



**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
Iztacala**

---

**U. N. A. M.**

**“TIPIFICACION CON FAGOS DE Pseudomonas aeruginosa”**

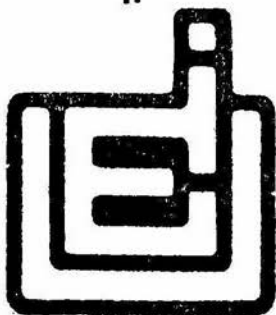
**T E S I S**

**Que para obtener el Título de**

**B I O L O G O**

**p r e s e n t a**

**MA. REBECA MONICA GUTIERREZ GUTIERREZ**



**Los Reyes, Iztacala**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

GRACIAS . . .

- . . . a mis Padres, Leo y Mina, así como a mis Hermanos, Lupe, Leo, Jesús e Iñigo, por el apoyo que me brindaron de manera constante a lo largo de todo mi desarrollo académico.
- . . . a mis Abuelos, Tato y Rebeca, por el impulso que me han brindado durante toda mi vida.
- . . . a mis maestros y compañeros por toda su ayuda.
- . . . al Maestro Sergio Vaca P. por la dirección y apoyo que me brindó a lo largo del desarrollo del trabajo experimental de esta tesis.
- . . . al Maestro Sergio González M. por haber despertado en mí el gusto por el Trabajo Experimental.
- . . . a mis Amigos Cándida, Rocío, Carmen, Lupita, Diego, Miguel, Gabriel y Octavio por su apoyo y ayuda en toda situación.
- . . . a Fernando por compartir conmigo tanto lo bueno como lo malo de todo lo que pasé para lograr conseguir el Título Profesional.

I N D I C E

1.- INTRODUCCION . . . . .	1
I. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> . . . . .	1
II. Infecciones a Humanos . . . . .	5
III. Tipificación . . . . .	11
IV. Bacteriófagos . . . . .	14
2.- MATERIAL Y METODOS. . . . .	21
I. Cepas . . . . .	21
II. Soluciones y Medios de Cultivo . . . . .	22
III. Aislamiento y Purificación de Bacteriófagos .23	
IV. Obtención de Lisados de Alto Título . . . . .	24
V. Titulación de Lisados . . . . .	24
3.- RESULTADOS . . . . .	26
I. Método de Tipificación . . . . .	26
II. Tipificación . . . . .	31
III. Obtención de nuevos fagos . . . . .	34
4.- DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . .	35
5.- BIBLIOGRAFIA . . . . .	41

## INTRODUCCION

### I.- Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es un organismo fisiológicamente tan versátil que el revisar los hábitats en los que se ha reportado la presencia de esta bacteria puede resultar sorprendente. Desde 1938 se encuentra en la literatura que al realizar estudios bacteriológicos de suelos provenientes de diferentes lugares, se reportan microorganismos que producen un pigmento amarillo-verdoso fluorescente. Posteriormente, Green, en 1973, al analizar el contenido bacteriano de 58 muestras de suelo de 17 campos irrigados para agricultura de California, encontró que 14 especímenes ( 24 % ) de cinco campos ( 29 % ) contenían Ps. aeruginosa ( 3 ). Schroth, en 1977, encontró que una de dos muestras de suelo que nunca se habían cultivado, contenían Ps. aeruginosa ( 3 ). Asimismo, F. S. Rhame ( 3 ), reporta que esta bacteria puede recuperarse de los sanitarios de cerca del 10 % de los humanos sanos y, frecuentemente, se encuentra con frecuencia en las aguas negras. Las cuentas de Ps. aeruginosa en estas aguas, exceden frecuentemente de cien mil bacterias por cada cien mililitros ( 3 ). Los estudios de la incidencia de esta bacteria en aguas potables, han producido rangos que -- van de un 24 % en Nor Israel, pasando por un 3.4 % del suplemento municipal de agua de Budapest, hasta un 0.4 % en el Sur de Ontario. Aún -- usando técnicas sensibles, no se ha podido recuperar esta bacteria de

agua de grifo clorinada. Es tan abundante este organismo que se ha encontrado que sobrepasa en número a las bacterias de libre flotación tanto como 1000:1 en varios sistemas acuáticos ( 5 ). Se ha reportado también que Ps. aeruginosa es capaz de crecer y reproducirse en agua destilada estéril, favoreciendo ésto el hecho de que el agua haya sido almacenada antes de ser inoculada con la bacteria;ésto último ha sido explicado como un almacenamiento de CO<sub>2</sub> disuelto en el agua que la bacteria utiliza como única fuente de carbono ( 9 ).

Desde el punto de vista evolutivo, Ps. aeruginosa juega un papel importante , pues es una de las pocas bacterias que pueden infectar tanto a plantas como a animales, --- siendo el sinónimo de esta bacteria como patógeno vegetal --- Pseudomonas polycolor ( 2 ).

J. W. Costerton ( 5 ) postula que el exopolisacárido bacteriano permite que crezcan estos organismos como microcolonias envueltas por mucosidad adheridas a las superficies en el suelo, agua fresca, medios ambientes marinos, en las -- superficies de las plantas, en la superficie epitelial de los órganos animales, en el aparato digestivo de los rumiantes y en muchos otros sistemas. Al analizar al microscopio una de -

TABLA 1

CARACTER	RESPUESTA
Medio abierto de Glucosa OF, ácido	+
Medio de Maltosa OF, ácido	-
Gas Glucosa	-
Indofenol Oxidasa	+
Catalasa	+
Arginina Dihidrolasa	+
Lisina, Ornitina Descarboxilasa	-
H <sub>2</sub> S	-
Indol, Rojo de Metilo y acetilmetilcarbinol	-

Modificada de:

Gilardi, G. L., Medical Microbiology en -  
Pseudomonas aeruginosa the organism,  
diseases it causes, and their treat-  
ment. Editado por L. D. Sabath, publi-  
cado por Hans Huber Publishers, Bern  
Stuttgart Vienna ( 1979 ) p.p. 28.

estas microcolonias, se observa que las bacterias son ovaladas de un grosor promedio de 0.5 micrómetros y una longitud de 1.4 a 3 micrómetros y cada célula presenta típicamente un flagelo polar ( 2 ). Para una identificación más segura, se toman en cuenta las respuestas de estas bacterias a las pruebas bioquímicas standard ( Tabla 1 ).

Sin embargo, existe una forma más sencilla de identificación que se basa en morfología colonial y características fenotípicas generales. Entre éstas últimas podemos encontrar el olor típico debido a la producción de aminoacetofenona ( 1 ) que ha sido descrito por algunos científicos como "afrutado" ( 2 ). Dentro de las características fenotípicas encontramos también la pigmentación debida a la producción de piocianina ( azul ) por casi todas las cepas, así como la de pioverdina ( verde-amarillo ), piorrubina ( rojo ), piomelanina ( café a negro ) y combinaciones entre ellas, cuya producción depende de las características físico - químicas del medio en que se está desarrollándose el organismo ( concentración de calcio, aminoácidos, alcoholes, etc. ) ( 1 ). El método que se basa en morfología colonial determina que pueden observarse varios tipos coloniales : Colonias abundantes en forma ---



irregular de 2-3 mm. de diámetro, con una superficie lisa -- ( tipo liso ); colonias circulares convexas, de 1-2 mm de diámetro con una superficie lisa brillante y una consistencia ligeramente viscosa ( semejando colonias de Enterobacteriaceae ); colonias elevadas de forma irregular con un centro hundido, - 2-3 mm. de diámetro y con superficie rugosa ( tipo rugoso );- colonias circulares convexas tendiendo a coalescer, de 1-3 mm de diámetro, con una superficie lisa brillante y una consistencia húmeda o viscosa ( tipo mucoide ); y colonias elevadas circulares con un centro alto, de 2-3 mm. de diámetro con una superficie lisa brillante y una consistencia membranosa o gelatinosa ( tipo gelatinoso ) ( 1 ).

## II. INFECCIONES A HUMANOS.

El hecho de que Ps. aeruginosa presente requerimientos nutricionales simples y la habilidad de metabolizar más - de 76 compuestos orgánicos diferentes ( 2, 3 ), permite que - este organismo sobreviva y se multiplique en fluidos y ambientes húmedos presentes en hospitales, entre los que se encuentran soluciones oftálmicas y antisépticas, humidificadores --

medioambientales, infusiones, jabones de hexaclorofeno, cremas para manos, lociones corporales, aparatos de succión, ventiladores respiratorios, incubadoras, decantadores de agua de las camas, plantas ornamentales, forceps, brochas de afeitarse, termómetros orales, jeringas, esponjas, suelos, etc. ( 1 ). - Debido a la incidencia de esta bacteria en los ámbitos hospitalarios, se ha tornado un problema serio ya que causa de un 10 a un 20 % de las infecciones nosocomiales ( 4 ). Cuando el paciente está inmunodeprimido por haber sido sometido a una intervención quirúrgica, a tratamientos con antibióticos, sufrido quemaduras graves o cualquier otra situación que favorezca el estado inmunodeprimido, se facilita la colonización por Ps. aeruginosa pues ésta es oportunista. Por ejemplo, se hizo un estudio de la velocidad de colonización por la bacteria en heridas producidas por quemaduras en un hospital ( 4 ) y se encontró que a las 30 horas después de sufrir la quemadura, más del 20 % de los enfermos presentaban la bacteria; a las 48 horas resultaron un 48 % colonizados y, por el quinto día, más del 60 % de las heridas por quemadura albergaban este organismo ( 4 ). Un grupo de investigadores encontró que en un 15-25 % de los pacientes quemados, las Ps. aeruginosa -

TABLA 2

Pseudomonas aeruginosa COMO MICROORGANISMO DE HOSPITAL

Resistencia a antibióticos conferida por plásmidos.

Frecuencia de infecciones en pacientes hospitalizados:  
10 - 20 %

- a) Quemaduras
- b) Leucemia
- c) Fibrosis Quística
- d) Tratamiento con Inmunodepresores

Rutas de Transmisión:

- a) Agua Destilada  $10^2$   $\xrightarrow{48 \text{ Horas}}$   $10^7$ /ml. ( 42 Días ).
- b) Alimentos: 8 - 15 % de muestras ( + ) en 8 hospitales Ingleses.
- c) Antisépticos Tópicos.
- d) Soluciones Oftálmicas.
- e) Manos de Personal.
- f) Soluciones Fenólicas Diluidas.
- g) Equipo ( Sondas, Aparatos de Succión, Esponjas, etc. )

Resumido de:

Clarke, P. H., and Richmond, M. H., Eds. Genetics and Biochemistry of Pseudomonas, John Wiley and Sons ( 1975 ).

Sabath, L. D., Ed. Pseudomonas aeruginosa the organism, Diseases it causes, and their treatment. Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna ( 1979 ).

colonizantes surgieron del tracto gastrointestinal del paciente ( 4 ); ésto se puede aclarar más si tomamos en cuenta que la bacteria se encuentra presente en cerca del 10 % de humanos sanos como saprófito intestinal ( 4 ) y cuando, entre --- otras cosas, aparece el exopolisacárido bacteriano, que según propone Costerton ( 5 ) es necesario para la persistencia de la bacteria en estado patógeno, surge el microorganismo en la zona afectada por la quemada o bien en los órganos afectados durante otras enfermedades, como en la fibrosis quística, --- leucemia y otras.

No es ésta la única ruta de transmisión de Ps. aeruginosa, pues en casi cualquier ambiente húmedo podemos encontrarla. Esto ha llevado a una división de las rutas de transmisión en inanimadas y humanas. Dentro de las inanimadas podemos encontrar, entre otras, el agua destilada, alimentos, antisépticos tópicos, soluciones oftálmicas, soluciones fenólicas diluídas, equipo ( tabla 2 ) y aún en el agua de los floreros ( 1 ) . Entre las humanas contamos con las manos y uñas del cuerpo médico y auxiliar de los hospitales, entre otros - ( tabla 2 ) .

Si a todo lo anterior aunamos que la Ps. aeruginosa

TABLA 3

SUSTANCIAS EXTRACELULARES DE P. aeruginosa RELACIONADAS CON  
SU VIRULENCIA.

SUSTANCIA	EFFECTOS
Exotoxina A	ADP- Ribosilación de EF-2 letal para ratón.
Proteasa y Elastasa	Hemorragias de órganos internos. Destrucción de Tejido Corneal ( E ) destrucción 7/9 Complemento. Inhibe movimiento de Polimorfonucleares y fagocitosis ( E ) inactivación de inhibidor Alfa - 1.
Moco	Inhibición de Fagocitosis ( Leuco. ) Efecto similar a infección en ratón.
Leucocidina	Destrucción de Leucocitos.
Fosfolipasa C	Hidrólisis de Fosfolípidos ( Hemólisi. ) Probable efecto citopático en pulmón.
Glucolípidos	Hemólisis.

Tomado de:

Homma, J. Yuzuru, Progress in the study on Ps. aeruginosa with emphasis on its Pathogenicity. Asian Med. J. 21-8 ( 1978 ).

presenta resistencia a antibióticos ( una amplia gama, por cierto ), podemos visualizar la importancia médica de estas bacterias. Costerton ( 5 ) propone dos mecanismos de resistencia, uno extrínseco, que se basa en barreras físicas y uno intrínseco, que implica barreras genéticas. El mecanismo extrínseco consiste en la barrera física proporcionada por el exopolisacárido bacteriano que tiene un efecto negativo en la penetración del antibiótico sin importar el blanco de éste en la célula. Mientras que el mecanismo extrínseco impide físicamente la acción del antibiótico, el intrínseco impone barreras genéticas que la bacteria ha adquirido por medio de plásmidos como la acción de la beta-lactamasa codificada por éstos ( 5 ).

Además de las características de resistencia, las bacterias presentan una serie de productos extracelulares que contribuyen en gran medida a su patogenicidad. Dentro de estos productos encontramos que cada uno de ellos tiene acción sobre diferentes partes del organismo a colonizar ( ver tabla 3 ).

### III. TIPIFICACION.

Hasta aquí queda clara la importancia médica de esta bacteria y, por ende, se torna obvia la necesidad, desde el punto de vista epidemiológico, de contar con métodos no sólo de identificación, sino también que tipifiquen de una manera segura y rápida, las diferentes cepas de Ps. aeruginosa en cuestión. Dentro de los métodos de tipificación encontramos varios que presentan diferencias en cuanto a las características en las que se basan, así como en sus grados de sensibilidad. Los métodos más usados son los siguientes: el serotipo, que consiste en medir la respuesta de la bacteria a sueros obtenidos a partir de antígenos de la misma especie de bacteria. Se usan dos tipos de sueros, el "H" obtenido del flagelo ( 7, 8 ) y el "O" obtenido del cuerpo de la bacteria ( 7, 8 ); suelen manejarse combinados para obtener datos que resulten más discriminadores, ya que el usar únicamente el "O" que comparten casi todas las bacterias ( 7, 8 ), o el "H" solamente, arrojan resultados poco discriminadores ya que hay ciertos grupos "O" y "H" que predominan ( 7 ). Otro de los métodos es el de aeruginocinotipia o piocinotipia, que tiene dos variantes, una

de ellas consiste en obtener la ( s ) piocina ( s ) ( protef-  
nas complejas con acción bactericida, de rango pequeño y alta  
letalidad ( 3 ) ) que produce la cepa y probar la respuesta  
de un grupo standard de bacteria al ser puesto en contacto --  
con ésta ( s ); la otra variante consiste en probar la resis-  
tencia o susceptibilidad de la cepa a un juego de piocinas --  
standard. El último de los métodos más usados es el de fagoti-  
pia, que consiste en medir la respuesta de la cepa a un juego  
de bacteriófagos o fagos standard. La sensibilidad del método  
está relacionada con el número de "tipos" de respuesta a la -  
infección con los fagos que pueden distinguirse, así como la  
distribución de aislados clínicos en las categorías "tipo". -  
Las limitaciones generales del método incluyen dificultades -  
con la standardización y reproducibilidad, disponibilidad li-  
mitada y naturaleza de intensa labor de la prueba ( 7, 8, 9 ).  
Se recomienda utilizar dos de los métodos para obtener una ti-  
pificación más discriminante. Las combinaciones que más se u-  
san son: serotipia y piocinotipia, o bien, fagotipia y pioci-  
notipia ( 7, 8, 9 ).



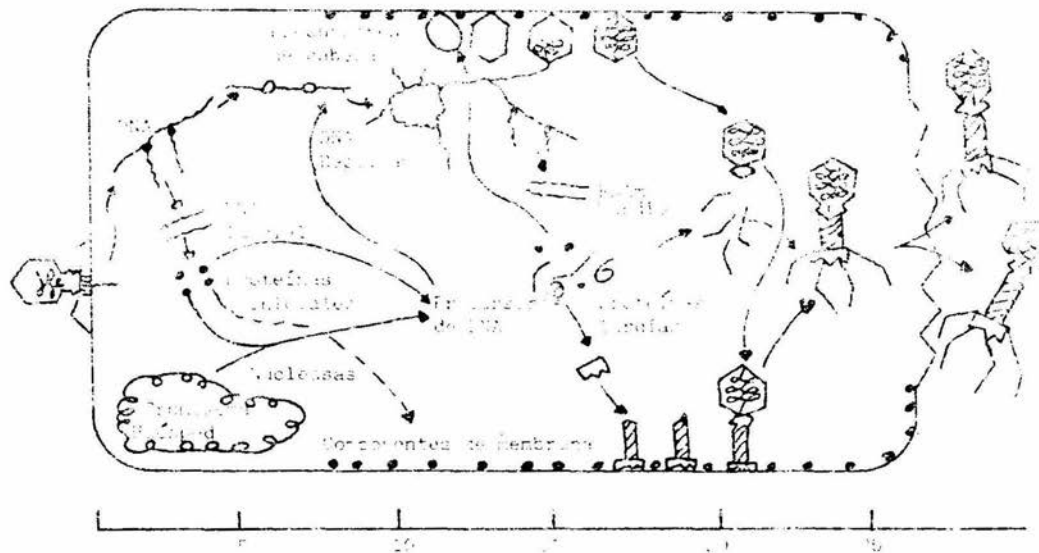


Figura 1.- Ciclo vital del bacteriófago T - par.

#### IV. BACTERIOFAGOS.

Los bacteriófagos, que son el instrumento biológico usado en la fagotipia de Ps. aeruginosa, están formados -- principalmente por proteínas y DNA en proporciones aproximadamente iguales ( 10 ). Stent, en 1973 ( 10 ), los define como entidades subcelulares capaces de ingresar en las células vivas y de reproducirse sólo en dichas células. Esto los hace -- ser parásitos intracelulares obligados, siendo la característica que los diferencia de otros parásitos intracelulares que su parasitismo es a nivel genético. Para comprender mejor el ciclo de vida de los bacteriófagos, tomaremos como modelo un fago cuyo ciclo se conoce más o menos completamente, el T par. Los fenómenos biológicos básicos implicados en este proceso -- los encontramos ejemplificados en la figura 1 y son:

- ✓a) Adsorción: que consiste en la unión del fago a la bacteria mediante receptores específicos.
- ✓b) Inyección: que la lleva a cabo mediante la introducción del DNA fágico a la bacteria interviniendo en el fenómeno la vaina contráctil -- del fago.

- c) Morfogénesis: que implica la biosíntesis y ensamble de las partes del fago que usará para -- ésto el complejo enzimático bacteriano.
- d) Lisis: que es la destrucción de la bacteria -- por la eclosión de la progenie del fago.

Ellis y Delbrück ( 1938 ) y Doerman ( 1948 ) ( pa ra una revisión ver referencia 11 ) mostraron que hay cuatro fases distintas en el ciclo vital de este fago: 1) adsorción, durante la cual los fagos se unen a las células susceptibles; 2) el periodo de eclipse, a lo largo del cual el virus infeccioso no puede detectarse ni dentro ni fuera de la célula; - 3) el resto del periodo latente, lapso en el que el fago se - multiplica dentro de la célula, como se determina por la tipi ficación del fago después de la lisis artificial de la célula; y 4) lisis, en la cual la célula infectada se rompe y libera la progenie del fago al medio circundante.

Esta línea de investigación ha tenido el avance - suficiente como para definir los eventos moleculares de cada una de las fases mencionadas. Se sabe así que la adsorción in volucra una reacción de reconocimiento entre las puntas de --

las fibras de la cola y los sitios de receptor específico en la pared celular de la bacteria huésped. A esto sigue la ubicación de la placa basal directamente encima de la pared celular y su unión vía los "alfileres" de la cola, o fibras cortas. La placa basal sufre un cambio conformacional sorprendente, casi coincidente con la contracción de la vaina de la cola. Esto resulta en forzar la parte dura de la cola a través de la pared celular y el DNA pasa de la cabeza, a través de la superficie celular, hasta el interior de la célula, todo en menos de un minuto. Un poco después de la inyección, la síntesis de los ácidos nucleicos y proteínas específicas de la célula huésped cesa, aparentemente debido a diferentes mecanismos. La expresión de los genes fágicos ocurre casi inmediatamente. Los productos virales iniciales son moléculas de RNAm y varias especies de RNAt. Los mensajeros fágicos iniciales codifican para una serie de proteínas, la mayoría de las cuales están involucradas en la síntesis de DNA viral y sus precursores. Algunas de estas proteínas son detectables un minuto después de la infección, a 37° C y todas continúan acumulándose hasta 10-15 minutos después de la infección. Va-

rios minutos después, la transcripción de las clases ini- -  
ciales de los genes se hace más lenta y las clases tardías  
comienzan a expresarse. Los transcritos de estas clases --  
tardías de genes codifican para proteínas estructurales --  
del fago y otras proteínas que juegan papeles no estructu-  
rales en el ensamblaje del virión. También, casi a los ---  
seis minutos después de la infección, la replicación del -  
DNA fágico comienza y, de hecho, la transcripción de las -  
clases más tardías de los genes virales requiere de la sín-  
tesis concurrente del DNA. Después de varios minutos, se -  
han acumulado juegos de moléculas de DNA replicante y de -  
proteínas estructurales y el ensamblaje de las subestruc-  
turas fágicas puede ser detectado. El DNA se empaqueta en  
las cabezas por un proceso aún desconocido. Al mismo tiem-  
po, dos vías independientes están generando colas y fibras  
de la cola. Las cabezas y las colas se unen en una reac- --  
ción espontánea. Las fibras se unen entonces a las placas  
basales en una reacción catalizada por enzimas. Esto gene-  
ra una partícula infecciosa, que puede detectarse por pri-  
mera vez casi a los doce minutos después de la infección.  
La acumulación de progenie infecciosa continúa hasta ----

25-30 minutos, o mucho más, bajo algunas condiciones de infección. Mientras tanto, una serie de cambios provocados por el fago en la estructura de la membrana citoplasmática y la pared celular de la célula, culmina en la ruptura de ésta última, con la consecuente liberación de aproximadamente cien partículas fágicas maduras de una célula originalmente infectada con tan poco como una partícula viral ( 11 ).

Hay ocasiones en que el fago no puede infectar en forma productiva a la bacteria y esto puede deberse a varias causas, entre las que podemos contar la ausencia o cambio conformacional del receptor, dos fenómenos bacterianos conocidos como restricción y modificación y la interferencia por plásmidos. Si el receptor en la superficie bacteriana no está presente o se encuentra oculto o modificado físicamente, la primera fase del ciclo vital, la adsorción, no puede llevarse a cabo y, por ende, no hay infección por el fago. Suponiendo que el DNA viral logra ser -- inyectado pero las enzimas de restricción, que son endonucleasas secuencia específicas, lo localizan, es degradado y la materia prima que queda es usada por la célula. La mo

dificación, que consiste en que el DNA bacteriano recién sintetizado es metilado por enzimas en sitios específicos reconocidos por las endonucleasas de la célula, si el DNA viral no ha sido metilado ( modificado ) por otra bacteria que infectó, las endonucleasas no lo reconocen como propio y sucede entonces la restricción. El hecho de que la célula tenga plásmidos, que son unidades de DNA circular extracromosómico estable y heredable, puede impedir que la bacteria sea infectada, ya que estos plásmidos provocan cambios superficiales en la célula y evitan así que se adsorba el fago.

Si la serie de eventos que conforman el ciclo de vida del fago llegan a buen término, se produce la lisis y la consecuente liberación de la progenie. Manejando diferentes diluciones de la solución concentrada de fagos ( ver Material y Métodos ), es posible contar el número de placas líticas aisladas obtenidas y así medir la susceptibilidad de la cepa bacteriana a la infección con un juego de fagos líticos probados y aceptados como herramienta de tipificación. Nos interesaba montar el método de fagotipia reportado en la literatura con medios de cultivo naciona-

les, para comprobar que en el laboratorio se podían tipificar 41 cepas provenientes de los Hospitales ISSSTE y Civil de Morelia y proporcionadas por el laboratorio de Bioquímica de la Universidad Michoacana a cargo del M. en C. Carlos Cervantes Vega. Si se llegara a presentar un alto porcentaje de cepas no tipificables, buscaríamos nuevos fagos aislados de las mismas bacterias clínicas que resultasen susceptibles de inclusión en el juego standard de bacteriófagos.

Asimismo, se pretendía probar si el método resultaba eficaz en la detección de cambios superficiales en las bacterias inducidos por la lisogenización por fagos silvestres, ya que en el laboratorio se pretende analizar lo anterior utilizando varios métodos, incluyendo a éste.



## MATERIAL Y METODOS

### I. CEPAS

Las bacterias ( Pseudomonas aeruginosa ) y bacteriófagos de colección fueron donados por el Dr. T. L. Pitt, investigador del Central Public Health Laboratory de Londres, al M. en C. Carlos Cervantes Vega, investigador de la Universidad Michoacana, quien nos las envió al laboratorio.

Las cepas clínicas de Pseudomonas aeruginosa, provienen de dos Hospitales, el Civil y el del ISSSTE de Morelia, Mich. y nos fueron donadas por el M. en C. Carlos Cervantes Vega, quien las identificó mediante las siguientes pruebas ( 7 ): crecimiento en agar Cetrimida, producción de pigmentos en los medios King A y King B, extracción de piocianina con cloroformo, observación de la fluorescencia con luz Ultra Violeta, prueba de la Oxidasa, hidrólisis de la gelatina, crecimiento a 42°C y tipificación por producción de piocinas.

## II. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo a lo largo de los experimentos:

- a) Agar Nutritivo 2 % : Caldo Nutritivo Bioxón 8 g., Agar Bacteriológico Bioxón 20 g. y Agua Destilada 1000 ml.
- b) Agar Nutritivo 0.7 % : Caldo Nutritivo Bioxón --- 8 gr., Agar Bacteriológico Bioxón 7 gr., Agua Destilada 1000 ml., se esterilizó y se agregaron ---  $\text{CaCl}_2$  1M 3 ml.
- c) Agar Sangre: Base de Agar Sangre Bioxón 40 gr., - Agua Destilada 1000 ml., se esterilizó y se agregaron 50 ml. de sangre humana desfibrilada y esté ril.
- d) SM : NaCl 5.85 g., Gelatina 0.5 g., Agua Destilada 480.5 ml., pH 7.4, después de esterilizar se - agregaron TRIS 1M pH 7.4 5 ml. y  $\text{MgSO}_4$  1M 2.5 ml.
- e) Caldo Nutritivo: Caldo Nutritivo Bioxón 8 g., Agua Destilada 1000 ml.

- f) Agar Suave : Agar Bacteriológico Bioxón 6 g., Peptona de Caseína Bioxón 10 g., NaCl Baker 2.5 g., Agua - Destilada 1000 ml.

### III. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE BACTERIOFAGOS

Se creció la cepa de Ps. aeruginosa en Caldo Nutritivo a 37°C con agitación durante 6 hrs., se centrifugó el cultivo a 15,000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante a un tubo estéril y se gotearon 5 microlitros sobre un tapiz de cepa indicadora en Agar Nutritivo 0.7 %. Se incubó por 18 hrs. a 37°C y se observó el halo de lisis sobre el tapiz bacteriano cuando apareció.

Para confirmar que el halo de lisis que se observó se debía a la muerte de la bacteria indicadora por un bacteriófago presente en el sobrenadante de la cepa clínica, con un palillo estéril se tomó un inóculo del centro del halo y se cruzó sobre una caja con Agar Nutritivo 0.7 % a la que se le agregó 0.1 ml. de la cepa indicadora con ayuda de Agar Suave. Se agitó suavemente para que el Agar Suave cubriera por completo la caja. Se dejó incubar a 37°C toda la noche, una -

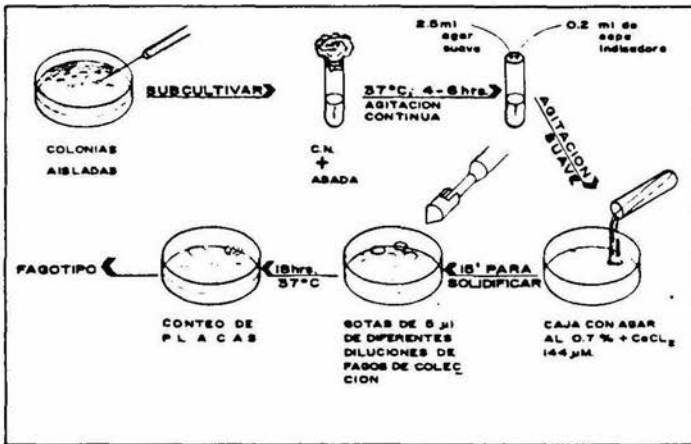


Figura 2.- Método ejemplificado de aislamiento y purificación de bacteriófagos.

vez que el agar suave había solidificado. Al día siguiente se observó la aparición de placas de lisis individuales en los casos en los que el sobrenadante había contenido bacteriófagos. Se repitió el procedimiento de purificación tomando el inóculo del palillo a partir de una placa aislada para obtener nuevamente halos de lisis ( figura 2 ).

#### IV. OBTENCION DE LISADOS DE ALTO TITULO

Los lisados de bacteriófagos se obtuvieron mezclando 0.2 ml. de la cepa indicadora de Ps. aeruginosa creciendo durante la noche en caldo nutritivo a 37°, más 0.1 ml. de  $\text{CaCl}_2$  1M, más una placa de fago en 1 ml. de caldo nutritivo. Se incubó la mezcla a 37° hasta lisis ( 4-5 horas ). Se centrifugó a 15,000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante a un tubo estéril, almacenándolo a 4°C.

#### V. TITULACION DE LISADOS

Los lisados se diluyeron en SM (  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ , etc. ) y se gotearon 5 microlitros de las diluciones apropiadas.

FAGO	TITULO
16	$2 \times 10^8$
21	$2.8 \times 10^{10}$
24	$6 \times 10^{10}$
31	$6 \times 10^{10}$
44	$8 \times 10^8$
73	$4.4 \times 10^{11}$
F8	$3.4 \times 10^{11}$
F10	$2.6 \times 10^9$
119x	$4 \times 10^{10}$
2	$3.2 \times 10^{11}$
1214	$1.6 \times 10^{11}$
M4	$1.1 \times 10^{12}$
M6	$1.8 \times 10^{11}$
C11	$4 \times 10^9$
188	$2 \times 10^{10}$

TABLA 4.- Título de los lisados de los bacteriófagos de la colección del C.P.H.L. calculados a partir de sus cepas indicadoras.

das sobre un tapiz de la cepa indicadora. Se incubó a 37°C toda la noche, al día siguiente se contaron las placas de lisis y se calculó el título usando la fórmula:

$$\text{UFP / ml} = \# \text{ de placas} / ( 0.0005 ) ( \text{Dilución} ) .$$

## RESULTADOS

### I. METODO DE TIPIFICACION

Antes de probar las respuestas de las cepas de la colección del CPHL a la infección con los bacteriófagos de la misma colección, cuya tabla patrón nos envió amablemente el Dr. Pitt, era necesario conocer el título de cada una de las diluciones preparadas para cada fago ( ver Material y Métodos Fracción V para la obtención de lisados de alto título ). En la tabla 4 se incluyen los títulos obtenidos correspondientes a la respuesta de las cepas más sensibles a cada uno de los fagos ( ver Material y Métodos Fracción V para la titulación de los lisados de alto título ) . Como podemos notar, los títulos resultaron altos, tomando en cuenta que todos caen en el rango que va de  $10^8$  a  $10^{12}$  y que el título obtenido generalmente obtenido en este tipo de pruebas es de alrededor de

Bacteriófagos

	7	16	21	24	31	44	68	73	F8	F10	119x	2	214	M4	M6	C11	188
7	5	0	0	-	0	0	0	1	0	-	4	0	-	4	0	4	0
16	-	5	-	0	0	0	5	-	0	2	0	-	0	-	0	0	0
21	3	0	5	-	0	4,2	5	-	0	-	4	1	0	0	0	-	5
24	-	-	0	5	0	5	4	0	3	-	-	0	5	4	0	4	5
31	0	0	4	0	5	-	0	0	-	-	0	-	0	0	0	0	4
44	0	-	3,5	-	0	4,5	0	-	0	-	4	-	4	0	0	0	4
68	0	0	0	0	0	-	5	11	4	-	0	0	5	0	0	0	-
73	0	2,3	0	0	0	-	5	5	0	-	5	0	2	0	4	5	-
F7	0	0	0	-	0	0	5	0	0	-	0	-	0	0	0	0	-
F8	3,1	5	0	5	0	5	5	1,2	4,5	0	4,5	5	5	5,4	3,4	4,5	0
F10	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4,5	0	0	0	0	0	0	0
119x	5	-	5	3,5	0	0	5	1,0	-	-	5	5	-	5	-	4,5	5
2	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5	0	5	0	5	5
214	0	2	5	2,1	0	2	5	2	3	2	2	-	5	0	0	0	0
M4	5	4,5	5	0	4	5	4,5	4	5	3	4,5	5	5	5	0	5	4
M6	0	2,1	4,5	2	0	-1	5	1	0	2	5,4	0	5,4	3	5	0	0
C11	5	2	4	0	0	5	5	0	5	0	3	-	4	-	5	0	0
188	0	-	0	0	0	0	5	1	-	0	0	-	0	0	3	5	0

Bacterias

TABLA 5.- Se tituló cada fago en todas las cepas como se describe en Material y Métodos.

5= Título en la cepa indicadora homóloga.

4=  $10^{-1}$ - $10^{-2}$  del título en la cepa indicadora homóloga.

3=  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  del título en la cepa indicadora homóloga.

2=  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  del título en la cepa indicadora homóloga.

1=  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  del título en la cepa indicadora homóloga.

0= Adelgazamiento ( sin formación de placa ).

- = No hubo reacción.



10<sup>9</sup>. Cabe mencionar que de los 18 lisados concentrados recibidos de Morelia, tuvimos que eliminar tres por no ser posible calcular su título, probablemente debido a su inactivación en el trayecto a México. Cada vez que se emplearon nuevos lisados, se calculó el título de ellos.

Una vez conocidos los títulos, se procedió a montar la tabla patrón para establecer la reproducibilidad del método con medios de cultivo nacionales ( Bioxón ). Utilizando la técnica descrita en la Fracción VI de Material y Métodos, procedimos a tipificar las cepas de colección. En la tabla 5, se comparan los resultados obtenidos por nosotros y los concentrados en la tabla patrón enviada por el Dr. Pitt. En los cuadros donde aparece un sólo número, se indica que el resultado obtenido en el laboratorio fue el mismo que el reportado por el Dr. Pitt, mientras que en los cuadros donde aparecen dos números, el primero corresponde al reportado por nosotros y el segundo al indicado por el Dr. Pitt. Se puede pensar que las variaciones indican que no es la respuesta adecuada, sin embargo, el Dr. Pitt aclara este punto al indicar que variaciones hasta de dos números ( en forma creciente o decreciente con respecto al reportado ) son válidas y se pue-

Bacteriófagos

Bacterias

	2	21	31	24	19A	16	44	73	FR	F	C	U	M	M6	188	CM
PH 10	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
PH 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 554	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 555	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+
PH 557	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 1293	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 2705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
PH 4363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 5011	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+
PH 307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 467	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 452	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 478	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
PH 489	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 580	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 582	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PH 623	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PH 626	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PH 628	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PH 650	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
PH 760	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 783	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 788	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 1003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 1037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PH 1043	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 1044	-	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 1046	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 1105	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 1106	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PH 1107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 1342	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 1371	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 1503	-	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 1522	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH 1600	-	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
PH 1650	-	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++

TABLA 6.- Respuestas de las Ps. aeruginosa obtenidos de Hospitales Mexicanos a los bacteriófagos de la colección del CPHL.  
 += 1 a 19 placas.  
 += 20 a 50 placas.  
 ++= Más de 50 placas.  
 -= No hay reacción.

HECATEMIA	RESPUESTA DE LAS <i>Pa. aeruginosa</i> A LA INFECCION DE LOS FAGOS DE COLECCION	TIPO
PHC 10	2/ 119x/ 114/ C11/ ** M4/ * 24/ ±	1
PIS 555	2/ 24/ 119x/ M4/ M6/ ** C11/ *	1
PIS 557	2/ **	2
PIS 2705	C11/ ±	1
PIS 5017	119x/ M6/ 188/ C11/ ** 44/ *	4
PHC 462	119x/ 16/ C11/ ** 2/ * 73/ F8/ M4/ M6/ ±	5
PHC 479	44/ C11/ ** F8/ 1214/ * 16/ M6/ ±	5
PHC 602	2/ 21/ 119x/ * 24/ 1214/ 188/ ±	7
PHC 624	2/ 24/ F10/ M4/ C11/ ±	8
PHC 650	2/ 119x/ M6/ 188/ ** M4/ 44/ C11/ * F8/ M4/ ±	8
PHC 711	44/ C11/ ** 119x/ * 16/ 1214/ ±	10
PHC 760	119x/ ** 2/ *	11
PHC 783	119x/ ** 2/ * 73/ ±	11
PHC 1001	2/ 119x/ *	11
PHC 1037	2/ 119x/ *	11
PHC 1051	119x/ 16/ C11/ ** 24/ M6/ ±	12
PHC 1083	2/ 119x/ 16/ 44/ F8/ 1214/ 188/ C11/ ** 24/ ±	13
PHC 1096	2/ *	11
PHC 1105	119x/ 2/ M6/ ±	11
PHC 1106	119x/ 2/ C11/ ±	11
PHC 1348	16/ 44/ 1214/ 21/ F8/ C11/ 119x/ ** M4/ * 2/ ±	14
PHC 1371	16/ 44/ 1214/ 21/ C11/ ** 119x/ M4/ F8/ * 2/ ±	14
PHC 1600a	2/ ** M4/ 44/ 188/ 119x/ * F8/ ±	15
PHC 1600b	16/ 2/ M4/ F10/ ±	16
PHC 1640	F8/ 21/ ** 44/ 24/ M4/ *	17
PHC 1658	21/ M4/ ** 44/ C11/ * F8/ ±	17

TABLA 7.- Los datos fueron seleccionados de la tabla 6. Se incluyen solamente las cepas tipificables agrupándolas dentro del mismo tipo cuando difieren en la respuesta a dos fagos inclusive. Son de diferente tipo cuando varían en la respuesta a más de dos fagos.

de asumir que prácticamente es la misma respuesta. Esto se de  
be a la poca reproducibilidad del método. Después de analizar  
las respuestas obtenidas luego de tres repeticiones y compa -  
rarlas con las reportadas en la tabla patrón, encontramos que  
al montar el método obtuvimos un 95 % de reproducibilidad sin  
tomar en cuenta la observación del Dr. Pitt, ya que si la to-  
mamos en cuenta, la reproducibilidad es del 100%.

## II. TIPIFICACION

Sabiendo que el método funcionaba con una reprodu-  
cibilidad aceptable, procedimos a tipificar las 41 cepas clíni-  
cas que nos envió el laboratorio de Morelia. Utilizando la téc  
nica VI de Material y Métodos, medimos la respuesta de cada --  
una de las cepas clínicas a la infección con todos los fagos -  
de colección. En la tabla 6 podemos observar los grados y los  
casos en los que las bacterias presentaron respuesta. Vemos --  
que de las 41 cepas clínicas, 26 resultaron tipificables ----  
( 63.41 % del total ) con la batería de fagos de colección, cu  
yas respuestas están concentradas en la tabla 7. Analizando la  
tabla se ve que obtuvimos 17 categorías tipo de respuesta a fa

TABLA 8: COMPARACION DE FAGOTIPOS Y PIOCINOTIPOS  
DE LAS CEPAS CLINICAS.

PIOCINOTIPO	FAGOTIPO	No. DE CEPAS
1ix; 3b	1	2
1c	11	7
1c	15	1
1c	16	1
5k; 5j	14	2
1b	17	2

	PIS 551	PHC 489	PHC 296	PHC 1197	PHC 624	PHC 633
PHC 763	-	-	*	-	-	*
PHC 763	-	-	*	-	-	*
PHC 711	-	-	*	-	-	*
PHC 602	-	-	*	-	-	*
PHC 1344	-	-	*	*	-	*
PHC 1679a	*	-	-	*	-	-
PHC 1096	*	-	-	-	-	-
PHC 1106	*	-	-	-	-	-
PHC 1001	*	-	*	*	-	*
PHC 479	*	-	*	-	-	*
PIS 10	*	-	-	-	-	*
PHC 452	*	-	*	-	-	*
PHC 1658	*	-	-	*	-	-
PHC 1602b	-	-	*	-	-	*
PHC 624	-	-	*	-	-	*
PIS 551	-	-	*	*	-	*
PHC 1051	-	-	*	*	-	*
PHC 650	-	-	*	-	-	*
PHC 1093	-	-	*	-	-	*
PHC 479c	-	-	*	-	-	*
PHC 1371	-	-	*	-	-	*
PHC 1640	-	-	*	*	-	*
PHC 501*	-	-	-	*	-	-
PHC 623	-	-	-	*	-	-
PHC 1937	-	-	*	-	-	*
PHC 786	-	*	-	-	-	-
PHC 1174	-	-	*	-	-	*

TABLA 9.- Fagotipo de las cepas de hospital obtenido a partir de sus respuestas a la infección con fagos -- silvestres. El margen izquierdo indica los bacteriófagos que infectaron productivamente, mientras que el margen superior indica las cepas tipificadas.

gos en las que se agrupan las 26 bacterias que dieron respuesta positiva a la infección. Asimismo, se notan las diferencias que permiten agrupar a las bacterias en las diferentes categorías tipo. El laboratorio de Morelia nos envió los resultados de la piocinotipia y, con los datos que obtuvimos por fagotipia, comparamos ambos resultados y encontramos que en algunos casos en los que el piocinotipo de dos o más cepas era diferente, el fagotipo era el mismo y viceversa ( tabla 8 ).

### III. OBTENCION DE NUEVOS FAGOS

De las 41 cepas clínicas tipificadas, 15 dieron respuesta negativa ( 36.56 % del total ), por lo que buscamos nuevos fagos susceptibles de inclusión en el juego de colección, obtenidos, además, de las mismas cepas clínicas. La técnica usada en el paso anterior se describe en la Fracción III de Material y Métodos. Se probó cada sobrenadante en las 41 cepas clínicas y se obtuvieron 28 bacteriófagos nuevos que sirvieron para tipificar sólo cinco ( 33.33 % del total ) de las cepas no tipificables. Las respuestas de estas cepas están concentradas en la tabla 9. Aquí encontramos que dos de las bacte

rias presentan la misma respuesta, por lo que podemos decir -- que éste es otro tipo nuevo. Esto aumenta el porcentaje de cepas tipificables de un 63.41 % inicial a un 75.6 % final.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Existen cinco razones que pueden explicar el hecho de por qué hubo cepas que dieron respuesta negativa a la infección con los diferentes fagos. Hay ocasiones que la presencia, o bien la ausencia, de sustancias específicas en el medio de cultivo, provocan que los receptores, específicos también, se oculten. También puede darse el caso de que dichos receptores no existan en la superficie celular. Cualquiera de los dos casos anteriores impide que se lleve a cabo el primer paso del ciclo vital de los fagos, es decir, la adsorción, lo que constituye la primera de las razones plausibles de las respuestas negativas de las cepas clínicas. Algunas veces el DNA viral sí penetra al interior de la célula, pero las endonucleasas secuencia específicas ( enzimas de restricción ) lo localizan, reconociéndolo como extraño y degradándolo hasta dejarlo como materia prima parte del acervo celular. Esto constituye nue-



tra segunda posible explicación a la no tipificación. Sucede también que las bacterias hayan sido previamente infectadas -- por otro fago relacionado con el que la intenta infectar, ocasionando ésto que la célula presente inmunidad contra el segundo fago conferida por el primero. Lo anterior sería la tercera razón que impediría la adecuada tipificación. En algunas ocasiones, los fagos que infectan a ciertas bacterias provocan en éstas un cambio morfológico llamado conversión lisogénica que le confiere a la bacteria inmunidad contra posibles infecciones posteriores. Si la cepa ha sufrido una conversión lisogénica, ésto explicaría la ausencia de respuestas por parte de las bacterias, lo que constituiría la cuarta razón de la no tipificación. Por último, si la bacteria posee un plásmido, éste le confiere un tipo de inmunidad cuya eficiencia se debe a cam -- bios a nivel de superficie celular, lo que causaría que los receptores específicos se ocultaran y, como consecuencia, no podría llevarse a cabo la adsorción, primer paso del ciclo fágico.

Aber ( 8 ) propone un sistema ideal para tipificar microorganismos que consta de varios puntos:

- 1) Sistema standardizado.

- 2) Reproducible.
- 3) Sensible.
- 4) Estable.
- 5) Disponible.
- 6) Barato.
- 7) Aplicable a un amplio rango de microorganismos.
- 8) Probado en el campo en conjunción con la investigación epidemiológica.

Analizando un poco el sistema propuesto por Aber y el aplicado por nosotros, podemos mencionar que en cuanto a -- que es un sistema standard, se puede lograr si se persiste en las condiciones de desarrollo de los experimentos y se intente mantenerlas iguales en las repeticiones. Mientras que en lo -- que concierne a la reproducibilidad, la obtenida por nosotros fue bastante satisfactoria, lo que habla a favor del método y -- de los medios de cultivo nacionales, ya que si cambia un poco -- digamos la concentración y proporción de las sales del medio, -- la bacteria oculta sus receptores, sintetiza moco o simplemente no crece. En cuanto a la sensibilidad, el método necesita conjgarse con otra técnica de tipificación de tal manera que los datos arrojados por el análisis resulten más confiables. Por par-

te de la estabilidad, los recursos biológicos utilizados son - bastante estables en cuanto a viabilidad si se mantienen en las condiciones adecuadas. Si la bacteria se mantiene en Agar Nutritivo 2 %, puede sobrevivir en perfectas condiciones por aproximadamente 30 días y, si se resiembró en medios frescos al final de ese lapso, se puede mantener durante largo tiempo. Existen otros medios de conservación que permiten mantener viable a la bacteria, entre los que podemos contar al Glicerol 80 % ( con el cual la bacteria puede durar hasta seis meses sin resiembra en congelación ), la liofilización ( que puede mantener viable a la bacteria por tiempo indefinido ), etc. En cuanto a los fagos, mantenidos en medio SM a 4°C bajan uno o dos logaritmos en el título, pero después permanecen estables y con capacidad de infección -- durante por lo menos seis meses. Por disponibilidad, depende de los medios con que se cuente tanto en el laboratorio como de la capacidad de solicitud a otros laboratorios del material biológico necesario. El método no es excesivamente caro, ya que en una investigación de este tipo se gasta de Agar Bacteriológico, por ejemplo, aproximadamente 600 g. a lo largo de un año de trabajo constante. En cuanto a la aplicabilidad a un amplio rango de microorganismos, la fagotipia se ha aplicado a un buen número de -

bacterias asociadas con infecciones nosocomiales, aunque ha sido particularmente útil con Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y la especie Salmonella. En cuanto a haber sido probado en el campo a la par que la investigación epidemiológica, disponemos de bibliografía que habla de su aplicación durante epidemias en varios hospitales ingleses ( 4 ).

Podemos concluir entonces que las limitaciones generales del método en este caso particular incluyen dificultades con la standardización del método, así como la intensa labor de la prueba.

Por otro lado, desde el punto de vista epidemiológico, es importante determinar la categoría tipo más abundante en una población de cepas. En el caso de las cepas clínicas que nos concierne, el que prevalece es el tipo 11, lo cual en caso de presentarse una epidemia grave en la que prevalezca este tipo, indica que el foco de infección se localiza dentro del mismo hospital del cual provienen.

El laboratorio de Morelia nos envió el piocinotipo de cada una de las cepas, lo cual nos permitió arrojar datos más confiables en cuanto al tipo de cada una de ellas. Como se indica en la introducción, se recomienda combinar dos métodos -

de tipificación de tal manera que al combinar los dos resultados, los datos que se reporten tengan un mayor grado de confiabilidad. Al establecer la correlación existente entre piocintipia y fagotipia, encontramos que es de 46 %, la cual, tomando en cuenta el número de cepas tipificadas, puede resultar aceptable.

Concluimos, asimismo, que el método de fagotipia será eficazmente útil para detectar cambios en la superficie celular inducidos por la lisogenización por fagos silvestres en las cepas que se manejarán.

Por último, creemos que este tipo de estudios deben por necesidad tornarse prácticas continuas en los laboratorios epidemiológicos de los hospitales, ya que esta clase de herramientas permiten establecer diagnósticos más firmes, así como los tratamientos a seguir. Sería asimismo conveniente que se toman más en cuenta y se les otorgara la importancia que merecen ya que cuando se presentan epidemias nosocomiales, son de gran utilidad para establecer los parámetros y las líneas de control a seguir para evitar que se propaguen las infecciones y resulten en epidemias poco controlables.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gilardi, G. L., Medical Microbiology en Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes, and their treatment. Editado por L. D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna ( 1979 ) p. p. 25 - 31
  
- 2.- Palleroni, N. J., General Properties and Taxonomy of the Genus Pseudomonas en Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Editado por P. H. Clarke y M. H. Richmond. John Wiley and Sons ( 1975 ) p. p. 1 - 37.
  
- 3.- Rhame, F. S., The Ecology and Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa en Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L. D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna ( 1979 ) p. p. 31 - 55.

- 4.- Pruitt, B. A. Jr., Infections of Burns and Other Wounds caused by Pseudomonas aeruginosa en Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L. D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna ( 1979 ) p.p.55 - 71
  
- 5.- Costerton, J. W., Pseudomonas aeruginosa in nature and disease en Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L. D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna ( 1979 ) p.p. 15 - 25.
  
- 6.- Lowbury, E. J. L., Ecological Importance of Pseudomonas aeruginosa: Medical Aspects en Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Editado por P. H. Clarke y M. H. Richmond. John Wiley and Sons ( 1975 ) p. p. 37 - 67.
  
- 7.- Pitt, T. L., State of the art: Typing Pseudomonas aeruginosa. J. Hosp. Infec. ( 1980 ) 1 193.

- 8.- Aber, C. R., Mackel, D. C., Epidemiologic Typing of Nosocomial Microorganisms, Am. J. Med. ( 1981 ) 70 899.
- 9.- Sakamoto, Y., A phage typing of Pseudomonas aeruginosa.  
Comunicación Personal ( 1980 ).
- 10.- Stent, G. S., Calendar, R., Molecular Genetics, and Introductory narrative. 2nd. ed. W. H. Freeman and Co.  
( 1978 ) E. U. A.
- 11.- Mathews, C. K., Reproduction of Large Virulent Bacteriophages en Comprehensive Virology, Vol. 7, Cap. 3,  
p. p. 179 - 294, Fraenkel Konrat eds., Plenum ( 1977 ).