80°C .

2.4.B.- ENSAYO DE NIVELES DE ANTICUERPOS.

El título de anticuerpos específicos existentes en el suero inmune de conejo se determinó según el método de E.L.I.S.A. (39), empleando como antígeno:

- 0.1 μgr . de LPS purificado del serogrupo O34 ó del serogrupo O11.
- 1 μgr de lámina-S purificada de la cepa TF7.
- 10^5 células de la cepa AH-3 o bien de la cepa TF7.

El antisuero obtenido presenta una afinidad en la dilución 1/50 con la Ig G de cabra anti-conejo unida a fosfatasa alcalina (Sigma A 9919).

2.4.C.- E.L.I.S.A.

2.4.C.1.- NO COMPETITIVO

En este trabajo se empleó el método de E.L.I.S.A. (enzyme linked immunosorbent assay) (39) en las condiciones indicadas por Trust (160).

En primer lugar se diluyó el antígeno en "coating buffer" (concentración final de 10^5 células, 0.1 μ gr. LPS ó 1 μ gr. de proteínas) y se colocaron 100 μ l. de dilución en cada pocillo de una placa de microELISA (Dynatech M-129 A, Izasa), incubándose a 4°C durante 24 h., para fijar el antígeno.

Una vez fijado el antígeno, se lavaron las placas (x3) con tampón PBS-Tween, colocandose luego 100 μ l. de PBS-Tween con 3 mgr/ml. de albúmina sérica bovina (B.S.A.) en cada pocillo e incubandose 1 h. a 37°C, con el fin de bloquear los lugares de unión inespecífica.

Transcurrido este tiempo se lavaron las placas (x3) con tampón PBS-Tween, se llenaron los pocillos con 100 μ l. de diferentes diluciones de anticuerpo primario específico en P.B.S.-Tween y se incubaron durante 1 h. a 37°C.

Posteriormente, se lavaron las placas (x3) en PBS-Tween y se llenaron los pocillos con 100 μ l. de anti-Ig G de conejo ligada a fosfatasa alcalina, purificada en cromatografía de afinidad, (Sigma) a una dilución 1/1000 en PBS-Tween conteniendo 2 mgr/ml. de B.S.A., incubandose 1h. a 37°C.

Finalmente, se lavaron las placas (x3) con tampón PBS-Tween, se llenaron los pocillos con 100 μ l. de p-nitrofenil-fosfato (Sigma 104) a concentración de 1 mgr/ml. en tampón dietanolamina y se incubaron 30 min. a 37°C., deteniendose la reacción enzimática por adición de 30 μ l. de NaOH 3 M en cada pocillo.

Los pocillos se leyeron a 405 nm. en un lector de microELISA (Titertek, Flow laboratories).

Los controles de "background" de la placa consistieron en pocillos en los cuales se depositó únicamente "coating buffer" y anti-Ig G de conejo ligada a fosfatasa alcalina.

2.4.C.2.- COMPETITIVO.

Los E.L.I.S.A. de competición se iniciaron diluyendo el antígeno purificado (lámina-S purificada) hasta una concentración final de 10 µgr/ml. en "coating buffer", colocando 100 µl. de la dilución en cada uno de los pocillos de la placa de microELISA (Dynatech M-129 A, Izasa) e incubandola durante 24 h. a 4°C para conseguir la fijación del antígeno.

Una vez fijado el antígeno a la placa de microELISA, se siguió el mismo proceso que el empleado en los E.L.I.S.A. no competitivos. La única, diferencia existente entre ambos procesos, fue el anticuerpo primario utilizado (anti-lámina-S), ya que, en este caso se adsorbió (previa utilización) durante 45 min. a 37°C con las cepas a determinar.

2.4.D.- WESTERN - BLOTTING.

La técnica de "Western-blotting" se inició con la electroforesis de membranas externas (OM) en SDS-PAGE y transferencia (Biorad Transblot System) de las mismas, a papel de nitrocelulosa (0.45 µm. de poro, Biorad) en presencia de tampón metanol-tris-glicina (Tris

25 mM, glicina 190 mM y 20 % de metanol) durante 3 h. a 60 V., según el sistema descrito por Towbin et al. (156).

Finalizada la transferencia, lavamos el papel de nitrocelulosa (x2) en tampón N.E.T. (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M y E.D.T.A. 0.005 M) durante 5 min. a temperatura ambiente y se colocó durante 1 h. en tampón N.E.T. con 1 % de B.S.A., para bloquear los lugares de unión inespecífica.

Después, se puso en contacto durante 1 h. a temperatura ambiente, con el anticuerpo primario (anti-lámina-S) diluido en tampón N.E.T. con 1 % de B.S.A. y 0.5 % de Tween-20.

Transcurrido este tiempo, se lavó (x3) en N.E.T. con 0.5 % Tween 20 durante 10 min., para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se sumergió en el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo ligado a fosfatasa alcalina (Sigma), diluido 1/1000 en N.E.T. con 1 % de B.S.A y con 0.5 % de Tween-20, durante 1 h. a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lavó (x3) en tampón N.E.T. con un 0.5 % de Tween-20 durante 10 min. y (x3) en "buffer 3" (Tris-HCl 0.1 M PH:9.5, NaCl 0.1 M y MgCl₂ 0.05 M) durante 10 min., con el fin de conseguir un pH alcalino idóneo para el revelado.

Finalmente se reveló en una placa de Petri, con una solución formada por 10 ml. de tampón alcalino, 44 µl. de solución N.B.T. (75 mgr/ml. nitro-blue-tetrazolium en 70 % de

N,N dimetilformamida (D.M.F.)) y 33 μ l. de solución B.C.I.P. (50 mgr/ml. 5-bromo-4-cloro-3 indolyl-fosfato en D.M.F.) hasta que se detectó marcaje.

El revelado se concluyó por adición de Tris-HCl 20 mM. pH 7.5 y EDTA 5 mM.

2.4.E.- COLONY-BLOTTING.

La técnica de "colony-blotting" se inició con la transferencia de colonias bacterianas, crecidas durante 3-4 h. a 37°C, a un filtro de nitrocelulosa (Millipore) esteril de 85 mm. de diámetro y 0.45 μ m. de poro. Una vez realizada la transferencia de las colonias, se inició la detección inmunológica de los antígenos superficiales.

La citada detección inmunológica de antígenos se realizó de igual modo que en el "Western-blotting".

2.5.- CARACTERISTICAS SUPERFICIALES.

2.5.A.- AUTOAGLUTINACION.

La autoaglutinación es una propiedad presente en algunas cepas bacterianas de A. hydrophila, relacionada con el grado de virulencia (117).

Para llevar a cabo este tipo de estudios, obtuvimos crecimientos de diferentes cepas bacterianas en T.S.B. a 37°C con agitación durante 24 h. A partir de ellos, inoculamos tubos de vidrio con 6 ml. de B.H.I. y los incubamos a 37°C estáticos durante 24 h. Transcurrido este tiempo, observamos la formación de un precipitado por autoaglutinación (SP⁺) o bien, turbidez (SP⁻).

Realizada la observación, se agitaron los tubos en un vortex durante 30 s. y se repartió su contenido por igual en dos tubos de vidrio (3 ml. en cada uno). Uno de los tubos se mantuvo estático durante 1 h. a temperatura ambiente y el otro, permaneció durante 1 h. en agua hirviendo. Finalmente, se dejaron los tubos 10 min. estáticos a temperatura ambiente y se observó la formación de un precipitado, autoaglutinación por precipitación después de hervir, (PAB⁺) o turbidez (PAB⁻).

En los test de autoaglutinación se empleó como control positivo la cepa TF7 y como control negativo la cepa Ba5.

2.5.B.- MOTILIDAD.

La motilidad de las diferentes cepas bacterianas de A. hydrophila se determinó mediante la técnica de la gota pendiente y en algunas ocasiones, observando el crecimiento de las cepas bacterianas en placas semisólidas de gelatina (110).

2.5.C.- TEST DE ADHESION DE HIDROCARBUROS.

Para determinar la hidrofobicidad superficial se empleó el test de adhesión de hidrocarburos descrito por Rosenberg (133).

Para llevar a cabo dicho test se obtuvieron crecimientos a 37°C en 20 ml. de TSB, hasta una densidad óptica (D.O.) a 650 nm. de 0.2, aproximadamente. Una vez alcanzan los cultivos la citada D.O., se lavan en tampón PUM, se centrifugan, se resuspenden en el tampón mencionado y se reparten en volúmenes de 1.2 ml. en tubos de rosca (Hatch 16 mm. de diámetro). Una vez repartidos los cultivos, se les adicionan diferentes volúmenes del hidrocarburo a ensayar (de 0.025 a 0.3 ml.), previamente calentado a 30°C.

Luego, se agitan los tubos durante 2 min. a máxima potencia y se dejan reposar durante 15 min. para que se separen las fases. Finalmente, se recoge la fase acuosa con una pipeta Pasteur y se mide la absorbancia a 400 nm.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y los controles fueron cepas a las que no se les adicionó hidrocarburo.

2.6.- PRODUCCION DE TOXINAS.

Se obtuvieron sobrenadantes de los crecimientos de diferentes cepas de A. hydrophila, según el método descrito por Lallier en 1984 (72) para determinar la actividad hemolítica, la actividad enterotóxica y el factor dermonecrótico.

La actividad hemolítica se determinó según el método descrito por Nieto (106).

La actividad enterotóxica se determinó mediante el ensayo con ratones lactantes descrito por Dean (28).

El factor dermonecrótico se determinó en piel de conejo, según el método de Olivier (111).

2.7.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

2.7.A.- TINCION NEGATIVA.

La visualización de bacterias enteras, flagelos o bacteriófagos al microscopio electrónico se realizó colocando gotas de cultivo bacteriano en fase estacionaria (previamente lavado en P.B.S.), flagelos o bacteriófagos purificados sobre rejillas recubiertas con carbón y formvar, las cuales se dejaron 1 min. y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % (pH 6.5) durante 1-2 min. (según material a estudiar) (127).

Las preparaciones se observaron con un microscopio Philips EM-301 ó bien con un Hitachi MT-800 (Servicio de Microscopía Electrónica. Univ. de Barcelona).

2.7.B.- PROTEINA-A LIGADA A ORO COLOIDAL.

2.7.B.1.- MARCAJE SIMPLE.

Se obtuvieron cultivos bacterianos en fase estacionaria de diferentes cepas de A. hydrophila serogrupo O11, se lavaron con P.B.S. estéril y se colocaron gotas de 10 µl. sobre rejillas de oro recubiertas con carbón y formvar. Luego, se lavaron (x2) con P.B.S. durante 15 s., se bloquearon con P.B.S.-1 % B.S.A. durante 15 min y se colocó, en ellas, el anticuerpo primario (anti-LPS O11 ó anti-lámina-S), diluido 1/100 en P.B.S.-1 % B.S.A., durante 45 min.

Transcurrido este tiempo se lavaron las rejillas (x3) con P.B.S. durante 1 min. y se colocó la proteína-A unida a oro coloidal de 10 nm. (cuando se empleó anti-lámina-S) ó de 20 nm. (cuando se utilizó anti-LPS O11) a dilución 1/20 en P.B.S.-1 % B.S.A. durante 20 min.

Finalmente se lavaron (x3) con P.B.S., (x2) agua desionizada (131) y se dejaron secar para ser observadas con un microscopio electrónico Philips EM-301.

2.7.B.2.- MARCAJE DOBLE.

El marcaje doble con proteína-A ligada a oro coloidal se realizó de igual modo que el simple. Se empleó en primer lugar, anti-lámina-S y en segundo lugar, anti-LPS O11; y cada uno de ellos se puso en contacto con proteína-A ligada a oro coloidal de diferente diámetro (132).

2.8.- AISLAMIENTO DE ESTRUCTURAS SUPERFICIALES BACTERIANAS.

2.8.A.- AISLAMIENTO DE MEMBRANAS.

Las membranas celulares se obtuvieron a partir de crecimientos en T.S.B. a 37°C con agitación durante 24 h., cuyas células se recogieron por centrifugación y se lavaron en Tris (hidroximetil aminometano) 10 mM pH 7.3 conteniendo Cl_2Mg 5 mM, para ser lisadas por sonicación en hielo a 90 W. durante 4 min, a intervalos de 1 min. Posteriormente, se eliminaron las células no lisadas mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. y se hizo sedimentar la fracción membranosa (membranas totales) por centrifugación a 100.000 x g durante 2 h. (154). Las membranas citoplasmáticas se solubilizaron dos veces en sodio-lauril-sarcocinato 0.5 % (SLS) (44) durante 20 min. a temperatura ambiente, para separar las membranas externas (OM) de las membranas internas (IM). Tras la solubilización, las OM se sedimentaron por centrifugación a 100.000 x g. durante 2 h. y se resuspendieron en DOC al 1 % y EDTA 2mM (124) guardandose a -20°C.

El contenido de las muestras se valoró según una modificación (85) del método de Lowry (78), empleandose como standard albúmina sérica bovina.

En ocasiones, se extrajo el lipopolisacárido de las proteínas de la membrana externa (OMP) por tratamiento con 88% de fenol a 70°C., según el método descrito por Hancock y Nikaido (54).

2.8.B.- AISLAMIENTO DE LAMINA-S.

Para el aislamiento de la estructura superficial bacteriana denominada lámina S, se obtuvieron crecimientos de Aeromonas hydrophila (serogrupo O11) a 37°C con agitación durante 24 h., se recogieron sus células mediante centrifugación (8.000 r.p.m. 20 min.) y se lavaron con Tris 20 mM pH 8. A continuación, 0.3 gr. de células bacterianas se agitaron durante 15 min. a 4°C con 10 ml. de tampón glicina 0.2 M pH 4, para que se liberase la lámina. Posteriormente, se centrifugó tres veces a 12.000 x g durante 20 min. para eliminar las células enteras y finalmente, se sedimentó la lámina mediante centrifugación del sobrenadante a 40.000 x g durante 30 min a 4°C (30, 31). El precipitado, se solubilizó en 1 ml. de Tris 20 mM pH 8 y se guardó a -20°C.

El contenido de las muestras se valoró según una modificación (85) del método de Lowry (78).

2.8.C.- AISLAMIENTO DE FLAGELOS.

La purificación de flagelos se llevó a cabo a partir de crecimientos de 20 ml. a 37°C durante 24 h., cuyas células se recogieron por centrifugación a 8.000 x g durante 15 min. y se lavaron en tampón PBS pH 7.4, para ser agitadas después, intensivamente en un vortex durante 2 min., con el fin de separar el flagelo de las células. Posteriormente, las células enteras se eliminaron por centrifugación a 14.100 x g durante 20 min. y el sobrenadante resultante se saturó con un 30% de sulfato amónico. El precipitado, que contenía los

flagelos, se resuspendió en 5 ml. de tampón TEAN (Tris-EDTA-Azida-NaCl, pH 7.4) y se dializó frente a este mismo tampón durante 24 h. Tras esta diálisis, se centrifugó a 14.100 x g durante 20 min. a 4°C y el sobrenadante, se centrifugó a 77.300 x g durante 2 h. a 4°C para obtener en el precipitado los flagelos purificados, los cuales se resuspendieron en tampón TEAN y se mantuvieron a -20°C.

2.8.D.- AISLAMIENTO DE LIPOPOLISACARIDO.

La purificación del lipopolisacárido se realizó por el método de Westphal y Jann (169) modificado por Osborn (112), cuyo principio es la extracción del LPS a partir de la envoltura celular bacteriana por tratamiento con fenol al 45% y precipitación de la fase acuosa con Cl_2Mg 1 M (concentración final 25 mM).

El subfraccionamiento del LPS purificado se realizó en una columna de cromatografía, según el método descrito por Ciurana y Tomás (21). Con este fin, se liofilizó el LPS y se solubilizó en un tampón formado por deoxicolato al 3% (w/v) (DOC), NaCl 0.2 M, EDTA 5 mM y Tris-HCl 20 mM (pH 8.3) a una concentración final de 7.5 mg/ml. Luego, se hizo pasar, a temperatura ambiente, por una columna de Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada con un tampón formado por DOC al 0.25 % (w/v), NaCl 0.2 mM, EDTA 5 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 8) y se recogieron fracciones cada 2.5 ml. Estas fracciones, fueron analizadas directamente con SDS-PAGE (162) o bien, dializadas frente a agua destilada; primero 24 h. a temperatura ambiente y luego, 24 h a 4°C; para su posterior análisis químico o estudio de inactivación.

2.9.- ANALISIS QUIMICO.

2.9.A.- ANALISIS DE CARBOHIDRATOS.

En el análisis químico del lipopolisacárido, se cuantificó la cantidad de carbohidratos totales, ácido deoxy-D-manno-octulosónico (KDO), ácido L-glicero-D-manno-heptosa (heptosas) y monosacáridos que se hallan en el LPS purificado.

- a) Los carbohidratos totales se cuantificaron por reacción con fenol-sulfúrico, según el método de Hanson y Phillips (55), empleando como standard la glucosa.

- b) La valoración colorimétrica del ácido deoxy-D-manno-octulosónico (KDO) y se realizó por el método del ácido tiobarbitúrico, previa hidrólisis del LPS en ácido sulfúrico 0.05 M durante 30 min. (66).

- c) El análisis de los monosacáridos se llevó a cabo mediante derivados de alditol acetato por cromatografía de gas-líquido (GLC), en una columna al 3% SP-3840 (Supelco Inc.) de 225°C a 180°C (147j). El LPS purificado se hidrolizó en HCl 1 N durante 2 h. a 100°C, se liofilizó y 50 mg. del mismo, se resuspendieron en 0.5 ml. de agua desionizada, para ser neutralizados, a temperatura ambiente, con igual volumen de NaBH₄ 0.5 N durante 60 min. Luego, se acetiló por adición de ácido acético glacial mediante goteo, hasta que la muestra paró de burbujear, y se secó por aireación con N₂. Posteriormente, se lavó dos veces con 2.5 ml. de metanol-HCl

(100:0.1) (secándose por aireación con N₂), otras dos con 1 ml. de etanol y se centrifugó en eppendorf a 13.000 x g durante 2 min. Finalmente, el sobrenadante se eliminó por aireación con N₂ y el precipitado se resuspendió en 0.4 ml. de piridina-anhidrido acético (1:1) durante 15 min a 100°C, se dejó enfriar y se inyectó en el cromatográfo. Los standards de carbohidratos alditol acetato fueron comprados a Supelco o bien, preparados por nosotros.

2.9.B.- ANALISIS DE LIPIDOS.

En el análisis de los lípidos que forman parte del LPS, obtenido a partir de crecimientos a 20°C y 37°C, de la cepa AH-3 de Aeromonas hydrophila se determinó el porcentaje de ácidos grasos saturados, insaturados, ramificados, hidroxilados y con anillo (ciclopropano). La preparación del LPS para el análisis de esteres metílicos se realizó con HCl metanólico (20). Los esteres se separaron e identificaron con ayuda de standards (Supelco) con 10 % de D.E.G.S.-P.S. en Supelcoport y un 3 % S.P.-2100 DOH en Supelcoport, mediante cromatografía de gases en un Varian 1700. Los picos de areas se determinaron por triangulación o con un integrador Varian CDS III.

A la standard interna se la adicionó con ácido pentadecanóico o bien con metil-pentadecanoato.

También se analizaron los lípidos existentes en células enteras de la cepa AH-3 crecida a 20°C y a 37°C. Para ello, se obtuvieron los lipidos existentes, según el método de

Folch et al. (46) y se extrajeron los ésteres metílicos por transmetilación con metóxido de sodio. Su posterior análisis e identificación se realizó de igual modo que en el caso del LPS purificado.

2.10.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

2.10.A.- GELES DE PROTEINAS.

El análisis de proteínas de las diferentes cepas bacterianas de Aeromonas hydrophila y de las cápsides de los bacteriófagos, se efectuó mediante geles de sodio dodecil sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (71) modificado por Ames (6).

Los geles empleados poseían un 5 % de acrilamida en el "stacking gel" y un 12 % en el "resolving gel", aunque en ocasiones la concentración empleada en el "resolving gel" fue del 7.5 % (146, 30).

La estimación de los pesos moleculares, de las diferentes bandas proteínicas, se realizó incluyendo en cada uno de los geles de proteínas realizados, una muestra de standard de proteínas (Molecular size standard, Bio Rad Lab.) cuyos pesos moleculares eran conocidos (P.m. Standard: 94, 67, 43, 30, 20 y 14 Kd.).

Los geles de proteínas fueron teñidos con Coomassie blue según las condiciones indicadas por Fairbanks (42).

2.10.B.- GELES DE LIPOPOLISACARIDO.

El LPS purificado, así como las fracciones obtenidas, se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata según el método de Tsai y Frasch (162).

En algunas ocasiones, el lipopolisacérido no se empleó purificado, sino que se utilizaron cultivos bacterianos según el método de Korhonen (68). Con este fin se tomaron 150 μ l. de crecimiento bacteriano en fase estacionaria, se centrifugaron, resuspendiéndose en 50 μ l. de "sample buffer" (71, 6), se hirvieron durante 10 min. y se les adicionaron 50 μ l. de proteinasa K (5 mgr/ml. en P.B.S.), incubándose durante 1-1.30 h. a 60°C. Transcurrido este tiempo se analizaron de igual modo el LPS purificado y las fracciones.

2.11.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO IMMUNE.

2.11.A.- RESISTENCIA DE LAS CEPAS A LA ACCION BACTERICIDA DEL SUERO NO IMMUNE.

La actividad bactericida del suero no-inmune de conejo se determinó mediante el recuento de células supervivientes a su acción (154, 95).

Se obtuvieron cultivos bacterianos en fase exponencial de 1 ml. (T.S.B.) a 37°C. ó 20°C, se concentraron (x10) en P.B.S. esteril y se le adicionó 90 µl. de suero no-inmune de conejo, previamente filtrado (0.45 µm. de poro). Una vez efectuada la mezcla, se incubó a 37°C con agitación, tomándose alicuotas a diferentes tiempos, las cuales se diluyeron y plaquearon en T.S.A., manteniendose a 37°C durante 24 h.

En estos experimentos se utilizaron dos controles: Uno, consistía en adicionar 90 µl. de P.B.S. estéril y en el otro, 90 µl. de suero no-inmune inactivado por calor (56°C durante 30 min.), a las células bacterianas concentradas, en lugar de suero no-inmune activo de conejo.

En los experimentos se empleo suero de conejo no-inmune obtenido el mismo día o bien, mantenido a -80°C.

2.11.B.- DETERMINACION DE LA VIA DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.

La determinación de la vía de activación del complemento se llevó a cabo empleando suero, en el que habíamos inactivado de forma específica la vía clásica, la vía alternativa y ambas vías a la vez.

La inhibición de la actividad de la vía clásica del complemento (C.C.P.) se realizó por quelación con etilén glicol-bis (aminoetil-eter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (E.G.T.A.) 20 mM y MgCl₂ 2 mM según el método descrito por Fine (45). En el caso de la vía alternativa del complemento (A.C.P.), se consiguió mediante la adición de inulina (2 mgr/ml.), según el método de Gotze y Muller-Eberhard (51) ó por calentamiento a 50°C durante 20 min., con lo cual se inactivó el factor B presente en la vía alternativa (56). Ambas vías se inactivaron por adición al suero de E.D.T.A. 20 mM o por calentamiento a 56°C durante 30 min.

Una vez tratado el suero, para inactivar específicamente la vía de actuación del complemento, se ensayó según el método de Morrison y Kline (100) modificado por Vukajlovich (165).

Como control se utilizó suero no-inmune de conejo del día o mantenido a -80°C.

2.11.C.- EXPERIMENTOS DE INACTIVACION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO-INMUNE.

Se resuspendió el LPS purificado de diferentes cepas de A. hydrophila en P.B.S. estéril hasta una concentración final de 1-5 mgr/ml. y se sonicó a 4°C para su perfecta disolución.

Una vez disuelto, se añadió a un tubo con 0'5 ml. de suero a una concentración de 0.01-0.2 mgr/ml., se ajustó hasta 0.9 ml. con P.B.S. esteril y se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación (200 r.p.m.). Luego, añadimos al citado tubo 0.1 ml. de la suspensión bacteriana de una cepa sensible al suero de A. hydrophila en fase exponencial (5×10^7 c.f.u./ml.) y lo incubamos durante 1 h. a 37°C con agitación. Finalmente, realizamos diluciones y lo plaqueamos en T.S.A., incubándolo a 37°C durante 24 h.

Experimentos similares se llevaron a cabo con fracciones liofilizadas del LPS, resuspendidas en P.B.S. a una concentración de 0.05 mgr/ml. en 0.5 ml. del suero no-inmune de conejo; con lámina-S purificada de la cepa TF7 a una concentración de 0.005-0.1 mgr/ml. en 0.5 ml. de suero ; y con cultivos bacterianos en fase exponencial a una concentración de 10^7 cel./ml. en 0.5 ml. de suero.

2.1.1.D.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL LPS.

La actividad anticomplementaria del LPS o de las fracciones del mismo se determinaron según el método de Shafer et al. (139) con ligeras modificaciones.

El suero (0.1 ml.) se mezcló con LPS a una concentración final de 0.01-0.2 mgr/ml. ó con fracciones de LPS a una concentración final de 0.1 mgr/ml. llevandose hasta un volumen final de 0.2 ml. en P.B.S. esteril e incubandose a 37°C con agitación durante 30 min. Una vez transcurrido, este tiempo se añadieron 0.2 ml. de eritrocitos de carnero sensibilizados (10^9 cel./ml.) al anticuerpo y se incubaron a 37°C durante 30 min. Finalmente se añadieron a la mezcla 3 ml. de salino a 0°C para parar la reacción, se eliminaron las células existentes precipitándolas mediante centrifugación y se determinó la adsorvancia del sobrenadante a 412 nm.

Como control positivo se emplearon eritrocitos de carnero sensibilizados, más suero sin LPS o fracciones.

Como control negativo se utilizaron eritrocitos de carnero sensibilizados con LPS o fracciones, sin suero.

2.12.- VALORACION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS DEL COMPLEMENTO.

2.12.A.- VALORACION DE LAS PROTEINAS EXISTENTES EN EL

SOBRENADANTE: C1q.

El C1 es una de las proteínas implicadas en la acción del complemento, cuando esta acción se lleva a cabo a través de la vía clásica (CCP). Dicha proteína, esta constituida por tres subunidades: C1q, C1r y C1s.

Para determinar los niveles de C1q existentes en suero no immune, al incubarse con diferentes cepas de A. hydrophila, se empleó un ELISA modificado.

En el mencionado ELISA, se fijó el anticuerpo anti-C1q diluido en "coating buffer" (1:100) a la placa de microELISA y se empleó como antígeno, suero no immune previamente incubado con diferentes cepas de A. hydrophila. Como controles se utilizaron células bacterianas y suerom fresco no immune sin incubar.

2.12.B.- VALORACION DE LAS PROTEINAS DEL COMPLEMENTO UNIDAS A MEMBRANA CELULAR: C3b Y C5b-9.

El C3 y el C5 son componentes del complemento implicados en la acción bactericida del suero no immune, los cuales se activan tanto por la vía clásica como por la alternativa.

Para determinar el consumo de C3 y de C5, se valoró la cantidad de C3b y de C5b9 unido a la membrana de las células bacterianas.

Con este fin, se obtuvieron crecimientos de 0.5 ml. en TSB durante 24 h. a 20°C de diferentes cepas de *A. hydrophila*, se centrifugaron y se resuspendieron en 50 µl. de suero no immune (cada uno). Una vez resuspendidos, se incubaron a 37°C y se sacaron aliquotas de 10 µl. a diferentes tiempos (0, 10, 15, 20 y 30 min.), que se colocaron en eppendorff con 400 µl. de PBS-frio, para parar la acción del suero. Una vez parada la reacción, se lavaron con PBS y se resuspendieron con 50 µl. de anticuerpo anti-C3b ó anti-C5b9 (1:100 en PBS), incubandose a 37°C durante 45 min. estáticos. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS y se resuspendieron con 50 µl. de proteína A ligada a APS (1:100 en PBS) incubandose a 37°C durante 45 min. Luego, se lavaron con PBS y se añadió el sustrato (p-nitrofenil-fosfato) a una concentración de 1 mg/ml. en tampón dietanolamina, incubandose a 37°C durante 30 min. Finalmente, se paró la reacción con 3M de NaOH y se leyeron a una D.O. de 405 nm.

Como control se empleó suero normal no immune sin incubar y células bacterianas solas.

2.13.- SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

Para determinar la sensibilidad a antibióticos se inocularon tubos conteniendo 2 ml. de T.S.B. con 20 μ l. del cultivo bacteriano de la cepa correspondiente. A estos tubos, se les adicionaron los antibióticos esterilizados por filtración a la concentración requerida.

Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación (200 r.p.m.) durante 24 h., al cabo de las cuales se determinó, visualmente, el crecimiento respecto a los controles, que eran tubos sin antibiótico.

2.14.- DOSIS LETAL 50 (D.L.₅₀).

La dosis letal (D.L.₅₀) fue calculada según el método de Reed y Munchen (125) y nos indica la cantidad mínima de bacterias necesarias para provocar la muerte en un 50 % de los animales estudiados.

2.14.A.- EN RATON.

Se obtuvieron crecimientos en T.S.B. a 37°C y 20°C con agitación durante 24 h. de diferentes cepas de A. hydrophila y se realizaron diferentes diluciones de los crecimientos.

Posteriormente, se inocularon vía intraperitoneal ratones hembra, tipo albino-suizo de 5-6 semanas, con 0.3 ml. de las diferentes diluciones. Finalmente, se realizó el recuento de muertos durante una semana .

2.14.B.- EN PECES.

Se obtuvieron crecimientos en T.S.B. a 37°C y 20°C con agitación durante 24 h. de diferentes cepas de A. hydrophila y se realizaron diferentes diluciones de los crecimientos.

Posteriormente, se inocularon peces vía intraperitoneal, de 12 a 18 gr., con 0.1 ml. de las diferentes diluciones y se mantuvieron en tanques estáticos de 20 l. a 17°C. Finalmente se contabilizaron los muertos a lo largo de dos semanas .

3.- RESULTADOS.

3.1.- CARACTERIZACION Y DETERMINACION DEL RECEPTOR PARA ALGUNOS BACTERIOFAGOS QUE INFECTAN A AEROMONAS HYDROPHILA.

3.1.A.- AISLAMIENTO Y PROPAGACION DE LOS BACTERIOFAGOS.

A partir de muestras de agua del río Besos se intentaron obtener bacteriófagos específicos para los serotipos O34 y O11 de A. hydrophila, teniendo en cuenta la propiedad que poseen los bacteriófagos de adsorberse a estructuras determinadas de la superficie bacteriana para introducir su material genético y llevar a cabo su ciclo lítico, con el fin de diferenciar estos serotipos de los restantes. Este interés se debe a que las cepas englobadas en el serotipo O34 son moderadamente virulentas y en el serotipo O11 altamente virulentas. Para ello, utilizamos la cepa AH-3 de serotipo O34 y la cepa TF7 de serotipo O11 crecidas tanto a 20°C como a 37°C, por tratarse de cepas que pueden encontrarse tanto en ambientes naturales como en clínica.

Sobre la cepa AH-3 a 37°C obtuvimos bacteriófagos con características muy similares a las del fago 18 aislado sobre la cepa Ba5 a 37°C (serotipo O34) por T.J. Trust (159); a 20°C se obtuvieron los bacteriófagos PM1 y PM2 (93); y finalmente, sobre la cepa TF7 tanto a 20°C como a 37°C únicamente se consiguió hallar el bacteriófago denominado PM3 (92).

Las E.O.P. determinadas para cada uno de los bacteriófagos sobre su cepa huésped son muy similares (10^{10} p.f.u./ml.) a excepción del bacteriófago 18 que presenta una E.O.P. un logaritmo inferior (10^9 p.f.u./ml.), tal y como se muestra en la tabla 2.

TABLA 2: E.O.P. de los bacteriófagos hallados sobre A. hydrophila.

Bacteriófago	Cepa huésped	Temperatura de aislamiento	E.O.P.
18	Ba5	37°C	4×10^9 p.f.u.
PM1	AH-3	20°C	2×10^{10} p.f.u.
PM2	AH-3	20°C	2×10^{10} p.f.u.
PM3	TF7	37°C	4×10^{10} p.f.u.

3.1.B.- MORFOLOGIA DE LAS CALVAS.

En cuanto a la morfología de las calvas generadas por cada uno de los bacteriófagos aislados, podemos decir que todos los obtenidos sobre cepas de A. hydrophila de serogrupo O34 dan lugar a calvas de lisis claras y por el contrario, el fago aislado sobre cepas de A. hydrophila de serotipo O11 da lugar a calvas de elevada turbidez.

Concretamente, el fago 18 da lugar a calvas de 4 mm. de diámetro; el fago PM1 origina calvas de lisis claras de 2-3 mm. de diámetro que presentan halos difusos alrededor; el fago PM2 da lugar a calvas claras de 3 mm. de diámetro con halos difusos; y finalmente, el fago PM3 da calvas turbias de unos 2 mm. de diámetro.

3.1.C.- ESPECTRO DE HUESPEDES.

Para determinar el espectro de huéspedes de los distintos bacteriófagos aislados sobre cepas de A. hydrophila, se emplearon diferentes géneros de la familia Vibrionaceae y Enterobacteriaceae, así como diferentes especies del género Aeromonas y serotipos de la especie A. hydrophila, tal y como se expone en la tabla 3.

De este modo, observamos que el bacteriófago 18 presenta un amplio espectro de acción a 37°C dentro de los diferentes serotipos de la especie A. hydrophila ya que, es capaz de infectar cepas avirulentas, moderadamente virulentas e incluso a los mutantes isogénicos lámina S de las cepas altamente virulentas. El fago PM1 presenta un espectro de huéspedes restringido al serogrupo O34 de A. hydrophila a 20°C. El fago PM2 tiene un amplio espectro de acción dentro del género Aeromonas, pues es capaz de infectar a cepas de las especies A. hydrophila, A. sobria y A. salmonicida. Finalmente, el fago PM3 es un bacteriófago capaz de replicarse en diferentes serotipos de A. hydrophila a 37°C, aunque no en todas las cepas de igual serotipo para el antígeno O; así cepas de serotipo O11 como la TF7 y LL1 son sensibles al PM3 y por el contrario las cepas AS-28 y ATCC9071, de igual serotipo que las anteriores, son resistentes al citado bacteriófago.

Por otra parte, también se vió que ninguno de los bacteriófagos aislados sobre A. hydrophila era capaz de infectar cepas de la familia Enterobacteriaceae ni a géneros diferentes al de Aeromonas dentro de la familia Vibrionaceae.

TABLA 3: Espectro de huéspedes de los bacteriófagos hallados sobre A. hydrophila.

Cepas bacterianas	Bacteriófagos				
	37°C			20°C	
	18	PM3	Aeh-1*	PM1	PM2
<u>VIBRIONACEAS</u>					
<u>A. hydrophila</u>					
<u>O34</u>					
AH3	+	+	+	+	+
Ba5	+	+	+	+	+
AH-101	+	-	+	+	+
AH-203	+	-	+	+	+
AH-10	+	-	+	+	+
AH-102	+	+	+	+	+
AH-103	+	+	+	+	+
<u>O22</u>					
AH-50	+	-	+	-	+
<u>O11</u>					
TF7	-	+	-	-	-
AH-45	-	+	+	-	+
AH-21	-	+	-	-	+
AH-24	-	+	-	-	+/-
AH-26	-	+	+	-	+/-
AH-28	-	-	-	-	-
AH-55	-	-	-	-	-
LL1	-	+	-	-	+
ATCC9071	-	-	-	-	-
AH-49	-	-	-	-	-
AH-51	-	-	-	-	-
AH-205	+/-	-	-	-	-
AH-121	+/-	-	+	-	-

Bacteriófagos

Cepas bacterianas	37°C			20°C	
	18	PM3	Aeh-1*	PM1	PM2
<u>No serotipadas</u>					
ATCC7966	-	-	+	-	+
64830	-	-	+	-	+
24963	-	-	-	-	+
25616	-	-	-	-	+
2911	-	-	-	-	-
17577	-	-	+	-	+
8973	-	-	+	-	+
38589	-	-	+	-	-
C-1	-	-	+	-	-
<u>A. sobria</u>					
AS-28	-	-	-	-	-
AH-48	-	-	-	-	+
18975	-	-	-	-	+
AS-76	-	-	-	-	-
<u>A. salmonicida</u>					
A450	-	-	+	-	+
A450-3	-	-	+	-	+
A450-1	-	-	+	-	+
<u>Vibrio anguillarum</u>					
(O1)	-	-	-	-	-

Todas las cepas probadas correspondientes a géneros de la familia Enterobacteriaceae fueron resistentes a los bacteriófagos obtenidos en las cepas de A. hydrophila.

Las cepas no serotipadas de A. hydrophila no corresponden al serotipo O34 ni O11.

*: Bacteriófago cedido por Ackermann (1), cuya cepa huésped es la denominada C-1 de A. hydrophila.

+: Sensible.

-: Resistente.

3.1.D.- CARACTERIZACION DE LOS BACTERIOFAGOS.

3.1.D.1.- CRECIMIENTO EN UNA SOLA ETAPA.

Con los experimentos de crecimiento en una sola etapa se determinó el tiempo empleado por cada uno de los bacteriófagos para llevar a cabo cada una de las fases del ciclo lítico, como son el tiempo de latencia, el tiempo de explosión y el tamaño de explosión. Así se determinó, tal y como se muestra en la tabla 4, que el bacteriófago 18 posee un periodo de latencia de 10 min., un periodo de explosión de 40 min. y un tamaño de explosión de 130 p.f.u./ml.; el fago PM1 posee un periodo de latencia de 50 min., un periodo de explosión de 30 min. y un tamaño de explosión de 170 p.f.u./ml.; el fago PM2 posee un periodo de latencia de 30 min., un periodo de explosión de 20 min. y un tamaño de explosión de 290 p.f.u./ml.; finalmente, el fago PM3 es un bacteriófago que da lugar a calvas pequeñas y muy turbias, lo cual hace muy difícil la determinación de su periodo de latencia y explosión, así como su tamaño de explosión.

A partir de estos resultados podemos decir que el bacteriófago 18 posee el menor periodo de latencia; con respecto al resto de los bacteriófagos estudiados; a diferencia del fago PM1 que presenta el mayor. Este hecho indica que el fago 18 tiene elevada facilidad para replicarse y construir sus partículas fágicas en el interior de la bacteria huésped, a diferencia del fago PM1, el cual requiere un tiempo elevado para formarlas. Por otro lado, también se observa que el fago 18 posee un elevado tiempo de latencia, lo cual indica que la liberación de las partículas fágicas al exterior se realiza lentamente. Finalmente, podemos

decir que el tamaño de explosión de los fagos 18 y PM1 son muy similares, a pesar de sus diferencias en los períodos de latencia y explosión, y el bacteriófago PM2 presenta el mayor tamaño de explosión (doble que el de los anteriores).

TABLA 4: Determinación del periodo de latencia y explosión, así como el tamaño de explosión, mediante experimentos de crecimiento en una sola etapa.

Bacteriófago	Periodo (min.)		Tamaño
	Latencia	Explosión	Explosión
18	10	40	130 p.f.u.
PM1	50	30	170 p.f.u.
PM2	30	20	290 p.f.u.

3.1.D.2.- DETERMINACION DE LA DENSIDAD.

Los gradientes de CsCl hasta el equilibrio para la determinación de la densidad de los bacteriófagos, pusieron de manifiesto que se trataba de bacteriófagos bastante densos, ya que sus densidades oscilaban entre 1.50 gr./cm³ y 1.51 gr./cm³, tal y como puede observarse en la tabla 5.

Así, el bacteriófago PM1 presenta una densidad de 1.51 gr./cm³, el PM2 una densidad de 1.51 gr./cm³ y el PM3 de 1.50 gr./cm³.

TABLA 5: Densidad de los bacteriófagos PM1, PM2 y PM3 de A. hydrophila mediante gradiente en CsCl, empleando como marcador de densidad el bacteriófago P22.

Bacteriófago	Densidad (gr./cm ³)
PM1	1.51
PM2	1.51
PM3	1.50

3.1.D.3.- DETERMINACION DEL MATERIAL GENETICO.

Para determinar el tipo de material genético presente en cada uno de los bacteriófagos aislados se empleo el método de Bradley (15), basado en la tinción con naranja de acridina de los bacteriófagos purificados. Con ello, observamos que el material genético de los bacterfiófagos PM1, PM2 y PM3 era ácido desoxiribonucleico (DNA) de doble cadena, tal y como se describe en la tabla 6.

Una vez determinado el tipo de material genético, se realizó la extracción del mismo (82) y la digestión con endonucleasas de restricción (11), como: EcoRI, EcoRV, BamHI, PvuI, BglI, PstI, Sall y HindIII. Con esto, observamos que el ADN del fago PM1 era restringido por tres enzimas: PstI, Sall y EcoRI; el ADN del fago PM2 era restringido por cuatro enzimas: EcoRI, Sall, HindIII y BamHI; y finalmente, el ADN del fago PM3 era restringido por cuatro enzimas: PstI, Sall, BgIII y BamHI.

El hecho de que el material genético de los bacteriófagos estudiados contuviese alguna diana para endonucleasas de restricción corrobora la idea de que su material genético sea DNA de doble cadena.

TABLA 6: Determinación del tipo de material genético presente en los bacteriófagos PM1, PM2 y PM3 de A. hydrophila, así como de las endonucleasas de restricción capaces de restringir su material genético.

Bacteriófago	Acido nucleico	Conformación (Bradley)	Enzimas de restricción activos.
PM1	DNA	Ds	PstI, Sall y EcoRI
PM2	DNA	Ds	EcoRI, Sall, BamHI y HindIII
PM3	DNA	Ds	PstI, Sall, BglII y BamHI

3.1.D.4.- CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS CONSTITUYENTES DE LOS VIRIONES.

Una vez purificados los bacteriófagos se determinaron los polipéptidos que los constituían, mediante electroforesis en SDS-PAGE y posterior tinción en Coomassie blue (42), observándose que el número de polipéptidos constituyentes en cada uno de los bacteriófagos oscilaba entre 13 - 15, tal y como puede observarse en las tablas 7, 8 y 9.

El bacteriófago PM1 presenta 14 polipéptidos, de los cuales destacan tres como mayoritarios, cuyos pesos moleculares son: 33, 18 y 16 Kd. (Tabla 7); el fago PM2 posee 15 polipéptidos, de los cuales tres son mayoritarios y sus pesos moleculares son: 56, 42 y 18.5 Kd. (Tabla 8); y el fago PM3 posee 13 polipéptidos, de los cuales cuatro de ellos son mayoritarios, con pesos moleculares de: 43, 41, 39 y 15.5 Kd. (Tabla 9).

TABLA 7: Polipéptidos constituyentes del bacteriófago PM1.



Designación polipéptido	Movilidad electroforética (cm.)	Peso molecular (Kd.)
P1	0.5	108
P2	1.7	51
P3	1.8	48
P4	1.9	45
* P5	2.8	33
P6	2.85	32
P7	2.9	31
P8	3.2	28.5
P9	3.3	27.5
P10	3.5	25.5
P11	3.8	23.5
* P12	4.6	18
P13	4.95	16
* P14	5.2	14.5

*: Polipéptidos mayoritarios.

TABLA 8: Polipéptidos constituyentes del bacteriófago PM2.

Designación polipéptido	Movilidad electroforética (cm.)	Peso molecular (Kd.)
P1	0.5	107
* P2	1.3	56
* P3	1.85	42
P4	2	40
P5	2.1	38
P6	2.2	36
P7	2.8	29
P8	2.9	27.5
P9	3.1	25
P10	3.3	23
P11	3.7	20
* P12	4	18.5
P13	4.6	16
P14	5.1	14
P15	5.4	12

* Polipéptidos mayoritarios.

TABLA 9: Polipéptidos constituyentes del bacteriófago PM3.

Designación polipéptido	Movilidad electroforética (cm.)	Peso molecular (Kd.)
P1	1.1	67
P2	1.2	63
* P3	1.8	43
* P4	2	41
* P5	2.1	39
P6	2.3	38
P7	2.6	33
P8	2.7	32
P9	3.1	28
P10	3.8	21.5
P11	4.2	18.5
P12	4.6	16.5
* P13	4.9	15.5
* Polipéptidos mayoritarios.		

3.1.D.5.- MORFOLOGIA DE LOS BACTERIOFAGOS PM1, PM2 y PM3.

Una vez purificados los bacteriófagos en gradiente de CsCl, pasamos a estudiar su morfología mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2% (127) y posterior observación mediante microscopía electrónica de transmisión en un microscopio Hitachi MT-800 (Servicio de Microscopía Electrónica. Universidad de Barcelona.).

Con esto, observamos que: El fago PM1 presenta cápside poliédrica, cola contráctil y placa basal al final de la cola de la cual, probablemente, salen tres fibras; tal y como puede observarse en las figuras 1.A y 1.B. El fago PM2 posee una cápside poliédrica, cola contráctil, collar, y una placa basal al final de la cola, de la que salen como mínimo seis espículas tal y como puede observarse en la figura 1.C. Este bacteriófago es similar a los bacteriófagos T de Escherichia coli. El fago PM3 posee una cápside poliédrica, una cola larga no contráctil acabada, probablemente, en fibras y presenta una estructura denominada "tapering end", tal y como se ve en la figura 1.D.

TABLA 10: Estructuras presentes en los bacteriófagos PM1, PM2 y PM3 de A. hydrophila.

Fagos	Estructuras				
	Cápside	Collar	Cola	Placa basal	fibras o espículas
PM1	Poliédrica	No	Contráctil	Si	3 fibras
PM2	Poliédrica	Si	Contráctil	Si	6 espíc.
PM3	Poliédrica	No	No contráctil	No	Si

TABLA 11: Tamaño de cada una de las estructuras que forman parte de los bacteriófagos PM1, PM2 y PM3 de A. hydrophila.

Fagos	Tamaño (nm.)				
	Cápside	Collar	Cola	Placa basal	fibras o espículas
PM1	60x60	-	130x20	3.3x20	53.3x2.3
PM2	105x80	7.5x20	110x20	3.5x25	17.5x7.5
PM3	45x45	-	205x10	-	-

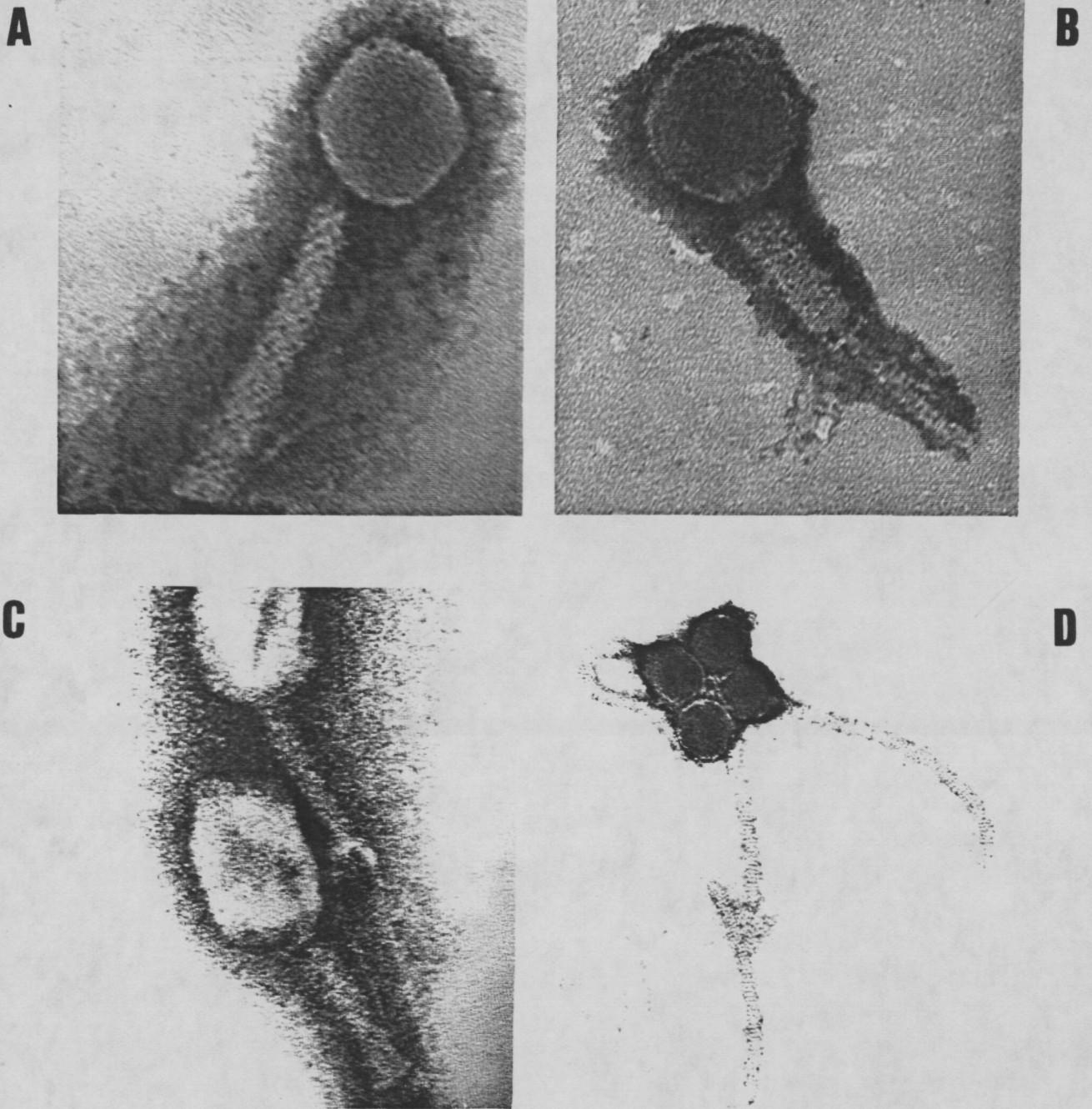


FIGURA 1: Tinción de los bacteriófagos de *A. hydrophila* con acetato de uranilo al 2%. A) Bacteriófago PM1 mostrando la cola estirada (300x); B) Bacteriófago PM1 con la cola contraída (300x); C) Bacteriófago PM2 mostrando el collar existente entre la cola y las largas espículas que salen de la placa basal (200x); y D) Fago PM3 presentando su larga cola no contráctil acabada en la estructura denominada "tapering end" (200x).

3.1.E.- DETERMINACION DEL RECEPTOR DE LOS BACTERIOFAGOS 18, PM1, PM2 Y PM3.

3.1.E.1.- OBTENCION DE MUTANTES POR RESISTENCIA A BACTERIOFAGOS.

La obtención de mutantes espontáneos por resistencia a bacteriófagos de A. hydrophila se realizó mediante la siembra de 10^8 cel./ml. de células, según la técnica de la doble capa de agar (2) y posterior adición de 10^9 p.f.u./ml. de bacteriófago. De este modo, obtuvimos mutantes resistentes al bacteriófago 18, PM1 y PM2 sobre las cepas AH-3, Ba5 y AH-101 de A. hydrophila serotipo O34, con una frecuencia de 10^6 y al bacteriófago PM3 sobre la cepa TF7 de A. hydrophila serotipo O11, con una frecuencia de 10^7 . Todos estos resultados se hallan reflejados en la tabla 12.

De cada una de las cepas parentales (AH-3, Ba5, AH-101 y TF7) se obtuvieron 10 mutantes espontáneos por resistencia a cada uno de los bacteriófagos, observándose que todas las cepas obtenidas por resistencia a un bacteriófago determinado presentaban el mismo patrón de sensibilidad. Debido a ello, todos los resultados se expresan únicamente para un sólo representante de cada tipo de mutantes. Concretamente, los mutantes resistentes al fago 18 en la cepa AH-3 (AH-8), Ba5 (AH-9) y AH-101 (AH-151), así como los resistentes al fago PM1 en las mismas cepas (AH-22, AH-23 y AH-161 respectivamente) son sensibles a los fagos PM2, PM3 y Aeh-1 y resistentes a los fagos 18, 69, 145 y PM1. Los resistentes al fago PM2 en las cepas AH-3 (AH-53), Ba5 (AH-54) y

AH-101 (AH-199) son sensibles al fago PM3 y resistentes al resto de los bacteriófagos. Finalmente, los resistentes al bacteriófago PM3 de la cepa TF7 (AH-28 y AH-55) son únicamente sensibles al bacteriófago Aeh-1. Todos estos resultados se hallan expuestos en la tabla 13.

Como controles se emplearon las cepas AH-3, Ba5 y AH-101 que eran sensibles a 37°C a los bacteriófagos 18, 69, 145, Aeh-1 y PM3 y a 20°C a los fagos PM1 y PM2; y la cepa TF7 que únicamente era sensible, tanto a 37°C como a 20°C a los fagos PM3 y Aeh-1.

TABLA 12: Frecuencia de obtención de mutantes espontáneos de las cepas AH-3, Ba5, AH-101 y TF7 de A. hydrophila, por resistencia a los bacteriófagos 18, PM1, PM2 y PM3.

Cepas	Frecuencia			
	37°C		20°C	
	18	PM3	PM1	PM2
AH-3	3×10^{-6}	NT	2×10^{-6}	3×10^{-6}
Ba5	5×10^{-6}	NT	2×10^{-6}	3×10^{-6}
AH-101	1×10^{-6}	NT	2×10^{-6}	3×10^{-6}
TF7	NT	8×10^{-7}	NT	NT

NT: No estudiadas.

TABLA 13: Sensibilidad a los bacteriófagos de las cepas parentales y a los mutantes espontáneos obtenidos por resistencia a cada uno de los bacteriófagos

Cepas	Características	Bacteriófagos						
		37°C					20°C	
		18	69	145	Aeh-1	PM3	PM1	PM2
AH-3	Parental	+	+	+	+	+	+	+
AH-8	AH-3-18R	-	-	-	+	+	-	+
AH-22	AH-3-PM1R	-	-	-	+	+	-	+
AH-53	AH-3-PM2R	-	-	-	-	+	-	-
Ba5	Parental	+	+	+	+	+	+	+
AH-9	Ba5-18R	-	-	-	+	+	-	+
AH-23	Ba5-PM1R	-	-	-	+	+	-	+
AH-54	Ba5-PM2R	-	-	-	-	+	-	-
AH-101	Parental	+	+	+	+	-	+	+
AH-151	AH-101-18R	-	-	-	+	-	-	+
AH-161	AH-101-PM1R	-	-	-	+	-	-	+
AH-199	AH-101-PM2R	-	-	-	-	-	-	-
TF7	Parental	-	-	-	+	+	-	-
AH-28	TF7-PM3R	-	-	-	+	-	-	-
AH-55	TF7-PM3R	-	-	-	+	-	-	-

3.1.E.2.- INTERACCION DE LOS BACTERIOFAGOS CON LA SUPERFICIE DE AEROMONAS HYDROPHILA.

Este tipo de experimentos se llevaron a cabo con el fin de determinar la estructura superficial bacteriana a la que se adsorben cada uno de los bacteriófagos estudiados.

En primer lugar, pusimos en contacto 10^3 p.f.u./ml. de cada uno de los bacteriófagos, con 10^7 células de las cepas parentales y de los mutantes espontáneos respectivos, obtenidos por resistencia a los bacteriófagos. Al realizar esto, observamos que las cepas parentales inactivan a los bacteriófagos, a diferencia de los respectivos mutantes espontáneos, los cuales, eran incapaces de inactivarlos. Este hecho indica que los mutantes espontáneos de las cepas parentales presentan alteraciones en alguna estructura superficial, que sería empleada como receptor por los respectivos bacteriófagos.

Seguidamente se realizaron inactivaciones con los componentes de la membrana externa, tanto de las cepas parentales como de los mutantes obtenidos para los bacteriófago 18, PM1 y PM2, cuyos resultados se muestran en las tablas 14, 15 y 16.

Los bacteriófagos 18 a 37°C , PM1 y PM2 a 20°C se inactivan con las OM, tratadas y no tratadas con proteinasa K, de las cepas parentales (AH-3, Ba5 y AH101) y no con las de los respectivos mutantes resistentes, de igual modo que sucede al emplear células enteras. Estos resultados, excluyen a las proteínas de la membrana externa como posible receptor de estos bacteriófagos.

Una vez excluidas las proteínas de la membrana externa como posibles receptores de estos bacteriófagos, purificamos el LPS tanto de las cepas parentales como de los respectivos mutantes y vimos que únicamente el LPS de las cepas parentales inactiva a los bacteriófagos estudiados. Por el contrario, si el citado LPS se trataba previamente con suero anti-LPS no inactivaba en ninguno de los casos. Al observar este hecho, se fraccionó el LPS de las cepas parentales y se realizaron inactivaciones con las fracciones de elevado peso molecular (HML-LPS), las cuales se hallaban enriquecidas en antígeno O, y con las fracciones de bajo peso molecular (LMW-LPS), las cuales se hallaban enriquecidas en oligosacáridos del núcleo del LPS. Este experimento permitió observar que los bacteriófagos 18 y PM2 se inactivan con las fracciones de bajo peso molecular (LMW-LPS) y por el contrario, el fago PM1 se inactiva con las fracciones de elevado peso molecular (HMW-LPS).

El fago PM3 a 37°C no se inactiva ni con las OM, tratadas o no con proteinasa K, ni con el LPS purificado, tanto de la cepa parental como de los mutantes resistentes al citado bacteriófago (AH-28 y AH-55). Por otro lado, al ponerlo en contacto con la cepa TF7 de *A. hydrophila* crecida en condiciones de motilidad (agitación de 200 r.p.m.) y en condiciones restrictivas de motilidad (crecimiento estático), se observa que únicamente se inactiva en condiciones de motilidad. Debido a esto, se purificaron flagelos de la cepa TF7, según se describe en el apartado 2.8.C. esta memoria, se analizaron mediante SDS-PAGE, con lo cual vimos que únicamente presentan un polipéptido de 45 Kd., tal y como se muestra en la figura 2.A. y se determinó su pureza mediante marcaje con anticuerpos contra flagelo unidos a proteína A ligada a oro (Figura 2.B.). Por último, pusimos en

contacto el fago PM3 con los flagelos purificados y vimos que se producía un 75% de inactivación (Figura 2.C.).

A la vista de estos resultados, examinamos la estructura superficial de los mutantes obtenidos (AH-28 y AH-55) y apreciamos que presentan una composición de proteínas de membrana y de LPS idéntica a la de la cepa parental. Tras ello, estudiamos su motilidad mediante placas semisólidas (110), gota pendiente y microscopía electrónica de transmisión para determinar la presencia o ausencia de flagelo (Figura 3). Con estos experimentos determinamos que la cepa salvaje presenta un flagelo monopolar que le permite moverse, a diferencia de los mutantes, los cuales presentan alteraciones en el número y la morfología del flagelo, siendo siempre inmóviles.

TABLA 14: Inactivación del bacteriófago 18 con células enteras y componentes de la membrana externa.

% inactivación del bacteriófago con:

Cepas	Células enteras	OM ^{a)}	OM tratadas con proteinasa-K ^{b)}	LPS ^{c)}	LPS anti-LPS ^{d)}	HMW LPS ^{e)}	LMW LPS ^{e)}
AH-3	96.8	92.7	91.5	72.3	<1.0	<1.0	69.7
AH-8	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT
Ba5	97.5	91.2	91.0	71.9	<1.0	<1.0	70.3
AH-9	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT
AH-101	95.8	91.7	91.6	69.7	<1.0	NT	NT
AH-151	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT

^{a)}: OM solubilizadas con un 1% de D.O.C. y 2 mM EDTA (124)

^{b)}: OM tratadas con proteinasa K (10 µg/ml.) durante 2 h. 45°C.

^{c)}: LPS purificado (100 µg.) (169, 112).

^{d)}: LPS purificado (100 µg.) tratado con igual volumen de suero anti-LPS durante 1 h. a 37°C.

^{e)}: Fracciones de alto y bajo peso molecular del LPS (50 µg.).

NT: No probado.

TABLA 15: Inactivación del bacteriófago PM1 con células enteras y componentes de la membrana externa.

% inactivación del bacteriófago con:

Cepas	Células enteras	OM ^{a)}	OM tratadas con proteinasa-K ^{b)}	LPS ^{c)}	LPS tratado anti-LPS ^{d)}	HMW LPS ^{e)}	LMW LPS ^{e)}
AH-3	97.8	93.2	93.4	76.8	<1.0	71.4	<1.0
AH-22	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT
Ba5	96.5	92.4	92.1	75.3	<1.0	71.6	<1.0
AH-23	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT
AH-101	97.1	92.6	92.6	76.4	<1.0	71.3	<1.0
AH-161	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT

^{a)}: OM solubilizadas con un 1% de D.O.C. y 2 mM EDTA (124)

^{b)}: OM tratadas con proteinasa K (10 µg/ml.) durante 2 h. 45°C.

^{c)}: LPS purificado (100 µg.) (169, 112).

^{d)}: LPS purificado (100 µg.) tratado con igual volumen de suero anti-LPS durante 1 h. a 37°C.

^{e)}: Fracciones de alto y bajo peso molecular del LPS (50 µg.).

NT: No probado.

TABLA 16: Inactivación del bacteriófago PM2 con células enteras y componentes de la membrana externa.

Cepas	% inactivación bacteriófago con:						
	Células enteras	OM ^{a)}	OM tratadas con proteinasa-K ^{b)}	LPS ^{c)}	LPS con anti-LPS ^{d)}	HMW LPS ^{e)}	LMW LPS ^{e)}
AH-3	98.3	97.6	96.8	77.2	<1.0	<2.0	75.8
AH-53	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT
Ba5	97.8	97.2	96.8	78.3	<1.0	<2.0	76.9
AH-54	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT
AH-101	96.8	93.1	91.0	71.3	<1.0	<2.0	NT
AH-199	<1.0	<1.0	NT	<1.0	NT	NT	NT

^{a)}: OM solubilizadas con un 1% de D.O.C. y 2 mM EDTA (124)

^{b)}: OM tratadas con proteinasa K (10 µg/ml.) durante 2 h. 45°C.

^{c)}: LPS purificado (100 µg.) (169, 112).

^{d)}: LPS purificado (100 µg.) tratado con igual volumen de suero anti-LPS durante 1 h. a 37°C.

^{e)}: Fracciones de alto y bajo peso molecular del LPS (50 µg.).

NT: No probado.

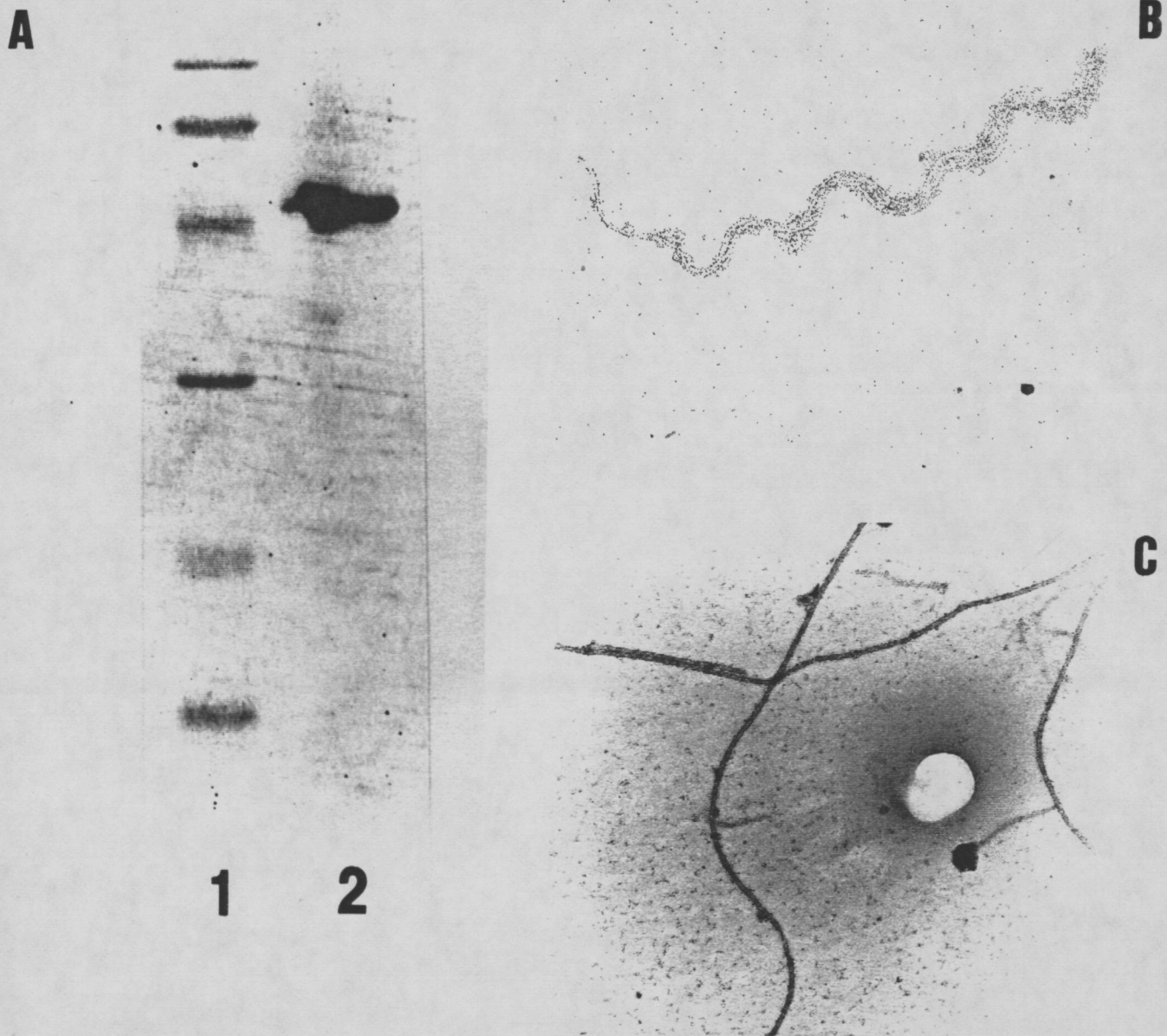


FIGURA 2: Purificación del flagelo de la cepa TF7 de *Aeromonas hydrophila* e inactivación del bacteriófago PM3 con el citado flagelo. A) Electroforesis en SDS-PAGE del polipéptido constituyente del flagelo de la cepa TF7. Columnas: 1, Standard de proteínas Pharmacia Fine Chemicals (14.0, 20.1, 30.0, 43.0, 67.0 y 94.0 Kd.) y; 2, Flagelos purificados. B) Microscopía electrónica de flagelos purificados marcados con anticuerpos específicos unidos a proteína-A ligada a oro coloidal de 10 nm. C) Tinción negativa, con acetato de uranilo, del bacteriófago PM3 adsorvido al flagelo purificado de la cepa TF7.

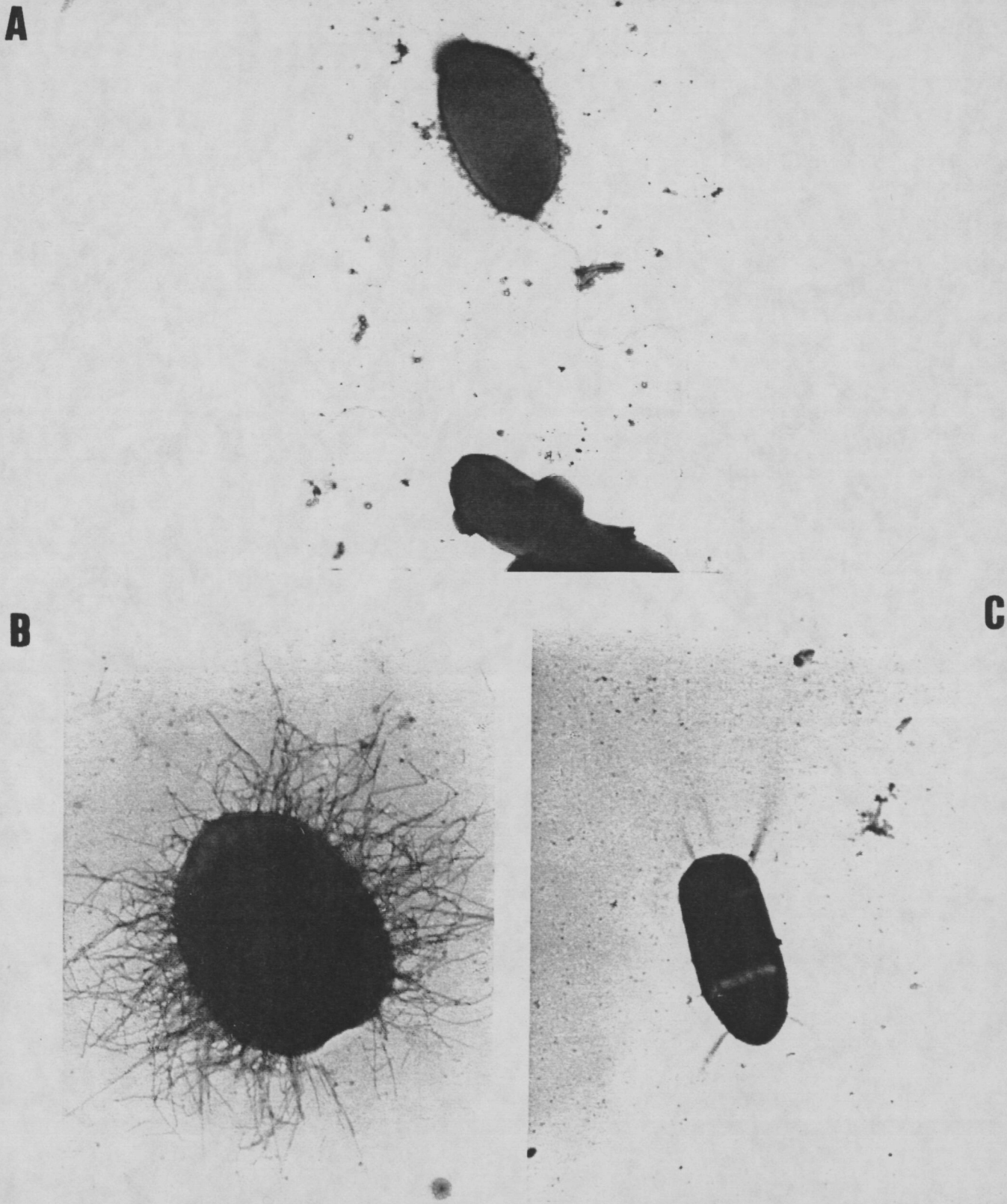


FIGURA 3: Tinción negativa con acetato de uranilo al 2%, de las cepas de A. hydrophila: A) TF7 (cepa parental); B) Mutante sin flagelo AH-28 y; C) Mutante sin flagelo AH-55.

3.2.- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE CELULAR DEL SEROTIPO O34 DE AEROMONAS HYDROPHILA.

3.2.A.- CARACTERIZACION DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS CEPAS DE SEROTIPO O34.

3.2.A.1.- PROTEINAS DE MEMBRANA.

Las proteínas de membrana de las cepas de Aeromonas hydrophila serogrupo O34 se obtuvieron tras sonicar y centrifugar para eliminar las células enteras. Las membranas obtenidas de este modo, reciben el nombre de totales (WM) y contienen tanto la membrana interna (IM), como la externa (OM).

Una vez obtenidas las WM , se trataron con sodio lauril sarcosinato (SLS) durante 20 min. a temperatura ambiente, para que se separasen las IM y OM y luego, se centrifugaron diferencialmente. Tras realizar esto, obtuvimos un precipitado insoluble correspondiente a las OM y una fracción soluble correspondiente a las IM.

Finalmente, se valoró la concentración de proteínas de membrana externa mediante el método de Lowry (78), se realizó una electroforesis en gel de polyacrilamida SDS-PAGE y se tiñó con Coomassie blue (42).

Con este proceso pudimos determinar que las OM de todas las cepas de Aeromonas hydrophila serogrupo O34 presentan un patrón muy similar de proteínas de membrana (OMP). Además, también vimos que el citado patrón es muy diferente del existente en otras cepas de A. hydrophila cuyo serotipo no es O34 (Figura 4.A.).

Tal y como se muestra en la figura 4.A. el serotipo O34 posee 16 proteínas en su OM, entre las que cabe destacar, como características, la presencia de cuatro proteínas cuyo peso molecular es 23.5, 29, 40 y 45.5 Kda. respectivamente.

3.2.A.2.- LIPOPOLISACARIDO.

a).- CARACTERIZACION POR GEL SDS-PAGE.

Para poder llevar a termino el estudio del LPS de las cepas de A. hydrophila serogrupo O34 mediante geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata según el método de Tsai y Frasch (162), se empleó LPS purificado según el método de Westphal y Jann (169) modificado por Osborn (112) o bien, cultivos bacterianos según el método de Korhonen (68).

Tras realizar este estudio, observamos que todas las cepas de serogrupo O34 presentaban un LPS en el que aparecen dos regiones claramente definidas: una región de bajo peso molecular, formada por el lípido A y el núcleo del LPS; y otra región de elevado peso molecular, formada por cadenas polisacáridicas de longitud heterogénea que constituyen el antígeno O del LPS. Esta región de elevado peso molecular aparece en los geles de poliacrilamida como un bandeo claramente definido que sale del núcleo del LPS.

La estructura del LPS presente en las cepas de A. hydrophila serogrupo O34 (AH-3 y Ba5) es muy distinta a la que aparece en cepas de cualquier otro serotipo (TF7 y ATCC7966), tal y como se muestra en la figura 4.B.

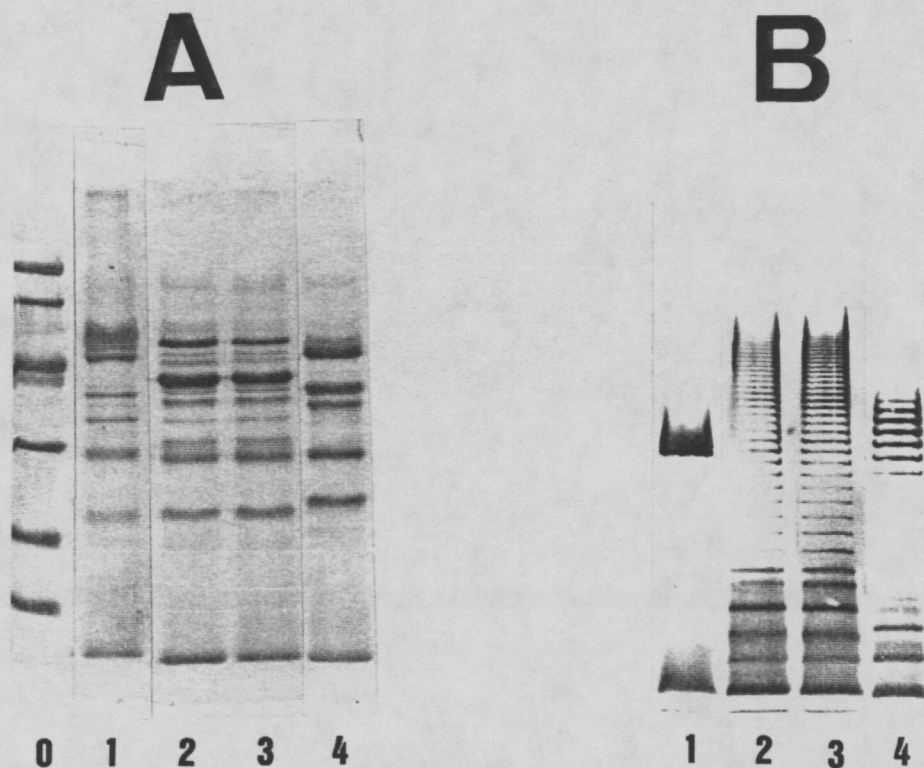


FIGURA 4 : A) Gel SDS-PAGE de proteínas de membrana externa (OMP) de cepas de *A. hydrophila*. Las OMP se obtuvieron como material insoluble en sodio-lauril-sarcosinato (44). Columnas: 0, standard de proteínas Pharmacia Fine Chemicals (14.0, 20.1, 30.0, 43.0, 67.0 y 94.0 Kd.); 1, Cepa TF7; 2, Cepa Ba5; 3, Cepa AH-3; y 4, Cepa ATCC7966. B) Gel SDS-PAGE del LPS de diferentes cepas de *A. hydrophila*. Se empleó LPS purificado según el método de Westphal y Jann (169) modificado por Osborn (112) y teñido según el método de Tsai y Frasch (162). Columnas: 1, Cepa TF7; 2, Cepa Ba5; 3, Cepa AH-3; y 4, Cepa ATCC7966.

b).- FRACCIONAMIENTO DEL LPS.

Al fraccionar el LPS de la cepa AH-3 de A. hydrophila , según la metodología descrita en el apartado correspondiente al apartado 2.8.D de esta Memoria, se observó que las fracciones 38 a 42 presentan moléculas de elevado peso molecular (HMW-LPS), por tanto poseen antígeno O en el LPS; y por otro lado, las fracciones 60 a 46, únicamente tienen moléculas de bajo peso molecular (LMW-LPS), las cuales constituyen el núcleo del LPS.

Las fracciones de elevado peso molecular se agruparon en un "pool" y las de bajo peso molecular en otro, para llevar a cabo con ellas los experimentos de inactivación de bacteriófagos y de resistencia al suero no inmune.

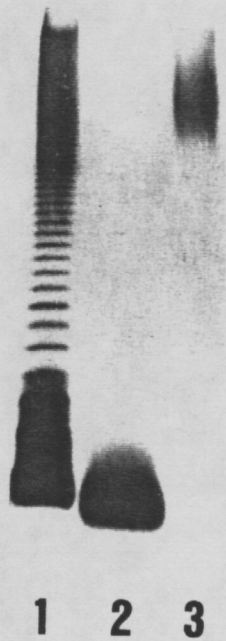


FIGURA 5: Gel SDS-PAGE del fraccionamiento del LPS de la cepa AH-3 de A. hydrophila serogrupo O34. Se purificó el LPS por tratamiento con fenol al 45% y se fraccionó por cromatografía en Sephacril. Columna: 1, LPS completo de la cepa AH-3; 2, LMW-LPS AH-3 y; 3, HMW-LPS AH-3.

c).- COMPOSICION QUIMICA.

El LPS purificado de cepas de A. hydrophila de serogrupo O34 se sometió a diferentes análisis químicos y por gas líquido cromatografía, con el fin de estudiar su composición química. Así, se observó que las cepas de serogrupo O34 presentan un contenido en KDO (ácido-2-ceto-3-desoxioctulosónico) de 0.018-0.019, en L-heptosa de 0.31, en glucosa de 1.55-1.57, en hexasaminas de 0.41-0.43 y no presentaban D-heptosa, pentosas, galactosa, ni rhamnosa. Todos los datos vienen dados en μ moles/ mgr. LPS y se hallan reflejados en la tabla 17.

TABLA 17: Resumen de la composición química del LPS purificado de las cepas AH-3 y Ba5 de A. hydrophila serogrupo O34.

^{a)} Analizado por colorimetría (66).

^{b)} Analizado por gas-líquido cromatografía (147).

μmoles/mg. de LPS de:

LPS	KDO ^{a)}	L-heptosa ^{b)}	D-heptosa ^{b)}	Pentosa ^{b)}	Glucosa ^{b)}	Galactosa ^{b)}	Rhamnosa ^{b)}	Hexosaminas ^{b)}
Ba5	0.019	0.31	0	0	1.55	0	0	0.43
AH-3	0.018	0.31	0	0	1.57	0	0	0.41

3.2.B.2.- DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE LPS.

Al estudiar la D.L.₅₀ se observó que las cepas de A. hydrophila serogrupo O34 eran más virulentas cuando crecían a 20°C que a 37°C, pues necesitaban un menor número de células para eliminar a la mitad de la población. Tras detectarse este hecho, se determinaron los niveles de KDO existentes en crecimientos a 20°C y a 37°C, así como la cantidad de HMW-LPS (antígeno-O del LPS) existente en las células de A. hydrophila serogrupo O34 al crecer a las citadas temperaturas.

Al determinar los niveles de KDO (66) existentes en la membrana externa (OM) de células de la cepa AH-3 crecida a 20°C y 37°C, observamos que: las OM de AH-3 a 20°C presentan 59 nmol./mg. OMP de KDO y a 37°C presentan 78 nmol./mg. OMP de KDO (Tabla 19). Esto, indica que las cepas crecidas a 20°C presentan menor cantidad de KDO que las crecidas a 37°C por mg de OMP.

Además, se realizó un ELISA en el que se empleó como anticuerpo, anti-LPS de la cepa AH-3 adsorbido con la cepa AH-22 (LPS corto) y como antígeno, 10⁵ células enteras o membranas totales (WM) de la cepa AH-3 crecidas a 20°C y 37°C. Con ello, pudimos apreciar que tanto las células enteras como las WM de la cepa AH-3 a 20°C presentaban mayor cantidad de HMW-LPS que a 37°C (Tabla 20).

Todas estas diferencias también se observaron al realizar geles SDS-PAGE del LPS de cepas de Aeromonas hydrophila serogrupo O34 crecidas a 20°C y 37°C (Figura 6).

Este comportamiento, en cuanto a la cantidad de lipopolisacárido sintetizado en función de la temperatura de crecimiento, no es exclusivo de la cepa AH-3, sino que ocurre en todas las cepas de A. hydrophila de serogrupo O34.

TABLA 19 : Medida de la cantidad de KDO existente en las proteínas de membrana externa de la cepa AH-3 de A. hydrophila serogrupo O34 al crecer a diferentes temperaturas.

Temperatura de crecimiento	KDO nmol./mg. OMP
37°C	78
20°C	59

TABLA 20 : ELISA empleando diferentes antígenos y anti-LPS de la cepa AH-3 adsorbido con la cepa AH-22 (LPS corto) de A. hydrophila.

Antígeno	O.D. ₄₀₅
10 ⁵ células de AH-3 a 20°C	0.663
10 ⁵ células de AH-3 a 37°C	0.367
WM (10 µg.) de AH-3 a 20°C	1.902
WM (10 µg.) de AH-3 a 37°C	1.309

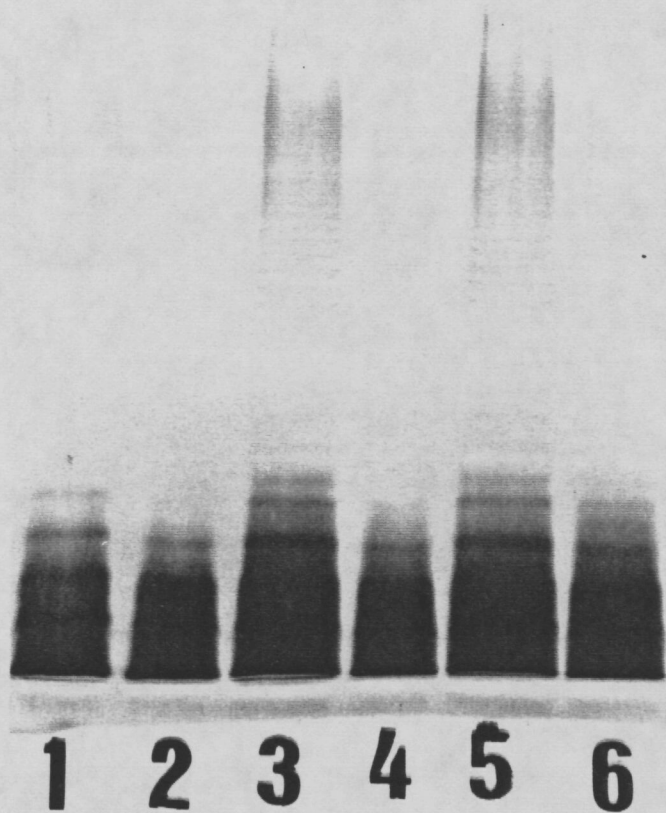


FIGURA 6: Gel SDS-PAGE del LPS de la cepa AH-3 crecida a 20°C y 37°C. Columna 1, LPS de AH-3 crecida a 20°C; 2, LPS de AH-3 crecida a 37°C; 3, LPS de Ba5 crecida a 20°C; 4, LPS de Ba5 crecida a 37°C; 5, LPS de AH-101 crecida a 20°C y; 6, LPS de AH-101 crecida a 37°C.