



**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<sup>a</sup> 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

## Capítulo 1

### 1.3.- Resultados

#### 1.3.1.- Caracterización parcial de las aguas residuales estudiadas

Las muestras de agua residual bruta, provenientes de las plantas de tratamiento 1 y 2 descritas en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, presentaron unos niveles de colifagos somáticos titulados sobre *E. coli* CN13 y de bacteriófagos que infectan a *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 bastante constantes en aguas residuales urbanas. Las aguas residuales de matadero presentaron mayor variabilidad en cuanto a dichos valores (Tabla 1.1).

El número de colifagos somáticos se utilizó como parámetro de referencia para caracterizar las muestras, ya que sus niveles en aguas residuales urbanas son muy constantes y altamente correlacionados con parámetros de contaminación fecal, como por ejemplo coliformes fecales.

**Tabla 1.1.-** Media geométrica del número de bacteriófagos infecciosos sobre *E. coli* CN13 y O157:H7(ATCC 43888) (ufp/ml) en las muestras de agua residual utilizadas para este estudio.

<i>Origen</i>	<i>n</i>	Bacteriófagos infecciosos de <i>E. coli</i> CN13	Bacteriófagos infecciosos de <i>E. coli</i> O157:H7
Entrada depuradora físicoquímica (Planta 1)	32	2,3.10 <sup>4</sup> (7,4.10 <sup>4</sup> - 4,5.10 <sup>3</sup> ) <sup>(a)</sup>	4,3. 10 <sup>2</sup> (2,1.10 <sup>3</sup> - 7,4.10 <sup>1</sup> )
Entrada depuradora biológica (Planta 2)	20	1,6. 10 <sup>4</sup> (6,0.10 <sup>4</sup> - 2,8.10 <sup>3</sup> )	2,9 10 <sup>2</sup> (8,9.10 <sup>2</sup> - 7,1.10 <sup>1</sup> )
Agua residual de matadero	8	1,7.10 <sup>5</sup> (1,2.10 <sup>6</sup> - 1,8.10 <sup>4</sup> )	ND <sup>(b)</sup>

(a) Valores máximos y mínimos de titulación en las muestras estudiadas.

(b) No disponible

NOTA: Este estudio se realizó durante un periodo de 19 meses comprendidos entre Junio de 1995 y Enero de 1997.

### **1.3.2.- Purificación de bacteriófagos a partir de agua residual**

#### **1.3.2.1.- Comprobación y adecuación del proceso de purificación de los bacteriófagos**

##### **1.3.2.1.1.- Purificación alternativa por gradientes de CsCl**

Para verificar que el gen de la toxina iba ligado a bacteriófagos, se realizó en un cierto número de muestras la purificación de los mismos por gradientes de CsCl.

Se observó una banda gris-azulada en la interfase que correspondía aproximadamente a la densidad 1.45 g/l, entre el gradiente de 1.3 y el de 1.5 g/l, correspondiente a la densidad de la mayoría de los bacteriófagos (Franki y col., 1991). Los resultados en paralelo con muestras sometidas a este proceso y las mismas muestras en que se obvió este paso, no dieron diferencias en las pruebas posteriores de amplificación por PCR. Por lo tanto, después de las primeras experiencias, se dejó de realizar esta etapa adicional de purificación, ya que se consideró que no era necesaria.

##### **1.3.2.1.2.- Tratamiento con nucleasas**

Los resultados de amplificación de muestras purificadas en paralelo con/sin tratamiento con nucleasas, constataron que no se observaban diferencias entre ambos protocolos.

En los resultados de los estudios con ADN añadido artificialmente a la muestra, se pudo comprobar la eficacia de actuación de la ADNasa en agua residual, puesto que no se detectó ADN en las muestras tratadas con ADNasa, pero si en aquéllas en que no se utilizó. No obstante, se mantuvo el tratamiento con ADNasa para eliminar la posibilidad de contaminación de ADN presente en la muestra.

En el caso de utilización de ARNasa, puesto que el ARN es mucho más inestable y tampoco se observaron diferencias en experimentos paralelos, se eliminó su uso del protocolo.

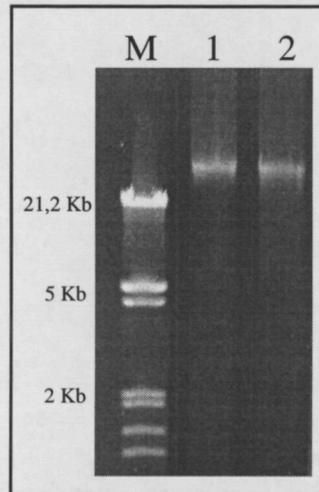
### **1.3.3.- Extracción de ADN de bacteriófagos**

La extracción de ADN fue visualizada en cada muestra mediante el gel de 0.8 % de agarosa. Los resultados de muestras de agua residual directa en muchas ocasiones no permitieron visualizar banda alguna, en otras ocasiones se observó una banda de tamaño superior a las 21,2 Kb.

Si bien no se verificó el peso molecular de la banda visualizada, dado que no tenía que corresponder necesariamente al genoma de los fagos que se pretendían detectar, el tamaño que presentó podría corresponder a distintas familias de bacteriófagos, (por ejemplo, fagos de la familia *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* presentan un genoma de peso molecular superior a las 21,2 Kb)

Esta banda fue observada principalmente en las muestras correspondientes a 100 ml de agua residual tratada (Figura 1.1).

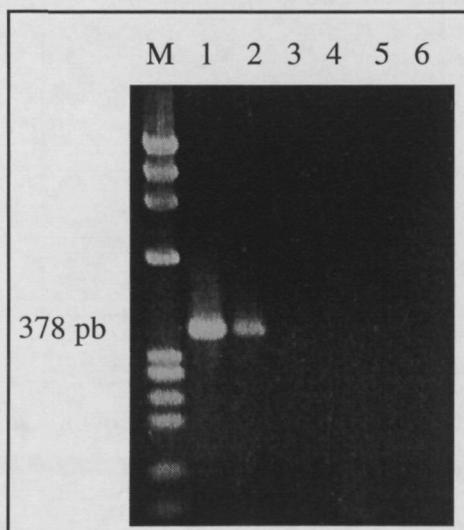
**Figura 1.1.-** Gel de 0.8 % de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carril M correspondiente al marcador, ADN de fago lambda cortado con los enzimas de restricción Hind III y EcoR I. Carriles 1 y 2 correspondientes al ADN extraído de los bacteriófagos purificados a partir de un volumen de 100 ml del agua de entrada de una depuradora de tratamiento fisicoquímico (planta 1).



#### **1.3.4.- Reconocimiento molecular y amplificación del gen de la Stx 2: Primera PCR**

Los productos amplificados obtenidos a partir de la primera PCR se intentaron visualizar mediante en un gel de 2 % de agarosa. En éste, se observó una banda de 378 pb, correspondiente al fragmento incluido entre los cebadores utilizados, tan sólo en las amplificaciones correspondientes a los controles positivos. Sin embargo, en el caso de las muestras analizadas no se observaron bandas visibles en dicho gel de agarosa. (Figura 1.2).

**Figura 1.2.-** Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Carril 1, control positivo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (portadora del gen de la Stx 2). Carril 2, control positivo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído del fago 933 W(portador del gen de la Stx 2). Carril 3, control negativo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no portadora del gen de la Stx 2). Carriles 4-6, amplificaciones por PCR del ADN extraído de bacteriófagos purificados de 100, 10 y 1 ml de agua residual respectivamente. Carril M presenta el marcador  $\Phi$ X-174-RF digerido con Hae III.

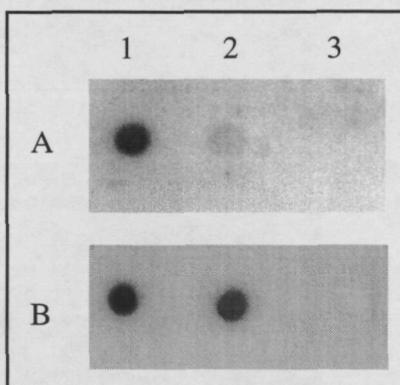


### 1.3.5.- Caracterización complementaria y aumento de sensibilidad del método

#### 1.3.5.1.- Hibridación con la sonda interna de los amplímeros obtenidos

Como ya se detalló en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, se realizó inicialmente una comparación de los resultados obtenidos al utilizar la sonda interna marcada con digoxigenina y la sonda interna marcada radiactivamente (Figura 1.3).

**Figura 1.3.-** Comparación de hibridación por "dot blot" de las mismas muestras comparando (A) la sonda marcada con digoxigenina, con (B) la sonda marcada radiactivamente. A-1 y B-1: amplificación por primera PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (positiva para la Stx 2), A-2 y B-2 amplificación por primera PCR del ADN de fagos purificados a partir de 100 ml de agua residual, A-3 y B-3 amplificación por primera PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (negativa para la Stx 2).



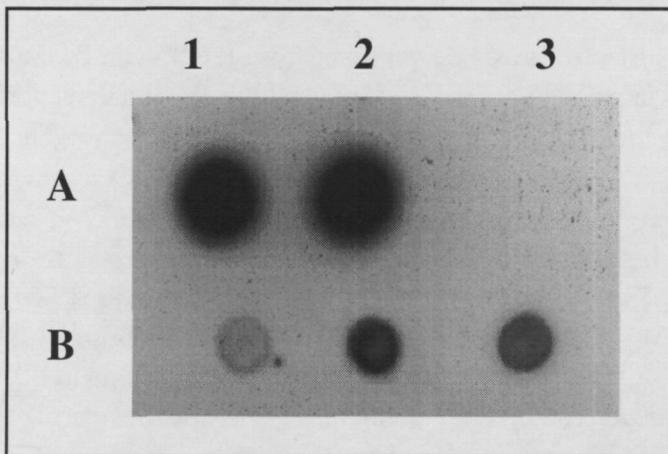
Si bien no se han verificado los límites de sensibilidad de ambos métodos. Al comparar los resultados obtenidos con la sonda marcada con digoxigenina y la sonda marcada radiactivamente, se observó que muestras para las cuales la sonda marcada con digoxigenina expresó un resultado negativo o poco visible, sin embargo dieron claros positivos cuando se hibridaron con la sonda radiactiva.

Por ello se decidió utilizar la sonda radiactiva en los siguientes experimentos. Los resultados de "dot blot" y "Southern blot" que se presentan a continuación se realizaron con este método.

#### 1.3.5.1.1.- "Dot blot"

Algunas de las muestras amplificadas en la primera PCR mostraron una señal clara al hibridarlas con la sonda marcada radiactivamente (Figura 1.4), aún en aquellos casos en que no se visualizó el amplímero obtenido mediante el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio

**Figura 1.4.-** "Dot blot" del producto amplificado obtenido en la primera PCR ,a partir del ADN de diferentes muestras, hibridado con la sonda marcada con <sup>32</sup> P. A1, control positivo de bacteria (*E. coli* O157:H7 ATCC 43889); A2, control positivo de bacteriófago (933 W); A3, Control negativo de bacteria (*E. coli* O157:H7 ATCC 43888); B1, B2 y B3 amplímeros obtenidos mediante la primera amplificación por PCR del ADN de fagos purificados de 100 ml de agua residual, no visualizados por gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.



#### 1.3.5.1.2.- "Southern blot"

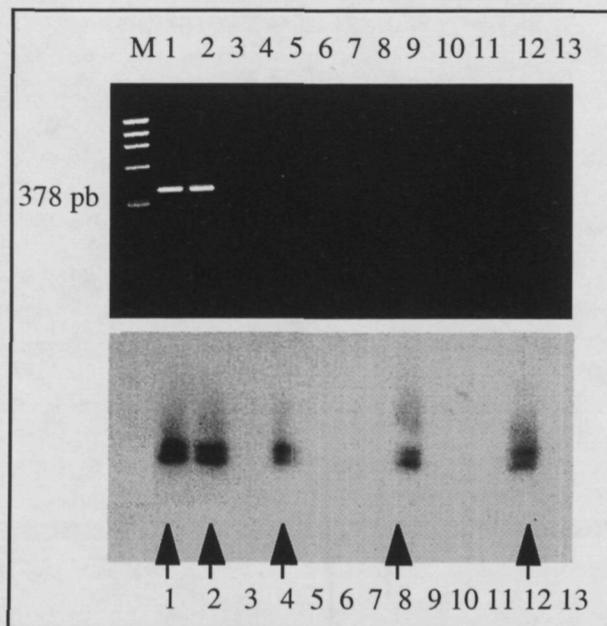
Como se indica en el apartado de Materiales y Métodos Generales, existen dos metodologías para la transferencia del gel de agarosa a una membrana, previa a la realización del "Southern blot". Esta transferencia puede realizarse bien partiendo de un gel de agarosa vertical mediante el protocolo "Sandwich", o bien partiendo de un gel de agarosa horizontal y realizando una transferencia semi-seca (Semi-Dry Blotter 5010) Ambos protocolos mostraron una buena eficiencia, si bien metodológicamente resulta más fácil la transferencia por "semi-dry".

Por este motivo, éste fue el método utilizado y con él se obtuvieron los resultados que se muestran en esta memoria de tesis.

En la Figura 1.5 se puede observar en el panel inferior un "Southern blot" realizado a partir de un gel de agarosa realizado con los productos amplificados de la

primera PCR. Éste fue transferido a una membrana de nylon por el tipo de transferencia "semi-dry". El ADN extraído de fagos purificados de volúmenes de 100, 10 y 1 ml de agua residual y amplificado por primera PCR no fue visualizado mediante el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, a excepción de los controles positivos, como ya se indicó en el apartado 1.3.4.

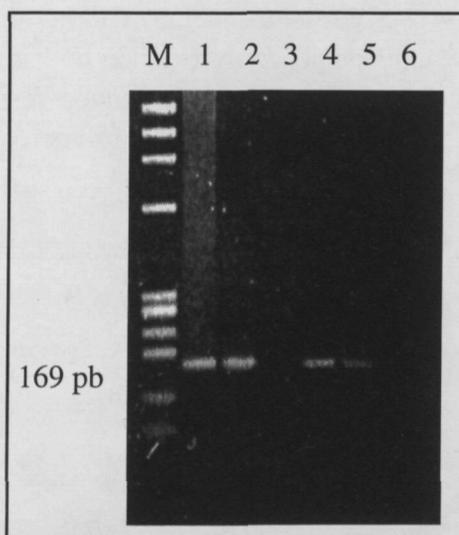
**Figura 1.5.- (A)** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de a partir de los productos de la primera amplificación por PCR. **(B)** Análisis por "Southern blot" del gel de agarosa del panel A hibridado con la sonda marcada radiactivamente. Carril 1, amplificación del ADN obtenido de *E. coli* ATCC 43889, portadora del gen de la Stx 2; Carril 2 amplificación del ADN obtenido del fago 933W; carriles 4, 8 y 12, amplificación del ADN obtenido de fagos purificados a partir de 10 ml de agua residual; carriles 5, 9 y 13 amplificación del ADN obtenido de fagos purificados a partir de 1 ml de agua residual; carriles 3, 6 y 10 amplificación del ADN obtenido de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, que no es portadora del gen de la Stx 2; carriles 7, 11 y 14 controles negativos que no contienen ADN molde; carril M, Marcador de pesos, ØX-174-RF digerido con Hae III.



### 1.3.5.2.- PCR anidada

Al realizar una segunda amplificación por PCR anidada a partir de las muestras amplificadas por primera PCR, sí se observaron resultados positivos en algunas de las muestras (Figura 1.6) al igual que se observó con la hibridación con la sonda interna. En este caso, amplímeros de 169 pb, obtenidos con los cebadores utilizados, fueron visualizados en un gel de agarosa, tanto en los controles positivos como en las muestras positivas.

**Figura 1.6.-** Gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio. Carril 1, control positivo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (positiva para Stx 2). Carril 2, control positivo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído del fago 933 W. Carril 3, control negativo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (negativa para Stx 2). Carriles 4-6, Amplificaciones por PCR del ADN extraído de bacteriófagos purificados de 100, 10 y 1 ml de una muestra de agua residual. Carril M presenta el marcador ØX-174-RF digerido con Hae III.



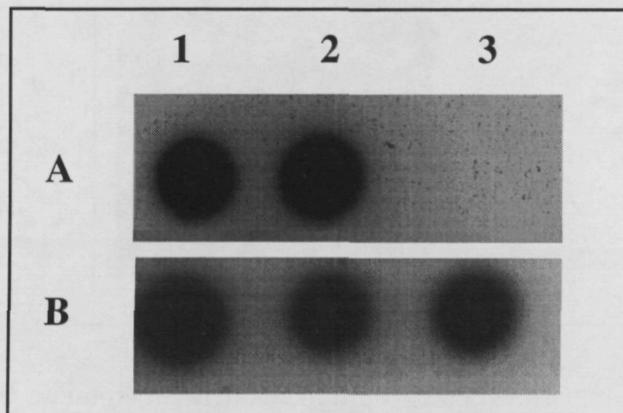
Durante los experimentos de optimización del método se utilizaron diversos controles positivos y negativos como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo. Los controles positivos de cepas productoras de Stx 2,

*E. coli* O157:H7 ATCC 43984 y ATCC 35150, los controles negativos de cepas no productoras de Stx 2, *E. coli* CN13, K5 y K12, así como el control negativo de bacteriófago no portador del gen de la Stx 2 (fago B 40-8 de *Bacteroides fragilis*) dejaron de utilizarse después de comprobar la correcta especificidad de los cebadores utilizados.

### 1.3.5.2.1.- "Dot blot"

Del mismo modo que para los amplímeros obtenidos por primera PCR, los amplímeros obtenidos por PCR anidada se comprobaron mediante "dot blot" como verificación adicional de que correspondían a un fragmento del la secuencia del gen de la Stx 2 (Figura 1.7).

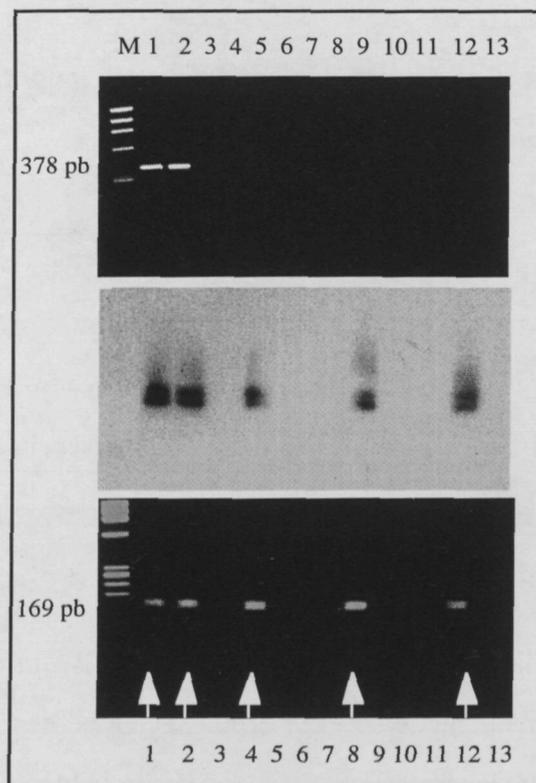
**Figura 1.7.-** "Dot blot" hibridado con la sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  de los amplímeros obtenidos por PCR anidada. A1: *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (portadora del gen de la Stx 2); A2: Bacteriófago 933 W portador del gen de la Stx 2; A3: *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no portadora del gen de la Stx 2); B1, B2 y B3: Amplificaciones por PCR anidada del ADN extraído de bacteriófagos purificados de 100, 10 y 1 ml de la muestra de agua residual, (cuyos resultados de PCR anidada visualizados mediante un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se muestran en la Figura 1.6).



**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**

Al comparar los resultados obtenidos con la PCR anidada con los resultados obtenidos con la primera PCR y el "Southern blot" (Figura 1.5), se observó que las muestras positivas detectadas por "Southern blot" de los amplímeros de la primera PCR, coincidían con las detectadas por PCR anidada en todos los casos estudiados, véase una muestra en la Figura 1.8.

**Figura 1.8** Comparación de los resultados obtenidos mediante la primera PCR (A), "Southern blot" (B) y la PCR anidada (C) de las mismas muestras. Carril 1, amplificación del ADN de *E. coli* ATCC 43889, que no es portadora del gen de la Stx 2; Carril 2 amplificación del ADN del fago 933W; carriles 4, 8 y 12, ADN amplificación del ADN obtenido de fagos purificados a partir de 10 ml de agua residual; carriles 5, 9 y 13 amplificación del ADN obtenido de fagos purificados a partir de 1 ml de agua residual 3, 6 y 10 ADN amplificación del ADN obtenido de la *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, que no es portadora del gen de la Stx 2; carriles 7, 11 y 14 controles negativos que no contienen ADN molde; carril M, Marcador de pesos, ØX-174-RF digerido con Hae III.



### **1.3.5.3.- Secuenciación de los amplímeros obtenidos**

Dependiendo de la muestra y de la eficacia del proceso, la longitud de la cadena secuenciada osciló entre 110 pb hasta 150 pb. La mayoría de las secuencias obtenidas resultaron ser totalmente homólogas a la secuencia descrita en el banco genético de la EMBL para el gen de la Stx 2 inserto en el genoma del fago 933 W (código EMBL X07865).

Se secuenciaron cinco muestras del total de muestras estudiadas, cuatro de ellas mostraron una homología del 100 % con la secuencia de la Stx 2 en una longitud de 130 pb, sin embargo una de las secuencias mostró un 97,5 % de homología observándose un nucleótido de diferencia y dos deleciones. Las implicaciones de dichas diferencias se comentan en la discusión de este capítulo. Las diferencias observadas en esta muestra, no son coincidentes con alguna secuencia de variantes de la Stx 2 previamente descritas en los bancos genéticos.

### **1.3.6.- Estimación de fagos totales portadores del gen de la Stx 2 en agua residual y aguas de matadero**

Los resultados obtenidos por PCR anidada para los diferentes volúmenes de agua residual urbana y para el agua residual de matadero se expresan en la Tabla 1.2. Se obtuvieron resultados positivos para bacteriófagos purificados a partir de 100 ml y 10 ml de agua residual urbana, pero nunca se detectó la presencia del gen de la toxina en volúmenes inferiores de agua residual.

Tratando conjuntamente todas aquellas muestras de un mismo origen, se pudo obtener una estimación del número de bacteriófagos portadores del gen en muestras de agua residual, aplicando la técnica del Número Más Probable.

Cabe señalar que al hacer esta aproximación no se pretende cuantificar, sino realizar una estimación del número de bacteriófagos que transportan el gen de la Stx 2.

El número de fagos portadores del gen de la Stx 2 indicado, correspondería al número real de fagos presentes en agua residual, en el caso hipotético de que el límite de sensibilidad del método fuera de 1 bacteriófago (el límite de sensibilidad no ha podido ser verificado como se comenta en la discusión de este capítulo).

No se realizó estimación de los valores correspondientes a agua residual de matadero, dado que en estas muestras sólo se estudió un volumen (10 ml). Los resultados obtenidos en aguas residuales de matadero sólo indican que la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 no es exclusiva de aguas residuales con contaminación fecal humana.

**Tabla 1.2.-** Estimación del número de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales urbanas.

Muestra	Volumen de agua analizada (ml)					NMP
	100 <sup>(a, b)</sup>	10	1	0,1	0,01	(Límite de confianza 95 %)
	(5)	(0,5)	(0,05)	(0,005)	(0,0005)	(fagos/ml) <sup>(c)</sup>
<b>Planta 1</b>	10/10 <sup>(d)</sup>	13/13	0/12	0/12	0/5	<b>0,24</b> (0,13 - 0,44)
<b>Planta 2</b>	7/7	4/4	0/2	-	-	<b>0,3</b> (0,085 - 1,09)
<b>Matadero</b>	-	7/7	-	-	-	ND <sup>(e)</sup>

(a) Volumen de agua residual a partir de la que se purificaron los bacteriófagos

(b) Dado que se amplificó 1 µl de los 20 µl totales en lo que se resuspendió el ADN extraído (ver apartado Materiales y Métodos), se han ajustado los volúmenes del agua residual a esta relación 1/20, por tanto los valores expresados entre paréntesis como 5, 0,5 ; 0,05 ; 0,005 y 0,0005 , corresponderían a experimentos realizados partiendo de volúmenes de 100, 10, 1, 0.1 y 0,01 ml de agua residual.

(c) Partículas físicas

(d) Número de muestras positivas sobre el total de muestras analizadas.

(e) Datos no disponibles debido al bajo número de análisis realizado.

### **1.3.7.- 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)**

Para comprobar la infectividad de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 sobre *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, se realizaron cultivos de enriquecimiento.

Al infectar un cultivo con bacteriófagos purificados de un volumen de agua residual, estos bacteriófagos infectan la cepa bacteriana presente en el cultivo, se multiplican en su interior y acaban produciendo una lisis de la célula bacteriana, por lo que quedan libres en el sobrenadante del cultivo.

De este modo en el sobrenadante de los cultivos se obtuvieron un número de fagos, todos ellos infecciosos para *E. coli* O157:H7, superior al número inicial de fagos con los que se realizó la infección.

Se estudió si entre los fagos infecciosos para O157:H7, presentes en el sobrenadante de los cultivos de enriquecimiento, se encontraban aquéllos que son portadores del gen de la Stx 2

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

Se realizaron experimentos de detección de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2, presentes en los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento. Para ello se purificaron los fagos presentes en el sobrenadante de dichos cultivos, se extrajo su ADN y, a partir de éste, se amplificó un fragmento del gen de la Stx 2 mediante primera PCR y PCR anidada, como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos por PCR anidada de un porcentaje de las muestras se verificaron mediante hibridación con sonda radiactiva ("Southern blot") de los productos amplificados

obtenidos a partir de la primera PCR. Los productos amplificados por PCR anidada se caracterizaron mediante secuenciación.

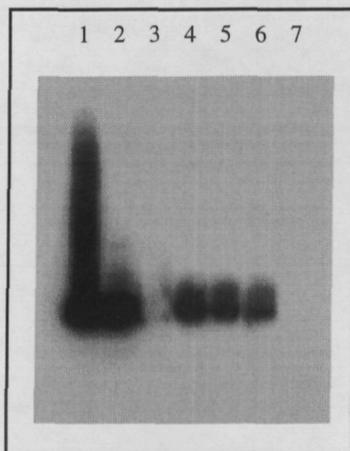
#### 1.3.7.1.1.- Primera PCR

Como ya sucedió anteriormente, los amplímeros obtenidos por primera PCR de las muestras analizadas, correspondientes a ADN extraído de fagos purificados de los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento, no fueron visualizados en la mayoría de las ocasiones mediante un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

#### 1.3.7.1.2.- "Southern blot"

Tal como se realizó anteriormente con los fagos purificados directamente de las muestras de agua residual, también en los experimentos de enriquecimiento se realizó hibridación con la sonda interna marcada radiactivamente (Figura 1.9) de los productos amplificados obtenidos en la primera PCR,

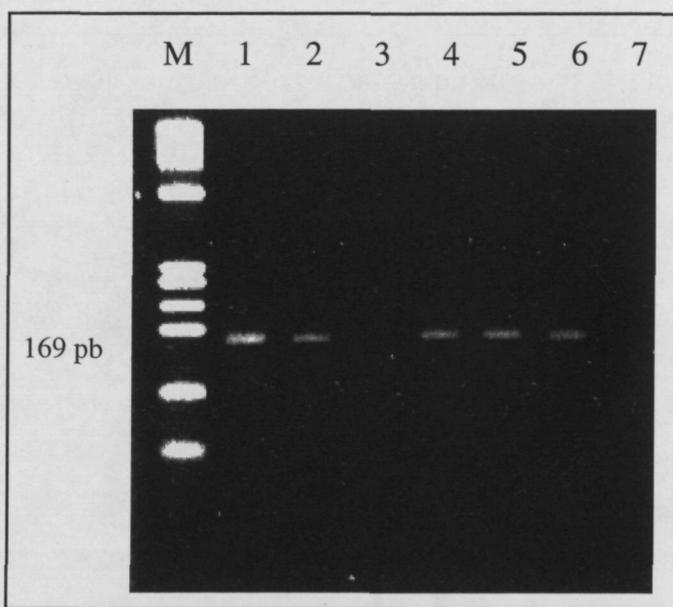
**Figura 1.9.-** "Southern blot" de un gel de 3 % de agarosa, hibridado con la sonda interna marcada radiactivamente. Carriles 1 y 2: controles positivos correspondientes a la amplificación por PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 y del fago 933 W, respectivamente. Carril 3: control negativo correspondiente a la amplificación por PCR del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. Carriles 4-7 amplificaciones por PCR del ADN extraído de fagos purificados del sobrenadante de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos parcialmente purificados de 10, 1, 0,1 y 0,01 ml de agua residual.



### 1.3.7.1.3.- PCR anidada

En las muestras indicadas posteriormente en la tabla 1.4, se obtuvo por PCR anidada un amplímero de 169 pb, correspondiente a un fragmento del gen de la Stx 2. (Figura 1.10).

**Figura 1.10.-** Gel de 3 % de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 2: controles positivos correspondientes a la amplificación por PCR anidada del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 y del fago 933 W respectivamente. Carril 3: control negativo correspondiente a la amplificación por PCR anidada del ADN extraído de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. Carriles 4-7 amplificaciones por PCR anidada del ADN extraído de fagos purificados del sobrenadante de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos parcialmente purificados de 10, 1, 0,1 y 0,01 ml de agua residual. (Corresponden a las mismas muestras que se presentaron en la Figura 1.9)



De nuevo se puede observar que los resultados obtenidos por PCR anidada coinciden con los obtenidos por "Southern blot" de la primera PCR (Figura 1.9).

### **1.3.7.2.- Secuenciación de los amplímeros correspondientes a los sobrenadantes de enriquecimiento**

Se realizó la secuenciación de los amplímeros obtenidos por PCR anidada de cinco series de cultivos de enriquecimiento. En cada serie, los cultivos habían sido infectados con fagos provenientes de 10, 1, 0,1, y 0,01 ml de agua residual. De algunos de estos cultivos se obtuvieron amplímeros de 169 pb correspondientes al fragmento del gen de la Stx 2. Para cada serie estudiada, se escogieron para secuenciar los amplímeros obtenidos con los cultivos infectados con menor volumen de fagos purificados de agua residual donde se detectó amplímero de 169 pb. Por ejemplo, si en una misma serie de cultivos se detectaron amplímeros de 169 pb en los cultivos infectados con fagos purificados de 10, 1 y 0,1 ml de agua residual, se escogió para secuenciar el amplímero correspondiente al cultivo infectado con fagos purificados a partir de 0,1 ml de agua residual.

Los resultados obtenidos por secuenciación de los amplímeros de PCR anidada del ADN de bacteriófagos purificados de los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento mostraron una elevada homología con la secuencia descrita en los bancos genéticos para el gen de la Stx 2 del fago 933 W.

En el siguiente capítulo se exponen con mayor detalle los resultados obtenidos en estas cinco series de cultivos de enriquecimiento.

### **1.3.8.- Determinación de la producción de la toxina en cultivos infectados**

Se realizaron dos tipos de estudios para comprobar, si después de la infección de fagos purificados de agua residual, se detectaba la Stx 2 en los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (inicialmente no productora de la toxina). Esto indicaría que los fagos transportan el gen completo de la toxina incorporado a su genoma.

En primer lugar se estudió la presencia de la subunidad A de la toxina en el sobrenadante de los cultivos infectados, en segundo lugar se estudió si los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento presentaban actividad citotóxica sobre cultivos de células Vero.

### **1.3.8.1.- Determinación de la presencia de la proteína**

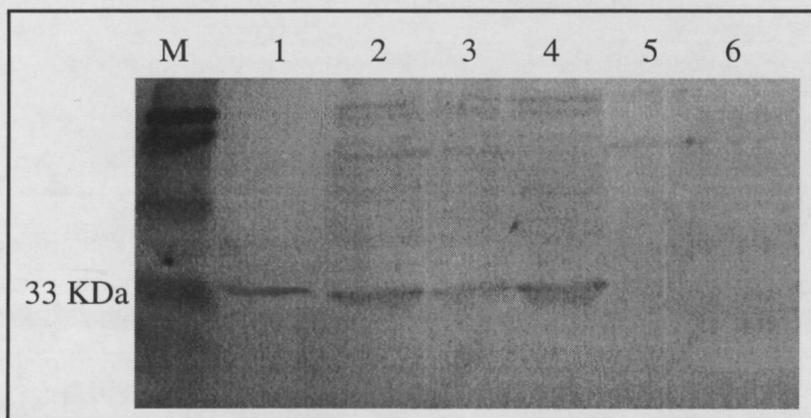
Se utilizaron para el estudio los sobrenadantes obtenidos a partir de cuatro series de cultivos de enriquecimiento de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 después de haber sido infectados con bacteriófagos purificados de volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml de agua residual urbana. Estos sobrenadantes se escogieron por haber dado previamente resultados positivos para el gen de la Stx 2 en experimentos de amplificación por PCR anidada

#### **1.3.8.1.1.- "Western blot"**

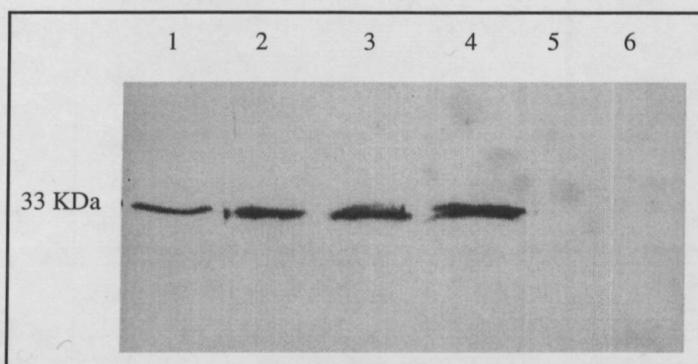
Se observó que la subunidad A de la toxina era detectada en estos sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento realizados con *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (inicialmente no productora de la Stx 2). Efectivamente, en el "Western blot" realizado con el sobrenadante de los cultivos de enriquecimiento, se observó una banda mucho más marcada que migró a la altura correspondiente al peso molecular de 33 kDa, que se esperaba para la subunidad A de la Stx 2. Esta misma banda fue claramente observada en el control positivo utilizado (O157:H7 ATCC 43889), sin embargo, no aparecía ni en el control negativo (O157:H7 ATCC 43888) ni en el control de agua residual. (Figura 1.11).

Esta banda más destacada, que migró a la altura correspondiente 33 kDa, se recortó, y a partir de la proteína purificada se realizó un "Western blot" y su correspondiente inmunodetección. En esta prueba se apreció con mucha más claridad la banda correspondiente al peso molecular de la subunidad A de la Stx 2 (Figura 1.12).

**Figura 1.11.-** "Western blot" (realizado con el anticuerpo monoclonal anti-subunidad A de la Stx 2) sobre una membrana de nitrocelulosa. Posición 1, sobrenadante de un cultivo sonicado de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (productora de Stx 2).; Posiciones 2, 3 y 4, sobrenadantes concentrados de cultivos de enriquecimiento realizados sobre *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 infectados con 10, 1 y 0.1 ml de agua residual tratada, respectivamente. Posición 5, sobrenadante de un cultivo sonicado de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no productora de Stx 2). Posición 6 agua residual tratada utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento. M marcador preteñido de pesos moleculares de proteínas estándar en kDa.



**Figura 1.12.-** Igual que la Figura 1.11, después de cortar y purificar una tira del gel SDS-PAGE en la zona donde se espera que migre la subunidad A.



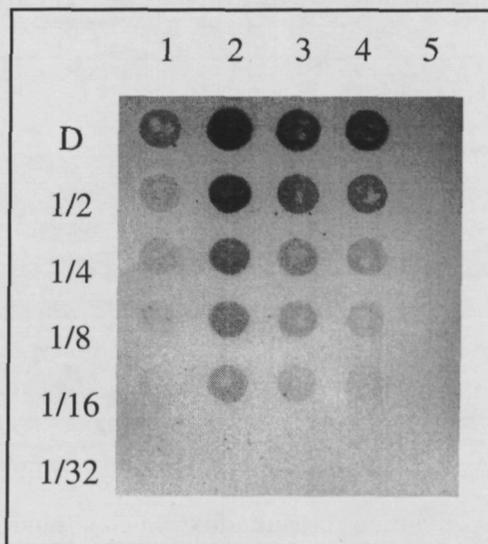
Se obtuvieron idénticos resultados en las cuatro series de cultivos de enriquecimiento estudiadas.

### 1.3.8.1.2.- Inmunoblot semicuantitativo

El inmunoblot semicuantitativo de una de las series de cultivos de enriquecimiento estudiadas, permitió observar visualmente la diferencia de producción de toxina en los enriquecimientos de cultivos de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 infectados con diferentes volúmenes de agua residual (Figura 1.13).

No se pretendió en ningún momento dar ningún valor ni sacar ninguna conclusión de estos resultados, sólo fue una comprobación más de que se evaluaba una producción variable causada por la infección con números diferentes de bacteriófagos purificados a partir de diferentes volúmenes de agua residual.

**Figura 1.13.-** Inmunoblot de preparaciones crudas para la semicuantificación de los antígenos de la toxina. Se realizaron diluciones 1/2 seriadas de los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento realizados sobre *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, infectados con fagos purificados a partir de 10, 1 y 0.1 ml de agua residual (posiciones 2, 3 y 4 respectivamente) y de los sobrenadantes de cultivos sonicados de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (posición 1) y ATCC 43888 (posición 5). Una gota de cada dilución se aplicó sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Stx 2-A (11E10).



#### 1.3.8.1.3.- Ensayo de citotoxicidad

Las pruebas realizadas sobre células Vero mostraron citotoxicidad para los controles positivos. Efectivamente, se observó citotoxicidad en los sobrenadantes filtrados obtenidos del sonicado de un cultivo de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (productora de la toxina). El efecto citopatológico fue detectado hasta la dilución  $10^{-4}$  de dichas muestras a las 24 horas de haber realizado el inóculo.

También, aunque en valores más bajos, se obtuvieron resultados positivos para el sobrenadante de un cultivo sonicado de *E. coli* C600 (933 W). Los efectos en este caso fueron visibles a las 48 horas de incubación.

El control negativo de bacteria (O157:H7 ATCC 43888), no presentó toxicidad al inocular el sobrenadante filtrado del lisado celular obtenido por sonicación, ni siquiera después de 72 horas de incubación.

En cuanto a las muestras analizadas, correspondientes a los sobrenadantes de cuatro series de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml de agua residual, cabe destacar que se descartó una de las series. El motivo fue que el agua residual procesada utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento de esta serie, presentó también un efecto citotóxico por sí misma. Tan sólo se tuvieron en cuenta las otras tres series, en que se comprobó que la citotoxicidad únicamente tenía lugar en los sobrenadantes de los cultivos infectados.

De las tres series probadas se detallan los siguientes resultados:

**1a.-** De los inóculos de 100  $\mu$ l del sobrenadante de las tres series de cultivos de enriquecimiento realizadas con diferentes volúmenes de bacteriófagos purificados de agua residual, se obtuvieron resultados positivos en enriquecimientos infectados con

10 ml y 1 ml de volumen de muestra, aunque sólo en dos de las tres muestras estudiadas (Tabla 1.3).

En experimentos donde se realizaron diluciones 1/2 con estas muestras, dieron también un efecto citotóxico que se atenuó al aumentar la dilución. En general los efectos se iniciaron a las 24 horas, pero fueron claramente visibles a las 48 horas de haberse realizado el inóculo.

**1b.-** En los inóculos de 100 µl del sobrenadante de los enriquecimientos concentrados diez veces utilizando unidades de microconcentradores, no se observó citotoxicidad, aunque las mismas muestras inoculadas sin previa concentración si la presentaron. Se supuso que algún factor necesario, para que tuviera lugar el efecto citotóxico, era eliminado en el paso de concentración, que tenía un paso de corte de 10K. Otra posibilidad podría ser que el proceso de concentración desnaturalizó la proteína, inactivándola.

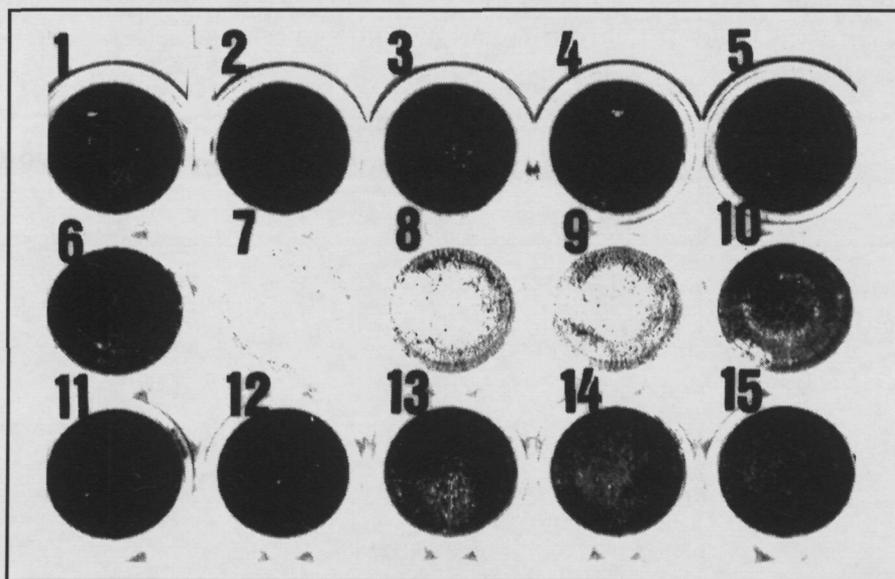
#### **1.3.8.1.3.1.- Neutralización**

Se realizó neutralización del sobrenadante obtenido de un cultivo sonificado de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (cepa productora de la toxina). En este caso, el anticuerpo neutralizó en gran medida los inóculos directos realizados con este sobrenadante. Como resultado se observó un leve efecto citopatológico, que sólo era visible a partir de las 48 horas. Este efecto fue muy atenuado respecto a la alícuota de la misma muestra sin anticuerpo, en la cual el efecto era ya muy evidente apenas transcurridas las 24 horas. El efecto citopático de las diluciones del sobrenadante del control positivo fue totalmente neutralizado por el anticuerpo.

En la neutralización realizada con los sobrenadantes obtenidos de las tres series de los cultivos de enriquecimiento (una fue eliminada por presentar toxicidad en el

agua residual), si bien las alícuotas no neutralizadas presentaron efecto citopatológico, este efecto se vio anulado de un modo claro en las alícuotas donde se había incorporado el anticuerpo anti A-Stx 2 (Figura 1.14).

**Figura 1.14.-** Estimación visual de citotoxicidad sobre una monocapa de células Vero. Los pocillos 1 al 5 muestran un control del cultivo de células Vero, donde sólo se ha inoculado medio de cultivo celular; el pocillo número 6 se inoculó con agua residual tratada del mismo modo que se hizo para infectar los enriquecimientos; los pocillos 7, 8, 9 y 10 se inocularon con 100 µl de una serie de diluciones decimales de un sobrenadante de un enriquecimiento de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 infectado con 10 ml de agua residual procesada. Los pocillos 11, 12, 13, 14 y 15 son idénticos a los pocillos 6, 7, 8, 9 y 10 después de haber sido neutralizados con el anticuerpo monoclonal anti-Stx 2 A (11E10).



#### 1.3.8.1.4.- Correspondencia entre los resultados de PCR anidada, "Western blot" y Citotoxicidad

Después de analizar las cuatro series de cultivos de enriquecimiento y de comprobar la presencia de la toxina en los sobrenadantes de los cultivos de las cuatro series, se pudo observar que los resultados obtenidos por PCR anidada correspondieron a la presencia de la subunidad A de la Stx 2 en los sobrenadantes de

los cultivos, aunque la toxina no siempre resultó ser activa sobre células Vero (sólo en dos casos de los tres estudiados).

De todas las muestras estudiadas, se obtuvo efecto citopatológico sobre células Vero en algunas de ellas, siempre coincidiendo con aquéllas que previamente dieron resultado positivo para la amplificación por PCR anidada y para la presencia de la toxina en el sobrenadante analizada por "Western blot" (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3.-** Comparación entre los resultados obtenidos en los análisis de amplificación del gen de la Stx 2 por PCR anidada, análisis de la presencia de la toxina en el sobrenadante por "Western blot" y análisis del efecto citotóxico sobre células Vero, en las cuatro series de cultivos de enriquecimiento estudiadas.

	Volumen <sup>(a)</sup> (ml)	Serie de cultivo de enriquecimiento			
		1	2	3	4
<b>PCR anidada</b>	10	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	+
<b>"Western blot"</b>	10	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	+
<b>Citotoxicidad</b>	10	-	C <sup>(b)</sup>	+	+
	1	-	C	+	+
	0.1	-	C	-	-

(a) Volumen de fagos purificados de agua residual utilizado para infectar los cultivos de enriquecimiento

(b) El agua residual utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento presentó citotoxicidad

*Sombreado:* Resultados coincidentes entre la amplificación por PCR anidada, la presencia de la toxina en el sobrenadante y el efecto citotóxico.

Como ya se comentó en el apartado 1.3.7.1.3.1, el efecto citotóxico de las series 3 y 4, fue posteriormente neutralizado con los anticuerpos monoclonales contra la subunidad A de la Stx 2.

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

A partir de los resultados obtenidos por PCR anidada con los bacteriófagos purificados de los sobrenadantes de cultivos infectados con fagos presentes en diferentes volúmenes de agua residual, se estimó el número de bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 y portadores del gen de la Stx 2 presentes en las muestras de agua residual.

Conjuntando los resultados obtenidos en todas las pruebas realizadas con aguas residuales del mismo origen (aunque recogidas en días diferentes), se presentan en la siguiente tabla el número de muestras positivas para los diferentes volúmenes de agua residual procesada con que se infectaron los cultivos de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no productora de la toxina). Ello permitió, del mismo modo que para el análisis de fagos directamente purificados de muestras de agua residual, aplicar la técnica del NMP para estimar el número de fagos portadores del gen de la Stx 2.

Como se ha señalado anteriormente, no se ha pretendido en ningún momento realizar una cuantificación exacta del número de fagos portadores del gen de la Stx 2

Los resultados indican un elevado número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en aguas residuales, que son además infecciosos para O157:H7 (ATCC 43888) (Tabla 1.4). La infectividad de estos fagos para O157:H7 puede afirmarse dado que se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en cultivos de enriquecimiento infectados con volúmenes de hasta 0,02 ml de fagos purificados de

agua residual. Sin embargo, en el estudio realizado con fagos purificados directamente de agua residual (sin enriquecimiento previo), no se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en menos de 1 ml de muestra (Ver Tabla 1.2).

**Tabla 1.4.-** Estimación del número de bacteriófagos infecciosos para O157:H7, portadores del gen de la Stx 2, en agua residual.

Origen de la muestra	Volumen de agua analizada (ml)						NMP (Límite de confianza 95%)  (fagos infecciosos/ml)
	10	1	0.2	0.1	0.02	0.01	
<b>Planta 1</b>	12/13 <sup>(a)</sup>	10/13	2/2	11/13	1/2	0/7	<b>3,74</b> (2,00 - 6,98)
<b>Planta 2</b>	2/2	2/2	1/1	2/2	0/1	0/2	<b>18,94</b> <sup>(c)</sup> (5,14 - 69,80)

(a) Número de muestras positivas para PCR anidada/ número total de muestras estudiadas.

(b) El resultado negativo obtenido en estas muestras no se tuvo en cuenta al aplicar la técnica del NMP por carecer de significación estadística. En la misma serie de cultivos de enriquecimiento, se detectaron fagos portadores de la toxina en volúmenes de 1 y 0,1 ml de la misma muestra de agua residual

(c) Número de muestras demasiado bajo para ser significativo.

Los valores obtenidos en la planta 1 son significativos y permiten afirmar que la cantidad de fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual oscila alrededor de 1 y 10 fagos portadores del gen de la Stx 2 por ml de muestra, lo cual corresponde aproximadamente a un 1% del total de fagos que infectan a *E. coli* O157:H7 en agua residual, (Ver Tabla 1.1).

Los valores de la planta 2 no son significativos, como indica la amplia diferencia entre el límite superior e inferior calculado en este caso. Este hecho es debido al bajo número de muestras analizadas. No obstante, los valores obtenidos para la planta 2, indican que los fagos portadores del gen de la Stx 2 se detectan también, en cantidades elevadas, en un agua residual diferente a la de la planta 1.

## **Capítulo 1**

### **1.4.- Discusión**

Los estudios presentados en este capítulo estuvieron dirigidos a comprobar la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual y a realizar una estimación de su abundancia.

En primer lugar se verificó la presencia de bacteriófagos en aguas residuales. Una serie de ensayos preliminares permitieron comprobar que realmente se estaban purificando únicamente bacteriófagos y que no se estaban detectando otros elementos, como por ejemplo residuos de ácidos nucleicos libres o unidos a restos celulares, existentes en el agua residual. Las pruebas realizadas con nucleasas y las purificaciones iniciales con gradientes de CsCl así lo demostraron.

Los amplímeros del gen de la toxina obtenidos mediante la primera PCR no pudieron visualizarse mediante un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, excepto en los controles positivos utilizados. Puesto que la sensibilidad que mostró la primera PCR, parecía ser insuficiente para detectar el gen de la Stx 2 a partir de la extracción de ADN de los fagos, se aumentó la sensibilidad del método mediante hibridación con una sonda interna así como por amplificación por PCR anidada.

Las técnicas empleadas ("dot blot" y "Southern blot"), realizadas sobre los amplímeros obtenidos con la primera PCR permitieron observar señales positivas para determinadas muestras. A partir de estas mismas muestras se obtuvieron amplímeros por PCR anidada, que pudieron visualizarse mediante un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Adicionalmente se repitió el proceso de hibridación por "dot blot" y "Southern blot" sobre los amplímeros obtenidos por PCR anidada, comprobándose que éstos pertenecían a fragmentos del gen de la Stx 2.

La técnica de amplificación por PCR anidada muestra normalmente una elevada sensibilidad, lo que en ocasiones supone la existencia de contaminación de las muestras y la aparición de falsos positivos. En los estudios realizados, se utilizó siempre un gran número de controles negativos a fin de poder descartar la presencia de falsos positivos.

La secuenciación de los productos amplificados obtenidos por PCR anidada, confirmó la amplificación de parte del gen de la Stx 2. No obstante, si bien la mayoría de las muestras estudiadas presentaron total homología con las secuencias depositadas en los bancos genéticos, en una de las muestras se observaron pequeñas diferencias de nucleótidos e incluso deleciones en la secuencia. En este caso, el gen de la Stx 2 estaría sometido a un cambio en la pauta de lectura que, probablemente, conllevaría una síntesis no funcional de la toxina.

Por los experimentos realizados, se tenía la certeza de que la técnica de PCR anidada utilizada permitía amplificar un fragmento correspondiente al gen de la toxina englobado en el genoma de bacteriófagos presentes en agua residual. No obstante, el límite de sensibilidad del método de PCR no pudo ser ajustado debido a la falta de un buen control positivo de bacteriófago. En efecto, la imposibilidad de mantener estable un "stock" de bacteriófagos portadores del gen fue un problema para el desarrollo de este estudio. Aunque el fago 933W fue muy útil como control positivo en los experimentos realizados, la pérdida de infectividad que mostraron estos bacteriófagos, producida inmediatamente después de activar su ciclo lítico, impidió realizar estudios más amplios de cuantificación del fago 933 W. En consecuencia, no se pudo evaluar la cantidad de partículas víricas que se detectaban mediante la técnica de PCR anidada, por lo que se desconoce la sensibilidad del método empleado.

Estos estudios no determinaron si los fagos detectados eran infecciosos o no y mucho menos si eran infecciosos sobre una cepa particular de *E. coli* O157:H7. Al aplicar la técnica de los enriquecimientos, se pudo determinar la capacidad de infección de los fagos portadores de la toxina sobre O157:H7, dado que se estudiaron aquellos fagos, presentes en el sobrenadante de los cultivos de enriquecimiento, que multiplicaron su número después de infectar la cepa.

La multiplicación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en los cultivos de enriquecimiento es evidente si se observa el volumen mínimo de agua residual purificada utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento a partir del cual se detectan resultados positivos. En efecto, en el caso de los enriquecimientos se detectan positivos en volúmenes de 0,1 ml e incluso de 0,02 ml en una ocasión. Por el contrario, en el caso de los fagos purificados directamente de agua residual, el volumen mínimo de muestra a partir de la cual se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 fue de 10 ml. Dado que la técnica utilizada fue la misma en ambos casos, la diferencia radica en que, para el mismo volumen de agua residual, el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 que se estudió en el sobrenadante de los cultivos de enriquecimiento fue superior, porque los fagos han multiplicado durante el enriquecimiento.

Los cultivos de enriquecimiento se infectaron con bacteriófagos purificados de diferentes volúmenes de cada muestra de agua residual. Durante el estudio de los fagos presentes en los cultivos de enriquecimiento se observó un curioso fenómeno en algunas muestras. Al analizar por PCR anidada el ADN de los fagos presentes en los cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de ciertos volúmenes de una muestra de agua residual (por ejemplo 1 ml), no se detectaba el gen de la toxina. Sin embargo éste sí era detectado en volúmenes menores de la misma muestra (0,1 ml), (ver tabla 1.4 apartado de resultados).

Existen dos posibles explicaciones a este hecho. Por un lado, la posibilidad de detectar el gen de la toxina depende de la probabilidad de que algún fago portador del gen se encuentre en el volumen de agua analizado. Si bien esta probabilidad es más alta cuanto mayor sea el volumen de muestra analizada, no siempre sucede así. La propia técnica del Número Más Probable admite la posibilidad de que un volumen superior de las muestras estudiadas presente resultados negativos mientras que en volúmenes inferiores de la misma muestra se detecten resultados positivos (De Man, 1975).

Por otro lado, en las muestras analizadas se infectaron los cultivos de *E. coli* O157:H7 con una población mixta de diferentes bacteriófagos presentes en el agua residual. Dentro del total de fagos presentes en agua residual, algunos tienen una capacidad de infección superior a otros. Cabe la posibilidad de que, en algunos enriquecimientos, fagos con capacidad de infección superior a los fagos portadores del gen de la Stx 2 infectaran las células bacterianas, produciendo una lisis masiva de estas células. La disminución en el número de células de *E. coli* O157:H7 reduciría la posibilidad de que los fagos portadores del gen de la Stx 2 se unieran a las células bacterianas. Por consiguiente disminuiría la posibilidad de infección y los fagos portadores del gen de la Stx 2 multiplicarían menos. Cuando el volumen de muestra analizada es superior, también la cantidad de fagos con mayor capacidad lítica que los fagos portadores del gen de la Stx 2 es mayor. Se reduciría, en este caso, la posibilidad de enriquecer los fagos portadores del gen, los cuales, al no poder multiplicar, no serían detectados por la técnica utilizada.

Los amplímeros obtenidos por PCR anidada a partir del ADN de los fagos purificados de los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento se confirmaron de nuevo mediante "Southern blot", realizado con los amplímeros obtenidos de la primera PCR de estas mismas muestras.

En dichos sobrenadantes se estudió, además, la presencia de la toxina Stx 2. Se realizaron estos estudios suponiendo que un cultivo de una cepa no portadora del gen de la toxina (*E. coli* O157:H7 ATCC 43888) pudiera producir la toxina después de la infección con bacteriófagos portadores del gen. Esta suposición se basó en el hecho de que estudios anteriores habían demostrado que el carácter de la toxina podía ser transducido a partir de cepas productoras de la toxina (*E. coli* O26 cepa H19) a cepas no productoras de toxinas (*E. coli* K12) mediante bacteriófagos lisogénicos portadores del gen (Williams Smith y col., 1983).

Efectivamente, los resultados de "Western blot" mostraron que la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888) era capaz de sintetizar la subunidad A de la toxina después de haber sido infectada con fagos purificados de diferentes volúmenes de agua residual, de los cuales un cierto porcentaje eran portadores del gen de la Stx 2. Los fagos eran la única posibilidad de transferencia del gen de la toxina a la cepa bacteriana, puesto que ningún otro elemento presente en el agua residual ni tampoco la propia cepa fueron la causa, como se demostró por los controles utilizados.

La cantidad producida de subunidad A de la toxina en los cultivos de enriquecimiento fue variable dependiendo de la cantidad de fagos que infectaron dichos cultivos. Los resultados de "Inmunoblot" semicuantitativo permitieron observar que la toxina se producía en cantidades diferentes, según el volumen de muestra utilizada a partir de la cual se purificaron los fagos con los que se infectaron los cultivos de enriquecimiento. En ningún momento se intentó realizar una cuantificación de la toxina. Con estos experimentos se pretendió solamente demostrar que la producción de toxina era un efecto variable, dependiente del número de fagos con que se realizaba la infección.

El hecho de detectar la presencia de la subunidad A de la Stx 2 no indicaba que esta toxina fuera completa y funcional. Para determinar si lo era, se realizaron los ensayos de citotoxicidad. En algunos de estos ensayos se pudo observar que los

bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2, que infectaron a una cepa no portadora del gen de la toxina (*E. coli* O157:H7, ATCC 43888), fueron capaces de inducir la producción de toxina Stx 2 funcional por parte de dicha cepa. La toxina producida provocó citotoxicidad sobre un cultivo de células Vero. La monocapa de células Vero se vio afectada por acción de la toxina presente en el sobrenadante de los cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de agua residual.

La afirmación de que tan sólo la Stx 2, presente en los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento, fue la causante de la citotoxicidad observada (y no otros elementos presentes en el agua residual) se vio respaldada, además de por los controles utilizados, por el hecho de que el efecto de citotoxicidad se neutralizó al incorporar el anticuerpo monoclonal contra el centro activo de la toxina, la subunidad A de la Stx 2.

Todas las muestras que presentaron resultados de citotoxicidad positiva, presentaron también resultados positivos por PCR, aunque no todas las muestras estudiadas, que eran positivas para PCR, mostraron citotoxicidad. En estas últimas, podría ser que los fagos con los que se infectaron los cultivos de enriquecimiento llevaran incorporado en su genoma sólo un fragmento del gen de la toxina, o que hubiera en el gen alguna mutación del tipo delección. En este caso, el fragmento detectado correspondería a la porción del gen comprendida entre los cebadores utilizados, siendo por lo tanto detectables por PCR. Sin embargo, si estos fagos no fueran portadores del operón completo del gen, éste no sería funcional, por lo que no se produciría la síntesis de toxina activa.

Asimismo, suponiendo que una fracción importante de fagos con los que se infectó un cultivo de enriquecimiento fueran fagos que presentaran alguna mutación tipo delección en la secuencia del gen (como ocurrió con una de las muestras analizadas por secuenciación), se obtendrían resultados positivos en la amplificación por PCR anidada. Sin embargo, estos fagos no serían capaces de inducir la síntesis de toxina

activa, puesto que el cambio en la pauta de lectura del gen produciría, en el mejor de los casos, una proteína no funcional.

A la vista de los resultados obtenidos, parece que algunos de los fagos detectados como portadores del gen de la Stx 2 no transportan en realidad el gen completo o funcional incorporado en su genoma. Sin embargo, un importante porcentaje de estos fagos sí que llevarían incorporado en su genoma el operón de la Stx 2, siendo entonces capaces de inducir en la bacteria la producción de la toxina activa.

El estudio de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales se realizó en base a los resultados obtenidos por PCR. Aunque por lo que se ha comentado anteriormente, estos fagos no siempre transportan el gen completo de la toxina, el estudio indicó que los fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en aguas residuales podían potencialmente transferir el carácter de la toxina a una cepa bacteriana inicialmente no portadora. Por tanto, se consideró que la estimación del número de fagos portadores del gen en aguas residuales era necesaria para un mayor conocimiento del fenómeno de transferencia de genes mediada por fagos en el medio ambiente.

Para realizar esta estimación se utilizaron los resultados obtenidos por PCR anidada a partir del ADN de los fagos purificados directamente de las muestras de agua residual. Tal como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos, se agruparon todos los resultados obtenidos con una misma metodología y correspondientes a muestras procedentes de un mismo punto de muestreo. El hecho de que todas las aguas analizadas presentaran valores de contaminación muy estable, permitió realizar esta agrupación de los resultados. Con estos datos se aplicó la técnica del Número Más Probable para estimar el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 directamente purificados de agua residual.

Los resultados de estimación del número de fagos indicaron elevados niveles de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales. Se detectaron muestras positivas hasta volúmenes correspondientes a 0,5 ml del agua residual procesada, aunque no en volúmenes inferiores. Si bien los resultados mostrados no han de ser tomados más que como una aproximación, se estimó que el número de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual era aproximadamente de 24 fagos por 100 ml de agua residual de la planta 1. Estos datos son muy similares a los obtenidos en la planta 2 (30 fagos /100 ml de agua residual).

En los análisis realizados con aguas residuales de matadero se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en todas las muestras, si bien estos fagos no pudieron cuantificarse debido a que se estudió un solo volumen de muestra. Los resultados obtenidos indicaron una presencia de los fagos portadores del gen de la toxina elevada y relativamente frecuente en muestras de aguas residuales de nuestra zona, tanto en muestras con contaminación de origen humano, como en muestras con contaminación de origen animal correspondientes a las aguas residuales de matadero. No obstante, los resultados de presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 directamente purificados de agua residual no indicaban que estos fagos fueran o no infecciosos, y si lo eran, no necesariamente debían serlo para *E. coli* O157:H7.

En efecto, la técnica de PCR permitió detectar tanto bacteriófagos activos como inactivos, puesto que la técnica de amplificación del ADN no discierne entre la infectividad de los bacteriófagos. Así pues, los fagos detectados en muestras de agua residual directa correspondieron al total de fagos portadores del gen presentes en las muestras.

El grupo de fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en aguas residuales comprende a los fagos portadores del gen no infecciosos, a los fagos infecciosos para *E. coli* (serotipo O157:H7 y otros) y a los fagos portadores del gen infecciosos para otras enterobacterias. Como ya se ha indicado en la introducción de este capítulo,

otras enterobacterias son también portadoras de genes de la familia de toxinas Stx 2. Dado que se pretendía estimar únicamente el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en agua residual, que eran infecciosos para *E. coli* O157:H7, se realizó una segunda estimación. Para ello se utilizaron los datos obtenidos por PCR anidada de los fagos purificados de los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento de *E. coli* O157:H7, infectados con fagos parcialmente purificados de diferentes volúmenes de agua residual. Con estos datos se aplicó de nuevo la técnica del Número Más Probable.

Para realizar la estimación de estos fagos, por un lado se agruparon los análisis realizados con muestras de agua residual provenientes de la planta 1 y asimismo se agruparon los análisis realizados con agua residual de la planta 2. De los resultados obtenidos, no deberían ser tenidos en cuenta los valores para la planta 2. Éstos, si bien fueron muy elevados, presentaron unos límites superior e inferior demasiado distantes, debido al bajo número de muestras analizadas. El número de muestras analizadas provenientes de la planta 1 fue mayor, y los límites superior e inferior mucho más ajustados al valor obtenido. Por ello deben considerarse como más significativos. En estas muestras se estimó que el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 era de 3,74 fagos infecciosos para O157:H7 por ml de agua residual.

Los valores que se obtuvieron de las muestras analizadas por cultivos de enriquecimientos infectados con fagos purificados de agua residual de la planta 1, fueron superiores a los obtenidos con los fagos purificados directamente de agua residual proveniente del mismo origen.

Inicialmente se podría esperar que el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 purificados directamente de agua residual fuera superior al número de fagos capaces de infectar una célula y por tanto replicar en un cultivo de enriquecimiento. Esto sería cierto considerando que en el primer caso se detectaron todos los fagos presentes en agua residual, vivos o muertos y capaces de infectar a diferentes

enterobacterias, mientras que en el segundo caso, sólo se detectaron aquellos fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7.

Sin embargo, un solo fago infectivo en un cultivo de enriquecimiento permitiría detectar resultados positivos, dado que aumentaría su número después de multiplicar en el cultivo. Teniendo en cuenta estos resultados, debemos suponer que con la técnica de PCR aplicada directamente sobre bacteriófagos purificados de agua residual, el límite de detección del método aplicado en este estudio no es de 1-10 bacteriófagos (como se ha descrito para algunos virus animales, Puig y col., 1994), sino probablemente mucho más alto.

Cuando, como en este caso, se trabaja con una técnica de PCR, de la cual se desconoce su sensibilidad debido a la falta de un control positivo de bacteriófago estable, el número de fagos puede ser crítico en caso de que la técnica no sea altamente sensible. Así, la sensibilidad del método tuvo menor influencia en los cultivos de enriquecimiento, en los cuales se trabajaba con la gran cantidad de fagos presentes en el sobrenadante del cultivo de enriquecimiento, que en muestras de agua residual, con un número de fagos menor. Por esta razón, la técnica de los enriquecimientos permitió realizar, independientemente de los límites de sensibilidad del método, una mejor aproximación del número de fagos portadores del gen que la que se realizó a partir de los estudios con fagos directamente purificados de agua residual. La estimación realizada de los fagos presentes en los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento, infectados con fagos purificados de agua residual de la planta 1, debe ser tomada en cuenta como más aproximada al número real de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales.

El cálculo del número de fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7 presentes en agua residual es sólo una estimación. No obstante, creemos que el número real de estos fagos presentes en agua residual oscila aproximadamente entre 1 y 10 fagos por ml de agua residual. Si esta apreciación es correcta, esto supone que

aproximadamente el 1 % del conjunto de fagos presentes en agua residual que infectan a *E. coli* O157:H7 transportan en su genoma el gen de la Stx 2. Una gran parte de estos fagos son potencialmente capaces, en condiciones favorables, de transferir el carácter de la toxina a cepas que no la poseen. En este caso pueden inducir la producción de la toxina por parte de estas cepas inicialmente no productoras y pueden por tanto jugar un papel muy importante en la transferencia horizontal del gen.

