



**Universidad de Barcelona
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología**

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

**M^a Teresa Muniesa Pérez
Tesis doctoral**



Universidad de Barcelona
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

Vº Bº del Director de la tesis

Dr. Joan Jofre Torroella

Memoria presentada por
M^a Teresa Muniesa Pérez
para optar al grado de
Doctor en Biología

Barcelona, Julio de 1998

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 94-96

A l'Àlex

Als meus pares

A la meva família

AGRADECIMIENTOS

Esta memoria de tesis doctoral ha sido escrita en castellano por decisión conjunta de mi misma y de mi director de tesis. No obstante, dado que los agradecimientos van dirigidos a aquellas personas que, en una u otra forma, me han ayudado durante la realización de este trabajo. Puesto que con la gran mayoría de estas personas tengo por costumbre comunicarme en catalán, me permito la licencia de escribir los agradecimientos en esta lengua.

AGRAÏMENTS

És costum en aquesta part de la memòria de tesi agrair, en primer lloc, al director de tesi la seva ajuda. En aquest cas no contradiré aquest costum, però vull fer constar que no ho faig només per tradició, sinó amb molt de plaer. Aquesta tesi doctoral senzillament no existiria sense la inestimable ajuda del meu mestre el Dr. Joan Jofre i Torroella. No només m'ha dirigit la tesi de manera impecable, sinó que gràcies a ell he après com funciona el procés anomenat "investigació". El Dr. Jofre m'ha ajudat a comprendre que aquest procés té realment sentit quan es realitza a fi d'aportar uns coneixements que puguin contribuir d'alguna manera al benestar social. Considero que aquest aprenentatge és més important que tot el que es pugui aprendre sobre l'experimentació en si mateixa. Gràcies Joan per la paciència que has tingut, per les magnífiques idees que sempre m'has donat, per la teva dedicació i estimul i per la confiança que has tingut en mi. Si alguna vegada decideixo realitzar una altre tesi doctoral, m'agradaria que me la tornessis a dirigir tu.

Al Dr. Francisco Lucena, un gran coneixedor de les nostres aigües, agrair-li els seus consells, la seva ajuda i la seva total disponibilitat a l'hora de traslladar-se a qualsevol punt de la geografia catalana. Gràcies a ell he obtingut moltes de les mostres que s'han analitzat en aquest estudi.

Al Dr. Anicet Blanch per introduir-me al camp de la biologia molecular i per compartir els seus amplis coneixements en l'intricat món de la informàtica.

A la Dra. Rosa Araujo per ensenyar-me i donar-me l'oportunitat de començar a treballar al departament i a la Dra. Rosina Gironès per les seves valuoses aportacions en les tècniques de PCR i la detecció de virus ambientals.

Al Dr. Ramon Parés, per llegir el meu treball i per donar-me opinions basades en la seva àmplia experiència.

Als serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, a en Ramon per la seva ajuda en la secuenciació i molt en especial a en Joan del Servei de Microscopia Electrònica per ensenyar-me el funcionament dels microscopis, ajudar-me cada cop que tenia problemes amb el microscopi i per subministrar-me sense la més mínima protesta les ingents quantitats de reixetes per microscopia que he necessitat.

Al consorci d'Aigües Ter-Llobregat, per permetre'm utilitzar les seves instal.lacions per realitzar alguns dels experiments descrits en aquesta memòria.

A tots els membres dels diferents laboratoris europeus que tan amablement m'han sumministrat moltes de les mostres analitzades en aquest estudi. Molt especialment al personal de l'Institut Pasteur de Lille per deixar-me utilitzar les seves instal.lacions. Espero continuar treballant conjuntament amb molts d'ells.

Un factor molt important pel bon funcionament d'una tesi doctoral és l'ambient de treball al laboratori. En aquest aspecte em puc considerar molt afortunada per haver gaudit de magnifiques estones a nivell professional i sobretot a nivell personal amb els meus companys de departament.

A l'Anna, la "meva companya de sempre". Moltes gràcies per la teva ajuda i per les bones estones que hem passat al laboratori. Ha estat un plaer treballar al teu costat.

A la Rosa. Espero que continuem mantenint l'amistat durant molt de temps, encara ens hem d'explicar moltes coses.

Al Dr. Xavi, gran amic i company d'esmorzars. Gràcies pels teus consells personals, professionals i cinèfils. Sincerament, espero que el nostre gran equip de futbol-sala pugui guanyar la lliga l'any que ve.

A la Marta, gràcies per tot. Estic segura que Mallorca està molt contenta de tenir-te com a filla adoptiva.

Al Jordi Dellundé. Gràcies per ser el millor mostrejador que hem tingut (i oblidat de la relació amb l'aigua residual) i gràcies també per aguantar-me donant-te la murga amb l'estadística. Ets un geni.

Al Dr. Jordi Frias. No cal que et digui que et considero un gran amic i un company de confidències com hi ha pocs. Amb tu la comunicació per e-mail ha cobrat un nou significat.

A la Rosario, a qui tinc el gust de considerar amiga. Gràcies per la teva ajuda i pel teu suport. Si la feina ho permet, continuarem trobant-nos a mig matí.

A la Montse. Gràcies per la teva ajuda cedint-me molts dels protocols utilitzats en biologia molecular i moltes gràcies per tot plegat, a veure quan organitzem un altre WACA.

Als meus companys de grup, Nuria C., Javi M., Joan Ramon, Idoia, Yolanda, Melanie, Albert, Laura, Xavi, Nuria, Anna, Sonia, Silvia. Gràcies per ser com sou, tots plegats m'heu alegrat la feina .

Als companys que van marxar, Esther, Miriam, Françoise, Joan, Rodri, Jose Maria, Toni, Xavi i Marta, Julio i Mercè, Ana Emilia, encara us enyoro.

Al Carles, "i després de tanta història i no va passar res de res", doncs si, una llàstima. Gràcies per fer-m'ho passar tan bé.

A la Cristina M., "mama" orgullosa i gran companya. Gràcies per les xerrades que hem fet.

A l'altre gent del departament, Cristina, Susana, Santi, Anna B., Jordi S., Marc, Ricard, Teresa, Olga, Toni P., José Maria, Eli, Sònia, Sandra, Toni N., Jordi U., Susana, Xavi R., Alicia, Maite, Mercè... N'hi ha tants que de ben segur que hem deixo algú. Perdoneu-me si és així, m'oblido dels noms, no de les persones.

A la Maria Rosa i l'Alberto, moltes gràcies per la vostra ajuda. La secretaria no seria el mateix sense vosaltres.

A tots els professors del departament. És difícil anomenar a tothom, però tots plegats heu fet que l'ambient de treball sigui immillorable, moltes gràcies.

Als meus amics de facultat, amb els quals encara ens veiem, m'encanta pertànyer a la nostra colla. Gràcies pel vostre suport. Molt especialment a en Xavi Pujol, en Jaume Graupera, la Marta Pasqual i la Maria José Martínez, els quals heu estat més a prop durant la tesi, el vostre recolzament ha estat molt important per mi.

A la resta d'amics, gràcies per tot.

A la meva família, la meva àvia, la meva padrina, els meus oncles, els meus cosins, els meus cunyats, el Marc i molt especialment al Toni. L'estabilitat d'una persona radica en sentir-se estimada. Jo sens dubte sóc afortunada en aquest sentit. Gràcies a tots per estar al meu costat.

Als meus pares, vull agrair-vos sobretot el haver-me donar l'oportunitat, els estudis i el tarannà necessari per que aquesta tesi doctoral s'hagi pogut fer realitat. Vosaltres m'heu fet com sóc i m'heu ensenyat el valor de la feina ben feta. Gràcies.

I per últim a l'Àlex. La veritat noi és que m'he divertit molt escrivint la tesi al teu costat i has estat el millor estimul que he tingut per continuar endavant. Estem junts des de fa molts anys i no m'has fallat mai. Ets el meu amic, el meu company i el meu marit i estic orgullosa de que sigui així. Gràcies per recolzar-me en moments difícils, per ajudar-me sempre i per estimar-me.

*"La ciencia tan sólo sirve para darnos una idea
de la extensión de nuestra ignorancia"*

Félix Lamennais (1782-1854)
Escritor y pensador francés

*"La felicidad del cuerpo se fundamenta en la salud;
la del entendimiento, en el saber"*

Tales de Mileto
(640 a.C)

Listado de abreviaturas

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ATCC	"American Type Culture Collection"
°C	grados celsius
C	citosa
Ci	curie
cm	centímetro
Da	dalton
γ ³² P-dATP	desoxiadenina trifosfato marcado con el isótopo ³² P en el grupo fosfato que se encuentra en posición γ , utilizado en el marcaje terminal de fragmentos de ADN.
DO ₆₀₀	densidad óptica leída a 600 nanómetros de longitud de onda
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
G	guanina
g	gramo
Ig	inmunoglobulina
kDa	kilodalton
KV	kilovoltio
l	litro
M	concentración molar
Mab	anticuerpo monoclonal
ME	microscopía electrónica
MEM	medio esencial mínimo
MET	microscopía electrónica de transmisión
mA	miliamperio
mg	miligramo
ml	mililitro

mmol	milimol
mM	milimolar
μl	microlitro
μmol	micromol
μM	micromolar
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NMP	número más probable
<i>p</i>	variable de significación estadística
pb	pares de bases
PBS	tampón salino fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	-log ₁₀ de la concentración de iones hidrógeno
pmol	picomol
pM	picomolar
p/v	relación peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato de sodio
SLT	"Shigella-like toxin"
SSC	citrato sódico salino
Stx	"Shigella toxin"
T	timina
Taq	abreviatura de <i>Termus aquaticus</i> , bacteria del cual se obtiene el enzima polimerasa termoestable utilizado en la técnica de PCR.
TBE	tris-acido bórico-EDTA, tampón utilizado para la electroforesis
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina
T _m	"melting temperature". Temperatura de desnaturalización del ADN
Tris	tris(hidrometil) aminometano
ufc	unidad formadora de colonia
ufp	unidad formadora de calva
V	voltios
v/v	relación volumen/volumen
(<i>n</i>)X	factor de concentración de una solución

ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción General	1
- Objetivos globales	11

Capítulo 1: Detección de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual

1.1.- <u>Introducción</u>	13
1.1.1.- Toxina Stx 2	13
1.1.1.1.- Estructura y heterogeneidad de la toxina Stx 2	13
1.1.1.2.- Secuencia del gen de la Stx 2	14
1.1.1.3.- Expresión del gen de la Stx 2 en células lisogenizadas	14
1.1.1.4.- Antigenicidad de la Stx 2	15
1.1.2.- <i>Escherichia coli</i> O157:H7	16
1.1.2.1.- Detección de <i>E. coli</i> O157:H7 en muestras de agua	16
1.1.2.2.- <i>E. coli</i> O157:H7 en medio acuático	17
1.1.3.- Fagos portadores de la Stx 2 en ambientes acuáticos	18
1.1.4.- Objetivos	18
1.2.- <u>Materiales y Métodos</u>	19
1.2.1.- Cepas bacterianas y bacteriófagos	19
1.2.1.1.- Obtención de "stocks" del bacteriófago 933 W	20
1.2.2.- Muestras utilizadas	21
1.2.3.- Caracterización parcial de las aguas residuales estudiadas	21
1.2.4.- Purificación parcial de bacteriófagos a partir del agua residual	21
1.2.4.1.- Comprobación y adecuación del proceso de purificación de los bacteriófagos	22
1.2.4.1.1.- Purificación alternativa por gradientes de CsCl	22
1.2.4.1.2.- Tratamiento con nucleasas	23
1.2.5.- Extracción del ADN de los bacteriófagos purificados y de las cepas bacterianas control	23
1.2.6.- Reconocimiento molecular y amplificación del gen de la Stx 2	24
1.2.6.1.- Diseño de cebadores y sonda	24
1.2.6.2.- Primera PCR	28
1.2.7.- Aumento de sensibilidad del método	29
1.2.7.1.- PCR anidada	29
1.2.7.2.- Controles utilizados	29
1.2.8.- Caracterización complementaria de los amplímeros obtenidos	31

1.2.8.1.- Hibridación con la sonda interna de los amplímeros obtenidos	31
1.2.8.2.- Secuenciación de los amplímeros obtenidos	32
1.2.9.- Demostración de la capacidad de los fagos presentes en aguas residuales que transportan el gen de la Stx 2 para infectar <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43888)	33
1.2.9.1.- Muestras utilizadas	33
1.2.9.2.- Purificación parcial de los bacteriófagos para realizar los enriquecimientos	33
1.2.9.3.- Cultivos de enriquecimiento	34
1.2.9.4.- Determinación de la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento	34
1.2.10.- Determinación de la producción de la toxina en cultivos infectados	35
1.2.10.1.- Determinación de la presencia de la proteína	36
1.2.10.1.1.- "Western blot"	36
1.2.10.1.2.- Inmunoblot semicuantitativo	39
1.2.10.1.3.- Ensayo de citotoxicidad	39
1.2.10.1.3.1.- Neutralización	41
1.2.11.- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2	42
1.2.11.1- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual	42
1.2.11.2.- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para <i>E. coli</i> O157:H7 en agua residual	43
1.3.- Resultados	45
1.3.1.- Caracterización parcial de las aguas residuales estudiadas	45
1.3.2.- Purificación de bacteriófagos a partir de agua residual	46
1.3.2.1.- Comprobación y adecuación del proceso de purificación de los bacteriófagos	46
1.3.2.1.1.- Purificación alternativa por gradientes de CsCl	46
1.3.2.1.2.- Tratamiento con nucleasas	46
1.3.3.- Extracción de ADN de bacteriófagos	47
1.3.4.- Reconocimiento molecular y amplificación del gen de la Stx 2: Primera PCR	48
1.3.5.- Caracterización complementaria y aumento de sensibilidad del método	49
1.3.5.1.- Hibridación con la sonda interna de los amplímeros obtenidos	49
1.3.5.1.1.- "Dot blot"	50
1.3.5.1.2.- "Southern blot"	51
1.3.5.2.- PCR anidada	53

1.3.5.2.1.- "Dot blot"	54
1.3.5.2.2.- Comparación de los resultados obtenidos por PCR anidada con los resultados obtenidos por "Southern blot" de los amplímeros obtenidos por primera PCR	55
1.3.5.3.- Secuenciación de los amplímeros obtenidos	56
1.3.6.- Estimación de fagos totales portadores del gen de la Stx 2 en agua residual y aguas de matadero	56
1.3.7.- Demostración de la capacidad de los fagos presentes en aguas residuales que transportan el gen de la Stx 2 para infectar <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43888)	58
1.3.7.1.- Determinación de la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento	58
1.3.7.1.1.- Primera PCR	59
1.3.7.1.2.- "Southern blot"	59
1.3.7.1.3.- PCR anidada	60
1.3.7.2.- Secuenciación de los amplímeros correspondientes a los sobrenadantes de enriquecimiento	61
1.3.8.- Determinación de la producción de la toxina en cultivos infectados	61
1.3.8.1.- Determinación de la presencia de la proteína	62
1.3.8.1.1.- "Western blot"	62
1.3.8.1.2.- Inmunoblot semicuantitativo	64
1.3.8.1.3.- Ensayo de citotoxicidad	65
1.3.8.1.3.1.- Neutralización	66
1.3.8.1.4.- Correspondencia entre los resultados de PCR anidada, "Western blot" y Citotoxicidad	67
1.3.9.- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 ,infecciosos para <i>E. coli</i> O157:H7, presentes en agua residual	69
1.4.- <u>Discusión</u>	71
Capítulo 2: Distribución y diversidad de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx2	
2.1.- <u>Introducción</u>	83
2.1.1.- Distribución geográfica de las infecciones producidas por <i>E. coli</i> O157:H7	83
2.1.2.- Distribución de serotipos no-O157:H7 portadores del gen de la Stx 2	85
2.1.3.- Variantes de la Stx 2	86
2.1.3.1.- Características generales	87
2.1.3.2.- Tipos de variantes de la Stx 2	88

2.1.3.3.- Fagos portadores de los genes de las variantes de la Stx 2	90
2.1.4.- Fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual	90
2.1.5.- Objetivos	90
2.2.- <u>Materiales y Métodos</u>	91
2.2.1. Muestras utilizadas	91
2.2.1.1.- Zona de origen	92
2.2.2.- Cepas bacterianas y medios de cultivo	97
2.2.3.- Purificación parcial de los bacteriófagos, enriquecimiento, extracción del ADN y amplificación por PCR	97
2.2.4.- Comparación de los fragmentos del gen de Stx 2 obtenidos por PCR anidada	98
2.2.4.1.- Muestras utilizadas	98
2.2.4.2.- Secuenciación	98
2.2.5.- Comparación de los amplímeros obtenidos con secuencias previamente descritas	100
2.2.5.1.- Comparación con secuencias del gen de la Stx 2	100
2.2.5.2.- Comparación con variantes de la toxina Stx 2	101
2.3.- <u>Resultados</u>	105
2.3.1.- Determinación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales de diversas procedencias	105
2.3.2.- Estudio de las secuencias de los amplímeros obtenidos	112
2.3.2.1.- Comparación de los fragmentos del gen de Stx 2 obtenidos por PCR anidada	112
2.3.2.2.- Comparación con variantes de la toxina Stx2	120
2.4.- <u>Discusión</u>	129
Capítulo 3: Persistencia de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2	
3.1.- <u>Introducción</u>	133
3.1.1.- Contaminación fecal de aguas y alimentos	133
3.1.2.- Procesos causantes de la inactivación de microorganismos.	133
3.1.3.- Persistencia de bacterias y bacteriófagos frente a procesos de inactivación	135

3.1.4.- Persistencia de <i>E. coli</i> O157:H7 y de los bacteriófagos que la infectan frente a procesos de inactivación	136
3.1.5.- Inactivación diferencial de los bacteriófagos	136
3.1.5.1.- Morfologías de bacteriófagos	137
3.1.5.2.- Tipos morfológicos de colifagos somáticos	138
3.1.5.2.1.- Fagos con cola: <i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> y <i>Podoviridae</i>	138
3.1.5.2.2.- Fagos sin cola: Familia <i>Microviridae</i>	140
3.1.6.- Persistencia de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2	141
3.1.7.- Objetivos	141
3.2.- <u>Materiales y Métodos</u>	143
3.2.1.- Estudio de persistencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas	143
3.2.1.1.- Persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 ante procesos de inactivación natural	143
3.2.1.1.1.- Presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua de río	143
3.2.1.1.1.1.- Muestras utilizadas	143
3.2.1.1.1.2.- Caracterización de las muestras	144
3.2.1.1.1.3.- Detección de los fagos portadores del gen de la Stx 2	144
3.2.1.1.2.- Experimentos de inactivación natural " <i>in situ</i> "	145
3.2.1.1.2.1.- Muestras utilizadas	145
3.2.1.1.2.2.- Experimentos realizados	149
3.2.1.1.2.3.- Parámetros microbiológicos estudiados	150
3.2.1.2.- Experimentos de inactivación por tratamiento con cloro	153
3.2.1.2.1.- Experimentos de inactivación de O157:H7 y de los bacteriófagos que la infectan por tratamiento con cloro	153
3.2.1.2.1.1.- Experimentos realizados	153
3.2.1.2.1.2.- Parámetros microbiológicos estudiados	155
3.2.1.2.2.- Experimentos de inactivación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 por tratamiento con cloro.	156
3.2.1.2.2.1.- Parámetros microbiológicos estudiados	157
3.2.1.3.- Experimentos de inactivación por un tratamiento de Pasteurización	159
3.2.1.3.1.- Experimentos realizados	159
3.2.1.3.2.- Parámetros microbiológicos estudiados	160
3.2.1.4.- Análisis estadístico	161
3.2.2.- Estudios de los tipos morfológicos de colifagos presentes en diferentes muestras de agua	162

3.2.2.1.- Caracterización de las muestras	162
3.2.2.2.- Aislamiento de los bacteriófagos	162
3.2.2.3.- Enriquecimiento de los bacteriófagos	163
3.2.2.4.- Observación al microscopio electrónico de transmisión	163
3.2.2.5.- Cálculo de los porcentajes obtenidos para cada tipo morfológico	163
3.2.2.6.- Estudio de los efectos producidos por diversos factores metodológicos	163
3.2.2.6.1.- Efecto del medio de cultivo utilizado	164
3.2.2.6.2.- Efecto de la filtración de la muestra	164
3.2.2.6.3.- Efecto de la cepa huésped utilizada	164
3.2.2.7.- Estudios de inactivación de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos	165
3.2.2.7.1.- Estudios de muestras de agua residual y de efluente de depuradora	165
3.2.2.7.2.- Estudios en muestras de agua sometidas a procesos de inactivación natural	166
3.2.2.7.2.1.- Inactivación natural en un río	166
3.2.2.7.2.2.- Experimentos de inactivación natural "in situ"	166
3.2.2.7.3.- Experimentos de inactivación por efecto del tratamiento con cloro	167
3.2.2.7.3.1.- Inactivación de las diferentes morfologías de colifagos somáticos por efecto del tratamiento con cloro	167
3.2.2.7.3.2.- Inactivación de las diferentes morfologías de los bacteriófagos infecciosos para <i>E. coli</i> O157:H7 por efecto del tratamiento con cloro	168
3.2.2.8.- Análisis estadístico	168
3.3.- Resultados	169
3.3.1. Estudio de persistencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2	169
3.3.1.1.- Persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 ante procesos de inactivación natural	169
3.3.1.1.1.- Presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua de río	169
3.3.1.1.2.- Experimentos de inactivación natural "in situ"	170
3.3.1.2. Experimentos de inactivación por tratamiento con cloro	174
3.3.1.2.1.- Experimentos de inactivación de <i>E. coli</i> O157:H7 y de los bacteriófagos que la infectan por tratamiento con cloro	174

3.3.1.2.2.- Experimentos de inactivación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 por tratamiento con cloro.	177
3.3.1.3.- Experimentos de inactivación por un tratamiento de Pasteurización	181
3.3.2.- Estudio de los tipos morfológicos de colifagos presentes en diferentes muestras de agua	183
3.3.2.1.- Observación de los tipos morfológicos de colifagos	183
3.3.2.2.- Estudio de los efectos producidos por diversos factores metodológicos	185
3.3.2.2.1.- Efecto del medio de cultivo utilizado y de la filtración de la muestra	185
3.3.2.3.- Efecto de la cepa huésped utilizada	187
3.3.2.3.1.- Estudio de las morfologías de los bacteriófagos infecciosos para O157:H7 en muestras de agua residual	187
3.3.2.3.2.- Morfotipos aislados con <i>E. coli</i> CN13	188
3.3.2.4.- Estudios de inactivación de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos	191
3.3.2.4.1.- Estudios de muestras de agua residual y de efluente de depuradora	191
3.3.2.5.- Estudios en muestras de agua sometidas a procesos de inactivación natural	192
3.3.2.5.1.- Inactivación natural en un río	192
3.3.2.5.2.- Experimentos de inactivación natural “ <i>in situ</i> ”	195
3.3.2.5.3.- Experimentos de inactivación por efecto del tratamiento con cloro	198
3.3.2.5.3.1.- Inactivación de las diferentes morfologías de colifagos somáticos por efecto del tratamiento con cloro	198
3.3.2.5.3.2.- Inactivación de las diferentes morfologías de los bacteriófagos infecciosos para <i>E. coli</i> O157:H7 por efecto del tratamiento con cloro	200
 3.4.- <u>Discusión</u>	 203
 4.- Discusión final	 217
 5.- Conclusiones	 221

6.- Materiales y Métodos Generales	223
6.1.- Purificación parcial de bacteriófagos a partir de agua residual	223
6.2.- Purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl	223
6.3.- Diálisis de las muestras	225
6.4.- Tratamiento con Nucleasas	226
6.5.- Extracción de ADN	226
6.6.- Realización de una PCR estándar	229
6.7.- Análisis del ADN . Electroforesis en gel de agarosa.	230
6.8.- Protocolos de fijación del ADN a una membrana	233
6.9.- Marcaje de un oligonucleótido con ³² P por el método de la T4 Kinasa	237
6.10.- Hibridación y detección de una sonda	238
6.11.- Secuenciación automática	241
6.12.- "Western blot"	242
6.13.- Precipitación de Proteínas	245
6.14.- Cultivo celular	246
6.15.- Obtención del anticuerpo anti A-Stx 2	248
6.16.- Titulación por el método de la doble capa de agar	249
6.17.- Activación del bacteriófago 933W	250
6.18.- Detección y recuento de cepas bacterianas por filtración	251
6.19.- Tinción negativa de bacteriófagos para observación al MET	252
7- Bibliografía	255
A.1- Anexo 1: Diluyentes, medios de cultivo y antibióticos	271
A.2- Anexo 2: Tampones y reactivos	277

Introducción General

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

Introducción general

Numerosos factores de virulencia como las toxinas son, a menudo, codificadas por elementos genéticos tales como los plásmidos, los transposones y los bacteriófagos. Estos elementos se mueven de manera horizontal y vertical por las poblaciones bacterianas, confiriendo una ventaja evolutiva para las células huéspedes a las que transfieren el material genético y en consecuencia para los propios genes transferidos.

Así por ejemplo, la conversión fágica está relacionada con la producción de muchas toxinas bacterianas importantes. Esto incluye la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae* (Laird y Groman, 1976), la toxina eritrogénica producida por *Streptococcus* (McShan y col., 1997), la enterotoxina de *Staphylococcus* (Betley y Mekalanos, 1985), recientemente se ha visto que también la toxina producida por *Vibrio cholerae* (Waldor y Mekalanos, 1996) y ciertas enterotoxinas producidas por *E. coli* (Scotland y col. 1983; O'Brien y col., 1984; Newland y col., 1985).

Enterotoxinas de *E. coli*

Escherichia coli puede producir muchas toxinas diferentes que actúan en el tracto intestinal, conocidas en conjunto como enterotoxinas. Las cepas de *E. coli* productoras de enterotoxinas, son patogénicas y actúan causando diversas enfermedades entéricas en animales y humanos. Aunque existe una cierta confusión respecto a la denominación de las cepas de *E. coli* patogénicas, tradicionalmente se han clasificado en cinco grupos principales (Blanco y col., 1991): Cepas enterotoxigénicas

(ETEC), cepas enteropatógenicas (EPEC), cepas enteroinvasivas (EIEC), cepas enteroadherentes y agregantes (ECEA) y cepas enterohemorrágicas (EHEC). Sin embargo, algunas clasificaciones posteriores las engloban sólo en tres categorías principales, las enterotoxigénicas (ETEC), las verotoxigénicas (VTEC) y las necrotoxigénicas (NTEC) (Blanco y col., 1995).

De entre todas ellas, este estudio se ha centrado en relación a las cepas de *E. coli* verotoxigénicas, llamadas así por ser productoras de toxinas que destruyen las células Vero. Se encuentran otras denominaciones en la bibliografía para estas cepas verotoxigénicas (VTEC), como son *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y *E. coli* productoras de toxinas "Shiga-like" (SLTEC).

Algunas de estas cepas son las causantes de diarreas hemorrágicas y síndromes urémicos en todo el mundo (Karmali y col., 1983; Griffin y col., 1991). Se han descrito diversos serotipos (O18, O26, O111, O128, O138 y O157), en los que se aíslan cepas EHEC de elevada virulencia. Entre todas ellas destaca *E. coli* O157:H7 por ser especialmente virulenta (Nataro y Kaper, 1998).

E. coli O157:H7 ha sido motivo de estudio en esta tesis por tres razones principales: En primer lugar es el serotipo mejor estudiado y más descrito en la bibliografía. En segundo lugar se encuentra disponible en las colecciones de cepas bacterianas, donde se puede obtener con o sin los genes que codifican para las toxinas que le confieren virulencia. Por último, la información existente en la bibliografía describe en este serotipo la presencia de bacteriófagos portadores de genes que codifican para las toxinas que produce. El estudio realizado en esta tesis se ha centrado principalmente en dichos bacteriófagos.

Transmisión de *E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 se transmite por agua y alimentos y de persona a persona. La mayoría de los casos han sido causados por ingestión de alimentos contaminados, especialmente carne de origen bovino.

El ganado vacuno constituye el reservorio principal de estos microorganismos (Blanco y col., 1995; Wang y col., 1996), siendo la carne picada poco cocinada y la leche sin pasteurizar los principales vehículos de transmisión. También se considera que el ganado ovino y caprino puede actuar como reservorio (Blanco y col., 1995).

Otros estudios apuntan además como posible causa de infecciones por *E. coli* O157:H7 la ingestión de mayonesa, yogures artesanales, zumos no pasteurizados, sidra, embutidos y vegetales crudos (Nataro y Kaper, 1998).

Además de los alimentos, otro de los vehículos de transmisión de O157:H7 son las aguas contaminadas. Se han producido brotes de origen hídrico, especialmente por consumo de agua no depurada, y por utilización de aguas recreacionales como lagos y piscinas (Keene y col. 1994). Encontramos, por ejemplo, en 1992 una importante epidemia en EEUU por ingestión de agua procedente de la red municipal, ésta fue causada por una mala cloración del agua debida a un mal funcionamiento del sistema de depuración (Swerdlow y col. 1992).

Toxinas "Shiga-like"

Estas toxinas son uno de los factores de patogenicidad más importantes de las cepas EHEC. Reciben el nombre de toxinas "*Shigella*-like" (SLT). Posteriormente la nomenclatura ha cambiado por "Shiga-toxins" (Stx) según la última clasificación (Calderwood y col., 1996) (*).

Las "Shiga-toxins" se describieron inicialmente como aquellas toxinas activas sobre las células Vero y HeLa. Se encuentran dos tipos principales, la Stx 1 que es sintetizada por todas las cepas EHEC, tiene elevada actividad citotóxica, es enterotóxica en segmentos de íleon de conejo y es letal cuando se la inyecta intraperitonealmente en ratones. Y la Stx 2, que es la toxina en la que se ha centrado este estudio, escogida en base a su especial virulencia. Básicamente tiene las mismas tres propiedades biológicas que la Stx 1, es decir, es citotóxica para células HeLa i Vero, es enterotóxica para segmentos del íleon en conejos y es letal para ratones en dosis comprendidas entre 100 ng i 2 µg. Pero aún siendo menos citotóxica, es específicamente más letal en ratones (Tesh y col., 1993) y parece más directamente relacionada con el desarrollo de la colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico (Nataro y Kaper., 1998).

Los primeros estudios de toxinas "Shiga-like" determinaron que una *Escherichia coli* enteropatógena causaba diarrea en conejos recién nacidos (Cantey y col., 1977) y en bebés humanos. Como estas cepas no eran enteroinvasivas y no eran capaces de producir las toxinas termolábiles (LT) o termoestables (ST) previamente descritas para *E. coli* hasta el momento, los autores hipotetizaban que debía haber otro mecanismo de virulencia que explicara la causa de estos síntomas.

(*) NOTA: A lo largo de toda esta memoria de Tesis Doctoral se nombran las toxinas similares a las de *Shigella* como "Shiga-toxin" o Stx. No obstante se ha respetado las nomenclaturas anteriores en los puntos en que se citan trabajos previos a dicho cambio, y también en las citas bibliográficas donde se nombra de la forma anterior.)

Simultáneamente, otros autores (Konowalchuk y col., 1977, Wade y col, 1979 y Scotland y col., 1980), encontraron algunas cepas de *Escherichia coli* (serotipos O18, O26, O68, O111 y O138) que eran capaces de sintetizar una toxina que producía cambios morfológicos en células Vero diferentes a las producidas por las clásicas enterotoxinas termolábiles de *Escherichia coli*, esta toxina fue denominada Verotoxina (VT).

Una de estas cepas del serotipo O26, la cepa H19, producía una enterotoxina diferente a la enterotoxina termolábil (LT) y dicha enterotoxina podía ser transferida a una cepa de *Escherichia coli* K12. Scotland y col. (1979, 1980) observaron que esta cepa K12 transferida, producía la enterotoxina y que entonces era VT positiva, por lo que se sugirió que esta enterotoxina era en realidad la Verotoxina (VT) y que había sido transferida desde la cepa H19 a la cepa K12.

Se cambió la denominación cuando se estudió la VT y se puso de manifiesto la similitud de esta toxina con la toxina de *Shigella*, puesto que dicha toxina era capaz de ser neutralizada por una antitoxina obtenida de conejos contra una preparación cruda de toxina de *Shigella*. A partir de entonces encontramos la nomenclatura de toxina "Shiga-like" (SLT).

Alison D. O'Brien y col. identificaron y purificaron en 1983 la verotoxina producida por *Escherichia coli* O157:H7, demostrándose que ésta era neutralizada por los anticuerpos contra la toxina purificada de *Shigella*, la denominaron toxina "Shiga-like" (posteriormente llamada Stx 1). Hasta el momento no se han descrito variantes de esta toxina.

En 1986, Strockbine y col. describieron una segunda toxina, que a diferencia de la primera no era neutralizada con los anticuerpos contra la toxina de *Shigella* y que denominaron toxina "Shiga-like" 2 (posteriormente llamada Stx 2). Estudios subsiguientes han descrito numerosas variantes de la Stx 2.

"Shiga-toxins" en otras bacterias

Aproximadamente 200 serotipos diferentes de *E. coli* pueden producir Stx (Johnson y col., 1996). Además de las cepas de *E. coli*, otras bacterias pueden producir también Stx.

Algunas cepas de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* producen bajos niveles de una citotoxina activa sobre células HeLa que puede ser neutralizada por el anticuerpo policlonal contra la toxina de *Shigella* y con el anticuerpo monoclonal contra la subunidad B de la Stx 1 (O'Brien y col. 1984). Además de estas, ciertas cepas de *Salmonella typhimurium* y varios aislamientos de *Campylobacter jejuni* producen bajos niveles de una citotoxina neutralizada con anticuerpos contra la toxina de *Shigella* (O'Brien y Holmes, 1987). En otros géneros tales como *Citrobacter freundii* (Schmidt y col., 1993) y *Enterobacter cloacae* (Paton y col., 1997) se ha descrito también la producción de toxinas similares a la Stx 2.

Inestabilidad del genotipo que codifica la producción de Stx 2

La producción de Stx 2 es una característica genética que no siempre permanece estable en una determinada cepa bacteriana. Karch y col. (1992) aportaron datos sobre la inestabilidad de los genes Stx en diferentes cepas de *E. coli* después de subcultivarlas. Estudios realizados por Schmidt y col. (1993) de la Stx 2 en *Citrobacter freundii*, describen también pérdidas de citotoxicidad en algunas cepas después de subcultivarlas. Otros trabajos (Paton y col., 1997), describen la inestabilidad "in vitro" de los genes de la toxina Stx 2 en cepas de *Enterobacter cloacae*.

Métodos moleculares han demostrado que existen aislamientos de O157 que tienen la capacidad de cambiar rápidamente su composición genotípica, en lo que se

refiere a los genes que codifican para las toxinas en subcultivos de la cepa inicial. Esta variación se puede observar por subcultivo de la cepa recién aislada. Este fenómeno es conocido como “clonal turnover” o reorganización clónica (Karch y col., 1995), se cree que ocurre dentro de la población de *E. coli* O157:H7 de un mismo paciente, y se caracteriza por la aparición de nuevos genotipos y la pérdida de los viejos. Este efecto también puede tener lugar durante el procesamiento de comida o cuando *E. coli* O157:H7 cambia de huésped. Quizá por ese motivo es muy difícil demostrar una relación entre los aislamientos de O157:H7 epidemiológicamente próximos.

Toxinas Stx y bacteriófagos

Las toxinas Stx 1 y Stx 2 son codificadas por genomas de fagos que lisogenizan las cepas bacterianas.

Los bacteriófagos que transportan los genes de las Stx son de diferentes tipos y se diferencian en base a propiedades tales como el rango de huéspedes que son capaces de infectar, la especificidad inmunológica o la susceptibilidad a la inactivación por calor.

E. coli O157, es susceptible de ser lisogenizada por al menos dos tipos diferentes de bacteriófagos portadores de genes de Stx, el bacteriófago 933 J portador del gen de la Stx 1 y el 933 W portador del gen de la Stx 2. Ambos bacteriófagos han sido descritos como lamboides (O'Brien y col. 1984) y por tanto pertenecientes a la familia *Siphoviridae*.

Las primeras investigaciones, que llevaron al descubrimiento de que los genes de estas toxinas se hallaban insertos en el genoma de bacteriófagos, fueron estudios sobre la capacidad de cepas VT positivas para transferir el carácter a otras cepas, en especial a la cepa *Escherichia coli* K12. Fue entonces cuando se vio que muchas de las

cepas transferidas se habían vuelto lisogénicas en el proceso. Esta observación dio lugar a la investigación por la que se descubrió que los genes VT en estas cepas estaban incorporados en el genoma de fagos con los cuales habían sido lisogenizadas. Si bien cabe destacar que no siempre las cepas lisogenizadas adquirían el carácter VT, y que no siempre la transferencia era mediada por fagos, los estudios realizados por Williams Smith y col. (1983) demostraron que la lisogenización de *Escherichia coli* K12 con fagos provenientes de cepas enteropatógenicas humanas podían tener como resultado la adquisición del carácter de la toxina VT.

A partir de estos estudios, Scotland y col. (1983) describieron bacteriófagos portadores de toxinas que espontáneamente se activaban a partir de una cepa K-12 de *Escherichia coli* que había sido co-inoculada junto a una cepa toxigénica H-19 de *Escherichia coli* O26. Se aislaron dos bacteriófagos diferentes, H-19A y H-19B, que eran liberados espontáneamente de una cepa *Escherichia coli* H-19. La cepa H-19 es productora de grandes cantidades de una citotoxina similar a la toxina de *Shigella*.

Un año después de que se purificara la toxina "Shiga-like" a partir de una de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 (cepa 933), O'Brien y col. describieron que la cepa 933, causante de diarreas hemorrágicas y productora de grandes cantidades de toxina "Shiga-like", era lisogénica para dos tipos diferentes de fagos portadores de genes de la toxina "Shiga-like", los llamaron 933 J y 933 W. El gen de la primera toxina o toxina "Shiga-like" 1 está englobada en el genoma del fago 933 J, mientras que el gen de la segunda toxina ("Shiga-like" 2) es transportado en el genoma del bacteriófago 933 W.

Fagos portadores de la Stx 2

Estudios realizados por el grupo de Helghe Karch (Datz y col., 1996) y por otros autores (Rietra y col., 1989; Wilsham y col. 1987), estuvieron dirigidos a estudiar algunos fagos inducidos del genoma de distintas cepas de *E. coli* O157. Se vio

que no existían diferencias entre su morfología, el tamaño de su genoma y que tenían patrones de restricción muy similares.

Además se comparó la secuencia del gen *p* entre fagos de cepas de *E. coli* O157 y la secuencia de dicho gen *p* en fagos lambda. El gen *p* es interesante por el papel que juega en la replicación de los fagos de la familia lambdaoide. Sus resultados demuestran que existe una gran similitud entre los genes *p* de los fagos 933W y los del fago lambda, lo que confirma que los fagos de O157 son fagos del tipo lambda. (Samadpour y col. 1995; Datz y col., 1996).

Es posible que los bacteriófagos integrados en el cromosoma de O157 sean los responsables de la inestabilidad del carácter de la Stx 2 y del fenómeno del "clonal turnover" (Karch y col. 1995) citado anteriormente.

Conversión fágica en ambientes naturales

Se supone que la conversión fágica debe ocurrir en los ambientes naturales en que las bacterias-fagos se encuentran. Sin embargo, la información disponible es muy escasa tanto en lo que se refiere a la ocurrencia del fenómeno de lisogenización/conversión en sí, así como a la presencia de bacteriófagos libres que transportan genes que confieren a las bacterias determinados caracteres, como por ejemplo la capacidad de producir toxinas, como es el caso de la Stx 2.

Así es, si bien está perfectamente descrito el fenómeno de transducción y la lisogenización/conversión en condiciones de laboratorio, existe muy poca información sobre su ocurrencia en condiciones naturales. Sin embargo ésta se ha podido observar en condiciones simuladas. Así por ejemplo, Saye y col (1990) demostraron que la transducción en *Pseudomonas aeruginosa*, tiene lugar durante incubación "*in situ*" en aguas dulces y principalmente cuando las bacterias se encuentran unidas a sólidos.

Mel y Mekelanos (1996) demuestran que la transducción del gen de la toxina colérica y la posterior conversión de cepas de *Vibrio cholerae* no toxigénicas tiene lugar con mayor eficacia en el tracto intestinal de animales de laboratorio que en experiencias realizadas "in vitro". Así pues, no parece existir duda de que la lisogenización/conversión es un fenómeno que no sólo ocurre en el laboratorio, sino que también se da en la naturaleza. En el caso de *E. coli* y Stx 2 no se ha observado lisogenización/conversión más que en condiciones de laboratorio. Sin embargo, diversos autores sugieren que para explicar la distribución de cepas de enterobacterias portadoras del gen de la Stx 2, aquélla se tendría que dar en alimentos (Samadpour y col., 1990), en aguas (Martins y col., 1992; Grant y col., 1996) y posiblemente en el tubo digestivo de hombres y otros animales. Incluso algunos autores sugieren que es posible pensar que la ingestión de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 podría conducir a la conversión de cepas de *E. coli* sin el gen, y por tanto no patogénicas, residentes en el digestivo de una determinada persona o animal.

Para que la lisogenización/conversión se dé en ambientes naturales, debe haber en éstos fagos portadores de los genes. En este caso la información es inexistente tanto para el gen de la Stx 2 como para cualquier otro a pesar del interés que muestran diversos autores (O'Brien y col. 1984; Datz y col., 1996, Beutin y col., 1997). Sin embargo hay información de la presencia en medio natural de bacterias que portan el gen de la Stx 2 (Martins y col., 1992; Grant y col., 1996). Si consideramos que una de las causas de inducción de lisogenia, y por tanto de liberación de bacteriófagos, es el estrés ambiental, es previsible que en medios en que se encuentran *E. coli* portadoras del gen, como heces, aguas contaminadas y alimentos contaminados, se pueda prever la presencia de dichos fagos, aunque no se haya descrito su detección hasta la fecha.

Objetivos globales

El estudio se desarrolló a tres niveles correspondientes a los tres capítulos de esta tesis, con los siguientes objetivos:

Puesta a punto de una metodología que permita estudiar la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales del área urbana de Barcelona. A partir de la metodología empleada estimar la cantidad de estos fagos presentes en agua residual.

Estudiar la frecuencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en aguas residuales de diferentes orígenes. Asimismo estudiar si el método utilizado permite determinar su diversidad.

Estudiar la persistencia de fagos portadores del gen de la Stx 2, infecciosos para *E. coli* O157:H7, en ambientes naturales y después de tratamientos de inactivación.

*Capítulo 1:
Detección de bacteriófagos portadores
del gen de la Stx 2 en agua residual*

Capítulo 1

Detección de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual

1.1.- Introducción

A continuación se describen algunas características de la Stx 2 y de *E. coli* O157:H7 de interés para comprender el desarrollo de este capítulo.

1.1.1.- Toxina Stx 2

1.1.1.1.- Estructura y heterogeneidad de la toxina Stx 2

La toxina Stx 2 consiste en una subunidad enzimática, la subunidad A, con un peso molecular de 33.000 Da, asociada de forma no covalente con un pentámero de subunidades B de 7.800 Da que actúan a nivel de unión con el receptor (Takeda y col., 1993). La unión de las dos subunidades conforman la toxina biológicamente activa.

La toxina es estable a 37 °C mientras que se inactiva a temperaturas superiores (Head y col., 1988).

La toxina purificada presenta actividad citotóxica sobre células Vero. También presenta una elevada actividad biológica, como muestran experimentos realizados con animales de laboratorio. Así por ejemplo, presenta enterotoxicidad sobre asas ligadas de intestino de conejo y causa mortalidad sobre ratones de laboratorio al ser inoculados intraperitonealmente con la toxina (Lindreng y col., 1994).

Se han descrito numerosas variantes de la toxina Stx 2, identificadas en función a sus características antigénicas. Estas variantes se describen con mayor precisión en el capítulo 2 de esta memoria de tesis.

1.1.1.2.- Secuencia del gen de la Stx 2

La secuencia completa de los genes que codifican para la toxina Stx 2 comprende una longitud total de 1.660 pares de bases (pb) (Jackson, Neill y col., 1987). En dirección 5'-3' de esta secuencia se encuentra el gen que codifica para la subunidad A, seguido del gen que codifica para la subunidad B.

En los bancos genéticos de la EMBL y del Gen Bank hay descritas numerosas secuencias del gen de la Stx 2. La mayoría se han obtenido a partir de secuenciar el gen de la toxina obtenido a partir del genoma de diversas cepas de *E. coli*. Asimismo está descrita la secuencia del gen estudiada a partir del genoma del bacteriófago 933 W. Todas las secuencias existentes del gen de la Stx 2 presentan alta homología entre ellas.

Además, hay descritas secuencias correspondientes a variantes del gen de la Stx 2 como se describe con más detalle en el capítulo siguiente.

Dentro de la secuencia, existen zonas altamente conservadas para todas de las secuencias descritas tanto de la Stx 2 como de sus variantes. Estas zonas de máxima homogeneidad entre las diversas secuencias fueron escogidas para el diseño de los cebadores y sondas utilizados en esta tesis doctoral.

1.1.1.3.- Expresión del gen de la Stx 2 en células lisogenizadas

Como se indica en la Introducción general de esta memoria de tesis, el gen de la Stx 2 se encuentra englobado en el genoma de bacteriófagos que se encuentran como profagos en el genoma de las cepas productoras de la toxina (O'Brien y col., 1984).

Los bacteriófagos muestran un impacto regulador de la producción de Stx 2. Este hecho se observa porque al aumentar la replicación de fagos portadores del gen de la toxina mediante la inducción del ciclo lítico del fago, se produce un aumento en la producción de la toxina por aumento del número de copias del gen de la toxina.

La adición de 0.2 µg/ml de Mitomicina C a un cultivo de *E. coli* O157:H7 productora de la toxina, se refleja en un aumento de la producción de Stx 2 de aproximadamente 100 veces (Head y col., 1988). Además, al aumentar las concentraciones de Mitomicina, aumenta a su vez la actividad tóxica del sobrenadante de dichos cultivos lisogénicos (Mühldorfer y col. 1996). Esto es debido a que la Mitomicina C actúa estimulando el ciclo lítico de los bacteriófagos lisogénicos en cepas de *E. coli*. Al aumentar el número de fagos, aumenta el número de copias del gen de la toxina, traduciéndose en un aumento de la producción de la propia toxina, la cual es detectada en el sobrenadante de estos cultivos lisogénicos activados.

1.1.1.4.- Antigenicidad de la Stx 2

Si bien la toxina Stx 1 es idéntica a la "Shiga-toxin", producida por *Shigella dysenteriae*, la Stx 2 se diferencia de la 1 y de la toxina de *Shigella* por la incapacidad de los anticuerpos policlonales anti "Shiga-toxin" de inhibir la actividad citotóxica de la Stx 2 (O'Brien y Holmes, 1987). La Stx 2 es neutralizada por antisueros preparados contra preparaciones crudas de la propia Stx 2, en tanto que no es neutralizada por anticuerpos anti Stx 1 y contra la toxina de *Shigella* (Scotland y col., 1986).

Los resultados obtenidos de aislar y caracterizar anticuerpos monoclonales contra la Stx 2 producida por *E. coli* enterohemorrágicas, han dado además mucha información sobre la inmunología de esta toxina. Perera y col. (1988) obtuvieron anticuerpos monoclonales (Mabs) del tipo Ig G, que reconocían la subunidad A de la Stx 2 y que eran altamente neutralizantes. Esto sugiere que dicha subunidad A es mucho más inmunodominante que la subunidad B.

Sin embargo, anticuerpos monoclonales producidos contra la subunidad B de la Stx 2, neutralizaban de forma débil el efecto de la toxina. Los autores argumentan que esto es, quizás, debido al hecho que el aislamiento de subunidades B se realiza de forma monomérica y que en realidad sería necesaria la obtención de Mab contra multímeros de subunidades B para que fueran efectivos como neutralizantes (Acheson y col., 1995).

1.1.2.- *Escherichia coli* O157:H7

1.1.2.1.- Detección de *E. coli* O157:H7 en muestras de agua

Se han descrito numerosos métodos de detección de *E. coli* O157:H7 y existe en la bibliografía abundante información al respecto. Pero en general, estos métodos están dirigidos a la detección de *E. coli* O157:H7 en muestras clínicas o de alimentos, donde, en caso de encontrarse presente, la concentración de O157:H7 suele ser elevada. No existen sistemas dirigidos específicamente a su detección en muestras de aguas.

Uno de los principales problemas para su detección parece ser que los sistemas que pretenden detectar la cepa por aislamiento en medio selectivo, presentan falta de especificidad. Dado el elevado número de serotipos de *E. coli* que encontramos en muestras de agua, y el bajo número de O157:H7 respecto al total, es difícil de discernir las cepas de *E. coli* O157:H7 del resto. Por este motivo es complicado estudiar la distribución de estas cepas en medios acuáticos.

Asimismo, muchas cepas de *E. coli* O157:H7 presentes en el medio acuático, se encuentran en un estado de estrés que dificultan su crecimiento en medios selectivos (Rocelle y col., 1995).

Por otro lado, no todas las cepas de *E. coli* O157:H7 son patogénicas (Karmali, 1989). Lo interesante, tanto a nivel clínico como ambiental, sería la detección de los serotipos estrictamente patógenos. La dificultad de detección de los serotipos patógenos en aguas es aún mayor, dado el bajo número de O157:H7 que se pueden detectar con los métodos empleados.

Las cepas de *E. coli* O157:H7 presentan ciertas características que la diferencian de la gran mayoría de cepas de *E. coli*. Por ejemplo, no crecen a temperaturas de 44 °C, temperatura comúnmente utilizada para el crecimiento de *E. coli* en muestras de agua y alimentos (Raghubeer y Matches, 1990). Este serotipo es, además, MUG (Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) negativo (Martins y col. 1992)

mientras que la gran mayoría de serotipos de *E. coli* presentan resultados positivos en esta prueba. Por último, la gran mayoría de cepas de *E. coli* O157:H7 no fermentan D-sorbitol, a diferencia de la mayoría de cepas de *E. coli* (Ojeda y col., 1995).

Estas diferencias han permitido desarrollar medios medianamente selectivos para la detección de O157:H7. No obstante, es necesaria la utilización de pruebas adicionales que confirmen la identificación de O157:H7, así como métodos que confirmen la producción de Stx por parte de las cepas aisladas.

La mayoría de estos métodos adicionales están dirigidos a la detección, por métodos moleculares, de *E. coli* O157:H7 o de los factores que le confieren patogenicidad, entre ellos están el gen de la Stx 1, de la Stx 2 o los fagos que los transportan.

La detección se realiza mediante sondas genéticas específicas (Newland y col., 1988; Karch y col., 1989), por amplificación por PCR (Pollard y col., 1990; Lee Lang y col. 1994) o por comparación con los patrones de restricción del fago lambda (Paros y col., 1993; Samadpour, 1995). También se han desarrollado métodos inmunológicos de detección de este serotipo, mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra las toxinas que produce (la Stx 1 y la Stx 2) (Perera y col., 1988; Acheson y col., 1993). Asimismo se han desarrollado métodos de detección serológicos del serotipo O157:H7 basados en la detección del antígeno O157 del LPS (Dylla y col., 1995; Park y col., 1996) y del antígeno H7 (Sowers y col., 1996).

Recientemente y dada la baja cantidad de *E. coli* O157:H7 presentes en algunas muestras, se han puesto a punto métodos de separación inmunomagnética (Besser-Wiek y col., 1996; Yu y Bruno, 1996). Estos métodos han resultado ser los más sensibles para la detección de O157:H7, superando incluso la sensibilidad de las técnicas de PCR (Karch y col., 1996).

1.1.2.2.- *E. coli* O157:H7 en medio acuático

Como se ha comentado en el apartado anterior, el serotipo O157:H7 de *E. coli* no es fácilmente detectable en muestras de agua. Cuando, en casos de epidemias de

origen hídrico, se han realizado análisis de las aguas que han sido el foco de la contaminación, se ha podido detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 (MacGowan y col., 1989). Sin embargo, no existen datos que permitan conocer ni aproximadamente la cantidad de O157:H7 existentes en aguas, ni tan solo en aguas residuales.

E. coli O157:H7 ha sido detectada en aguas residuales por medio de métodos de amplificación por PCR (Grant y col. 1996), sin embargo parece encontrarse en bajos niveles. Si estos bajos niveles son reales o son producto de los problemas de detección que presenta este serotipo, está aún por determinar. Otros estudios (Martins y col. 1992), indican que entre un 3-4 % de *E. coli* termotolerantes, aisladas de aguas tratadas y no tratadas, poseen Stx 1 o/y Stx 2, de las cuales sólo una fracción corresponde a *E. coli* O157:H7, como se ha mencionado anteriormente.

1.1.3.- Fagos portadores de la Stx 2 en ambientes acuáticos

Aunque algunos autores de prestigio han mencionado la conveniencia de disponer de información sobre los fagos portadores de la Stx 2 en agua residual, no existe información al respecto, por tanto se desconoce el papel que juegan estos en la transmisión de factores de virulencia en el medio ambiente.

1.1.4.- Objetivos

- Poner a punto una metodología para determinar la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la toxina Stx 2 en aguas residuales.

- Estimar el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales

- Determinar la infectividad de los fagos portadores del gen de la Stx 2 sobre *E. coli* O157:H7.

- Determinar si el gen de la Stx 2 transportado por estos bacteriófagos es funcional.

Capítulo 1

1.2.- Materiales y Métodos

1.2.1.- Cepas bacterianas y bacteriófagos

Como controles positivos de cepas portadoras del gen de la Stx 2, se utilizó *E. coli* O157:H7 ATCC 43889, productora de Stx 2. En algunos experimentos iniciales se usaron también cepas de *E. coli* O157:H7, ATCC 43894 y ATCC 35150, ambas productoras de la Stx 2.

Como control positivo de fagos portadores del gen de la Stx 2 se utilizó el bacteriófago 933W, obtenido por inducción lisogénica con Mitomicina de *E. coli* C600(933W), como se indica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Como controles negativos de cepas no portadora del gen de la Stx 2, se utilizó la cepa *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 que no posee el gen que codifica para la toxina. Esta misma cepa, se utilizó también en los cultivos de enriquecimientos y para cuantificar los fagos infecciosos para O157:H7 en aguas residuales. Asimismo, en algunos experimentos iniciales se utilizaron las cepas *E. coli* CN13, *E. coli* K5 y *E. coli* K12, que no producen Stx 2.

Como controles negativos de bacteriófagos no portadores del gen de la Stx 2, se utilizó en algunos experimentos iniciales el ADN extraído de fagos B 40-8 infecciosos para *Bacteroides fragilis* (Tartera, 1986).

Para el recuento de colifagos somáticos se utilizó la cepa de *E. coli* CN13 (Pedroso y Martins, 1995).

(*) *NOTA:* La cepa C600 (933W) que contiene el fago 933 W integrado como profago, nos fue cedida independientemente por tres autores, la Dra. Alison D. O'Brien, el Dr. Helge Karch y la Dra. Inge Müldhoffer, a quienes agradecemos sinceramente la cesión.

1.2.1.1- Obtención de "stocks" del bacteriófago 933 W

Si bien fue muy útil la utilización del fago 933W como control positivo, la metodología empleada para su activación y el posterior mantenimiento del "stock" de fagos portadores del gen de la Stx 2 ocupó un tiempo considerable durante la realización de esta tesis doctoral. El protocolo de activación del ciclo lítico del fago 933 W se comenta en el apartado de Materiales y Métodos Generales. Si bien la activación del ciclo lítico del fago acabó resolviéndose satisfactoriamente, los subsiguientes intentos de mantener estable el "stock" del fago 933 W purificado, llevaron a realizar diferentes aproximaciones para preservar el "stock" obtenido. Todas estos intentos resultaron fallidos (*).

El título obtenido después de activar el ciclo lítico del fago fue aproximadamente de 10^8 ufp/ml inmediatamente después de su activación. A las 24 horas desde la obtención del "stock", el título obtenido descendió a aproximadamente a 10^3 ufp/ml, a las 48 horas tan sólo se detectó un título de aproximadamente 1-10 ufp/ml, a las 72 horas no se observaron calvas de lisis al realizar la enumeración del "stock" (**).

(*) Mantenimiento de los "stocks" del bacteriófago 933 W: A fin de mantener estable el "stock" obtenido del fago 933 W, se intentó la adición de inhibidores de proteasas (10 µl/ml PMSF y 1µl/ml Leupectina) o la adición de Glicerol como crioprotector. Asimismo se probó a guardarlo a diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C, 37 °C y (- 20) °C) y en todos los casos se intentó guardarlo expuesto a la luz o protegido de la luz. Ninguno de los sistemas utilizados dio resultados efectivos.

(**) Este fenómeno de inactivación del fago 933 W nos fue descrito previamente por uno de los investigadores que amablemente nos cedió la cepa C600(933W), la doctora Inge Mühlendorfer. La Dra. Mühlendorfer describió el proceso como "degradación" del fago, proceso que pudimos, en efecto, comprobar.

1.2.2.- Muestras utilizadas

Las muestras de aguas residuales estudiadas provenían el área urbana de Barcelona. Se obtuvieron de la entrada de una depuradora de tratamiento fisicoquímico (Planta 1), que recibe agua residual de una zona urbana con aproximadamente 1.400.000 habitantes y de la entrada de una depuradora de tratamiento biológico (Planta 2), que recibe agua proveniente de una zona urbana con 400.000 habitantes. Asimismo se utilizaron muestras de agua residual de varios mataderos.

Las muestras se analizaron inmediatamente a su llegada al laboratorio. El tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y su análisis no superó en ningún caso las 5 horas.

1.2.3.- Caracterización parcial de las aguas residuales estudiadas

Las muestras estudiadas se caracterizaron parcialmente enumerando los colifagos somáticos y los bacteriófagos capaces de infectar a *E. coli* O157:H7 ATCC 43888.

La enumeración de bacteriófagos se realizó por el método de la doble capa de agar (Adams, 1959), con medio Scholten's modificado (Anexo 1), según el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

1.2.4.- Purificación parcial de bacteriófagos a partir del agua residual

Se purificaron bacteriófagos a partir de volúmenes de 100, 10 y 1 ml de las muestras de agua residual urbana. El protocolo de purificación de los bacteriófagos a

partir del agua residual se especifica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Asimismo se purificaron fagos a partir de 10 ml de aguas residuales de matadero, siguiendo idéntica metodología.

Los bacteriófagos se cuantificaron por el método de la doble capa de agar antes y después del proceso de purificación.

1.2.4.1.- Comprobación y adecuación del proceso de purificación de los bacteriófagos

En los experimentos iniciales se quiso descartar que el protocolo de purificación de bacteriófagos a partir de agua residual purificara algo más que bacteriófagos, para ello se realizaron dos aproximaciones.

1.2.4.1.1.- Purificación alternativa por gradientes de CsCl

Se realizó alternativamente una purificación de bacteriófagos mediante gradientes de CsCl. Las muestras fueron posteriormente dializadas para la eliminación de sales antes de proceder a la extracción del ADN. Para realizar este protocolo, se prepararon las bolsas de diálisis y, una vez preparadas, se procedió a la diálisis de las muestras, tal como se especifica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Este protocolo se aplicó en los 10 experimentos iniciales, se hicieron pruebas en las que se realizaban experimentos paralelos aplicando o no la purificación por gradientes de cloruro de Cesio y posterior diálisis de las muestras. Al no encontrar diferencias entre ambos procesos, finalmente se eliminó del protocolo.

1.2.4.1.2.- Tratamiento con nucleasas

A fin de eliminar la posibilidad de estar amplificando ADN presente en el agua residual en lugar de ADN extraído de los bacteriófagos, se procedió a tratar los bacteriófagos parcialmente purificados con nucleasas. Para ello se utilizó ADNasa I a una concentración final de 10^{-3} unidades de ADNasa I/ μ l de muestra

Se verificó la efectividad de actuación de la ADNasa mediante diferentes pruebas para comprobar el correcto funcionamiento de la ADNasa en agua residual. Se compararon los resultados obtenidos a partir de muestras tratadas con/sin ADNasa y tratándolas con ADNasa a diferentes concentraciones. Finalmente se utilizaron las concentraciones descritas anteriormente. Asimismo se inocularon de manera artificial aproximadamente 100 ngr de ADN (correspondiente al amplímero obtenido por PCR anidada del gen de la Stx 2) por ml de muestra de agua residual concentrada, y se procesaron las muestras en paralelo con/sin tratamiento con ADNasa, comprobándose si existían diferencias.

En algunos experimentos iniciales se realizó además tratamiento con ARNasa (10^{-3} unidades/ μ l de muestra). Posteriormente se dejó de utilizar la ARNasa al comprobar que no existía diferencias en muestras paralelas ensayadas con/sin dicho tratamiento.

1.2.5.- Extracción del ADN de los bacteriófagos purificados y de las cepas bacterianas control

El ADN de los bacteriófagos parcialmente purificados del agua residual y del fago 933 W inducido de *E. coli* C600(933W), se extrajo como se indica en el apartado de Materiales y Métodos Generales. El ADN extraído se precipitó y se diluyó en 20

µl de agua bidestilada estéril. El ADN se visualizó mediante un gel de 0,8 % de agarosa en TBE 1X (preparado según se especifica en el Anexo 1).

Igualmente se realizó la extracción de ADN de las cepas bacterianas usadas como control en este estudio, según se indica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

1.2.6.- Reconocimiento molecular y amplificación del gen de la Stx 2

1.2.6.1.- Diseño de cebadores y sonda

Los cebadores utilizados para la primera PCR y para la PCR anidada, así como la sonda específica que describimos posteriormente, se diseñaron a partir de las secuencias del gen que codifica para la toxina Stx 2 depositadas en los bancos genéticos de la EMBL (European Molecular Biology Library) y del Gen Bank.

Se compararon las secuencias existentes del gen de la Stx 2 en los bancos genéticos. Para ello se realizó un alineamiento múltiple de estas secuencias (software Pile Up, basado en el método de Needleman y Wunsch, 1970). Los resultados se editaron utilizando el software Pretty Box, para visualizar las homología.

Estos análisis demostraron que todas las secuencias descritas en los bancos genéticos para el gen de la Stx 2 de diversos orígenes coincidían con un 100 % de homología en algunos fragmentos.

Pudiendo escoger, por lo tanto, cualquiera de las secuencias descritas para el gen de la Stx 2 como modelo, se decidió utilizar precisamente la correspondiente al gen

de la Stx 2 inserto en el bacteriófago 933 W (código EMBL X07865) por tener mayor relación con los estudios que se iban a realizar.




En una de las regiones del gen que presentaba total homología para todas las secuencias del gen de la Stx 2 estudiadas, (entre las posiciones 450 y 900 del gen de la Stx 2 inserto en el genoma del bacteriófago 933 W, código EMBL X07865), se definieron los oligonucleótidos que se utilizaron como cebadores y sonda en este estudio.

Se evaluó su especificidad comparando estos oligonucleótidos con todo el banco genético mediante el software FastA, (Devereux y col., 1984). Se estudió que estuvieran libres de estructuras terciarias como “hairpins” (horquillas) i dímeros mayores de 3 pares de bases (pb), utilizando el programa Oligo 4.01 (Rychlik, 1989). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa MWG Biotech, Boehringer Mannheim, España.

De este modo se diseñaron los cebadores para la primera PCR y para la PCR anidada, así como una sonda interna (Figura 1.1).

Figura 1.1.- Fragmento del gen de la Stx 2 del genoma del fago 933W depositado en el banco genético de la EMBL con el código X07865. Se puede observar la región que codifica para la subunidad A donde se sitúan los cebadores de primera PCR y PCR anidada así como la sonda interna. También se puede observar el inicio de la región que codifica para la subunidad B.

1 ATCGCATAGC TCATCGGAAC AAGCTCAAGC GGTCTCCGGT CGAGTCCTCA
 51 TGCCTCCATT ATCTGCATTA TGCCTTGTTA GCTCAGCCGG ACAGAGCAAT
 101 TGCCTTCTGA GCAATCGGTC ACTGGTTCGA ATCCAGTACA ACGCGCCATA
 151 TTTATTACC AGGCTCGCTT TTGCGGGCCT TTTTATATC TGCGCCGGGT
 201 CTGGTGCTGA TTA~~CTTCAGC~~ CAAAAGGAAC ACCTGTATAT **GAAGTGTATA**
 251 **TTATTTAAAT** GGGTACTGTG CCTGTTACTG GGT~~TTTTCTT~~ CGGTATCCTA
 301 **TTCCCGGGAG** TTTACGATAG ACT~~TTTCGAC~~ CCAACAAAGT TATGTCTCTT
 351 **CGTTAAATAG** TATACGGACA GAGATATCGA CCCCTCTTGA ACATATATCT
 401 **CAGGGGACCA** CATCGGTGTC TGTTATTAAC CACACCCAC CGGGCAGTTA
 451 TTTTGCTGTG GATATACGAG GGCTTGATGT CTATCAGGC **CGTTTTGACC**
 501 **ATCTTCGCT** GATTATTGAG CAAAATAATT TATATGTGGC CGGGTTCGTT
 551 **AATACGGCAA** CAAATACTTT CTACCGTTTT TCAGATTTTA CACATATATC
 601 AGTGCCCGGT GTGACAACGG TTCC**ATGAC AACGGACAGC AGTTATACCA**
 651 **CTCTGCAACG** TGTCGCAGCG CTGGAACGTT CCGGAATGCA AATCAGTCGT
 701 **CACTCACTGG** TTT**CATCATA** TCTGGCGTTA ATGGAGTTCA GTGGTAATAC
 751 AATGACCAGA GATGCATCCA GAGCAGTTCT GCGTTTTGTC ACTGTCACAG
 801 CAGAAGCCTT ACGCTTCAGG CAGATACAGA GAGAATTCG TCAGGC**ACTG**
 851 **TCTGAAACTG** CTCTGT**GT**GTA TACGATGACG CCGGGAGACG TGGACCTCAC
 901 TCTGAACTGG GGGCGAATCA GCAATGTGCT TCCGGAGTAT CGGGGAGAGG
 951 ATGGTGTCAG AGTGGGGAGA ATATCCTTTA ATAATATATC AGCGATACTG
 1001 GGGACTGTGG CCGTTATACT GAATTGCCAT CATCAGGGGG CGCGTTCTGT
 1051 TCGCGCCGTG AATGAAGAGA GTCAACCAGA ATGTCAGATA ACTGGCGACA
 1101 GGCCTGTTAT AAAAATAAAC AATACATTAT GGGAAAGTAA TACAGCTGCA
 1151 GCGTTTCTGA ACAGAAAGTC ACAGTTTTTA TATACAACGG GTAAATAAAG
 1201 GAGTTAAGCA TGAAGAAGAT GTTTATGGCG GTTTTATTG CATTAGCTTC
 1251 TGTTAATGCA ATGGCGGCGG ATTGTGCTAA AGGTAAAATT GAGTTTTCCA

	Cebadores de primera PCR	X	Subunidad A de la Stx 2
	Cebadores de PCR anidada	X	Parte de la subunidad B
	Sonda interna		

Las características concretas de cada oligonucleótido utilizado se presentan a continuación.

Primera PCR

cebador directo- 5'- GCGTTTTGACCATCTTCGT-3'

Tm: 65 °C, pb: 19

Posición: 490-508.

cebador reverso - 5' ACAGGAGCAGTTTCAGACAG-3'

Tm: 68 °C, pb: 20

Posición: 848-867

Amplímero correspondiente: 378 pb

PCR anidada

cebador directo: 5'- TAATACGGCAACAAATACT-3'

Tm: 50 °C, pb: 19

Posición: 550-568

cebador reverso: 5'- TGATGAAACCAGTGAGTGA-3'

Tm: 53 °C, pb: 19

Posición: 700-718

Amplímero esperado: 169 pb

Sonda interna

5' - ATGACAACGGACAGCACTTATAACCAC- 3'

Tm: 57.3 °C ,pb : 26

Posición: 626-651

Temperatura de hibridación: 55 °C

1.2.6.2.- Primera PCR

Un µl de la solución conteniendo el ADN extraído se amplificó mediante un primer paso de PCR. La realización de la PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Los ciclos utilizados para la realización de la primera PCR fueron los siguientes:

Primera fase: Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C

Segunda fase : Repeticiones consecutivas durante 35 ciclos.

A) Desnaturalización: 1.5 minutos a 94 °C

B) "Annealing" (unión de cebadores) : 1 minuto a 55 °C

C) Elongación: 1 minuto a 72 °C

Tercera fase: Elongación final: 4 minutos a 72 °C

Cuarta fase: Conservación de la muestra : Tiempo indefinido a 4 °C .

Se amplificó con un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400), utilizando microtubos de 0,2 ml.

Los amplímeros obtenidos en la primera PCR se intentaron visualizar mediante un gel de 2 % de agarosa según se especifica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

1.2.7.- Aumento de sensibilidad del método

Dado que no se obtuvieron resultados visibles mediante la primera PCR, se intentó aumentar la sensibilidad del método mediante una PCR anidada.

1.2.7.1.- PCR anidada

Un μl del producto amplificado obtenido en la primera PCR fue utilizado como ADN molde en la segunda PCR o PCR anidada,

Se siguieron los mismos ciclos de amplificación ya descritos en la primera PCR. La temperatura de "annealing" (unión de cebadores) fue en este caso de 50°C.

Los amplímeros obtenidos en PCR anidada se intentaron visualizar mediante un gel de agarosa al 3% según se especifica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

1.2.7.2.- Controles utilizados

En todas las reacciones realizadas se utilizaron una serie de muestras "control". Los controles realizados fueron los siguientes:

Controles negativos

- *Control del medio*: Realizado con el medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano, o el tampón utilizado para resuspender los bacteriófagos purificados a partir de diferentes muestras de agua residual.

- *Control de los cultivos de enriquecimiento*: Realizado con la bacteria *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 que no posee los genes de la toxina, siguió el proceso de enriquecimiento en los experimentos donde se realizaron, que se describen posteriormente.

- *Control de proceso de extracción*: Realizado con agua bidestilada estéril, siguió el mismo proceso de extracción de ADN que las muestras analizadas.

- *Control bacteriano*: Realizado con ADN extraído a partir de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, no portadora del gen de la toxina, siguió el proceso desde la primera PCR.

- *Control de la primera PCR*: Realizado con agua bidestilada estéril, siguió el proceso desde la primera PCR.

- *Control de PCR anidada*: Realizado con agua bidestilada estéril, siguió el proceso desde la PCR anidada.

Durante la optimización del proceso se utilizaron como controles negativos adicionales el ADN extraído de las cepas *E. coli* CN13, *E. coli* K5 y *E. coli* K12 no portadoras del gen de la Stx 2 y como controles negativos de bacteriófagos, el ADN extraído de fagos B 40-8 de *Bacteroides fragilis*.

Controles positivos

- *Control positivo de bacteria*: Realizado con el ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 productora de Stx 2.

- *Control positivo de bacteriófago*: Realizado a partir del ADN extraído del bacteriófago 933W portador del gen de la Stx 2. El protocolo de obtención de dicho bacteriófago a partir de la cepa lisogénica donde se encuentra, previa activación del ciclo lítico del fago, se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Asimismo durante la optimización del proceso se usaron como controles positivos adicionales las cepas de *E. coli* O157:H7, ATCC 43894 y ATCC 35150, todas ellas productoras de la Stx 2.

1.2.8.- Caracterización complementaria de los amplímeros obtenidos

Los amplímeros obtenidos en la primera amplificación por PCR se caracterizaron mediante hibridación con una sonda interna.

1.2.8.1.- Hibridación con la sonda interna de los amplímeros obtenidos

Para comprobar la identidad de los amplímeros obtenidos por PCR se realizó una hibridación con una sonda interna. Se realizaron dos aproximaciones:

1.- Por un lado se realizó una hibridación con los productos amplificados obtenidos en la primera amplificación por PCR.

2.- Además se realizó una hibridación con los productos amplificados obtenidos por PCR anidada. En ambos casos la hibridación se realizó mediante las técnicas de "dot blot" y de "Southern blot".

La temperatura de hibridación utilizada para la sonda fue de 55 °C. La especificidad de la sonda diseñada se comprobó, a dicha temperatura, mediante los controles positivos y negativos de bacteria y bacteriófagos que se citaron en el

apartado 1.2.7.2. de este capítulo. No se observaron señales de hibridaciones positivas en los controles negativos utilizados.

Se realizaron inicialmente pruebas con la sonda marcada con digoxigenina. para las pruebas de "Southern blot" y "dot blot". Posteriormente y a fin de aumentar la especificidad de la sonda, ésta se marcó radiactivamente con ^{32}P por el método de la T4 Kinasa (según se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales), y se realizaron las mismas pruebas con la sonda radiactiva. Este método fue finalmente el más utilizado y con él se muestran los resultados obtenidos.

1.2.8.2.- Secuenciación de los amplímeros obtenidos en la PCR anidada

Se realizó otra comprobación adicional de la identidad de los amplímeros mediante secuenciación de los amplímeros obtenidos con la PCR anidada.

Se utilizaron para secuenciar los mismos cebadores que se diseñaron para la realización de la PCR anidada. Con el cebador de cadena directa se secuenció la cadena 5'-3' y con el cebador de la cadena reversa se secuenció la cadena 3'-5'. Ambas cadenas se compararon para poder comprobar el buen funcionamiento de la técnica de secuenciación.

El protocolo seguido para la secuenciación fue el estándar definido por Perkin Elmer Corporation. El secuenciador utilizado fue ABI PRISM 377 ADN Sequencer, Perkin Elmer. La metodología se indica brevemente en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Las secuencias obtenidas se compararon con la existente en el banco genético de la EMBL, obtenida a partir del fago 933 W código X07865 (Jackson y col., 1987).

1.2.9.- Demostración de la capacidad de los fagos presentes en aguas residuales que transportan el gen de la Stx 2 para infectar *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888)

La amplificación por PCR del ADN extraído de bacteriófagos parcialmente purificados directamente de aguas residuales no permite conocer si estos bacteriófagos son infecciosos. Para conocer si estos bacteriófagos eran infecciosos sobre una cepa de *E. coli* O157:H7, se realizaron experiencias de enriquecimiento de los bacteriófagos presentes en las muestras de agua residual.

1.2.9.1.- Muestras utilizadas

Las muestras de aguas residuales de origen urbano usadas en las experiencias de enriquecimientos tenían el mismo origen que las utilizadas para los análisis que se han descrito en los apartados posteriores.

Las muestras se caracterizaron parcialmente enumerando los colifagos somáticos (utilizando la cepa *E. coli* CN13) y los bacteriófagos capaces de infectar a *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. La enumeración de los bacteriófagos se realizó según el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

1.2.9.2.- Purificación parcial de los bacteriófagos para realizar los enriquecimientos

Se sometió a las muestras a un tratamiento previo antes de realizar los enriquecimientos a fin de eliminar las posibilidad de contaminación no debida a bacteriófagos. Así, los bacteriófagos fueron parcialmente purificados del agua residual mediante una filtración de la muestra (con membranas de 0,22 μm , Millex™-GV Millipore) y tratamiento con ADNasa, de modo idéntico al descrito anteriormente.

1.2.9.3.- Cultivos de enriquecimiento

Se realizó un cultivo de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (que no posee los genes que codifican para la Stx 2) hasta el inicio de la fase exponencial (correspondiente a una D.O. de 0,1 con una longitud de onda de 600 nm). Se utilizó para el crecimiento de la cepa el medio Scholten's modificado.

Se infectó 100 ml de este cultivo con los bacteriófagos parcialmente purificados a partir de volúmenes decrecientes de agua residual (10, 1, 0,2 , 0,1 , 0,02 y 0,01 ml). El volumen final de cada cultivo de enriquecimiento fue ajustado a 250 ml con medio Scholten's modificado.

Los cultivos de enriquecimiento se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Los sobrenadantes de dichos cultivos se centrifugaron a 12.000xg durante 30 minutos. Se determinó luego la presencia de bacteriófagos portadores de la secuencia del gen Stx 2 tal como se indica a continuación.

1.2.9.4.- Determinación de la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento

Se realizó previamente una purificación de dichos bacteriófagos tomando una alícuota del sobrenadante obtenido después de centrifugar y se filtró con membranas de 0,22 µm de baja afinidad para proteínas (Millex™-GV Millipore). La muestra descontaminada se trató con ADNasa y se extrajo el ADN de los bacteriófagos.

A partir del ADN extraído de los bacteriófagos se amplificó el gen de la Stx 2 mediante amplificación por primera PCR. Se intentó visualizar los amplímeros obtenidos en la primera PCR mediante un gel de 2 % de agarosa teñido con bromuro de etidio. Al no observarse banda alguna en la mayoría de los casos, se realizó

amplificación por PCR anidada y se visualizaron los amplímeros obtenidos mediante un gel de 3 % agarosa de tñido con bromuro de etidio.

Se comprobó la identidad de los amplímeros obtenidos en la primera PCR mediante "Southern blot", y se compararon estos resultados con los obtenidos por PCR anidada.

Por último se identificaron los amplímeros obtenidos por PCR anidada mediante secuenciación. La metodología aplicada en el caso de la secuenciación de estas muestras, así como los resultados obtenidos se describen con más detalle en el siguiente capítulo.

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de enriquecimiento se utilizaron además para determinar la presencia de la toxina.

1.2.10.- Determinación de la producción de la toxina en cultivos infectados

La aparición en el sobrenadante de los cultivos de enriquecimiento de bacteriófagos portadores de una parte de la secuencia del gen de la Stx 2 indicó que los bacteriófagos presentes en aguas residuales que la transportan eran infecciosos para O157:H7, pero ello no indicaba que transportaran el gen completo de la Stx 2 ni que éste fuera funcional.

Teniendo en cuenta que cultivos lisogénicos que se inducen con Mitomicina producen un aumento en la producción de toxina (Mühldorfer y col., 1996), se hipotetizó que en el sobrenadante de los cultivos infectados por bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 se debería encontrar toxina.

Para la detección de la toxina en los sobrenadantes, se realizó "Western blot" con un anticuerpo específico y ensayos de actividad citotóxica sobre células Vero.

1.2.10.1.- Determinación de la presencia de la proteína

Se escogieron para este estudio cuatro series de cultivos de enriquecimiento de *E. coli* O157:H7, ATCC 43888 (no portadora del gen de la Stx 2), infectados con bacteriófagos purificados de volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml de agua residual. Todas las series habían presentado previamente resultados positivos por PCR anidada en los tres volúmenes analizados.

1.2.10.1.1.- "Western blot"

Se realizó la detección de la subunidad A de la Stx 2, ya que como se ha descrito anteriormente, ésta es más inmunogénica que las subunidades B.

La detección de la subunidad A de la toxina se realizó mediante un "Western blot" con anticuerpos monoclonales contra esta subunidad. Para ello, los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento se concentraron mediante la utilización de unidades de 10 K de sección de corte de membrana en microconcentradores Microsep™, centrifugando a 16.000xg a 4 °C para reducir el volumen 10 veces, desde 4 ml a 400µl.

Luego se realizó una electroforesis SDS-PAGE en un gel conteniendo un 12% de poliacrilamida, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales. Se cargaron 15µl de cada sobrenadante concentrado en cada pocillo del gel de poliacrilamida.

Como control positivo y negativo se utilizaron 15 μ l de los sobrenadantes sonicados durante tres periodos de 1 minuto, de cultivos de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (productora de la toxina) y *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no productora de la toxina).

Por último, se utilizó como control 15 μ l del agua residual procesada utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento.

Se realizó la electroforesis aplicando un voltaje de 100 V durante 2 horas. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa como se indica en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Para realizar la inmunodetección se utilizó como anticuerpo (Ab) primario el anticuerpo monoclonal contra la subunidad A de la Stx 2 Mab recuperado del sobrenadante del hibridoma 11E10 ATCC CRL 1907 (Perera y col., 1988) según se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales. La concentración del anticuerpo recuperado correspondía aproximadamente a 20-50 μ g de anticuerpo/ml de sobrenadante. (Harlow y Lane, 1988). El protocolo de inmunodetección se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

En este primer "Western blot", se pudo observar la aparición de una banda más destacada correspondiente al peso molecular esperado para la subunidad A de la toxina. Por ello, a partir de un nuevo gel SDS-PAGE, se realizó la purificación de la proteína correspondiente, recortando el gel a la altura donde había migrado la banda que se había observado en el "Western blot". La purificación de la proteína se llevó a cabo mediante el protocolo que se describe a continuación.

Purificación de la proteína

1.- Se prepararon varios geles SDS-PAGE del modo descrito en el apartado de Materiales y Métodos Generales. Se utilizó un gel de diez pocillos para el sobrenadante del cultivo de enriquecimiento infectado con fagos purificados a partir de un volumen de 10 ml de agua residual. Otro gel para el enriquecimiento infectado con 1 ml y otro para el de 0,1 ml. Asimismo se preparó un gel para el control positivo de bacteria, otro para el control negativo de bacteria y un tercero para el agua residual procesada utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento.

2.- Se cargaron 15 μ l de cada muestra en todos los pocillos de un mismo gel. Las seis electroforesis se realizaron a 100 V.

En la zona donde migró la subunidad A de la Stx 2, determinada a partir del "Western blot" (ver resultados), se recortó una tira de cada gel y se electroeluyó en tampón de recorrido (Anexo 2), utilizando un Electroeluter (Strataeluter™ Electroelution Device. Stratagene) aplicado un voltaje de 60 V durante 1 hora a 4 °C.

3.- Las proteínas obtenidas de este modo se precipitaron utilizando el protocolo de precipitación de proteínas descrito en el apartado de Materiales y Métodos Generales. Luego se resuspendieron en 15 μ l de agua bidestilada estéril. Las muestras se desnaturalizaron mediante la adición de 50 μ l de β -mercaptoetanol e incubación a 100 °C durante 5 minutos. A continuación se realizó de nuevo una electroforesis en un gel SDS-PAGE, seguido de "Western blot" e inmunodetección según se ha descrito al inicio de este apartado.

Este protocolo se repitió para cada una de las cuatro series de cultivos de enriquecimiento estudiadas.

1.2.10.1.2.- Inmunoblot semicuantitativo

Se realizó asimismo una semicuantificación de la toxina presente en los sobrenadantes de una de las series de cultivos de enriquecimiento mediante un análisis de Inmunoblot (Lindgren y col., 1994).

Para ello se realizaron diluciones seriadas 1/2 de los sobrenadantes de los enriquecimientos infectados con fagos purificados de volúmenes de 10, 1, y 0,1 ml de agua residual, así como del sobrenadante de un cultivo sonicado de *E. coli* O157:H7 cepas ATCC 43889 (productora de la Stx 2) y ATCC 43888 (no productora de la Stx 2).

Se inocularon gotas de 50 µl sobre una membrana de nitrocelulosa y se conjugó con el anticuerpo primario (Mab contra la subunidad A de la Stx 2). Se realizó la inmunodetección del modo ya descrito para el "Western blot".

1.2.10.1.3.- Ensayo de citotoxicidad

Se realizaron pruebas de toxicidad sobre células Vero de los sobrenadantes de las cuatro series de cultivos de enriquecimientos. Para estas pruebas se prepararon "microtiters" de 96 pocillos con una monocapa de células Vero según se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Se realizaron los siguientes análisis para cada una de las cuatro series de cultivos de enriquecimiento.

1a.- Después de eliminar 100 µl de medio de cultivo de cada pocillo, se inocularon 100 µl de los sobrenadantes filtrados (por membranas de 0,22 µm de baja afinidad para proteínas) de los enriquecimientos realizados con los bacteriófagos purificados de

volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml de agua residual. Asimismo en algunos experimentos se realizaron inóculos con diluciones decimales y/o seriadas 1/2 de dichas muestras.

1b.- Se inoculó 100 µl del sobrenadante de los enriquecimientos concentrados diez veces utilizando unidades de microconcentradores de 10K de diámetro de poro, según se ha descrito en el apartado 1.2.10.1.1.

Además para controlar que el efecto citotóxico de las muestras no era debido a otros factores diferentes a la Stx 2, como por ejemplo toxinas u otros componentes tóxicos presentes en el agua residual, se realizaron los siguientes controles:

Controles positivos

- Control positivo *E. coli* O157:H7 ATCC 43889, (cepa productora de Stx 2). Los cultivos bacterianos en fase de crecimiento estacionario fueron lisados por sonicación y filtrados con membranas de 0,22µm (Milllex™-GV Millipore) de baja afinidad para proteínas. Se probó inóculo directo y diluciones decimales hasta 10⁻⁴, realizadas con PBS.

- Control positivo de *E. coli* C600(933W). Se utilizó el sobrenadante de un cultivo de dicha cepa obtenido de igual modo al descrito en el párrafo anterior.

Controles negativos

- Control de 100 µl del medio (Scholten's) utilizado para realizar los cultivos de enriquecimiento.

- Controles negativos con muestras de agua residual utilizadas para infectar los cultivos de enriquecimiento, a fin de eliminar la posibilidad de toxicidad de las muestras de agua estudiadas.

- Controles negativos con sobrenadantes de crecimientos de la cepa *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no productora de la toxina) obtenidos por sonicación del modo descrito para los controles positivos.

- Control negativo de PBS utilizado para las diluciones de las muestras.

2.- Se incubaron los "microtiters" en presencia de 0,5% de CO₂ a 37 °C y se observó si aparecía efecto citopatológico de las muestras sobre el cultivo celular a las 24, 48 y 72 horas mediante el microscopio invertido.

3.- Al final del proceso se realizó, en algunos casos, una tinción con la solución fijadora Cristal violeta y formol (Anexo 1). Se inoculó 100µl de esta solución en cada pocillo y se mantuvo en contacto durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó la solución de tinción y se realizó un lavado con PBS.

1.2.10.1.3.1.- Neutralización

Se realizaron asimismo estudios de neutralización para cada una de las cuatro series de cultivos de enriquecimiento, tanto en los inóculos realizados con las muestras directas como con las diluciones 1/2 de éstas.

Para realizar la neutralización se dividió cada muestra en dos alícuotas, en una de ellas se diluyó la muestra 1:1 con el medio RPMI-1640 conteniendo el anticuerpo monoclonal anti A-Stx 2, obtenido como se indica en el apartado de Materiales y Métodos Generales. La otra alícuota se diluyó 1:1 con el medio RPMI-1640 sin anticuerpo.

Las muestras con/sin el anticuerpo se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se inocularon 100 µl de cada muestra sobre la monocapa de células Vero formada en cada pocillo de los "microtiters". Se comparó el efecto citotóxico producido por la misma muestra, neutralizada y sin neutralizar.

1.2.11.- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2

A partir de los resultados obtenidos por PCR anidada se pretendió realizar una estimación del número de fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en muestras de agua residual y de los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para *E. coli* O157:H7 presentes en las muestras de agua residual utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento.

Con esta aproximación se pretendió tener una idea del número de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales, pero debe ser tomada en cuenta tan sólo como una estimación.

1.2.11.1- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual

A partir de los resultados obtenidos por PCR anidada con el ADN extraído de los fagos purificados directamente de las muestras de agua residual, se estimó el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 en estas muestras.

Para ello se agruparon todas las muestras analizadas de agua residual de cada lugar de muestreo como una sola muestra. Así, se estimó la cantidad de fagos portadores del gen de la Stx 2 en la planta 1 y en la planta 2 .

Dado que se analizó la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 entre el total de fagos purificados de volúmenes de 100, 10 y 1 ml de agua residual, se dispusieron el número total de muestras positivas para el gen de la Stx 2 en cada volumen frente al total de muestras analizadas para ese mismo volumen. Por ejemplo, se analizó la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en 10 muestras de 100 ml de agua residual de la planta 1. De estas 10 muestras, en todas se detectaron fagos

portadores del gen de la Stx 2 por PCR anidada, así pues la relación de muestras positivas respecto al total de muestras analizadas para un volumen de 100 ml en la planta 1 fue de 10/10. De igual manera se procedió con los distintos volúmenes analizados de agua residual de cada origen. Con estos resultados se calculó el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 aplicando la técnica del Número Más Probable (De Man, 1975).

1.2.11.2.- Estimación del número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para *E. coli* O157:H7 en agua residual

A partir de los resultados obtenidos por PCR anidada con el ADN extraído de los fagos purificados de los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento, infectados con distintos volúmenes de fagos purificados de agua residual, se estimó el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en estas muestras. En este caso, estos fagos eran además capaces de infectar a *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, dado que se detectaron en los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento después de multiplicarse al infectar la cepa.

Para ello se procedió de igual modo al descrito en el apartado anterior. Se agruparon las muestras de agua residual de los dos orígenes analizados, por un lado se agruparon las muestras provenientes de la planta 1 y por otro lado se agruparon las muestras provenientes de la planta 2.

Dado que de cada origen se analizaron fagos purificados de sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento que habían sido infectados con fagos presentes en diferentes volúmenes de agua residual, se agruparon las muestras donde se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 frente al total de muestras analizadas para cada volumen. Por ejemplo, se analizaron un total de 13 cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de 10 ml de agua residual proveniente de la planta 1,

de éstos, en 12 sobrenadantes se detectó la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2, así pues la relación de muestras positivas respecto al total de muestras analizadas fue de 12/13 para un volumen de 10 ml de agua residual proveniente de la planta 1. De igual manera se procedió con los distintos volúmenes analizados y para los dos orígenes de agua residual analizada (planta 1 y 2).

De nuevo se estimó el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 aplicando la Técnica del Número más Probable (De Man, 1975).