

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

3.2.B.3.- VARIABILIDAD EN LA COMPOSICION DE LOS LIPIDOS.

a).- LIPIDOS TOTALES.

Una de las características que presentan determinadas especies bacterianas como: Pseudomonas aeruginosa (69), Proteus mirabilis (135), Escherichia coli (163), Yersinia enterocolitica (166), etc., es la de variar la composición de lípidos de su membrana afectando a su virulencia en función de la temperatura de crecimiento.

Partiendo de este hecho, se obtuvieron crecimientos a 37°C y 20°C de la cepa AH-3 de A. hydrophila serogrupo O34, se extrajeron los lípidos totales según el método de Folch (46) y se analizaron por cromatografía de gases.

Al realizar esto, determinamos que en crecimientos a 20°C había un 30.62% de ácidos grasos saturados, 30.17% de insaturados, 10.67% de ramificados, 2.51% de hidroxilados y 2.12% de ácidos grasos con anillo (ciclopropano). Además, dentro de los ácidos grasos saturados predominaban los hexadecanóicos (C16:0) con un 14.36% y los nonadecanóicos (C19:0) con un 4.53%.

Cuando analizamos los crecimientos obtenidos a 37°C hallamos 39.62% de ácidos grasos saturados, 23.67% de insaturados, 14.64% de ramificados, 1.01% de hidroxilados y

1.42% de ácidos grasos con anillo (ciclopropano). Dentro de los ácidos grasos saturados debemos destacar el predominio de los hexadecanoicos (C16:0) con un 28.67% y de los octodecanoicos (C18:0) con un 3.78%.

Como puede verse en la gráfica 1, hallamos a 20°C: en primer lugar (con niveles similares) los ácidos grasos saturados e insaturados; en segundo, los ramificados; y finalmente, los hidroxilados y con anillo. A 37°C encontramos: en primer lugar, los ácidos grasos saturados; en segundo, los insaturados; en tercero, los ramificados; y finalmente, los hidroxilados y con anillo.

Viendo todos estos datos podemos decir que cuando las cepas crecen a 37°C hay un aumento de ácidos grasos ramificados y saturados; entre los que podemos destacar la prácticamente ausencia de nonadecanoicos (C19:0), presentes cuando la cepa crece a 20°C; y un descenso de insaturados, hidroxilados y ácidos grasos con anillo. Todo ello, en comparación con la misma cepa crecida a 20°C.

Los datos referentes al porcentaje de ácidos grasos componentes de los lípidos totales se hallan reflejados en la tabla 21.

En resumen, podemos decir que variaciones en la temperatura de crecimiento implican cambios cuantitativos y cualitativos en la composición de los lípidos totales.

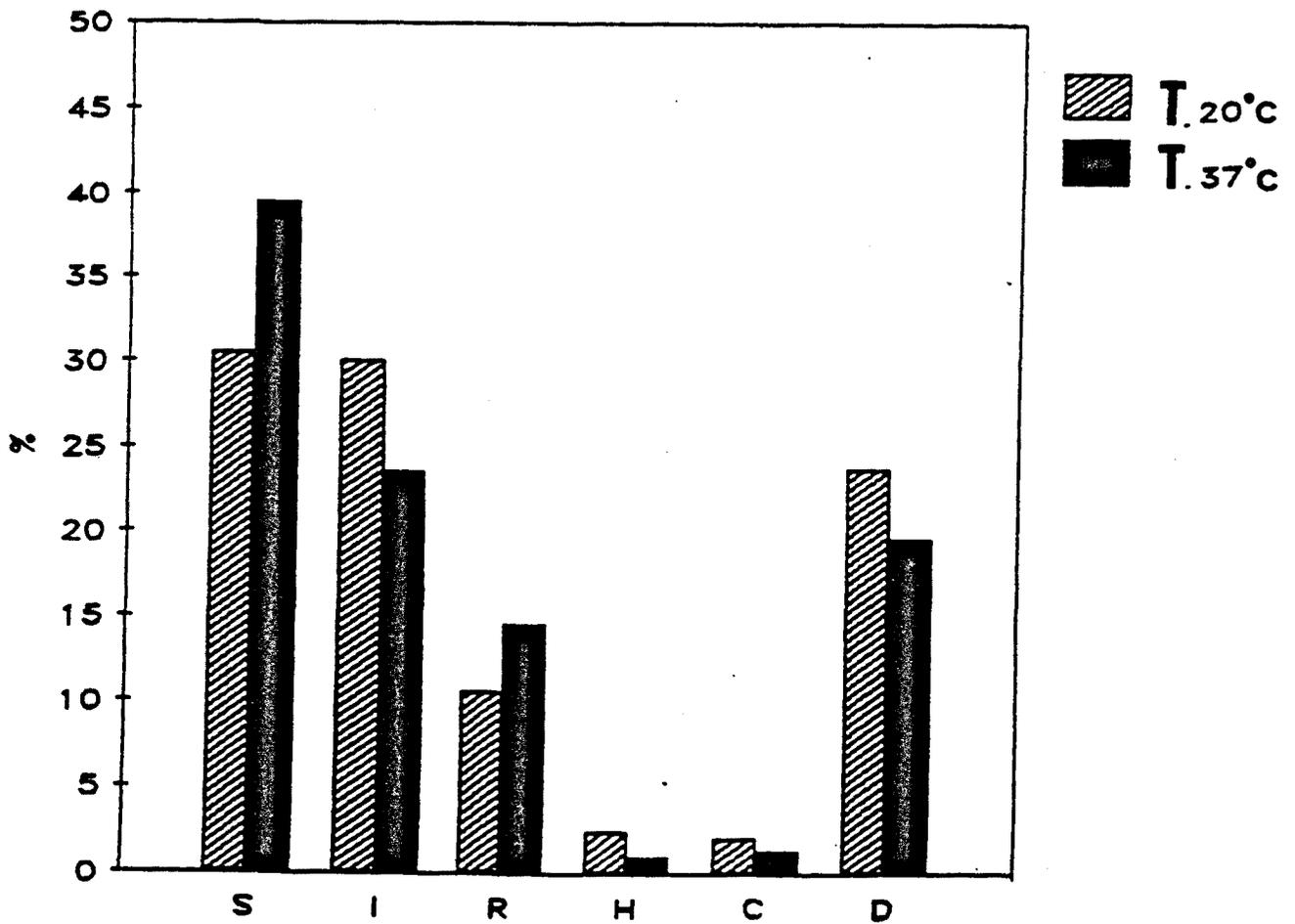
TABLA 21 : Resumen de la composición de ácidos grasos existente en las células de la cepa AH-3 de A. hydrophila serogrupo O34 al crecer a 20^oC y 37°C.

Acido graso (%)	AH-3 / 20°C	AH-3 / 37°C
<u>Saturados</u>		
C10:0	tr	tr
C11:0	-	-
C12:0	0.13	0.16
C13:0	1.32	0.74
C14:0	1.14	1.29
C15:0	1.41	1.01
C16:0	14.36	28.67
C17:0	3.78	2.74
C18:0	3.20	3.78
C19:0	4.53	0.40
C20:0	0.75	0.83
<u>Insaturados</u>		
C16:1	20.12	16.27
C18:1	10.05	7.40
<u>Ramificados</u>		
i-C14:0	0.13	0.15
a-C15:0	2.21	2.62
i-C16:0	2.49	3.49
a-C17:0	5.84	8.38

Acido graso (%)	AH-3 / 20°C	AH-3 / 37°C
<u>Hidroxilados</u>		
2-OH-C10:0	-	-
2-OH-C12:0	tr	tr
3-OH-C12:0	0.14	0.11
2-OH-C14:0	0.63	tr
3-OH-C14:0	0.83	0.39
2-OH-C16:0	0.91	0.51
<u>Con anillo ciclopropano</u>		
CY-C17:0	1.14	0.88
CY-C19:0	0.98	0.54
<u>Desconocidos(a)</u>		
%total	23.91	19.67

(a) El total de desconocidos se refiere a la suma del porcentaje de pequeños picos (individualmente menos de 0.5%) que no han podido ser caracterizados con patrones conocidos, y pudieran ser productos de degradación, artefactos de preparación de muestra, etc., que suelen aparecer debido a la alta eficacia de la columna capilar. El porcentaje total de desconocidos puede ser distribuido equitativamente en el resto de los picos conocidos.

GRAFICA 1: Histograma comparativo de la composición de ácidos grasos existentes en las células de AH-3 de A. hydrophila crecida a 20°C y a 37°C.



S: Saturados; I: Insaturados; R: Ramificados; H: Hidroxilados; C: Ciclopropano y D: Desconocidos.

b).- LIPIDOS DEL LPS.

Como decíamos en el apartado anterior, algunas especies bacterianas tienen la capacidad de variar sus lípidos totales en función de la temperatura de crecimiento con efectos en su virulencia y en consecuencia, varían los ácidos grasos existentes en el lipopolisacárido.

Para analizar la composición de ácidos grasos existentes en el LPS de cepas de A. hydrophila de serogrupo O34 se obtuvieron crecimientos a 20°C y 37°C de la cepa AH-3, se purificó su LPS y se determinó su composición por cromatografía de gases. Tras realizar este proceso, se observó que el LPS obtenido a partir de crecimientos a 20°C presentaba 43.5% de ácidos grasos saturados, 13.81% de insaturados, 1.96% de ramificados, 23.22% de hidroxilados y 1.45% de ácidos grasos con anillo (ciclopropano).

Al analizar el LPS obtenido a partir de crecimientos a 37°C se determinó que poseía 28.44% de ácidos grasos saturados, 14.2 de insaturados, 2.11% de ramificados, 24.60% de hidroxilados y 1.07% de ácidos grasos con anillo (ciclopropano).

Tal y como se aprecia en la gráfica 2, existe una mayor cantidad de ácidos grasos saturados y cíclicos a 20°C que a 37°C y por el contrario, una menor cantidad de ácidos grasos insaturados, ramificados e hidroxilados a 20°C que a 37°C.

Es importante destacar, dentro de los ácidos grasos saturados, el descenso a 37°C de los ácidos grasos de tipo C12:0, C13:0, C14:0 y C16:0 así como, el aumento de los de tipo C17:0, C18:0 y C19:0, y la desaparición de los C20:0. También, debemos remarcar dentro de los ácidos grasos con anillo, los de tipo CY-C17:0 cuando la cepa crece a 20°C y por el contrario, los de tipo CY-C19:0, cuando crece a 37°C.

Como puede observarse, los cambios que se producen en la composición de ácidos grasos del LPS al variar la temperatura de crecimiento son tanto cuantitativos como cualitativos.

Los datos referentes al porcentaje de cada uno de los ácidos grasos que componen los lípidos del LPS se hallan reflejados en la tabla 22.

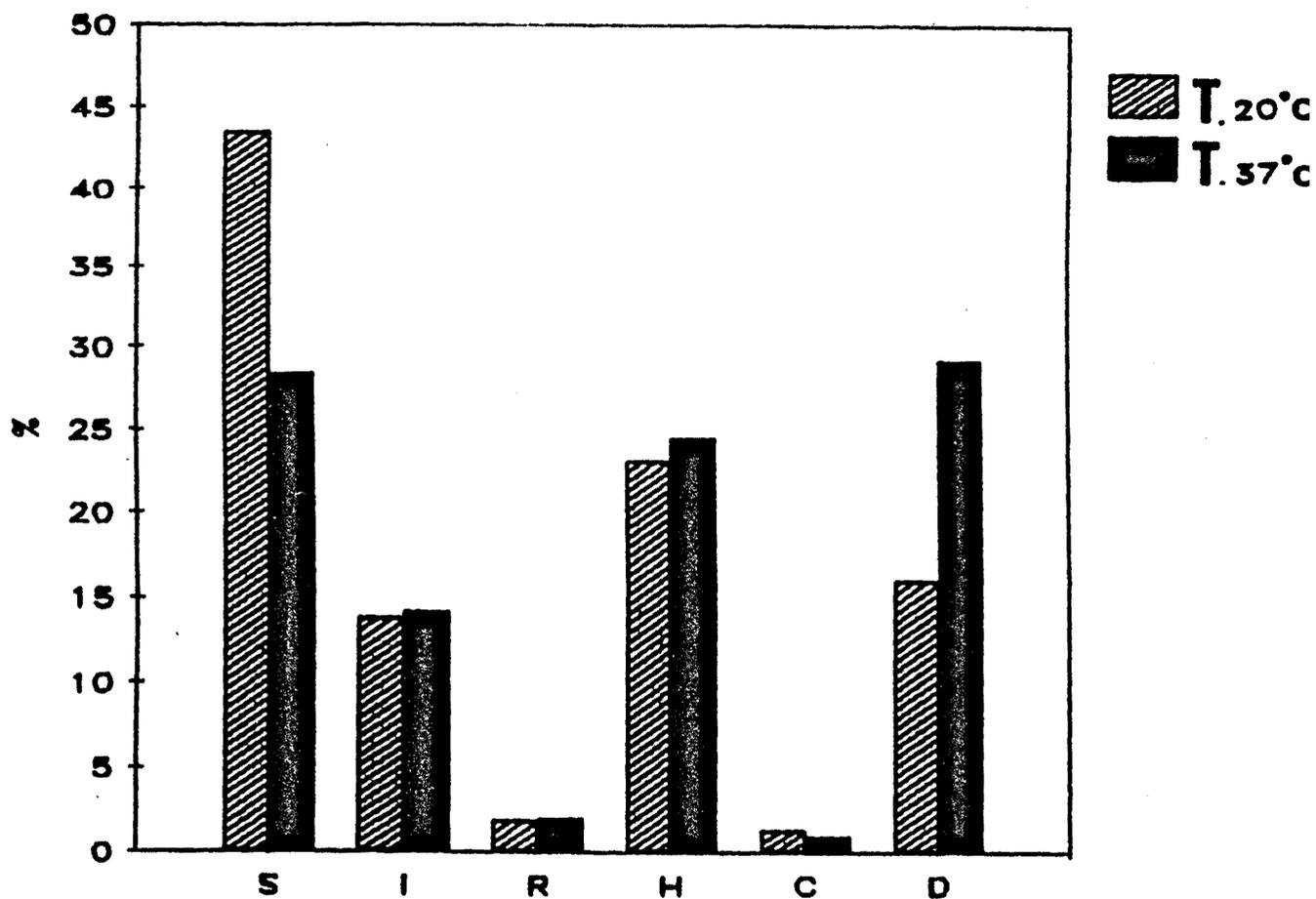
TABLA 22 : Resumen de la composición de ácidos grasos existente en el LPS purificado de la cepa AH-3 de A. hydrophila serogrupo O34 al crecer a 20°C y 37°C.

Acido graso (%)	LPS AH-3 / 20°C	LPS AH-3 / 37°C
<u>Saturados</u>		
C10:0	tr	tr
C11:0	-	-
C12:0	5.77	0.13
C13:0	2.35	0.30
C14:0	1.57	0.68
C15:0	-	-
C16:0	23.68	12.53
C17:0	0.23	1.58
C18:0	7.45	9.68
C19:0	2.07	3.54
C20:0	0.38	-
<u>Insaturados</u>		
C16:1	10.89	9.70
C18:1	2.92	4.50
<u>Ramificados</u>		
i-C14:0	0.58	tr
a-C15:0	0.29	0.28
i-C16:0	-	-
a-C17:0	1.09	1.83

Acido graso (%)	LPS AH-3 / 20°C	LPS AH-3 / 37°C
<u>Hidroxilados</u>		
2-OH-C10:0	tr	tr
2-OH-C12:0	0.93	0.19
3-OH-C12:0	0.75	0.41
2-OH-C14:0	1.95	2.09
3-OH-C14:0	18.23	17.54
2-OH-C16:0	1.36	4.60
<u>Con anillo ciclopropano</u>		
CY-C17:0	1.20	tr
CY-C19:0	0.25	1.07
<u>Desconocidos(a)</u>		
%total	16.06	29.35

(a) El total de desconocidos se refiere a la suma del porcentaje de pequeños picos (individualmente menos de 0.5%) que no han podido ser caracterizados con patrones conocidos, y pudieran ser productos de degradación, artefactos de preparación de muestra, etc., que suelen aparecer debido a la alta eficacia de la columna capilar. El porcentaje total de desconocidos puede ser distribuido equitativamente en el resto de los picos conocidos.

GRAFICA 2: Histograma comparativo de la composición de ácidos grasos el LPS purificado de la cepa A11-3 crecida a 20°C y a 37°C.



S: Saturados; **I:** Insaturados; **R:** Ramificados; **H:** Hidroxilados; **C:** Ciclopropano y **D:** Desconocidos.

3.2.C.- SENSIBILIDAD A LOS BACTERIOFAGOS DE LAS CEPAS DE SEROTIPO O34.

Para determinar la sensibilidad a los bacteriófagos 18, 69, 145, Aeh1 y PM3 a 37°C. y PM1, PM2 a 20°C de las cepas de serogrupo O34 de Aeromonas hydrophila se realizó la siembra en masa de 10^8 células bacterianas y 10^9 p.f.u. de cada uno de los bacteriófagos por separado.

Los resultados se muestran en la tabla 23. En ella, puede observarse como todas las cepas pertenecientes al serotipo O34 son sensibles a 37°C a los bacteriófagos 18, 69, 145 y Aeh1 y a 20°C a los bacteriófagos PM1 y PM2; a diferencia de lo que sucede con cualquier otro serotipo de la especie Aeromonas hydrophila.

TABLA 23 : Sensibilidad a los bacteriófagos de algunas cepas de Aeromonas hydrophila.

Cepas Serotipo		Bacteriófagos						
		37°C					20°C	
		18	69	145	Aeh1	PM3	PM1	PM2
AH-3	O34	+	+	+	+	+	+	+
Ba5	O34	+	+	+	+	+	+	+
AH-101	O34	+	+	+	+	-	+	+
AH-10	O34	+	+	+	+	-	+	+
AH-203	O34	+	+	+	+	-	+	+
AH-102	O34	+	+	+	+	+	+	+
AH-103	O34	+	+	+	+	+	+	+
AH-50	O22	+	+	+	-	+	-	+
TF7	O11	-	-	-	-	+	-	-
ATCC7966	N.S.	-	-	-	+	-	-	+

N.S.: No serotipada.

+ : sensible.

- : resistente.

3.2.D.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES ISOGENICOS EN CEPAS DE SEROTIPO O34.

3.2.D.1.- OBTENCION DE MUTANTES POR RESISTENCIA PARA BACTERIOFAGOS.

La obtención de mutantes espontáneos por resistencia a bacteriófagos se realizó con el fin de obtener un grupo de mutantes isogénicos para las estructuras superficiales de las cepas de A. hydrophila serogrupo O34, que nos permitiese llevar a cabo estudios de patogenicidad para determinar el papel que desempeña cada una de las citadas estructuras.

Así, se obtuvieron mutantes espontáneos resistentes a los bacteriófagos: PM1, cuyo receptor son las fracciones de HMW-LPS; 18 y PM2, cuyos receptores son las fracciones de LMW-LPS. Los citados mutantes se obtuvieron con una frecuencia de 10^{-6} , sobre las cepas de serogrupo O34 de A. hydrophila.

Tal y como puede observarse en la tabla 24, los mutantes obtenidos a partir de las cepas AH-3, Ba5 y AH-101, por resistencia al bacteriófago 18 (AH-8, AH-9 y AH-151) y al bacteriófago PM1 (AH-22, AH23 y AH-161) son resistentes a los bacteriófagos 18, 69, 145 y PM1 y sensibles al Aeh-1 y PM2; y los obtenidos por resistencia al PM2 (AH-53, AH-54 y AH-199) no son sensibles a ninguno de estos bacteriófagos.

TABLA 24 : Sensibilidad a los bacteriófagos de las cepas parentales de serogrupo O34 y a sus 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	-	-	-	-	-	-	-

3.2.D.2.- PROTEINAS DE MEMBRANA.

Se obtuvieron las WM de los mutantes espontáneos por resistencia a los bacteriófagos 18, PM1 y PM2. A partir de ellas, se consiguieron las OM como material insoluble en SLS (44) y luego, se valoraron por el método de Lowry (78) y se tiñeron con Coomassie blue (42).

Tras realizar este proceso, pudimos apreciar que todos los mutantes isogénicos obtenidos sobre cepas de A. hydrophila de serogrupo O34, por resistencia a bacteriófagos, presentaban un patrón de proteínas de membrana externa idéntico al de la cepa de parental. Este hecho queda reflejado en la figura 7, en la que aparecen las membranas externas de las cepas AH-3 y Ba5, así como las de sus mutantes isogénicos repectivos.

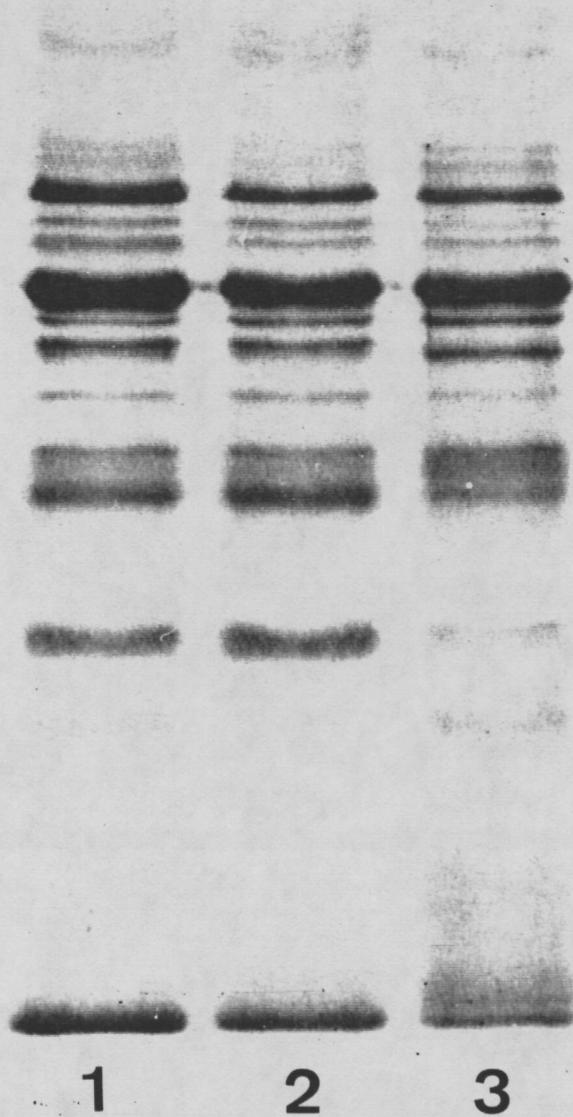


FIGURA 7: Gel de SDS-PAGE de proteínas de membrana externa de los mutantes isogénicos por resistencia a bacteriófagos de las cepas de *A. hydrophila* serogrupo O34. Columna: 1, cepa AH-3; 2, cepa AH-8 y; 3, cepa AH-22.

3.2.D.3.- LIPOPOLISACARIDO.

a).- CARACTERIZACION POR SDS-PAGE.

El análisis del LPS purificado y teñido con nitrato de plata, de los mutantes espontáneos obtenidos por resistencia a bacteriófagos, se muestra en la figura 8. En ella, puede observarse como todos los mutantes obtenidos poseen un LPS desprovisto de cadenas de carbohidratos de elevado peso molecular (HMW-LPS), los cuales constituyen el antígeno O del LPS, presente en las cepas salvajes de serogrupo O34.

Además, en cuanto a la región de bajo peso molecular (LMW-LPS) formada por los oligosacáridos del núcleo del LPS, podemos dividir a los mutantes en dos grupos: Un primer grupo formado por mutantes resistentes al PM1, que presentan un núcleo del LPS con igual movilidad electroforética que el de las cepas salvajes; y un segundo grupo formado por los mutantes resistentes al 18 y/o al PM2, que presentan un cambio en la movilidad electroforética del núcleo del LPS. Esta mayor movilidad, indica que el núcleo del LPS de este tipo de mutantes isogénicos presenta, probablemente, un menor peso molecular que el de la cepa parental.

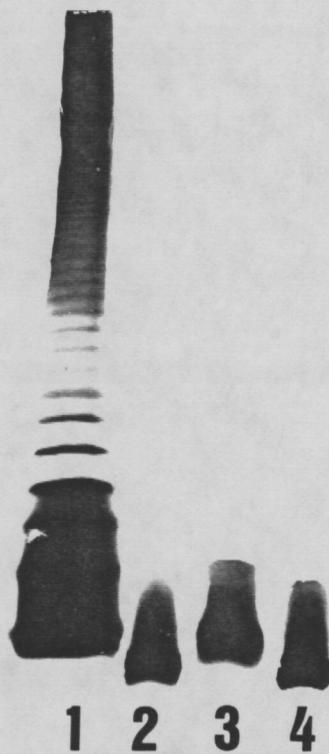


FIGURA 8: Gel SDS-PAGE del LPS de los mutantes isogénicos obtenidos por resistencia a bacteriófagos. Se empleó LPS purificado y tinción con nitrato de plata. Columna: 1, AH-3; 2, AH-8; 3, AH-22 y; 4, AH-53.

b).- COMPOSICION QUIMICA.

Una vez purificado el lipopolisacárido de los mutantes resistentes a los bacteriófagos, según el método de Westphal y Jann (169) modificado por Osborn (112), se sometió a análisis químicos y a gas-líquido cromatografía para determinar su composición química.

De este modo, se observó que el LPS de los mutantes resistentes al bacteriófago 18 y PM2 presenta un aumento considerable en la cantidad de KDO y L-heptosas, reducción de glucosas y ausencia total de hexosaminas (Gráfica 3). Por otro lado, el LPS de los resistentes al PM1 posee un aumento en el nivel de KDO y L-heptosas, descenso en el nivel de glucosa, aparición de rhamnosa (no existente en el LPS de cepas salvajes) y ausencia total de hexosaminas (Gráfica 3 y 4).

La reducción de glucosa presente en los resistentes al 18 ó al PM2 podría explicar la alteración existente en la movilidad electroforética del núcleo del LPS (LMW-LPS), ya que los citados mutantes isogénicos por su composición química presentan un núcleo englobado en el tipo 2, según Shaw y Hodder (140), pues la glucosa es uno de los componentes de dicho núcleo. También encontramos, en los citados mutantes, ausencia total de hexosaminas, lo cual corrobora la ausencia de antígeno O del LPS (HMW-LPS), pues las hexosaminas son uno de los componentes fundamentales de esta región del LPS.

En los mutantes resistentes al PM1, tal y como se ha dicho antes, existe un descenso en la cantidad de glucosa del núcleo y la aparición de rhamnosa como elemento nuevo en el LPS de las cepas de serogrupo O34. Esto, probablemente, se debe a que parte de la glucosa presente en el núcleo es sustituida por rhamnosa, lo cual para el alargamiento de la molécula de LPS y evita la inserción del antígeno O del LPS (HMW-LPS). Este impedimento de anclaje en el caso del HMW-LPS se refleja en la ausencia total de hexosaminas.

Todos estos datos quedan plasmados en la tabla 25.

TABLA 25: Resumen de la composición química del LPS purificado de los mutantes resistentes a bacteriófagos, derivados de la cepa AH-3 y Ba5 de Aeromonas hydrophila serogrupo O34.

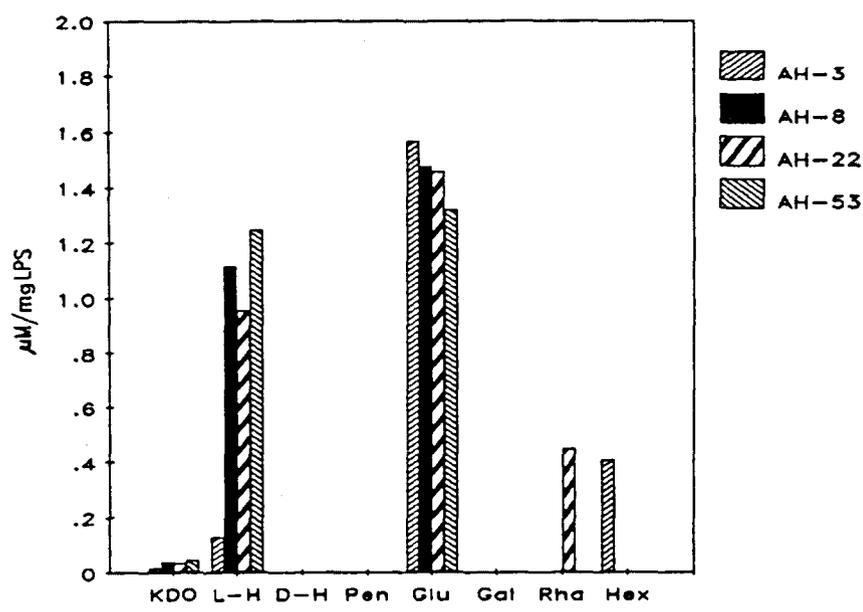
^{a)} Analizado por colorimetría (66).

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

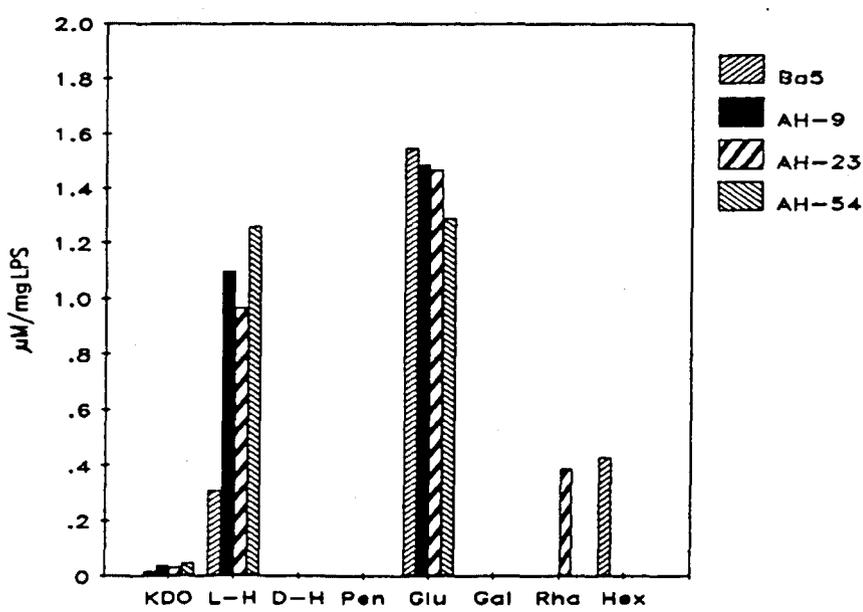
μmoles/mg. de LPS de:

LPS	KDO ^{a)}	L-Heptosa ^{b)}	D-Heptosa ^{b)}	Pentosa ^{b)}	Glucosa ^{b)}	Galactosa ^{b)}	Rhamnosa ^{b)}	Hexosaminas ^{b)}
AH-3	0.018	0.31	0	0	1.57	0	0	0.41
AH-8	0.043	1.12	0	0	1.48	0	0	0
AH-22	0.038	0.96	0	0	1.46	0	0.45	0
AH-53	0.051	1.25	0	0	1.32	0	0	0
Ba5	0.019	0.31	0	0	1.55	0	0	0.43
AH-9	0.042	1.10	0	0	1.49	0	0	0
AH-23	0.036	0.97	0	0	1.47	0	0.39	0
AH-54	0.050	1.26	0	0	1.29	0	0	0

GRAFICA 3: Histograma comparativo de los niveles en $\mu\text{moles/mgr. LPS}$ de cada uno de los mutantes isogénicos por resistencia a bacteriófagos de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.



GRAFICA 4: Histograma comparativo de los niveles en $\mu\text{moles/mg. LPS}$ de cada uno de los mutantes isogénicos por resistencia a bacteriófagos de la cepa Ba5 de *A. hydrophila*.



3.2.D.4.- DOSIS LETAL.

Se determinaron las dosis letales (D.L.₅₀) para los mutantes isogénicos de las cepas de A. hydrophila de serogrupo O34 y se observó que eran un logaritmo superiores a las determinadas en las cepas parentales. De ello se desprende que los mutantes isogénicos necesitan mayor número de células, que las cepas parentales, para eliminar a la mitad de la población y en consecuencia, son menos virulentos que las cepas parentales.

3.2.E.- PRODUCCION DE TOXINAS.

La capacidad de producir toxinas que poseen las cepas de A. hydrophila de serogrupo O34 y sus mutantes isogénicos, se determinó mediante análisis de sobrenadantes, según el método descrito por Lallier (72). De este modo pudimos observar que todas las cepas de serogrupo O34, así como sus mutantes isogénicos para estructuras superficiales, poseen a 20°C la misma capacidad de síntesis de hemolisinas, proteasas, amilasas, enterotoxinas, factor dermonecrótico, etc..

Si comparamos la capacidad de secretar toxinas de las cepas de serogrupo O34 con la de otros serogrupos, vemos que las cepas de serogrupo O34 poseen a 20°C mayor capacidad de secreción de toxinas en general, que la de otros serotipos más virulentos como podría ser el O11.

3.2.F.- SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

Al determinar la sensibilidad a algunos antibióticos de las cepas parentales y mutantes isogénicos para estructuras superficiales, observamos que todos eran sensibles a: Tetraciclina (5 µg/ml.), Neomicina (10 µg/ml.), Acido Nalidíxico (1 µg/ml.) y K_2TeO_3 (1 µg/ml.); resistentes a: Polimixina (20 µg/ml.), Carbamicilina (20 µg/ml.), Ampicilina (40 µg/ml.) y DOC (10 µg/ml.); y únicamente existen diferencias entre las cepas salvajes y los mutantes para: Streptomina (15 µg/ml.), Novobiocina (5 µg/ml.), SDS (5 mg/ml.) y EDTA (5 mg/ml.).

En la tabla 26, únicamente se hallan computados los resultados obtenidos para la cepa AH-3 y sus mutantes, pues para cualquier otra cepa resultan ser idénticos.

TABLA 26 : Resumen de la sensibilidad a los antibióticos de la cepa AH-3 de A. hydrophila y sus mutantes isogénicos.

Antibiótico	Cepas			
	AH-3	AH-8	AH-22	AH-53
Tetraciclina (5 µg/ml.)	NC	NC	NC	NC
Polimixina (20 µg/ml.)	C	C	C	C
Carbamicilina (20 µg/ml.)	C	C	C	C
Streptomycina (15 µg/ml.)	C	NC	NC	NC
Neomicina (10 µg/ml.)	NC	NC	NC	NC
Acido Nalidixico (1 µg/ml.)	NC	NC	NC	NC
Ampicilina (40 µg/ml.)	C	C	C	C
Novobiocina (5 µg/ml.)	C	NC	NC	NC
SDS (5 mg/ml.)	C	NC	NC	NC
EDTA (5 mg/ml.)	C	NC	NC	NC
DOC (10 mg/ml.)	C	C	C	C
K ₂ TeO ₃	NC	NC	NC	NC

C: crecimiento.

NC: ausencia de crecimiento.

3.2.G.- ESTUDIO DE LA ACCION DEL SUERO NO IMMUNE SOBRE CEPAS DE SEROGRUPO O34.

3.2.G.1.- RESISTENCIA DE LAS CEPAS A LA ACCION BACTERICIDA DEL SUERO NO IMMUNE.

Al estudiar la resistencia a la acción bactericida del suero fresco no immune, tanto de conejo como humano, se observó que las cepas parentales, que presentan un antígeno de tipo O34, son resistentes al citado suero y por el contrario, los mutantes isogénicos obtenidos por resistencia a bacteriófagos (Tabla 27), que presentan un LPS sin antígeno y con modificaciones en los oligosacáridos del núcleo, son sensibles al suero en las condiciones utilizadas.

Debemos decir que las cepas parentales no son únicamente resistentes a la actividad bactericida del suero, sino que incluso siguen creciendo de forma moderada tras la incubación.

Por otro lado, entre los mutantes estudiados se observan diferentes grados de sensibilidad. Así, las cepas más sensibles resultan ser las resistentes al bacteriófago PM2 (AH-53, AH-54 y AH-199), con un porcentaje de supervivencia menor al 1% tras una hora de incubación en suero fresco no immune. Los mutantes resistentes a los bacteriófagos 18 o PM2 (Tabla 28) presentan un porcentaje menor al 1%, después de dos horas de contacto con el suero no immune. En los tres casos, a las tres horas de incubación se han llegado a

valores inferiores al 0.1% de supervivencia, tal y como se muestra en la gráfica 5.

Debido a que en la mezcla de incubación (PBS:suero, 1:4) había una deprivación de nutrientes respecto al medio original en que se hallaban las cepas, se comprobó que las diferencias de viabilidad observadas se debían a factores bactericidas del suero y no a factores nutricionales. Con este fin, se descomplementó el suero por calentamiento a 56°C durante 30 min. o por tratamiento con EDTA y se estudió la supervivencia de las cepas, en el citado suero. Al realizar esto, observamos la ausencia total de mortalidad en todas las cepas, tal y como se muestra en la Tabla 28. De estos resultados se desprende que las sensibilidades antes citadas se deben al poder bactericida del complemento existente en el suero fresco no immune y no a factores nutricionales.

Tras haber mantenido en contacto durante 3 h. los mutantes sensibles al suero de A. hydrophila con suero sin descomplementar, se obtuvieron supervivientes que se purificaron mediante estrias en placa (Tabla 27). Posteriormente, se analizó la resistencia al suero de estas cepas (Tabla 28), de igual modo que se había realizado con las cepas sensibles anteriormente estudiadas, y se comprobó la selección de poblaciones resistentes al suero (Gráfica 5).

TABLA 27 : Características de las cepas de A. hydrophila empleadas para desarrollar el estudio de resistencia al suero fresco no inmune.

Cepa	Características	Origen
AH-3	Serotipo O34, S ^R .	Merino et al. 1989 (91)
AH-8	Derivada de AH-3, 18 ^R , S ^S .	Merino et al. 1990 (94)
AH-22	Derivada de AH-3, PM1 ^R , S ^S .	Merino et al. 1990 (92)
AH-53	Derivada de AH-3, PM2 ^R , S ^S .	Merino et al. 1990 (93)
AH-34	Derivada de AH-8, S ^R .	Este trabajo
AH-35	Derivada de AH-22, S ^R .	Este trabajo
AH-301	Derivada de AH-53, S ^R .	Este trabajo
Ba5	Serotipo O34, S ^R .	Lallier et al. 1984
AH-9	Derivada de Ba5, 18 ^R , S ^S .	Merino et al. 1989 (91)
AH-54	Derivada de Ba5, PM2 ^R , S ^S .	Merino et al. 1990 (93)
AH-302	Derivada de AH-9, S ^R .	Este trabajo
AH-30	Derivada de AH-54, S ^R .	Este trabajo
AH-101	Serotipo O34, S ^R .	Merino et al. 1989 (91)
AH-151	Derivada de AH-101, 18 ^R , S ^S .	Merino et al. 1990 (94)
AH-199	Derivada de AH-101, PM2 ^R , S ^S .	Merino et al. 1990 (93)
AH-304	Derivada de AH-151, S ^R .	Este trabajo
AH-30	Derivada de AH-199, S ^R .	Este trabajo.

18^R: Cepa resistente al bacteriófago 18.

PM1^R: Cepa resistente al bacteriófago PM1.

PM2^R: Cepa resistente al bacteriófago PM2.

S^S: Suero sensible.

S^R: Suero resistente.

GRAFICA 5: Supervivencia de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* y sus derivadas ante la acción bactericida del suero fresco no inmune de conejo.

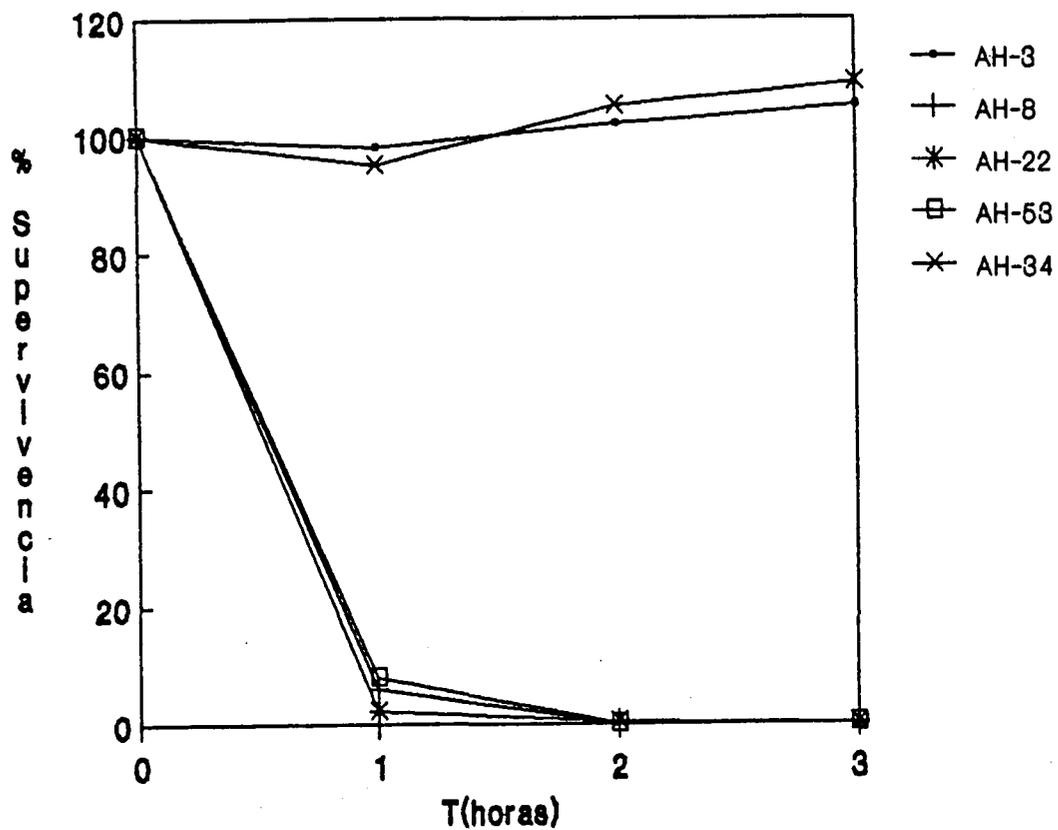


TABLA 28 : Supervivencia de las cepas de A. hydrophila en suero no immune y en el mismo suero descomplementado¹⁾.

% de supervivientes en:

Cepas	Suero no immune			Suero no immune descomplementado		
	1 h.	2 h.	3 h.	1 h.	2 h.	3 h.
AH-3	96	99	101	102	103	109
AH-8	1.8	0.2	<0.1	104	103	112
AH-22	2.5	0.7	<0.1	105	104	111
AH-53	0.8	<0.1	<0.1	103	105	108
AH-34	94	100	103	106	113	120
AH-35	94	101	104	107	115	121
AH-301	91	101	105	102	107	114
Ba5	98	102	105	104	107	116
AH-9	1.9	0.3	<0.1	100	106	108
AH-54	0.7	<0.1	<0.1	102	104	107
AH-302	96	100	103	103	109	118
AH-303	97	99	102	104	109	117
AH-101	97	100	108	102	110	116
AH-151	1.7	0.1	<0.1	100	102	104
AH-199	0.9	<0.1	<0.1	99	101	105
AH-304	98	101	106	103	111	118
AH-305	97	102	106	105	112	120

¹⁾ El suero no immune se descomplementó por tratamiento con calor a 56°C durante 30 min. o bien, por tratamiento con EDTA durante 1 h. a 37°C.

Una vez obtenidos los mutantes resistentes al suero se estudiaron sus características de membrana. Así, se observó que presentan un patrón de proteínas de membrana externa idéntico al de las cepas de las que proceden y un lipopolisacárido sin HMW-LPS, con menor movilidad electroforética en geles de SDS-PAGE que el de las cepas sensibles de las que derivan, tal y como se muestra en la figura 9.

Además se analizó la composición química del LPS de estos mutantes resistentes al suero y se observó que presentan niveles de KDO y L-heptosas algo inferiores a los de las cepas sensibles de las que derivan, no poseen glucosa y en contraposición, presentan moléculas de galactosa (Gráfica 6). Posiblemente, la glucosa existente en las cepas parentales sensibles al suero es sustituida, en las cepas resistentes, por galactosa. Este hecho, constituye una modificación química y estructural en el núcleo del LPS (LMW-LPS), que da lugar a la transformación de las cepas sensibles en resistentes a la acción bactericida del suero normal no inmune. Estos resultados se muestran en la tabla 29.

Todos los datos acumulados hacen pensar que existe una estrecha relación entre la composición química y estructural del núcleo del LPS y la resistencia de las cepas a la acción del suero normal.

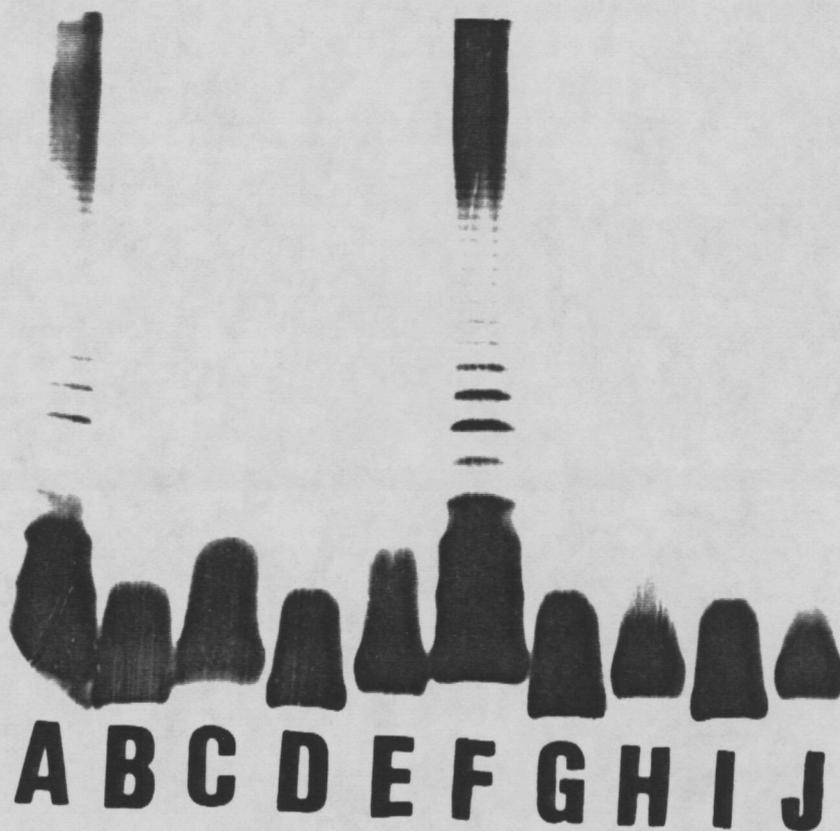


FIGURA 9 : Gel SDS-PAGE del LPS de los mutantes obtenidos por resistencia al suero a partir de las cepas AH-8 y AH-22 de *A. hydrophila*. Columna: A, AH-3; B, AH-8; C, AH-34; D, AH-53; E, AH-301; F, Ba5; G, AH-9; H, AH-302; I, AH-54; y J, AH-30.

TABLA 29: Resumen de la composición química del LPS purificado de los mutantes resistentes al suero de serogrupo O34 de A. hydrophila.

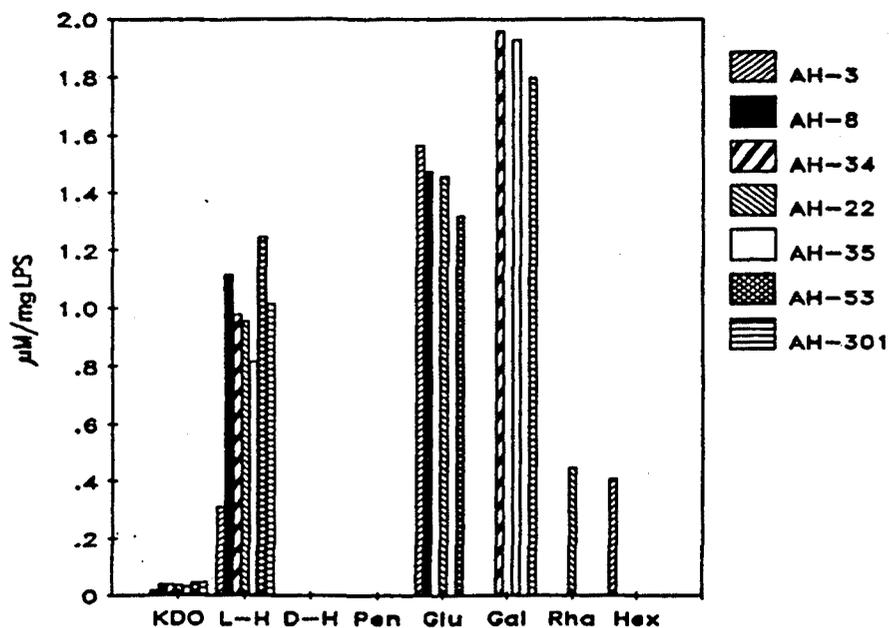
^{a)} Analizado por colimetría (66).

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

μmoles/mg. de LPS de:

LPS	KDO ^{a)}	L-Heptosa ^{a)}	D-Heptosa ^{a)}	Pentosa ^{a)}	Glucosa ^{a)}	Galactosa ^{a)}	Rhamnosa ^{a)}	Hesoxamina ^{a)}
AH-3	0.018	0.31	0	0	1.57	0	0	0.41
AH-8	0.043	1.12	0	0	1.48	0	0	0
AH-34	0.041	0.98	0	0	0	1.96	0	0
AH-22	0.038	0.96	0	0	1.46	0	0.45	0
AH-35	0.036	0.82	0	0	0	1.93	0	0
AH-53	0.051	1.25	0	0	1.32	0	0	0
AH-301	0.048	1.02	0	0	0	1.80	0	0

GRAFICA 6: Histograma comparativo de los niveles de LPS, en μmoles/mg. LPS, existentes en cada uno de los mutantes isogénicos obtenidos por resistencia a la acción bactericida del suero no inmune.



3.2.G.2.- VIA DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.

Al estudiar la resistencia a la acción bactericida del suero observamos que las cepas obtenidas por resistencia al bacteriófago PM2 (LPS corto) son rápidamente eliminadas al entrar en contacto con suero normal no immune (Gráfica 6). Por el contrario, si se colocan en contacto con suero descomplementado (inhibida la vía clásica y la alternativa) por tratamiento con EDTA o por calor durante 30 min. a 56°C, se observaba la pérdida de la actividad bactericida sobre estas misma cepas .

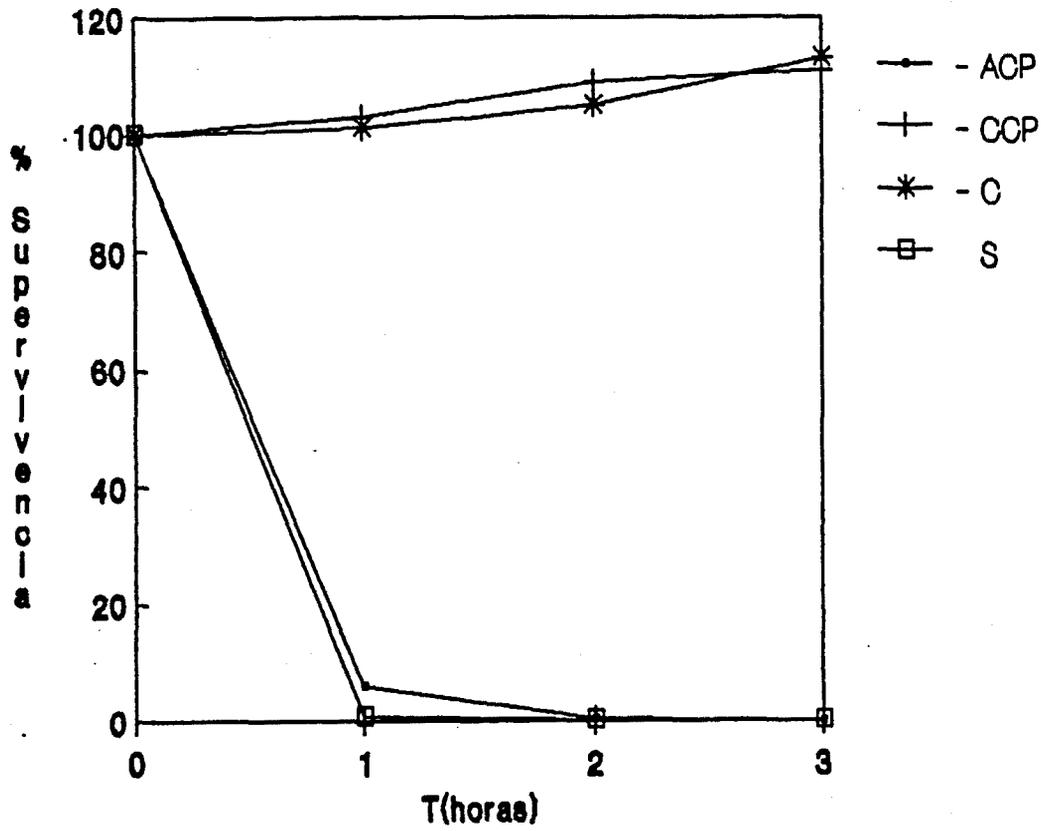
Esto, parece demostrar de forma clara que la actividad bactericida del suero no immune en las cepas de A. hydrophila se debe a la acción del complemento.

Una vez determinado el agente causal de la actividad bactericida del suero no immune, se determinó la vía de actuación del mismo. Para ello, se incubaron las cepas sensibles con suero al que se le había inhibido selectivamente la vía clásica de activación del complemento (CCP) mediante tratamiento con Mg^{2+} -EDTA y por otro lado, con suero al que se le había inhibido selectivamente la vía alternativa (ACP) mediante tratamiento con inulina o calentamiento a 50°C durante 20 min. Cuando se empleó el suero deficiente en vía clásica observamos pérdida de la actividad bactericida y por el contrario, cuando se empleó el deficiente en vía alternativa observamos que aún seguía existiendo actividad bactericida (Gráfica 7). Resultados similares se obtuvieron con todas las cepas sensibles al suero de A. hydrophila.

Otro dato importante para determinar la vía de activación del complemento es el hecho que se produce al emplear suero no immune deficiente en C1, en lugar de suero normal no immune. Cuando empleamos suero deficiente en C1 observamos que las cepas sensibles a la acción del suero normal no immune, se convierten en resistentes. Esto, se debe a que la falta de proteína C1 hace que no pueda activarse el complemento por la vía clásica, ya que dicha proteína es el componente fundamental de la vía.

Todos estos resultados sugieren que la acción bactericida del suero no immune en las cepas de A. hydrophila serogrupo O34, se lleva a cabo mediante la vía clásica de activación del complemento.

GRAFICA 7: Cinética de muerte de *A. hydrophila* AH-3 y sus mutantes isogénicos derivados para suero no inmune.



3.2.G.3.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO IMMUNE CON LPS.

Se purificó el LPS de la cepa AH-3 de A. hydrophila serogrupo O34 y se utilizó a diferentes concentraciones para inhibir la acción bactericida del suero no immune sobre la cepa sensible al suero A. hydrophila AH-53. La supervivencia de la cepa AH-53 en suero normal no immune tras 60 min. de incubación a 37°C fue de 0, 35, 60, 89, 105 y 112 a una concentración de LPS de 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 mg/ml. respectivamente.

En la tabla 30 se muestran los porcentajes de supervivencia de las cepas sensibles al suero de A. hydrophila, al incubarse con suero normal no immune tratado con LPS (100 µg/ml.) de las cepas sensibles o bien, de las resistentes de A. hydrophila.

Las cepas sensibles (Tabla 30) presentan en suero no immune una supervivencia inferior al 0.1% tras 180 min. de incubación a 37°C, sin embargo todas ellas sobreviven bien si el suero ha sido previamente preincubado con LPS de cepas tanto sensibles como resistentes. Esto se debe a que el LPS de todas estas cepas activa la acción del complemento y por tanto, cuando el suero no immune se pone en contacto con cepas sensibles ya se han gastado todas las proteínas que constituyen el complemento y no puede desarrollar, en consecuencia, su acción bactericida.

Una vez confirmada la responsabilidad del LPS en la activación del complemento, se determinó la región del mismo causante de dicha acción.

Con este fin, se fraccionó en función de su peso molecular el LPS de la cepa AH-3 de A. hydrophila empleando una columna de Sephacryl S-300, tal y como se describe en el apartado 2.8.D de esta Memoria. La presencia de LPS en las fracciones se monitorizó para determinar la relación KDO-hexosas y se estudiaron mediante SDS-PAGE. Finalizado el fraccionamiento, se agruparon las fracciones en dos "pool": uno que contenía las fracciones de elevado peso molecular (HMW-LPS) y otro, las de bajo peso molecular (LMW-LPS). Ambos "pool" se reflejan en la figura 5. Las fracciones agrupadas de este modo se emplearon para inactivar suero no immune, observandose que las cepas sensibles al suero de A. hydrophila presentan un elevado porcentaje de supervivencia si el suero se preincuba con LMW-LPS y por el contrario, presentan bajo porcentaje de supervivencia si se preincuban con HMW-LPS, tal y como se indica en la tabla 30.

TABLA 30 : Inhibición de la actividad bactericida del suero para cepas sensibles de A. hydrophila, tras 180 min. de incubación en suero normal no inmune tratado con LPS homólogos y heterólogos y fracciones del LPS de la cepa AH-3 de A. hydrophila.

Supervivencia (%) en suero normal tratado con:							
Cepas normal	Control	LPS			fracciones LPS AH-3		
	Suero normal	Suero sensibles		Suero resistentes		HMW	LMW
		AH-8	AH-53	AH-3	AH-34		
AH-8 <0.1	100	103	99	101	0.6	98	
AH-53 <0.1	100	98	98	102	0.7	99	
AH-9 <0.1	104	102	97	104	0.8	102	
AH-54 <0.1	100	103	98	100	0.6	96	
AH-151 <0.1	102	100	99	103	0.6	98	
AH-199 <0.1	103	103	96	101	0.9	101	

El LPS se empleó a una concentración de 100 µg/ml.

3.2.G.4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL LPS.

Todos los experimentos realizados hasta el momento parecen indicar que el papel principal de la protección, ante la actividad bactericida del suero, lo tiene el LPS. Esta actividad viene dada por la acción del complemento y en consecuencia, queda demostrado que el LPS afecta al complemento.

La actividad anticomplementaria del LPS de las cepas de A. hydrophila serogrupo O34 se midió para determinar si el efecto inhibitorio de la actividad bactericida del suero se debe a la habilidad para activar y consumir el complemento del suero. La actividad anticomplementaria del LPS de las cepas resistentes al suero depende de la dosis, al igual que ocurre con las moléculas de bajo peso molecular del LPS (LMW-LPS). El LPS de las cepas sensibles al suero posee una baja actividad anticomplementaria, incluso a concentraciones elevadas de 200 µg/ml., al igual que ocurre con las fracciones de elevado peso molecular del LPS (HMW0-LPS) de las cepas salvajes (AH-3, Ba5 y AH-101) de serogrupo O34 de A. hydrophila.

3.2.H.- VALORACION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS DEL COMPLEMENTO.

3.2.H.1.- NIVELES DE C1q EXISTENTES EN SUERO NO IMMUNE TRATADO CON CEPAS DE SEROGRUPO O34.

Como se ha determinado anteriormente el complemento es, a través de la vía clásica, el responsable de la acción bactericida del suero no immune sobre cepas de A. hydrophila serogrupo O34.

Para confirmar este hecho, se determinaron los niveles de C1q existentes en suero no immune al ser incubado con 10^5 células ó con 100 µg/ml. de LPS, tanto de cepas sensibles como resistentes al suero de A. hydrophila. Al realizar estos experimentos, se observó que tanto las células como el LPS de ambos tipos de cepas (sensibles y resistentes) son capaces de activar la vía clásica, ya que los niveles detectados de C1q, en suero tratado, descienden a medida que transcurre el tiempo de incubación.

También, se observó que al poner en contacto fracciones de elevado peso molecular para el LPS (HMW-LPS) de la cepa AH-3 con suero no immune, no varía el nivel de C1q y por el contrario, si se utilizan fracciones de bajo peso molecular (LMW-LPS) se produce un descenso en los niveles de C1q existente en suero no immune. Todos estos datos indican que las fracciones de elevado peso molecular no activan la vía clásica, en contraposición a las de bajo peso molecular que si la activan.

3.2.H.2.- NIVELES DE C3b Y C5b-9 DEPOSITADOS EN LA MEMBRANA DE CEPAS DE SEROGRUPO O34 TRATADAS CON SUERO NO IMMUNE.

Una vez establecida la vía de activación del complemento, se determinaron los niveles de C3b y C5b-9 existentes en la membrana de la cepa AH-3 y en la de sus mutantes sensibles y resistentes al suero, tras ser incubados en suero normal no immune.

Al estudiar los niveles de C3b unido a membrana, se observó que la cepa salvaje AH-3 y los mutantes O sensibles al suero presentaban un aumento en la cantidad de C3b unido a sus membranas a medida que transcurría el tiempo de incubación (Figura 10.A) y por el contrario, este componente del complemento no se unía a los mutantes O resistentes a la acción bactericida del suero (Figura 10.B). La no unión de C3b a las membranas de estos mutantes resistentes (AH-34, AH-35 y AH-301) implica el total impedimento a la acción bactericida del complemento en estas cepas.

Tras determinar la unión de C3b a las membranas, se estudió si las cepas capaces de unir C3b, también eran capaces de ligar C5b-9 y con ello, permitir al complemento realizar su ciclo completo. Se observó que la cepa salvaje AH-3 de A. hydrophila no une C5b-9 (Figura 11.A), de ahí su resistencia a la acción bactericida del suero, y por el contrario, los mutantes sensibles al suero unen C5b9 a sus membranas, ya que los niveles de este

componente en sus membranas aumenta al transcurrir el tiempo de incubación (Figura 11.B).

Estos datos, reflejados en la tabla 31, confirman la resistencia a la acción del suero de la cepa AH-3 y de los mutantes O^r resistentes, así como la sensibilidad al citado suero de las cepas O^s sensibles.

TABLA 31: Niveles de C3b y C5b-9 del complemento, unidos a la membrana de diferentes cepas de A. hydrophila al incubarse con suero no immune.

D.O. ₄₀₅	Cepas sensibles			Cepas resistentes			
	AH-8	AH-22	AH-53	AH-3	AH-34	AH-35	AH-301
C3b	0.9	1	1.2	0.5	<0.1	<0.1	<0.1
C5b-9	1.2	1.5	1.6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

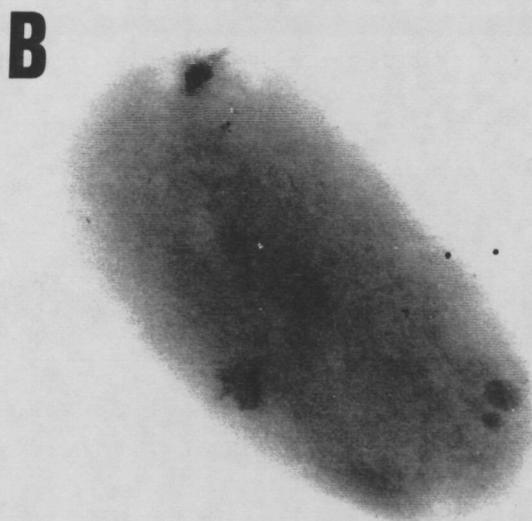
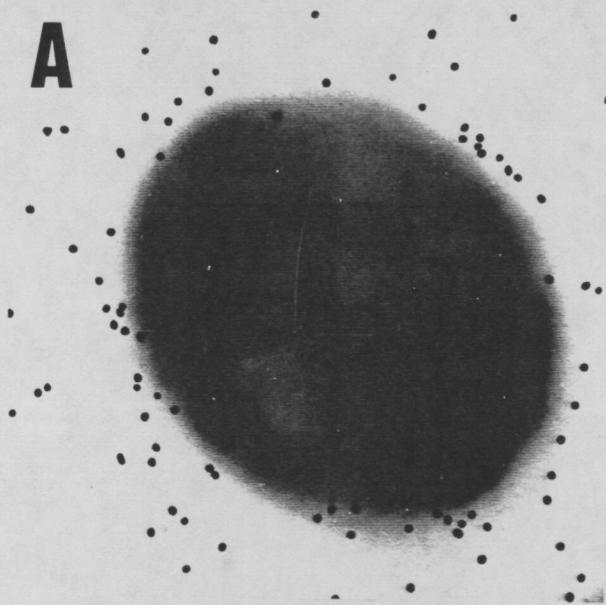
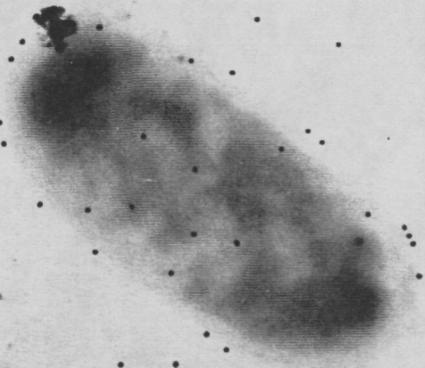


FIGURA 10: Marcaje de diferentes cepas de *A. hydrophila* serogrupo O34 al ponerse en contacto con anti-C3b unido a proteina A-oro de 20 nm. A) Mutante sensible al suero AH-22 y C) Mutante resistente al suero AH-35.

A



B



FIGURA 11: Marcaje de diferentes cepas de *A. hydrophila* de serogrupo 0 34 al ponerse en contacto con anti-C5b-9 ligado a proteína A-oro de 20 nm. A) Mutante sensible al suero AH-22, y B) Cepa salvaje AH-3.

3.3.- ESTUDIO DE LA SUPERFICIE CELULAR DEL SEROTIPO O11 DE AEROMONAS MESOFILAS.

3.3.A.- CARACTERIZACION DE LA MEMBRANA EXTERNA DE CEPAS DE SEROGRUPO O:11.

3.3.A.1.- PROTEINAS DE MEMBRANA.

Al estudiar la membrana externa (OM) de las cepas de serotipo O11 se observó que todas ellas presentaban un patrón de proteínas muy similar (Figura 12) que difería notablemente del existente en cepas de cualquier otro serotipo de esta especie bacteriana.

Este serotipo presenta en su membrana externa 11 Omp. Entre estas proteínas predomina una de 30 Kd. y un grupo de proteínas comprendidas entre 45-55 Kd. Este último grupo de proteínas se diferencian muy poco en geles SDS-PAGE al 12.5%, tal y como han descrito anteriormente Dooley y Trust (30), probablemente debido a que se hallan ligadas al lipopolisacárido. A causa de esto, se requieren geles con menor porcentaje de acrilamida para poder mejorar su resolución.

Mediante este tipo de geles se observó que eran tres las proteínas mayoritarias comprendidas entre 45-55 Kd. y que el peso molecular de cada una de ellas variaba en función de la cepa utilizada, existiendo en todos los casos una proteína más abundante de

52 Kd.

La cepa TF7 presenta en consecuencia, cuatro Omp mayoritarias de 30, 48, 50 y 52 Kd., respectivamente.

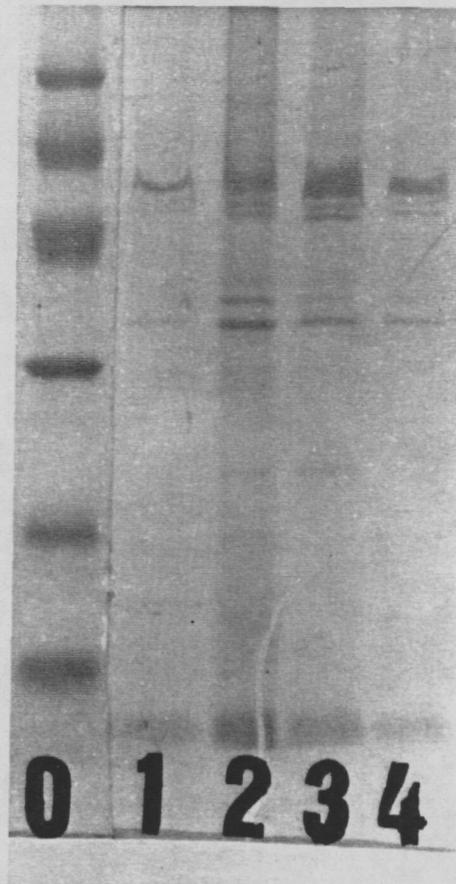


FIGURA 12: Gel SDS-PAGE 7.5% de proteínas de membrana externa de cepas de serogrupo O11. Columna: 0, Standard de proteínas Pharmacia Fine Chemicals (14.0, 20.1, 30.0, 43.0, 67.0, y 94.0 Kd.); 1, Cepa TF7; 2, Cepa LL1; 3, Cepa ATCC9071; y 4, Cepa AS-28.

3.3.A.2.- LAMINA S.

Las cepas de Aeromonas de serogrupo O11 poseen una lámina proteínica de estructura tetragonal y extraperiférica a la célula bacteriana denominada lámina S. Mediante purificación de esta lámina (31), según el método descrito en el apartado 2.8.B. de esta Memoria, se ha observado que está formada por una única proteína de 52 Kd. denominada proteína S (Figura 13). Esta proteína es común en todas las cepas de este serogrupo.

Un dato a remarcar es que la denominada lámina S de las cepas de Aeromonas móviles de serogrupo O11, presenta similitudes y diferencias con la lámina A existente en las cepas altamente virulentas de Aeromonas salmonicida.

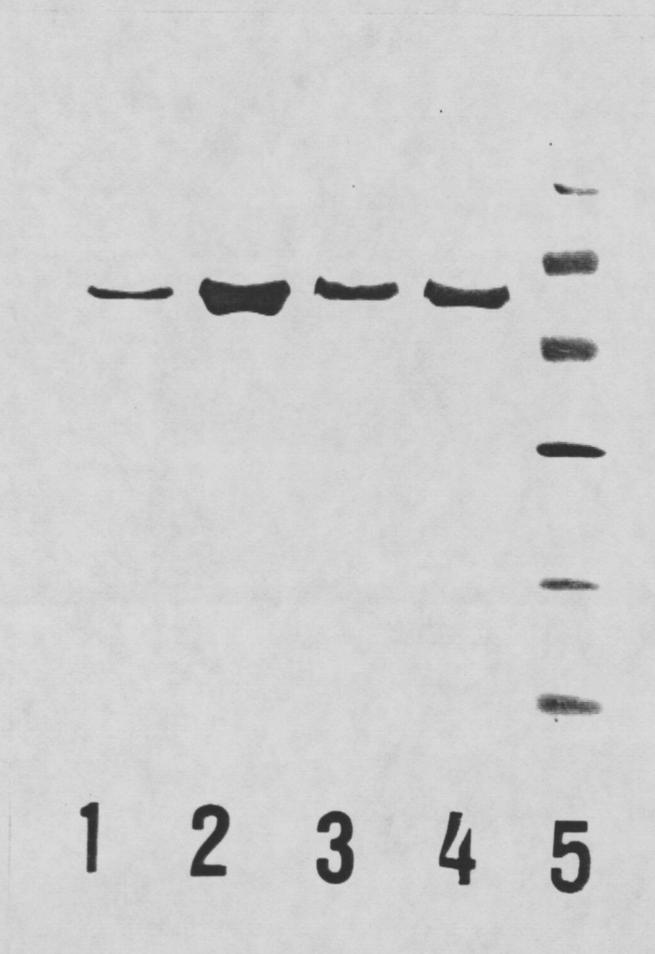


FIGURA 13: Gel SDS-PAGE de lámina-S purificada mediante extracción en Tris-glicina, de las Aeromonas motiles de serogrupo O11. Columna: 1, Cepa TF7; 2, Cepa LL1; 3, Cepa AS-28; 4, Cepa ATCC9071; y 5, Standard de proteínas Pharmacia Fine Chemicals (14.0, 20.1, 30.0, 43.0, 67.0, y 94.0 Kd.).

3.3.A.3.- LIPOPOLISACARIDO.

a).- CARACTERIZACION POR SDS-PAGE.

Se obtuvieron crecimientos durante 24 h. en T.S.B. con agitación a 37°C, a partir de los cuales se purificó el LPS según el método de Westphal y Jann (169) modificado por Osborn (112) o bien, se emplearon células enteras según el método de Korhonen (68), para analizar mediante geles SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata (162) el LPS presente en las cepas de Aeromonas móviles de serogrupo O11.

Se observó que las cepas del citado serogrupo presentan un LPS en el que se distingue claramente una región formada por moléculas de bajo peso molecular (LMW-LPS), que constituyen el núcleo del LPS; y otra, formada por moléculas de elevado peso molecular (HMW-LPS), que se caracterizan por mostrarse en geles de poliacrilamida como una doble banda de elevado peso molecular y constituye el denominado antígeno O del LPS. Esta estructura de las HMW-LPS presente en las cepas de Aeromonas móviles de serogrupo O11 se asemeja a la existente en las cepas de Aeromonas salmonicida, las cuales presentan también un antígeno O del LPS caracterizado por constituir, en SDS-PAGE, una doble banda de elevado peso molecular, aunque de menor movilidad electroforética que la existente en las Aeromonas de serogrupo O11. Un punto importante, es que todas las cepas de serogrupo O11 no poseen un antígeno O con igual movilidad electroforética.

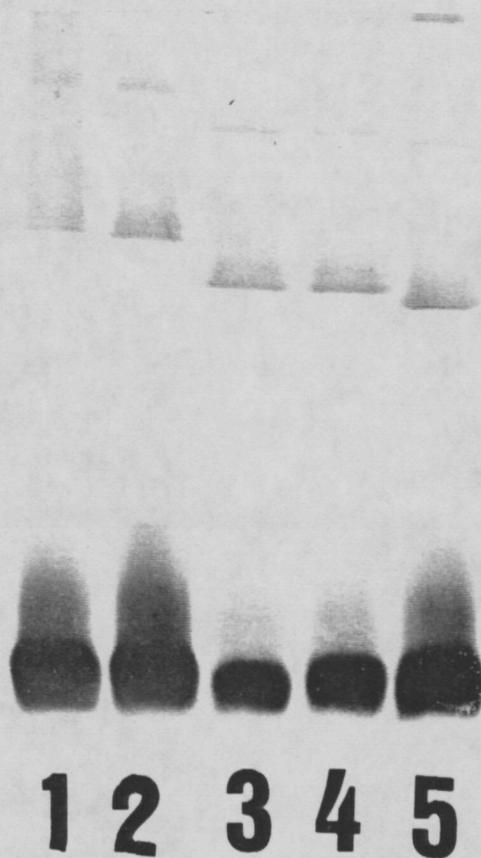


FIGURA 14: Gel SDS-PAGE a partir de LPS purificado, según el método de Westphal y Jann (169) modificado por Osborn (112) y teñido según el método de Tsai y Frasch (162). Columna: 1, Cepa TF7; 2, Cepa LL1; 3, Cepa ATCC9071; 4, Cepa AS-76; y 5, Cepa AS-28.

b).- FRACCIONAMIENTO.

Al fraccionar mediante una columna de cromatografía, según el método descrito por Ciurana y Tomás (21), el LPS purificado de la cepa TF7 de serogrupo O11, se observó que las fracciones 32 a 46 contienen cadenas homólogas de polisacáridos de elevado peso molecular (HMW-LPS), que constituyen el antígeno O del LPS, y las fracciones 48 a 60 contienen oligosacáridos de bajo peso molecular (LMW-LPS), que constituyen el núcleo del LPS (Figura 15).

Las fracciones así obtenidas se agruparon en dos "pool": uno de ellos contenía fracciones de bajo peso molecular (LMW-LPS) y el otro, fracciones de elevado peso molecular (HMW-LPS). Esta agrupación de fracciones se realizó con el fin de aumentar su contenido y poder concentrarlas mediante liofilización, para llevar a cabo los experimentos de inactivación tanto del suero no inmune, como de los bacteriófagos.



FIGURA 15: Gel SDS-PAGE del fraccionamiento del LPS purificado de la cepa TF7 de serogrupo O11, teñido según el método de Tsai y Frasch (162). Columna : 0, LPS de la cepa TF7; 1-5, HMW-LPS TF7; y 6-13, LMW-LPS TF7. Cada fracción se colocó en un pocillo a una concentración de 2-3 μg .

c).- COMPOSICION QUIMICA.

Una vez purificado el LPS de las cepas de serogrupo O11, 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 O11 presentaban un contenido en KDO de 0.025, en L-heptosa de 0.32, en glucosa de 1.22, en galactosa de 1.27, en mannososa de 1.82 y en hexosaminas de 0.57. Todos estos datos vienen dados en μ moles/mg. de LPS y se hallan reflejados en la tabla 32.

Si se compara la composición química del LPS de las cepas de serogrupo O11 con el de otros serogrupos, como el O34 (anteriormente estudiado), podemos apreciar que las cepas de serogrupo O11 poseen un nivel de KDO y hexosaminas superior al del O34, la cantidad de L-heptosas permanece igualada en ambos grupos, y la cantidad de glucosa es inferior en el serogrupo O11. Además, cabe destacar la existencia de mannososa y galactosa en el LPS de las cepas de serogrupo O11, como diferencia remarcable entre el LPS de estos dos serotipos pertenecientes al grupo de Aeromonas móviles (Gráfica 8).

TABLA 32: Resumen de la composición química del LPS purificado de las cepas TF7 de serogrupo O11 y AH-3 de serogrupo O34 de Aeromonas hydrophila.

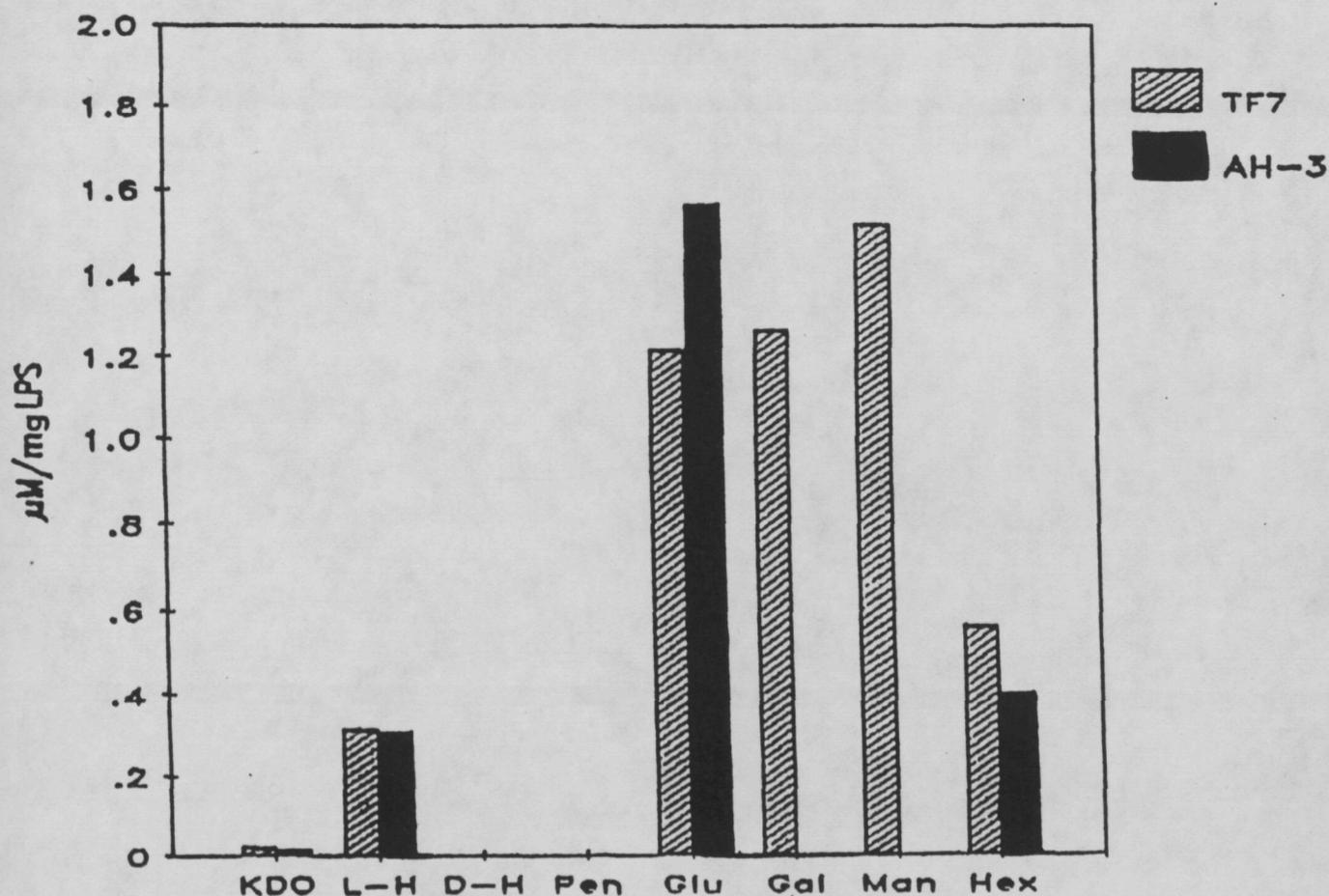
^{a)} Analizado por colorimetría (66).

^{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)}	Mannosa ^{b)}	Hexosamina ^{b)}
TF7	0.025	0.32	0	0	1.22	1.27	1.52	0.57
AH-3	0.018	0.31	0	0	1.57	0	0	0.41

GRAFICA 8: Histograma comparativo de la composición química del LPS purificado de las cepas AH-3 y TF7 de Aeromonas hydrophila.



d).- CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.

Tras purificar el LPS de la cepa TF7 de Aeromonas serogrupo O11, obtuvimos antisuero específico para el citado LPS, según la metodología descrita en el apartado 2.4.A. de esta Memoria, y determinamos mediante ELISA (39) el título de los anticuerpos específicos existentes en el mismo. Se determinó que a una dilución de 10^4 del antisuero se detectaban 100 ng. de antígeno (LPS de la cepa TF7).

Una vez establecido el título del antisuero se estudió la reactividad cruzada presente entre diferentes LPS de serogrupo O11 y otros serogrupos. Para ello, empleamos la técnica de ELISA (39) utilizando anti-LPS de la cepa TF7 como anticuerpo y como antígeno 10^5 células de las cepas de serogrupo O11 : TF7, LL1, ATCC9071, AH-205 y AH-121; y LPS purificado de las cepas AH-3 y ATCC7966 cuyo serotipo no es el O11. Al realizar esto, se observó que todas las cepas de serogrupo O11 presentaban reactividad cruzada y por el contrario, este anticuerpo no era capaz de reconocer a cepas con serogrupos diferentes al O11 (Tabla 33).

TABLA 33: ELISA empleando diferentes antígenos y anti-LPS obtenido a partir de LPS purificado de la cepa TF7.

Antígeno	D.O. ⁴⁰⁵
LPS de <u>Aeromonas hydrophila</u> TF7 (0.5 µg.)	1.42 +/- 0.07
LPS de <u>Aeromonas hydrophila</u> LL1 (0.5 µg.)	1.40 +/- 0.08
10 ⁵ células de <u>Aeromonas hydrophila</u> TF7	1.26 +/- 0.10
10 ⁵ células de <u>Aeromonas hydrophila</u> LL1	1.20 +/- 0.09
10 ⁵ células de <u>Aeromonas hydrophila</u> ATCC9071	0.94 +/- 0.12
10 ⁵ células de <u>Aeromonas hydrophila</u> AH-205	0.87 +/- 0.15
10 ⁵ células de <u>Aeromonas hydrophila</u> AH-121	0.90 +/- 0.08
LPS de <u>Aeromonas hydrophila</u> AH-3 (0.5 µg.)	<0.1
LPS de <u>Aeromonas hydrophila</u> ATCC7966 (0.5 µg.)	<0.1

3.3.B.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES PARA ESTRUCTURAS SUPERFICIALES DE LAS CEPAS DE SEROGRUPO O:11.

3.3.B.1.- OBTENCION DE MUTANTES O Y LAMINA-S

Para obtener los mutantes isogénicos para estructuras superficiales se llevó a cabo una mutagénesis con D.E.S. sobre las cepas TF7, AS-28 y ATCC9071 de serogrupo O11. Tras enriquecer el número de mutantes se realizó una contraselección mediante inmunoprecipitación durante 1 h. a 37°C con:

- a) Para seleccionar los mutantes S⁻, la inmunoprecipitación se realizó con anti-láminaS de la cepa TF7.
- b) Para seleccionar los mutantes O⁻, la inmunoprecipitación se realizó con anti-LPS de la cepa TF7.
- c) Para seleccionar los mutantes O⁻S⁻, se realizó una doble inmunoprecipitación, primero con anti-LPS y luego, con anti-lámina-S.

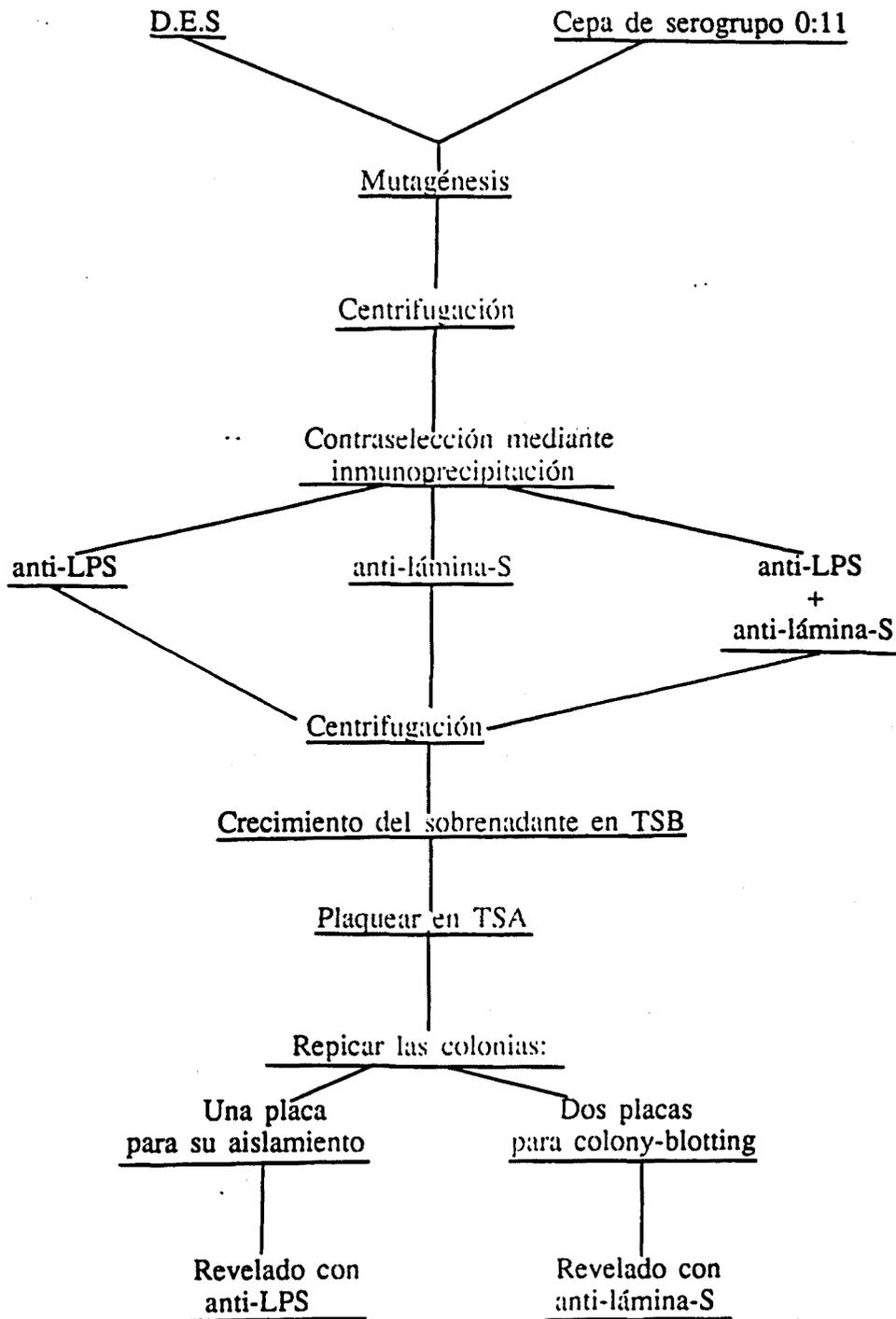
Posteriormente, se tomo cada sobrenadante y se colocó en un tubo con 2 ml. de TSB a 37°C durante 24 h. con agitación. Finalmente se plaqueó en TSA y las colonias que

la selección de los mutantes mediante la técnica de colony-blotting.

Según esto, con cada grupo de mutantes (cada placa) se realizaron dos colony-blotting: uno de ellos se reveló con anti-LPS y el otro, con anti-lámina-S; tal y como se describe en el esquema adjunto.

Tras realizar el revelado de los colony-blotting, se seleccionaron las colonias positivas para LPS y negativas para lámina-S como posibles mutantes O⁺:S⁻, las positivas para lámina-S y negativas para LPS como posibles O⁻:S⁺ y las negativas para ambos, como posibles O⁻:S⁻ (Tabla 34). Estos resultados se muestran en la figura 16.

ESQUEMA 1: Metodología utilizada para la obtención de los mutantes sogénicos O⁻ y/o lámina-S de cepas de Aeromonas móviles de serogrupo O11.



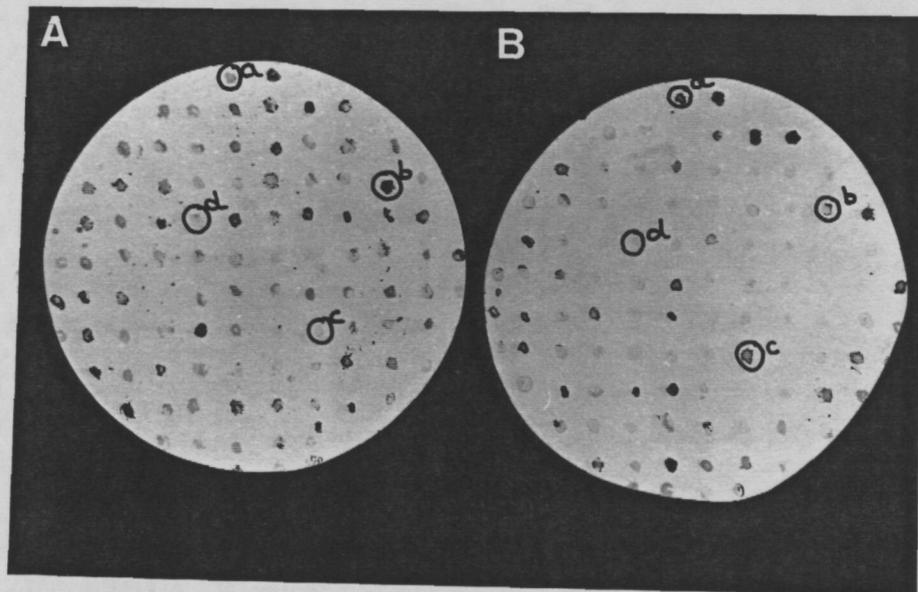


FIGURA 16: Colony-blotting para seleccionar los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de *Aeromonas hydrophila* serogrupo O11. A) Revelado con anti-LPS de la cepa TF7. B) Revelado con anti-lámina-S de la cepa TF7. En estos colony-blotting se puede apreciar la cepa salvaje TF7 (a) que es positiva para anti-láminaS y negativa para anti-LPS, debido al recubrimiento de esta estructura denominada lámina-S, (b) Mutante AH-45 tipo O⁺:S⁻, (c) Mutante AH-21 de tipo O⁻:S⁺ y (d) Mutante isogénico AH-26 tipo O⁻:S⁻

TABLA 34: Mutantes isogénicos de la cepa TF7 de Aeromonas hydrophila serogrupo O11, obtenidas mediante mutagénesis con DES.

Cepas	Características	Origen
TF7	O ⁺ :S ⁺	R. Lallier, Canada
AH-45	O ⁺ :S ⁻	Derivada de TF7
AH-21	O ⁺ :S ⁺	Derivada de TF7
AH-24	O ⁺ :S ⁺	Derivada de TF7
AH-25	O ⁺ :S ⁻	Derivada de TF7
AH-26	O ⁺ :S ⁻	Derivada de TF7
AH-27	O ⁺ :S ⁻	Derivada de AH-26
AH-100	O ⁺ :S ⁻	Derivada de AH-25

3.3.B.2.- OBTENCION DE MUTANTES FLAGELO

Los mutantes carentes de flagelo, AH-28 y AH-55, de la cepa TF7 de Aeromonas hydrophila serogrupo O11 se obtuvieron mediante resistencia al bacteriófago PM3, tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.E.1. de esta Memoria.

3.3.B.3.- CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES.

Tras seleccionar los posibles mutantes para estructuras superficiales, se comprobó la superficie de cada uno de ellos.

En primer lugar se determinó el LPS que presentaban, mediante geles SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata. Con ellos se observó que la cepa AH-45 (O⁺:S⁻), AH-28 y AH-55 (H⁻) presentaban un LPS completo idéntico al de la cepa salvaje TF7, es decir presentaban un núcleo y un antígeno O del LPS en forma de doble banda; la cepa AH-21 (O⁻:S⁺) presentaba un LPS incompleto, en el que no se apreciaba la existencia de antígeno O y únicamente hallabamos núcleo; la cepa AH-24 (O⁻:S⁺) posee un LPS similar al de la cepa AH-21, que sólo difiere en la movilidad electroforética, pues su núcleo presenta mayor movilidad que el de la cepa AH-21 y en consecuencia, es algo más corto; y finalmente, la cepa AH-26 (O⁻:S⁻) posee un LPS corto (solo núcleo) de mayor movilidad electroforética en SDS-PAGE que el de cualquier otro mutante y por consiguiente, el más corto de todos. Un dato significativo es que en numerosas ocasiones, las cepas de tipo (O⁻

S*) presentan una doble banda poco aparente a la altura del antígeno O del LPS, esto se debe a que los citados mutantes tienen capacidad para sintetizar el antígeno O del LPS, pero por alguna razón no pueden anclarlo a su superficie (Figura 17).

En segundo lugar, se determinó la composición química del LPS purificado de cada uno de estos mutantes y se observó que a medida que disminuía el núcleo del LPS aumentaba la cantidad de KDO, L-heptosas y mannosas; y disminuía el nivel de glucosa, galactosa y hexosaminas, tal y como se muestra en la tabla 35.

En tercer lugar, mediante ELISAs de competición utilizando como antígeno lámina-S purificada de A. hydrophila TF7 y anti-láminaS como anticuerpo, se comprobó la presencia o ausencia de dicha estructura superficial en los mutantes obtenidos (O* o O) (Tabla 36). No obstante es importante constatar que cepas carentes de lámina-S todavía pueden sintetizar la proteína S constitutiva de dicha lámina, pero son incapaces de estructurarla en forma de lámina y queda vertida al medio externo, tal como se ha comprobado mediante geles de acrilamida realizados con sobrenadantes precipitados y concentrados. Un hecho similar ocurre en los mutantes lámina-A negativos de A. salmonicida.

En cuarto lugar, se purificaron sus OM y mediante geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie blue se observó que sus proteínas de membrana externa eran idénticas a las de la cepa salvaje (TF7) de la que proceden. Luego, con las OM purificadas se realizó un Western-blotting revelado con anti-láminaS (Figura 18) en el que se observaba la presencia de lámina-S en la cepa salvaje TF7 (O*:S*) y en el mutante AH-21 (O:S*), la cepa AH-24



FIGURA 17: Gel SDS-PAGE a partir de LPS purificado de los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de serogrupo O11. Columnas: 1, Cepa salvaje TF7; 2, Cepa AH-45; 3, Cepa AH-21; 4, Cepa AH-24; y Cepa AH-26.

TABLA 35: Resumen de la composición química del LPS de los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de serogrupo O11.

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

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

µmoles/mg. de LPS de:

LPS	KDO ^{a)}	L-Heptosa ^{b)}	Pentosa ^{b)}	Glucosa ^{b)}	Galactosa ^{b)}	Mannosa ^{b)}	Hexosamina ^{b)}
TF7	0.025	0.32	0	1.22	1.27	1.82	0.57
AH-21	0.052	0.73	0	0.17	1.22	1.73	0
AH-24	0.11	0.98	0	0.08	0	2.12	0
AH-26	0.22	1.31	0	0.02	0	2.57	0
AH-27	0.11	0.98	0	0.12	1.27	1.28	0
AH-45	0.026	0.31	0	1.24	1.29	1.55	0.60
AH-28	0.023	0.29	0	1.19	1.25	1.48	0.55

GRAFICA 9: Histograma comparativo de la composición química del LPS purificado de los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de serogrupo O11.

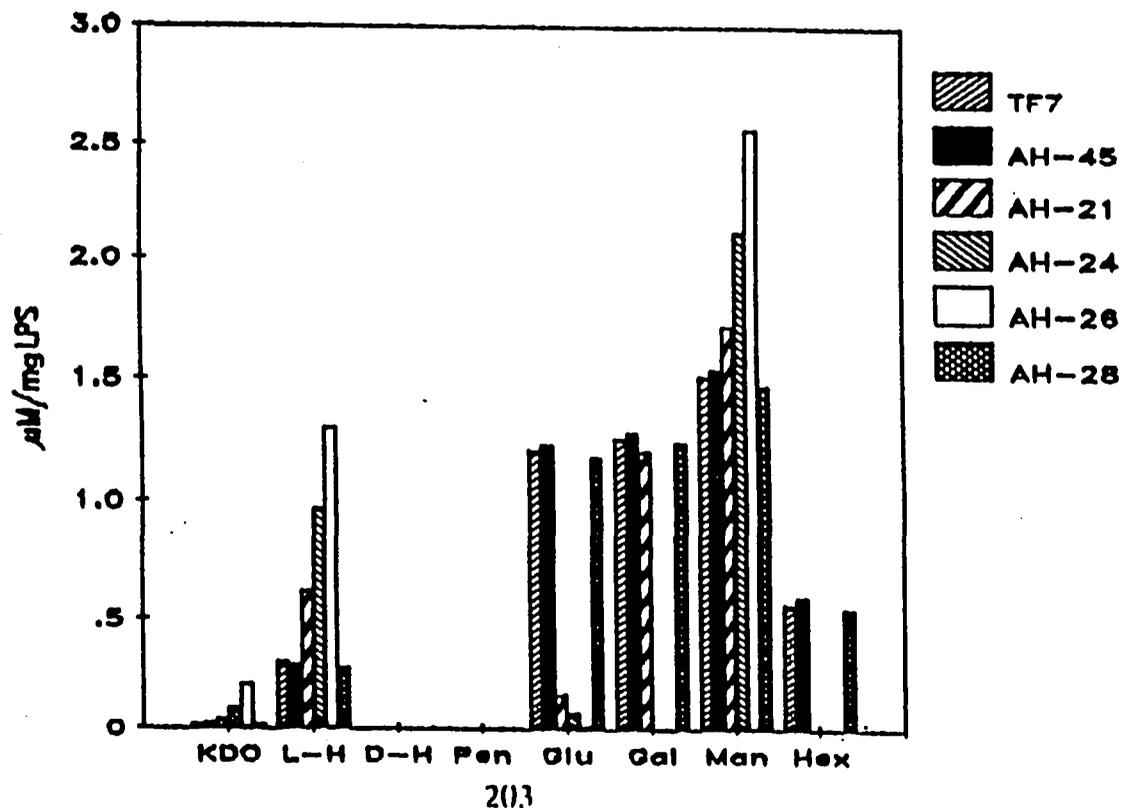


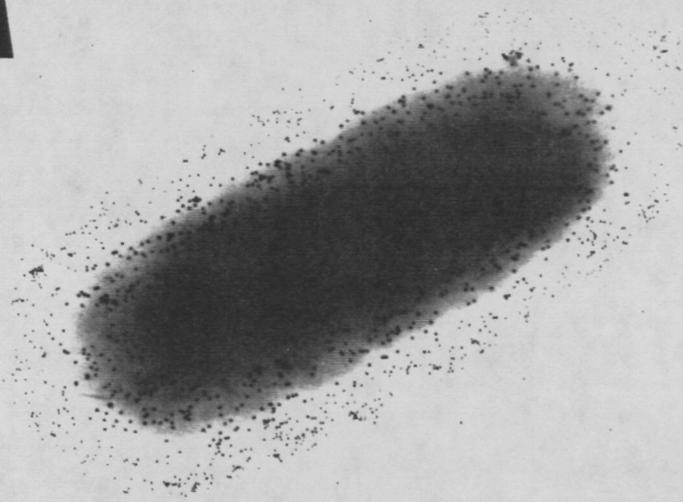
TABLA 36: ELISA de competición empleando como antígeno lámina-S de la cepa TF7 de serogrupo O11 y anti-laminaS adsorbido a diferentes mutantes isogénicos de la citada cepa bacteriana.

Anti-laminaS adsorbido con	O.D. ₄₀₅
Sin adsorber	1.30 +/- 0.06
10 ⁵ cél. de <u>A. hydrophila</u> TF7	0.30 +/- 0.09
10 ⁵ cél. de <u>A. hydrophila</u> AH-21	0.80 +/- 0.10
10 ⁵ cél. de <u>A. hydrophila</u> AH-45	1.25 +/- 0.05
10 ⁵ cél. de <u>A. hydrophila</u> AH-26	1.22 +/- 0.06
10 ⁵ cél. de <u>A. hydrophila</u> AH-24	1.12 +/- 0.08



FIGURA 18: Western-blotting de OM purificadas de los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de A. hydrophila, revelado con anti-lámina-S. Columnas: A, Cepa TF7; B, Cepa AH-45; C, Cepa AH-21; D, Cepa AH-26; E, AH-25.

A



B

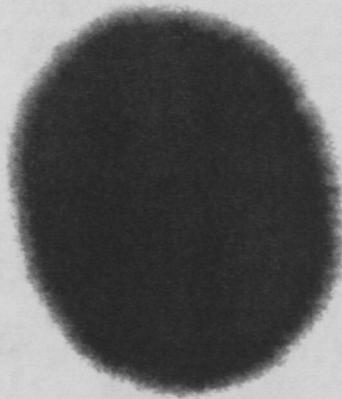
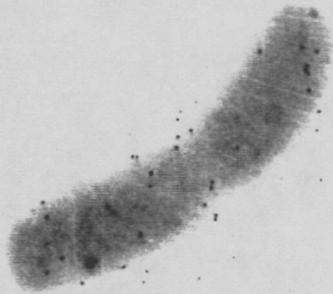


FIGURA 19: Marcaje de los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de *A. hydrophila* con anti-LPS unido a proteína-A-oro de 20 nm. A) Cepa AH-45 (O⁻:S⁻) y B) Cepa parental TF7 (O⁻:S⁻).

A



B

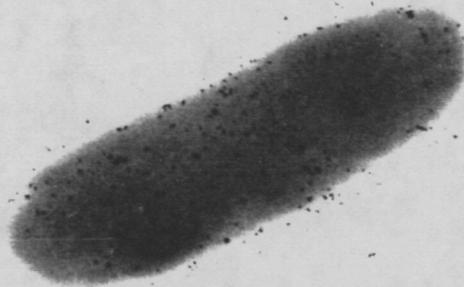


FIGURA 20: Marcaje de los mutantes isogénicos de la cepa TF7 de A. hydrophila con anti-LPS unido a proteína-A-oro de 20 nm. y anti-lámina-S unida a proteína-A-oro de 10 nm. A) Cepa AH-45 y B) Cepa TF7