

34
29^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS DE
Vibrio cholerae DE AGUAS NEGRAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA :

MISAEI MONDRAGON BARRETO

DIRECTORES :

DRA. SILVIA GIONO CEREZO

QFI. ANDREA BECERRIL OSNAYA

M EN C. GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO. SEPTIEMBRE DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Aislamiento de Bacteriófagos de Vibrio cholerae de Aguas Negras

que presenta el pasante: Miguel Mondragón Barreto
con número de cuenta: 833438C-3 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Méx., a _____ de _____ de 199__

| | | |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE | <u>M.V.Z. Luz Ma. Ortega Leyva</u> | |
| VOCAL | <u>C.P.I. Andrea Becerril Canaya</u> | |
| SECRETARIO | <u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>MenC. Sofia González Gallardo</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>C.P.B. Marcela Hernández Vargas</u> | |

**AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS
DE Vibrio cholerae DE AGUAS NEGRAS.**

**A mis padres:
Jesús Mondragón Martínez
Raquel Barreto Vázquez
por su ejemplo, confianza,
guía, amor y apoyo para
lograr ésta meta.
A ellos con respeto y gratitud.**

**A mi esposa:
Rosy
por su amor, apoyo
y compañía.**

**A Marianita,
mi linda y adorable
bebé.**

A mis hermanos
con cariño:
Samuel, Esther, David, Eli y Elizabeth.

**A la M en C.
Guadalupe Rodríguez Angeles
por su ayuda y consejos para
la realización de éste trabajo.**

**A mis amigos:
por su amistad.**

**A tí :
que sin saberlo me
has ayudado en los
momentos difíciles
de mi vida.**

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. SILVIA GIONOCEREZO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA MOLECULAR, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS (INDRE). SSA.

GLOSARIO

| | | |
|-----|---|------------------------------------|
| APA | - | Agua peptonada alcalina. |
| BAB | - | Base de agar sangre. |
| BHI | - | Caldo de infusión cerebro corazón. |
| DNA | - | Acido desoxirribonucleico. |
| LPS | - | Lipopolisacárido. |
| RNA | - | Acido ribonucleico. |
| RTD | - | Dosis rutinaria de trabajo. |
| pb | - | Pares de bases. |
| TSB | - | Caldo soya-tripticosa. |
| TSI | - | Agar triple azucar-hierro. |
| UFP | - | Unidades formadoras de placas. |

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 2 |
| I. Aspectos generales | 3 |
| II. Definición de <u>Vibrio cholerae</u> | 4 |
| III. Definición de bacteriófago | 5 |
| IV. Morfología y clasificación de vibriofagos | 6 |
| V. Diferenciación de biotipos de <u>V. cholerae</u> O1 | 10 |
| - Métodos para biotipificar <u>V. cholerae</u> O1 | 12 |
| VI. Multiplicación de bacteriófagos | 16 |
| VII. Fagotipificación de <u>V. cholerae</u> O1 | 21 |
| - Fagotipificación para la identificación de cepas de <u>V. cholerae</u> .. | 21 |
| - Fagotipificación de <u>V. cholerae</u> biotipo clásico | 23 |
| - Fagotipificación de <u>V. cholerae</u> biotipo eltor | 23 |
| VIII. Propiedades de los bacteriófagos de <u>V. cholerae</u> | 24 |
| JUSTIFICACION | 27 |
| OBJETIVOS | 28 |
| MATERIAL Y METODOS | 30 |
| RESULTADOS | 45 |
| DISCUSION | 55 |
| CONCLUSIONES | 60 |
| REFERENCIAS | 63 |

Resumen

Se trabajaron con 100 muestras ambientales (aguas negras) recolectadas de diferentes partes de la Ciudad de México. De éstas muestras se aislaron y se lograron propagar 3 bacteriófagos de *Vibrio cholerae* O1 biotipo eltor, a los cuáles se les llamó: 41 INDRE, 670 INDRE, y 672 INDRE.

Se observó que los fagos INDRE tuvieron la misma afinidad y el mismo comportamiento lítico que el fago V eltor de Basu y Mukerjee cuando se enfrentaron a cepas de *V. cholerae* O1 biotipo eltor. También mostraron la misma afinidad hacia los tres serotipos de *V. cholerae*.

Se les practicó la técnica de extracción de DNA a todos los fagos (41, 670, 672, IV y V) para comparar, por medio del corrimiento electroforético, los pesos moleculares de los genomas. De esto se obtuvo que los cinco genomas de fagos tienen el mismo peso molecular. Se calculó el peso molecular y resultó ser que los DNAs de los fagos IV clásico, V eltor, 41 INDRE, 670 INDRE y 672 INDRE, tienen el mismo valor de peso molecular que es de 13,894 pares de bases (pb).

INTRODUCCION

I. ASPECTOS GENERALES.

El cólera es una enfermedad específica del ser humano. Se sabe que produce infección gastrointestinal aguda, grave, caracterizada por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación rápida, acidosis, colapso circulatorio y en los casos no tratados, la muerte dentro de las 24 horas de su aparición. La infección también puede ser asintomática o provocar síntomas leves. La letalidad en los casos graves no tratados puede exceder el 50%, pero si se aplica tratamiento oportuno ésta se reduce a menos del 1% (27,52). Esta enfermedad ha involucrado a muchos países del mundo en siete epidemias originadas en la India, en el continente asiático (32).

Estimaciones hechas por Pollitzer (1959), señalan que se perdieron más de cien millones de vidas en estas epidemias (41).

Las epidemias de cólera originadas en Asia fueron conocidas como cólera asiático. El organismo causal de ésta enfermedad fué Vibrio cholerae Clásico. Gotschlich en 1906, aisló otro tipo de éste organismo del intestino de seis peregrinos de la Mecca, en la estación de cuarentena El Tor, en la India. Los pacientes provenían de un área que era completamente libre de cólera, ésto causó gran confusión respecto a la identidad y el origen de la bacteria. Estas cepas de Vibrio presentaron una similitud muy estrecha con el tipo clásico de V. cholerae, excepto en la prueba de hemólisis de eritrocitos de carnero o cabra, propiedad que no se presenta en las cepas clásicas. A éstas cepas de V. cholerae; comúnmente se les conocía como vibrios El Tor, pero desde 1969 se le denomina como V. cholerae biotipo o biovar eltor. V. cholerae biovar eltor fué aislado de gran cantidad de casos de diarrea secretora severa, también se recuperó de individuos sanos y de fuentes acuáticas situadas en el suroeste de Asia y en la India (41).

En 1961, territorios extensos del lejano oriente incluyendo a Macao, Hong Kong, Sarawak y Filipinas estuvieron involucrados en lo que ahora se sabe fué el principio de la séptima pandemia (13). Mukerjee y Guha Roy (1962) fueron los primeros en

reportar aislamientos de V. cholerae biotipo eltor de las epidemias de cólera en éste territorio. En ésta década, el cólera eltor se extendió sobre las islas del oeste y del sur del Pacífico, a países del sureste y Asia central hasta llegar a muchos países lejanos de África y Europa (41).

En vista de que la historia del cólera se ha caracterizado por oleadas epidémicas, se creía que no existía ningún reservorio natural permanente en la mayor parte del mundo. Sin embargo, en años recientes se han identificado en el ambiente focos endémicos de V. cholerae O1 toxigénico. Por ejemplo, reiteradamente se han producido casos de cólera a consecuencia de haber bebido agua de ciertos ríos australianos remotos o por comer cangrejos semicocidos capturados en las aguas de la costa del Golfo de México en territorio perteneciente a los E.U. En ambos lugares se aisló V. cholerae O1 toxigénico de las aguas superficiales. Ello indica que al menos algunas cepas de V. cholerae O1 pueden persistir en el ambiente natural, tanto en aguas de mar como en aguas de río; y con mayor razón, persisten en corrientes de aguas residuales o aguas negras (13, 22,38, 51).

II. DEFINICION DE Vibrio cholerae.

V. cholerae es un bacilo aerobio gram negativo curvo que tiene gran movilidad por poseer un flagelo polar. No forma esporas. Es indofenol oxidasa positivo y a partir de la glucosa produce ácido, sin gas. Usualmente, no fermenta la lactosa dentro de 24 h de incubación. Fermenta la glucosa, la sacarosa y la manosa, pero no la arabinosa. Una cepa puede ser llamada V. cholerae tan solo si produce lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, pero no produce arginina dehidrolasa, ni ácido sulfhídrico detectable en el medio de TSI ó en el agar hierro de Kligler (16,41).

Los primeros estudios de la estructura antigénica de Vibrio revelaron que hay diferentes tipos serológicos y demostraron la presencia de antígeno flagelar H (termolábil) y antígeno somático O (termoestable). Las grandes epidemias de cólera fueron causadas por cepas de V. cholerae con un mismo antígeno somático O

presente en su pared celular, que se designa como grupo O1. Sin embargo, las cepas pertenecientes a otros grupos serológicos, como grupos de V. cholerae No O1 o vibrios NAG (vibrios no aglutinables con suero anti-O1, designados con números arábigos) se han encontrado en otros brotes de diarrea parecida a cólera o en casos de gastroenteritis (16). La simple distinción entre V. cholerae O1 y V. cholerae No O1 se volvió obsoleta a principios de 1993, cuando se dió el primer reporte de que una severa epidemia parecida a colera emergió en la India y Bangladesh (7). En un principio, el organismo causante de éste brote fué clasificado como V. cholerae No O1. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que éste microorganismo no pertenecía a los serogrupos "O" previamente descritos para V. cholerae, sino que era uno nuevo, designado como O139 (30, 48).

V. cholerae O1 se clasifica en dos biotipos o biovares: biotipo clásico y biotipo eltor. La variante eltor fué descubierta como la causante de cólera durante la séptima epidemia; pero las propiedades de ese organismo no fueron lo suficientemente distintivas como para demandar o cambiar su identidad como una especie separada (16).

V. cholerae biotipo clásico y biotipo eltor pertenecen al serotipo O1. Los vibrios del serogrupo O1 pueden ser diferenciados serológicamente en tres subgrupos o serotipos en base a qué componentes del antígeno O (A, B y C) se expresan en la pared celular de la bacteria. Estos serotipos son: Inaba, Ogawa e Hikojima, (16). (Tabla 1).

III. DEFINICION DE BACTERIOFAGO.

Las bacterias son sujetos de infección por un gran número de virus, conocidos como bacteriófagos.

Aunque los efectos de la infección por bacteriófagos fueron observados por muchos investigadores en los inicios del siglo, no fué sino hasta que Twort, en 1915, estudió la acción lítica en colonias de estafilococos y aisló el agente responsable. Dos años mas tarde, d'Herelle, independientemente aisló un bacteriófago del bacilo

que produce disentería, caracterizándolo como un parásito ultramicroscópico presente en la bacteria, y le dió el nombre de "bacteriófago". Hasta 1922, la verdadera naturaleza de los bacteriófagos era todavía un tema controversial, ya que la teoría de los virus no era completamente aceptada (10). Ahora, sin embargo, las técnicas modernas han demostrado que estaban en lo cierto; y así, Adams(1) definió que los bacteriófagos son "virus autónomos, análogos a los virus de las plantas y de los animales, pero que obligadamente parasitan a las bacterias". Hasta 1940, la investigación de fagos consistía principalmente de intentos desalentadores para usar los fagos con fines terapéuticos y no fué sino hasta la Segunda Guerra Mundial en que surgió una investigación más a fondo (10).

Desde el descubrimiento de los bacteriófagos, se han encontrado otros tipos de sustancias, como las bacteriocinas, asociadas con varias especies de bacterias; pero no todas tienen actividad biológica como los bacteriófagos, que pueden desarrollar dos tipos de ciclos replicativos, el ciclo lítico y el ciclo lisogénico, (ver mas adelante) (10).

Los estudios sistemáticos acerca de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los vibrifagos empezaron a realizarse alrededor de 1960 (16).

IV. MORFOLOGIA Y CLASIFICACION DE VIBRIOFAGOS.

Los virus están contruidos con los mismos principios y, por lo tanto, los fagos tienen una forma viral convencional: un corazón constituido por ácido nucléico que puede ser RNA ó DNA, y que está envuelto por una capa proteica y además, muchos de ellos tienen un tallo con el cuál se adsorben a su célula hospedera. Sin embargo, la forma y el tamaño de la cubierta de proteínas varía grandemente. El ácido nucléico se encuentra en forma de una larga molécula filamentososa que puede estar integrada por una cadena sencilla o una cadena doble (10).

TABLA 1.

Serotipos de Y. cholerae O1.

| Serotipo | Subsidiario de antígeno O presente en cultivo. | Aglutinación en <u>suero adsorbido de conejo</u> | |
|-----------|---|---|-------|
| | | Ogawa | Inaba |
| Ogawa | A, B | + | - |
| Inaba | A, C | - | + |
| Hikojima* | A, B, C | + | + |

* Algunos autores lo consideran como un serotipo de transición.

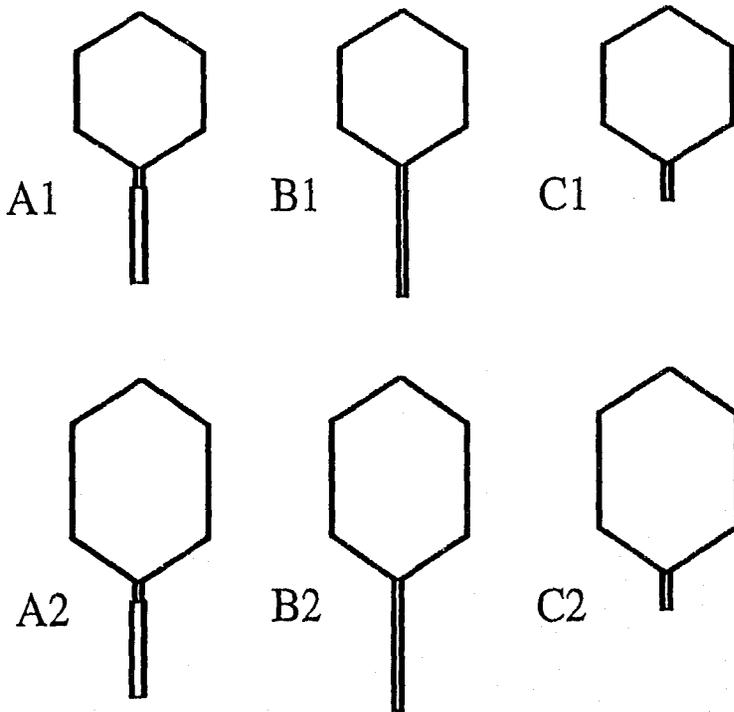
Tomado de Giono, S. 1994. (27).

La cubierta proteica es un ensamblado de subunidades morfológicamente idénticas, las cuáles están compuestas de unidades más pequeñas. La partícula puede o no tener apéndices como parte estructural o adheridas a ella. Para explicar la descripción morfológica, Lwoff et al. en 1959 (34), desarrolló una terminología especial. El ácido nucleico se le conoce como corazón; la cubierta proteica es la cápside o cabeza y las subunidades morfológicas que lo forman son los capsómeros. A la partícula infectiva completa se le llama virion (29).

Los virus están contruidos en estrictas líneas geométricas y obedecen las leyes de simetría. Horne y Wildy revisaron en detalle este aspecto (28,10). Los principios estructurales fundamentales de los virus fueron dictados por Crick y Watson en 1956 (14), quienes sentaron los principios; particularmente de los pequeños viriones contenedores de RNA. Ellos señalaron que el material genético era insuficiente para codificar nada más que un pequeño número de proteínas de bajo peso molecular, así que el único modo de construir una cápside era empleando repetidamente el mismo tipo de molécula. Esta teoría daba apoyo a la presencia de las subunidades proteicas mencionadas antes, debido a que una mejor manera de utilizar las subunidades idénticas era dándoles un rearrreglo ordenado, como lo es el rearrreglo simétrico. Desde que se hicieron éstas predicciones, el microscopio electrónico ayudó a demostrar que éstas teorías son válidas, no solo para los pequeños viriones, sino también para los grandes y complejos virus, incluyendo los bacteriófagos (10).

En 1984, Ackermann et al. (4), propuso el esquema de clasificación actual; en el que los fagos fueron clasificados principalmente empleando el criterio del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), (37). Solo se consideraron en ésta clasificación los fagos cultivables y los de morfología conocida. Se excluyeron aquellos fagos defectuosos y las vibriocinas (8).

Los fagos tienen cabezas isométricas o elongadas y tallos que son contráctiles, largos y no contráctiles o muy cortos y no contráctiles. Se agrupan en seis morfotipos básicos y en las familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, como se ilustra en la figura 1 (4,5).



Myo-

Siphon- *

Podo-

viridae

* También llamado Styloviridae.

Figura 1. Morfotipos de Vibriofagos.

Tomado de Ackerman, HW, y cols. 1984 (4).

La caracterización morfológica sistemática de vibriofagos fué reportada por primera vez por Chatterjee et al. en 1965 (15). Los fagos clásicos de Mukerjee fueron teñidos, empleando la tinción negativa con fosfotungstato de sodio.

El fago del grupo I presentó una cabeza polihédrica de $70.6 \pm 1.8 \times 74.0 \pm 2.7$ nm. La presencia de un tallo es dudosa, aunque se observó una proyección corta parecida a una barra o cola sobresaliente de un vértice de la cabeza. Los fagos del grupo II poseen una cabeza polihédrica bien definida de $62.1 \pm 3.1 \times 65.6 \pm 3.7$ nm, y un tallo de 81.0 ± 3.2 nm de largo y 16.6 ± 2.0 nm de ancho. Se detectaron también, estructuras semejantes a una placa, y fibrillas al final del tallo. Los fagos del grupo III también presentaron una cabeza polihédrica de $61.1 \pm 5.0 \times 64.4 \pm 5.3$ nm, y un tallo corto de 17.8 ± 2.0 de largo y 17.4 ± 2.5 nm de ancho. Los fagos del grupo IV poseen una cabeza polihédrica de $73.8 \pm 3.3 \times 83.6 \pm 4.0$ nm y un tallo largo, delgado y flexible de 152.8 ± 8.2 nm de largo y 10.7 ± 1.4 nm de ancho. Una placa o estructura semejante a un plato de aproximadamente 13.0 nm fué detectada al final del tallo (16,35,36, 41)(Fig. 2).

De los cinco grupos de fagos eltor, solo un fago perteneciente al grupo I fué estudiado por Maiti y Chaterjee (41).

V. DIFERENCIACION DE BIOTIPOS DE V. cholerae O1.

V. cholerae O1 biovar eltor se considera diferente de los vibrios del biovar clásico en base a sus características bioquímicas. La prueba de hemólisis, fué usada por largo tiempo como único criterio para distinguir ambos biotipos de V. cholerae, posteriormente se consideró inadecuada para éste propósito. Las cepas eltor que fueron no hemolíticas en su primoaislamiento pero fueron hemolíticas después de unos cuantos subcultivos, siguieron siendo consideradas eltor. Tomando en cuenta ésta variación en la propiedad hemolítica de las cepas eltor, se desarrollaron otras pruebas con el fin de diferenciar ambos biotipos (41).

Las pruebas más importantes son: aglutinación de eritrocitos de pollo, técnica propuesta por Finkelstein y Mukerjee en 1963; sensibilidad a polimixina B,

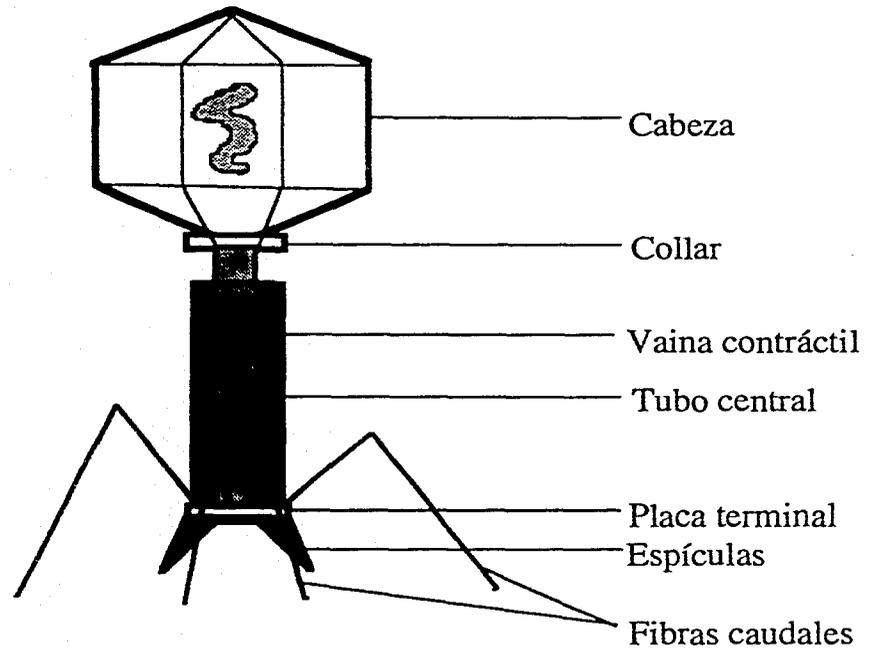


Figura 2. ESTRUCTURA DE BACTERIOFAGO.

Bacteriófago IV clásico de Vibrio cholerae.

Modificado de Ackerman, HW. y cols. 1984 (4) y Majumdar, S. y cols. 1988 (36).

propuesta por Gan y Tjia en 1963 y sensibilidad a fago IV y V, propuesta por Mukerjee en 1963 y Basu y Mukerjee, respectivamente (41).

Desde el surgimiento de las cepas eltor en epidemias y pandemias, la biotipificación asume gran importancia epidemiológica. Tabla 2.

A. METODOS PARA BIOTIPIFICAR V. cholerae O1.

1.- Prueba de Hemólisis.

El método utilizado es el propuesto por Feeley y Pittman en 1963, ellos recomendaron el uso de cultivos de toda la noche a 37°C en caldo de infusión cerebro corazón (BHI), pH 7.1 a 7.4, mezclado con igual volúmen de una suspensión al 1% de eritrocitos de carnero en solución salina e incubada a 37°C por 2 horas. La lectura se realiza después de mantener los tubos en refrigeración toda la noche. Sin embargo, se demostró que la hemólisis producida por V. cholerae eltor es inestable cuando existe un pH alcalino en el medio. Esto puede prevenirse adicionando glicerol al 1% al BHI antes de inocular.(41).

2.- Prueba de Hemaglutinación.

En los últimos años se ha incrementado grandemente el uso de ésta prueba, por ser un método rápido y fácil para diferenciar los biotipos clásico y eltor de V. cholerae. Muchos investigadores han utilizado eritrocitos de pollo, pero los eritrocitos de carnero, cabra y humano pueden ser utilizados ocasionalmente. La sangre total se colecta en solución de Alsever ó heparinizada ó desfibrinada. Un cultivo en caldo BHI de las cepas problema no es recomendable para la hemaglutinación. Se recomienda hacer una suspensión en solución salina de la cepa problema y trabajarla por alguno de los siguientes métodos: hemaglutinación en portaobjetos y hemaglutinación en tubo. En la actualidad se realiza en microplaca de 96 pozos (26,41).

3.- Prueba de sensibilidad a Polimixina B.

Gan y Tjia, en 1963, observaron que había diferencia en la sensibilidad de las cepas del biotipo clásico y del biotipo eltor al enfrentarlas a discos de polimixina B de 50 µg. Estos discos se colocan sobre un sembrado masivo de la cepa problema

TABLE 2. Características de los dos biotipos de V. cholerae O1.

| Biotipo | Prueba | | | | |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| | Hemólisis de eritrocitos de Carrere | Aglutinación de eritrocitos de Pollo | Sensibilidad a Polimixina B | Sensibilidad a fago IV | Sensibilidad a fago V |
| Clásico | - | - | + | + | - |
| Eltor | + | + | - | - | + |

Adaptado de Mukerjee, S. 1978 (41).

en una caja Petri con agar nutritivo. Las cajas se incuban a 37°C por 24 h. Las cepas sensibles muestran zonas de inhibición alrededor del disco (41).

Roy et al., en 1965, obtuvo mejores y más claros resultados por goteo de un cultivo en caldo de 2 h de la cepa problema en agar nutritivo con 15 µg/ml de polimixina B. Solo el biotipo eltor, que es resistente, creció a esta concentración. Es necesario ajustar el pH del agar nutritivo entre 7.0 y 7.6 para hacer la prueba (41).

4.- Prueba de susceptibilidad a fago IV clásico.

Mukerjee, en 1963, reportó que todas las cepas de V. cholerae biotipo clásico fueron sensibles al vibriófago IV; al contrario de las cepas biotipo eltor, que no fueron lisadas por éste fago a la concentración rutinaria de trabajo (RTD) (39).

Se coloca una gota de fago ajustado a su RTD en una placa de agar nutritivo con un inóculo masivo de la cepa problema. La placa se incuba a 37°C por 24 h y se observa que las cepas del biotipo clásico muestran clara evidencia de un halo de lisis, mientras que el crecimiento del biotipo eltor muestra crecimiento (39).

5.- Prueba de susceptibilidad a fago V eltor.

Basu y Mukerjee (1968) demostraron que el fago V eltor puede utilizarse como una prueba que complementa la fagotipificación con fago IV clásico. Ellos observaron que todas las cepas de V. cholerae O1 biotipo eltor ensayadas, fueron sensibles a fago V, mientras que las cepas biotipo clásico mostraron resistencia hacia éste fago, a la concentración usual de trabajo (RTD). (9).

El patrón diferente dado en la susceptibilidad a fagos IV y V presentada por V. cholerae O1, ha sido utilizado para la diferenciación de biotipos desde hace varios años. (9,40,42).

Para la diferenciación de los dos biotipos, la fago-sensibilidad es la que ofrece los resultados más consistentes. Tabla 3 (41).

Barua y Gomez en 1967, reportaron sus observaciones en la caracterización de biotipos, y concluyeron que la tipificación con el fago IV junto con el fago V permitía obtener resultados mucho muy aceptables (41).

TABLA 3.

Estudio de *Vibrio cholerae* O1 para separar biotipos.

| Prueba | Biotipo | Variación en | | |
|--|---------|------------------|----------------------|----------------------|
| | | No total pruebas | resultados esperados | Por ciento variación |
| -Hemólisis de eitrocitos de carnero. | clásico | 331 | 0 | 0.0 |
| | eltor | 1,08 | 443 | 40.8 |
| -Aglutinación de eritrocitos de pollo. | clásico | 331 | 1 | 0.3 |
| | eltor | 879 | 8 | 0.9 |
| -Polimixina B. | clásico | 587 | 0 | 0.0 |
| | eltor | 585 | 19 | 3.2 |
| -Sensibilidad a fagos IV y V. | clásico | 5,69 | 0 | 0.0 |
| | eltor | 1,09 | 0 | 0.0 |

Tomado de Mukerjee, S. 1978. (41).

VI. MULTIPLICACION DE BACTERIOFAGOS.

La multiplicación viral es un proceso complejo constituido por muchas etapas elementales; de ahí que la selección de un modelo adecuado virus-célula en los inicios del desarrollo de la virología haya sido una de las causas más importantes de los rápidos adelantos realizados en éste campo. Este modelo ha resultado útil a pesar de la amplia variedad de virus existentes y de las notables diferencias que hay en su estructura y en la cantidad de información genética que poseen, ya que la totalidad de los virus resultan muy parecidos en cuanto a los aspectos básicos de su multiplicación (25).

En la década de 1930, los bacteriófagos fueron adoptados como sistemas modelo por Burnet en Australia y por el húngaro Schlesinger; posteriormente, fueron utilizados por un amplio grupo de investigadores trabajando en íntima relación, entre los que se contaban Delbrück, Luria, Hershey y Cohen en los Estados Unidos., y Lwoff en Francia. Estos investigadores concentraron sus esfuerzos en el estudio de los fagos de Escherichia coli, especialmente en los fagos de número par de tipo T (25).

Los bacteriófagos pueden presentar estadios estructurales distintos: viriones extracelulares, fagos vegetativos y profagos; todos los bacteriófagos presentan por lo menos, una fase de fago vegetativo durante su multiplicación intracelular, pero no todos ellos pueden convertirse en profagos. Los que pueden convertirse en profagos reciben el nombre de **fagos temperados o lisogénicos**; es decir, son aquellos que resultan capaces de convertirse en profagos; los otros se denominan **fagos virulentos o líticos** y en forma normal no se integran como profagos. (21,25)

Infeción de la célula huésped.

Adsorción es el primer paso del proceso infeccioso que consiste en la unión de un virión del fago a receptores específicos de la célula bacteriana específica.

Posteriormente, el DNA se separa de la cubierta bacteriana y se efectúa la **liberación del ácido nucleico** en el interior de la célula (21,25).

La adsorción de ciertos fagos necesita de determinadas condiciones metabólicas en

la célula huésped, mientras que algunos son adsorbidos a 0° C, otros necesitan temperaturas mayores. El proceso de adsorción incluye la formación de puentes iónicos entre cargas complementarias en el punto de unión del virión y de los receptores celulares. Por ésta razón, el proceso es inhibido en presencia de un pH muy bajo o muy elevado, momento en que algunos de los radicales que interactúan pierden su ionización y se separan (25).

Se demostró que el *V. cholerae* biotipo clásico posee una proteína de membrana externa que actúa como receptor para el fago IV clásico y no interviene el LPS como receptor para su adsorción (46).

La adsorción de un bacteriófago puede resultar abolida por mutaciones bacterianas que cambian los receptores. Estas mutaciones que exhiben resistencia al bacteriófago pueden cambiar también la especificidad antigénica de las células (25).

Penetración. Los fagos con colas contráctiles, tales como los fagos II, III y IV clásicos de *V. cholerae* semejan jeringas hipodérmicas, inyectando el DNA del fago dentro de la célula (29).

Eclipse. Una vez inyectado el DNA, las células alteradas no producen placas en caso de que sean inoculadas en la forma normal; pero su infectividad reaparece de nuevo al formarse la progenie del virus. Esta desaparición temporal de la infectividad, que recibe el nombre de fase de eclipse, se debe en parte a la incapacidad del DNA vírico desnudo para infectar a las bacterias en condiciones ordinarias y también a la transformación temporal del DNA en una forma replicativa no infecciosa (29).

Otros datos sobre el papel del ácido nucléico han sido obtenidos por la infección de las bacterias con DNA procedente de fago purificado. Este fenómeno no fué descubierto fácilmente, ya que las células bacterianas aceptan ácidos nucleicos víricos infecciosos tan solo en condiciones especiales: 1) en forma de esferoplastos, 2) en forma de bacterias intactas en un estado competente especial, que les permita aceptar DNA bacteriano transformante, ó 3) si son expuestas al mismo tiempo a un fago coadyuvante al que la bacteria es sensible. Es posible que cualquiera de éstas condiciones pueda provocar orificios en la pared celular, a través de los cuales

penetraría el DNA aislado. Existen efectos que son ocasionados por la unión del fago a la bacteria, con la consecuente alteración del metabolismo celular. La simple unión de la cola del fago sin que exista expresión de los genes víricos (p.ej., en presencia de cloramfenicol, que inhibe la síntesis protéica), altera la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula, la cuál permite el paso de moléculas no muy grandes (p.ej. nucleótidos) al medio.

Estos cambios metabólicos ocasionan que la síntesis de proteínas y de DNA celular se detengan casi inmediatamente. Los cambios de la membrana y los efectos metabólicos son reversibles en células infectadas por fagos con una multiplicidad baja; sin embargo, en células infectadas por fagos con una multiplicidad elevada se produce una lisis celular sin que se logre la multiplicación vírica, ya que no se completa el ciclo y no se produce fago. Esto se conoce como "lisis desde afuera" (25).

Ciclo de Multiplicación Vírica.

Algunos fagos siguen solamente una estrategia muy sencilla para su supervivencia; es decir, después de infectar un huésped específico y susceptible, subvierten sus funciones con el propósito de producir un gran número de partículas de fago descendientes, dando como resultado de esa infección lítica la producción de más fagos, y la bacteria huésped muere (21,25,29).

En el ciclo lítico típico, el DNA del fago entra en la célula huésped, sus genes son transcritos en un orden preestablecido, el material genético del fago se replica, y se producen los componentes proteicos pertenecientes a la partícula del fago; finalmente, la bacteria huésped se rompe o lisa para liberar las partículas descendientes de fago ya ensambladas (47).

Otros fagos tienen una doble existencia. Por un lado, son capaces de autoperpetuarse por la misma vía del ciclo lítico, en la cuál desarrollan una estrategia dispuesta a producir tantas copias del fago y tan rápidamente como sea posible. Pero también tienen una existencia alternativa, en la cuál el genoma del fago está presente o se integra en la bacteria en una forma latente conocida como profago. A ésta forma de propagación se le denomina Lisogenia (21).

Los genomas de los fagos son necesariamente pequeños; como en todos los virus, existe una limitación principal que es la necesidad de empaquetar adecuadamente el ácido nucléico dentro de su cubierta proteica. Esta limitación determina muchas veces la estrategia vírica para la reproducción (33).

El desarrollo lítico se realiza mediante una vía en la cuál las funciones del fago se expresan en un orden particular para obtener la cantidad correcta de cada componente. El ciclo puede dividirse en dos partes generales: etapa temprana y etapa tardía (21,25,29).

La **etapa temprana** de la infección representa el periodo que va desde la entrada del DNA hasta que comienza su replicación. Habitualmente, la etapa temprana está dedicada a la producción del DNA. Esto incluye las enzimas relacionadas con la síntesis del DNA, recombinación, y algunas veces modificación. La **etapa tardía** de la infección representa el periodo que va desde el comienzo de la replicación hasta el paso final en el cuál la célula bacteriana se lisa para liberar la descendencia del fago (21,25,29).

La **etapa tardía** es donde se sintetizan los componentes proteicos de la partícula de fago; a veces son necesarias muchas proteínas para formar las estructuras correspondientes a la cabeza y a la cola, de modo que la mayor parte del genoma del fago se dedica a las funciones tardías. Además de las proteínas estructurales, se producen "proteínas de ensamblaje" para contribuir a la construcción de la partícula completa, aún cuando ellas mismas no sean incorporadas después al fago. En el momento en que éstos componentes son ensamblados formando las cabezas y las colas, es cuando la replicación del DNA ha alcanzado su grado máximo (25,29,33).

Maduración. La maduración consiste en la combinación irreversible del ácido nucléico del fago con una cubierta proteica. La partícula madura es, desde un punto de vista morfológico, un virus infeccioso típico y no se reproduce más en la célula en la cuál se formó. Si las bacterias experimentaran una lisis artificial al final del periodo de eclipse, se encontrarían partículas de fago inmaduras o incompletas en las cuáles el DNA puede removerse fácilmente (29).

Lisis y liberación del nuevo fago. La síntesis del fago continúa hasta que la célula se desintegra, liberando al fago infeccioso. La célula estalla como resultado de la presión osmótica, después de que la pared celular ha sido debilitada por la lisozima del fago (29).

Sabita Majumdar y cols. en 1988 (36), estudiaron el ciclo de multiplicación vírica, a nivel molecular, del fago IV clásico en su cepa hospedera; después de la infección, el DNA del fago se enlaza a la membrana celular; a los 10 minutos, la síntesis de macromoléculas de la cepa hospedera se suspende (45). A los 20 minutos de la infección, el DNA de fago se sintetiza, primeramente en forma de unidades monoméricas. Después de 30 minutos de la infección, el DNA del fago se sintetiza predominantemente como DNA concatenado. Después de 50 minutos, el DNA concatenado se fragmenta en unidades monoméricas y se encapsula dentro de las nuevas cabezas de fago. En éste momento ya existen partículas de fagos maduros. A los 65 minutos después de la infección, la célula infectada se lisa liberando la nueva generación de fagos (18,19,36,47).

Ciclo de Multiplicación Lisogénica.

Además de ser capaces de seguir la vía lítica simple de los virus virulentos, un bacteriófago temperado o lisogénico infectante es también capaz de persistir en la célula huésped en estado de reposo o profago (21). Esto se refiere a que el profago está integrado en el genoma de la bacteria y se hereda de la misma manera que los genes durante la replicación de la bacteria. En virtud de poseer un profago, una bacteria lisogénica tiene por lo tanto, inmunidad contra la infección dada por otro fago de la misma especie; por lo cuál, generalmente solo hay una copia de un profago de un tipo particular en el genoma bacteriano (21).

Las formas lisogénicas y lítica pueden alternarse como se ilustra en la figura 3. Cuando un fago es producido durante un ciclo lítico y entra en una nueva célula bacteriana, puede repetir el ciclo lítico o bien, entrar en el estado lisogénico. El cambio depende de las condiciones de infección y de los genotipos del fago y de la bacteria. Un profago puede ser liberado de las restricciones de la lisogenia por un

proceso denominado "Inducción", en el cuál es escindido del genoma de la bacteria para generar un DNA del fago libre, que entonces continúa a través de la vía lítica (33).

El genoma de los bacteriófagos temperados contiene algunos genes que funcionan en la replicación viral y otros que lo hacen durante la lisogenización del huésped. Uno de los genes implicados en la lisogenización codifica para la producción de una proteína represora (llamada proteína de inmunidad) que evita la transcripción de los genes necesarios para la respuesta lítica. Si se forma una cantidad suficiente de éste represor antes de que se presente la replicación viral, el virus se convierte en un profago. Cuando el nivel del represor se hace submínimo, lo cuál se efectúa espontáneamente con baja frecuencia, el profago se cambia a un estado lítico o vegetativo (21).

Aunque el mecanismo o mecanismos de inducción no se conocen muy bien, se puede efectuar la inducción de un profago utilizando una o varias condiciones, como son: la exposición a luz ultravioleta, utilizando una adecuada concentración de mitomicina C, o bien, con cambios de temperatura (41).

VII. FAGOTIPIFICACION DE V. cholerae O1.

A. FAGOTIPIFICACION PARA LA IDENTIFICACION DE CEPAS DE V. cholerae.

Mukerjee y colaboradores, trabajando en un área endémica (Calcuta), probaron mas de 6000 cepas de V. cholerae aisladas de muestras fecales y obtuvieron muchos fagos durante su investigación epidemiológica, esto les permitió organizar su esquema de tipificación. El Instituto WHO en Calcuta , facilitó el avance y desarrollo de esquemas de fagotipificación, debido a la cooperación internacional (41).

Los estudios conducidos por Mukerjee y cols. desde 1955 dieron por resultado el desarrollo de dos esquemas de fagotipificación para los biotipos clásico y el tor de V. cholerae O1, obteniéndose alto grado de precisión (9,39,40,41).

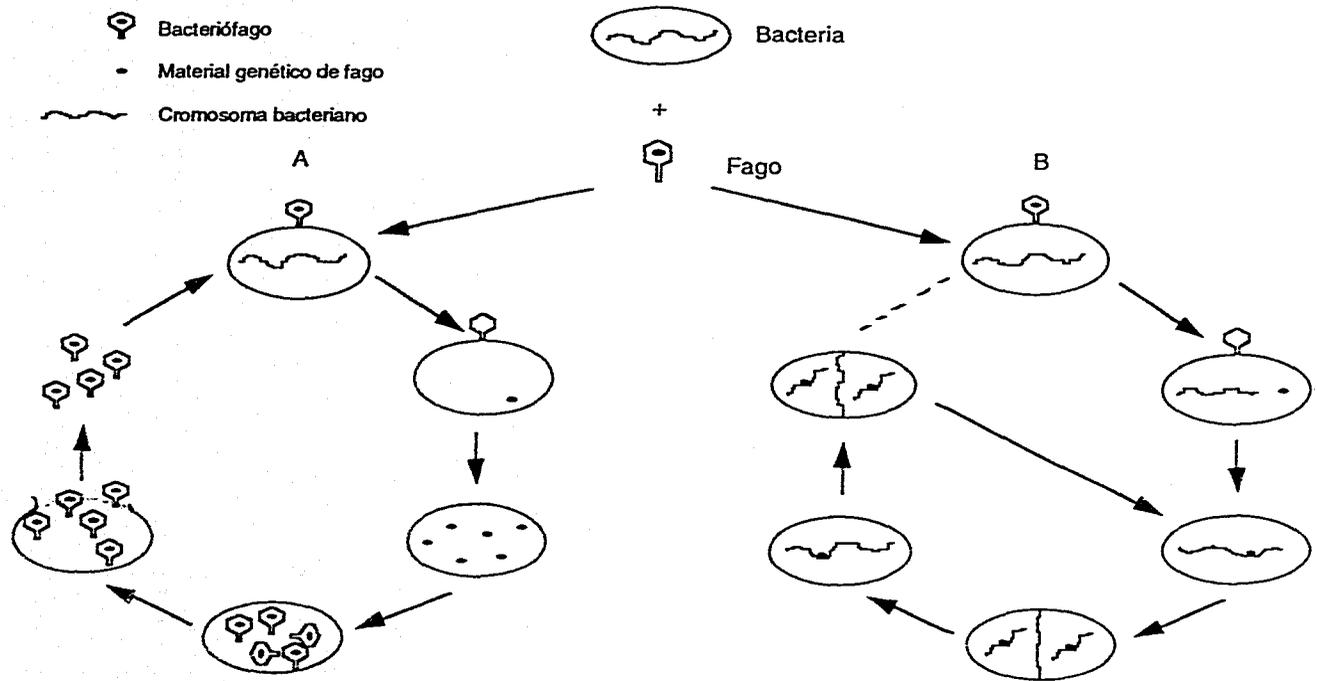


Figura 3. INFECCION DE BACTERIAS POR FAGOS.

A. Infección lítica: el bacteriófago inyecta su ácido nucléico que se reproduce de forma autónoma. Esta multiplicación conduce a la lisis de la célula y a la liberación de nuevas partículas fágicas.

B. Infección lisogénica: el ácido nucléico del fago es incorporado al cromosoma (profago) y se divide al mismo tiempo que éste. La bacteria sobrevive a la infección.

Tomado de Leclerc, H. 1975. (31).

B. FAGOTIPIFICACION DE V. cholerae BIOTIPO CLASICO.

Nicolle y sus colaboradores en 1960 y 1962; y Gallut y Nicolle en 1963, agruparon las cepas de V. cholerae en base a su patrón de sensibilidad a ocho fagos líticos obtenidos de varias fuentes. Newman y Eisenstark en 1964, estudiaron una larga serie de cepas contra diferentes grupos de fagos. Nicolle et al. establecieron que había cuatro fagotipos pertenecientes a cepas de V. cholerae clásico procedentes de la epidemia de Bangkok de 1959-60, y obtuvieron dos fagotipos pertenecientes a tres cepas biotipo eltor (41).

Mukerjee identificó cinco fagotipos principales de V. cholerae biotipo clásico en base a sus patrones de sensibilidad a los cuatro grupos de cólerafagos aislados de heces de pacientes con cólera. Tabla 4 (39).

C. FAGOTIPIFICACION DE V. cholerae BIOTIPO ELTOR.

La fagotipificación de V. cholerae biotipo eltor fué descrita por Nicolle et al. en 1960, Gallut y Nicolle en 1963, Newman y Eisenstark en 1964, y Mukerjee en 1965 (41).

Se construyó un esquema de fagotipificación basándose en seis fagotipos de cepas de V. cholerae biotipo eltor, con lo que se pudieron distinguir cinco grupos de vibriófagos eltor. Tabla 5 (9,41).

En 1993, Chattopadhyay et al. reportó un nuevo esquema de fagotipificación en el cuál se utilizan 10 fagos. Este nuevo esquema separó 1000 cepas de V. cholerae dentro de 146 fagotipos (17,30).

La gran utilidad de los esquemas de fagotipificación propuestos para ambos biotipos de *V. cholerae*, se usa en procesos relacionados con el seguimiento epidemiológico de un lugar a otro; o bien, para el seguimiento de portadores crónicos (41).

VIII. PROPIEDADES DE BACTERIOFAGOS DE *V. cholerae*.

A. MORFOLOGIA DE PLACAS LÍTICAS DE VIBRIOFAGOS.

Existen tres tipos de placas líticas producidas por vibriofagos en un crecimiento de cepa hospedera, que son: 1) Placas claras con diámetro que depende del fago y de la cepa hospedera, así como de otros factores. 2) Placas claras con halo periférico que parece ser debido a la acción lítica de las enzimas inducidas, y 3) Placas claras con una zona central turbia producida principalmente por vibriofagos lisogénicos. La morfología de las placas líticas no es una característica fiel de los diferentes grupos de fagos, y dependen de muchos factores ambientales (1,2,3,6).

TABLA 4.

Esquema de fagotipificación para *V. cholerae* biotipo clásico.

| Fagotipo de <i>V. cholerae</i> clásico. | Lisis por fagogrupo. | | | |
|---|----------------------|----|-----|----|
| | I | II | III | IV |
| 1 | + | + | + | + |
| 2 | - | + | + | + |
| 3 | + | - | + | + |
| 4 | - | - | + | + |
| 5 | + | + | - | + |

+ = Lisis

- = No lisis.

Adaptado de Mukerjee, S. 1978. (41).

TABLA 5.

Esquema de fagotipificación para *V. cholerae* biotipo eltor.

| Fagotipo de <i>V. cholerae</i> eltor. | Lisis por fagogrupo. | | | | |
|---|----------------------|----|-----|----|---|
| | I | II | III | IV | V |
| 1 | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | - | + |
| 3 | + | + | - | + | + |
| 4 | + | + | - | - | + |
| 5 | + | - | - | - | + |
| 6 | - | + | - | - | + |

+ = Lisis

- = No Lisis.

Tomado de Mukerjee, S. 1978. (41).

Justificación

Mukerjee y Basu en los años 60's describieron los esquemas de tipificación con fines de diferenciación o biotipificación de las cepas de Vibrio cholerae O1 utilizando bacteriófagos obtenidos de heces fecales de pacientes con cólera.

El realizar el aislamiento de vibriofagos de aguas negras procedentes de distintos puntos de la Ciudad de México, nos va a permitir hacer comparación del comportamiento lítico de los fagos obtenidos en el INDRE y los fagos de referencia IV de Mukerjee (1963) y V de Basu y Mukerjee (1968) obtenidos en Calcuta, India.

La comparación de los patrones líticos permitirá definir similitudes o diferencias en la capacidad lítica de los fagos aislados de diferente fuente, diferente lugar y diferente año.

En México es necesaria la biotipificación de V. cholerae para determinar si las cepas son infectadas por los mismos fagos ya descritos hace 3 décadas o están presentes en las aguas negras otros fagos nuevos y diferentes.

El estudio a nivel de DNA ayudará a comparar electroforéticamente los pesos moleculares de los genomas de fago IV clásico, fago V eltor y los fagos obtenidos en éste proyecto. Esto podría ser de gran utilidad puesto que los fagos aislados servirán como una herramienta en el seguimiento epidemiológico del V. cholerae O1, que tiene una especial importancia por lo necesario que es determinar el origen geográfico y la relación de las cepas que actualmente circulan en la República Mexicana y en el mundo.

OBJETIVOS

OBJETIVO

Aislar vibriofagos a partir de aguas negras recolectadas de diferentes sitios de la Ciudad de México y compararlos con el fago IV Clásico de Mukerjee y V Eltor de Basu y Mukerjee.

OBJETIVOS INTERMEDIOS

Aislar fagos a partir de los sobrenadantes de aguas negras libres de bacterias que previamente dieron cultivo positivo y cultivo negativo a Vibrio cholerae 01.

Relacionar su comportamiento o patrón lítico frente a diferentes cepas de V. cholerae 01 aisladas en México, y comparar con los patrones líticos dados por el F-IV clásico y el F-V eltor.

Conocer el peso molecular de su genoma y compararlo con el peso del genoma de los Fagos IV Clásico y V Eltor utilizando técnicas de extracción de DNA y técnicas de electroforesis.

MATERIAL

Y

METODOS

MATERIAL:

Gradillas para tubos de 13 x 100
Gradillas para tubos eppendorf
Guantes de látex para cirujano
Puntas de 10, 200 y 1000 μ l para micropipeta
Tubos eppendorf de 0.5 y 1.5ml
Vidriería de laboratorio

EQUIPO:

Agitador magnético
Autoclave
Balanza analítica
Balanza de 2 platos
Baño metabólico
Cámara de electroforesis 8x10 para geles de agarosa
Centrífuga clínica
Congelador
Fuente de poder para cámara de electroforesis
Horno de microondas
Incubadora
Mechero
Microcentrífuga refrigerada
Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ l
Potenciómetro
Transiluminador
Vortex

MEDIOS DE CULTIVO:

Agar blando al 0.5% en BHI. Mca. Bioxon.

Agua Peptonada Alcalina (APA). 10X. (10% peptona, 10% NaCl).

Base de agar sangre (BAB) en placa. Mca. Bioxon.

Caldo de infusión cerebro corazón (BHI). Mca. Bioxon.

REACTIVOS:

Acido acético.

Agarosa.

Agua destilada.

Dietilpirocarbonato.

Etanol al 96°.

Marcadores de peso molecular: *lambda-HindIII* y *phiX174-HaeIII*.

Regulador de carga para electroforesis.

Regulador de TAE 10x (Tris base 400mM, Acido acético glacial 190mM, EDTA 0.01mM).

Solución de cloroformo-alcohol isoamflico (24:1).

Solución de NaCl 3M.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Cepas de referencia de Vibrio cholerae 01 eltor

V. cholerae 01 eltor Inaba. INDRE 206, Secundino.

V. cholerae 01 eltor Inaba. CDC 6905. Perú, Trujillo.

V. cholerae 01 eltor Ogawa. Hidalgo 267.

Un total de 314 Cepas V. cholerae 01 eltor pertenecientes al cepario del laboratorio del INDRE, obtenidas de diferentes brotes de cólera.

A) RECOLECCION Y TRATAMIENTO DE LAS AGUAS NEGRAS.

La muestra se tomó directamente con hisopo de Moore o bien se utilizó un bote de plástico de boca ancha con el cuál, desde la orilla del arroyo a examinar se recolectó la muestra. Se deben de utilizar guantes. En el caso de que no sea fácil tomar la muestra, se recomienda usar una cubeta de plástico pequeña y un cordón para poder alcanzar la corriente. Previamente se preparó un frasco de boca ancha de 500 ml con tapón de rosca, se le añadieron 50 ml de APA concentrada 10x conteniendo 10% de peptona y 10% de NaCl. Se ajustó a pH de 9.0 y se esterilizó. A éste frasco se le añadieron aproximadamente 450 ml del agua recolectada. De éste modo el medio quedó diluido 1:10, dando una concentración de 1% de peptona y NaCl. Se incubó durante 6 h. o toda la noche a 37°C. Se toma una muestra con un hisopo de la superficie del agua del frasco después de transcurrido el tiempo de incubación y el hisopo se colocó en un tubo que contenía 10 ml de APA 1x, pH 9.0, con 1% de peptona y 1% de NaCl; se incubó a 37°C por 6 h (26).

La forma de recolección de aguas negras comúnmente empleada en el INDRE, es empleando los hisopos de Moore, que pueden construirse con pedazos de gasa de algodón de malla cerrada (15 cm de ancho y 60-120 cm de largo), doblándolo de forma longitudinal por varias ocasiones para formar rollos cilíndricos compactos, atando el centro firmemente con alambre. Se envuelvió el hisopo en papel estrasa y se esterilizó en autoclave 15 lb/15 min. Los alambres que sostienen las gasas se unieron a cables de pescar de "nylon" o bien, se usó otro pedazo de alambre; se sumergieron los hisopos en las aguas negras para obtener la muestra y se dejaron por 24 h (26).

Se quitaron las gasas, se separaron de los alambres e inmediatamente se sumergieron en 500ml de APA , pH de 9.0, empleando recipientes de boca ancha. En el transporte de los recipientes al laboratorio se usaron refrigerantes. En el laboratorio, se incubó durante 8-18h a 35°C y se procedió de igual manera que la muestra directa; es decir, se hizo un segundo pase a 10 ml de APA 1x y se incubó por otras 6 h (26). Este sobrenadante se conservó a 4°C hasta su utilización en la técnica B.

B) AISLAMIENTO DE FAGOS.

Fundamento: Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Al igual que todos los virus, cada tipo de fago se multiplica únicamente en células hospederas específicas. Los fagos y sus huéspedes suelen compartir el mismo hábitat natural como estrategia para la conservación de su especie; en éste caso, las aguas negras son un hábitat que pueden compartir ambos.

Procedimiento.

- 1 - Mezclar: 0.1 ml de un cultivo joven, en BHI, de la cepa de Vibrio cholerae 01 ajustada al tubo 5 del Nefelómetro de MacFarland; 0.1 ml de sobrenadante de aguas negras y 4.0 ml de agar blando (al 0.5 %) base BHI a 50°C.
- 2 - Homogenizar.
- 3 - Vaciar en caja Petri con agar BAB.
- 4 - Incubar 18-24 h a 37°C.

INTERPRETACION:

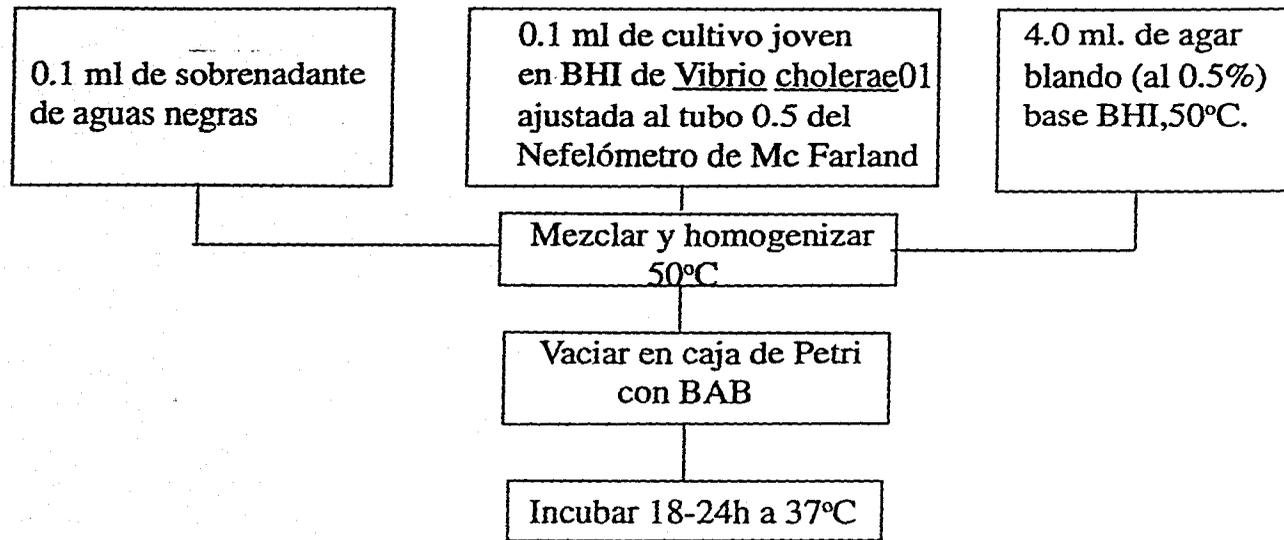
- Presencia de fagos si se observan placas líticas.
- Negativo a fagos si no se presentan placas líticas.

Modificado de Cano M.P. 1989 (12).

Preparación del Agar Blando.

Pesar el polvo de agar BHI según las indicaciones del fabricante y disolver en agua destilada calentando un poco. Una vez disuelto, agregar 0.5% (p/v) de agar bacteriológico y disolver. Alicuotar 4 ml en tubos de ensaye de 16x150 con tapón rosca y esterilizar. Almacenar en refrigeración a 4°C.

Diagrama 1. AISLAMIENTO DE FAGOS.



35

INTERPRETACION:

- Presencia de fagos si se observan placas líticas ó halos de inhibición.
- Negativo a fagos si no se presentan placas líticas.

C) PROPAGACION DE FAGOS.

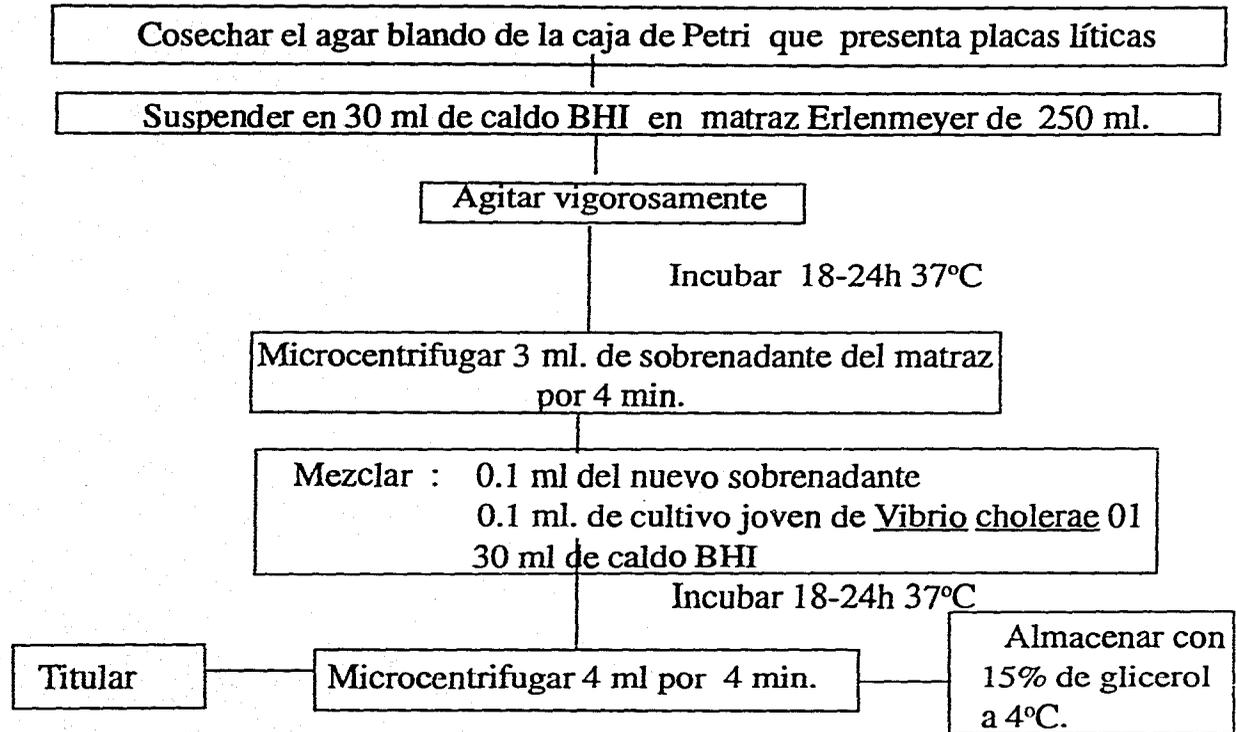
Fundamento: Al poner en contacto un cultivo bacteriano con una suspensión de fagos y sembrarlo sobre cajas de medio sólido, es posible apreciar pequeñas áreas claras denominadas placas líticas; la formación de éstas se debe a la lisis de las bacterias por los fagos inoculados inicialmente y su progenie.

Procedimiento.

- 1 - Cosechar el agar blando de las cajas Petri que presenten placas líticas.
- 2 - Suspender en 30 ml de caldo BHI en matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- 3 - Agitar vigorosamente.
- 4 - Incubar 18-24 h 37°C.
- 5 - Microcentrifugar 3 ml de sobrenadante del matraz por 4 minutos.
- 6 - Mezclar : 0.1 ml del nuevo sobrenadante con 0.1 ml de cultivo joven de V. cholerae en un volumen de 30 ml de caldo BHI.
- 7 - Incubar 18-24 h 37°C.
- 8 - Microcentrifugar 4 ml por 4 min.
- 9 - Titular.
- 10- Almacenar con 15% de glicerol a 4°C.

Modificado de Cano M.P, 1989 (12).

Diagrama 2. PROPAGACION DE FAGOS



D) BIOTIPIFICACION CON FAGOS.

Fundamento: El hecho de que el Vibrio cholerae O1 del biovar clásico y biovar eltor tengan diferente afinidad hacia los fagos clásicos o eltor, hace de los vobriofagos una herramienta muy útil para la biotipificación de la bacteria.

Procedimiento.

- 1 - Sembrar la cepa a ensayar en un tubo con caldo nutritivo o caldo BHI.
- 2 - Incubar 2 - 4 h a 37°C. Si es posible, con agitación.
- 3 - Con un hisopo sembrar masivamente toda la superficie de una placa de agar nutritivo o agar BAB.
- 4 - Con ayuda de una pipeta, colocar sobre la superficie unas gotas de la suspensión de fagos.
- 5 - Dejar secar unos minutos.
- 6 - Incubar de 18 - 24 h a 37°C.
- 7 - Interpretar como sensibles las cepas que tengan halos de inhibición de cualquier diámetro y comparar con los testigos:

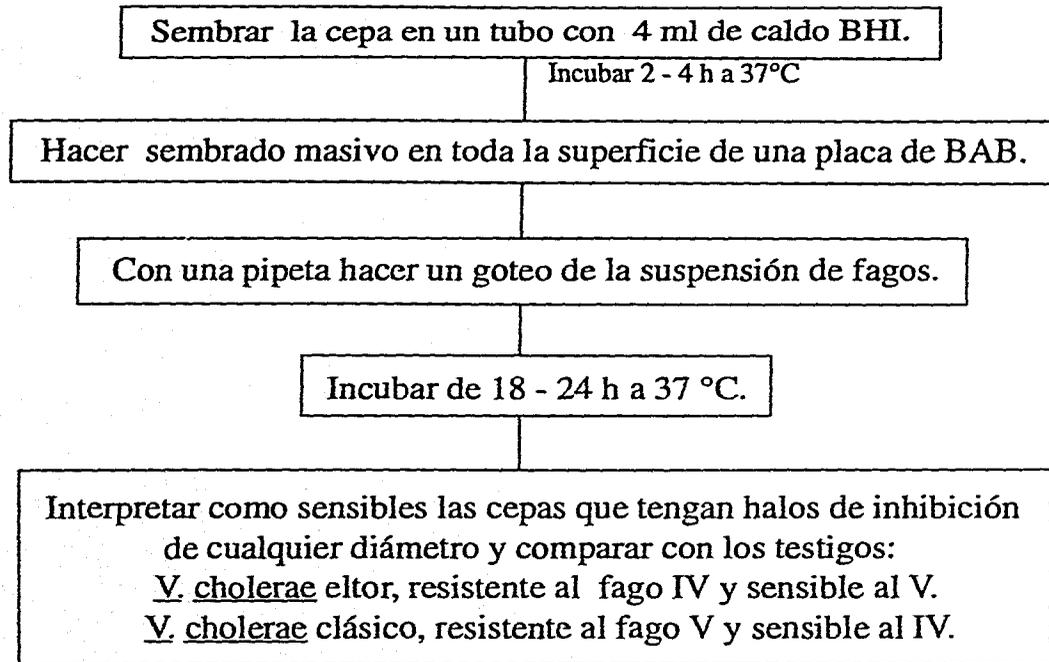
V. cholerae eltor, resistente al fago IV y sensible al V.

V. cholerae clásico, sensible al fago IV y resistente al V.

Tomado de Giono, S. 1994. (27).

Diagrama 3. BIOTIPIFICACION CON FAGOS.

39



E) EXTRACCION DE DNA DE FAGOS.

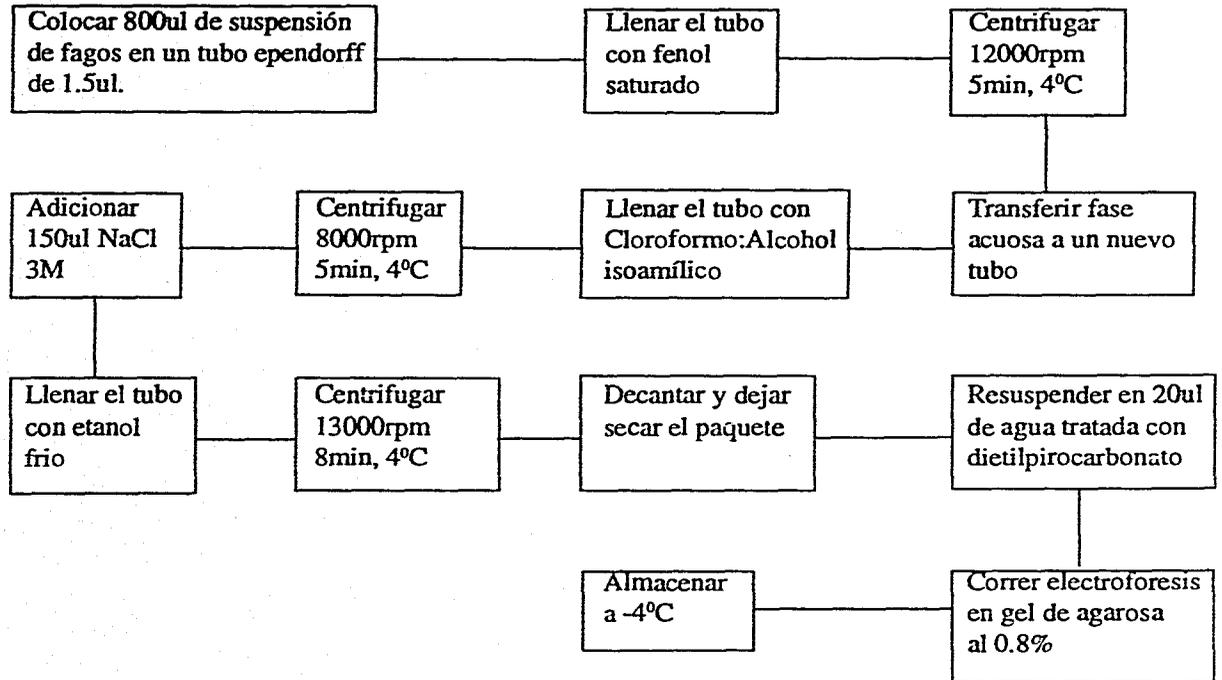
Fundamento: Los virus bacterianos por poseer una simple cubierta o cápside constituida por proteínas, hace relativamente sencillo el llevar a cabo una extracción y obtener el material genético viral que generalmente consta de cadenas de bajo peso molecular.

Procedimiento.

- 1 - Colocar 800 μ l de suspensión de fagos en un tubo ependorff de 1.5 μ l.
- 2 - Adicionar fenol saturado con Tris-HCl, pH 8.0 hasta 1.5 μ l.
- 3 - Agitar con vortex.
- 4 - Centrifugar a 12,000 rpm, 5 min a 4°C.
- 5 - Pasar la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo.
- 6 - Agregar cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) hasta llenar el tubo.
- 7 - Agitar vigorosamente con vortex.
- 8 - Centrifugar a 8,000 rpm 5 min a 4°C.
- 9 - Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 10- Adicionar 150 μ l de NaCl 3M.
- 11- Llenar el tubo con etanol absoluto frío.
- 12- Centrifugar a 13,000 rpm 8 min a 4°C.
- 13- Decantar y agregar unas gotas de etanol al 70% frío; teniendo cuidado de no disgregar la pastilla.
- 14- Decantar y dejar secar el paquete.
- 15- Resuspender en 20 μ l de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato.
- 16- Correr electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 120 V por 30 min para evaluar la extracción y concentración tentativa del DNA.
- 17- Se almacena a -20°C.

Modificado de Popovic T, y cols. 1993, (44).

Diagrama 4. EXTRACCION DE DNA DE FAGOS.



F) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Fundamento: Los ácidos nucleicos pueden ser analizados por electroforesis debido a que en un pH neutro, los grupos fosfato le confiere una carga neta negativa. Esta carga hace que dentro de un campo eléctrico, las moléculas de DNA o RNA, migren hacia el polo positivo del campo.

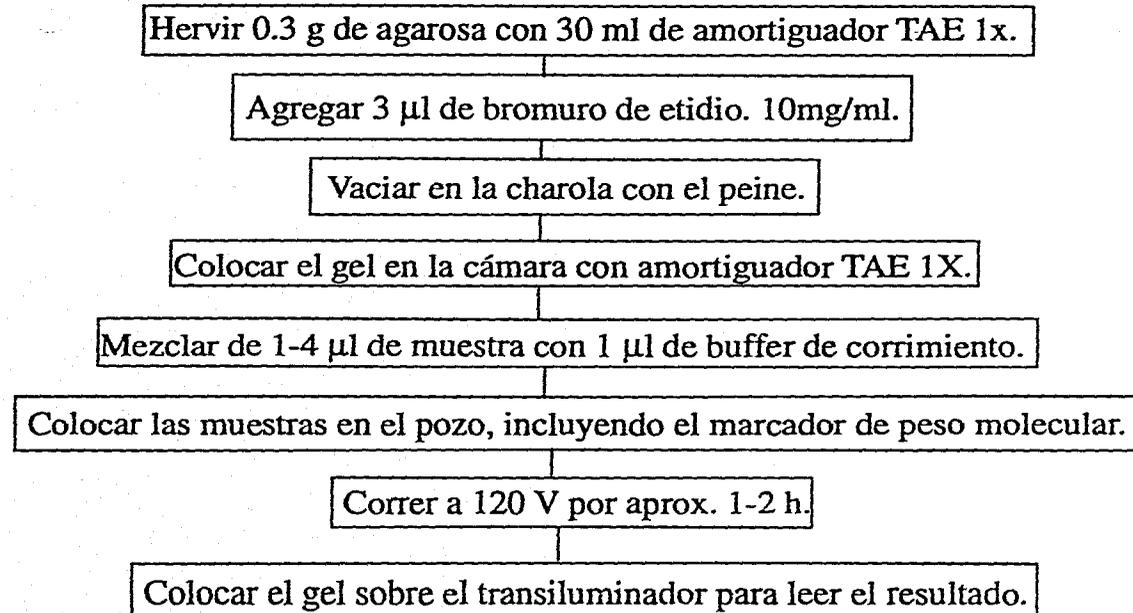
Procedimiento.

Para preparar un gel de 10 x 6 cm de agarosa al 1%, se necesitan 0.3 g de agarosa mas 30 ml de amortiguador TAE 1X.

- 1 - Hervir la mezcla hasta una disolución total.
- 2 - Añadir 3 µl de solución de bromuro de etidio 10 mg/ml.
- 3 - Sellar los extremos de la charola para el gel con cinta adhesiva y colocar el peine.
- 4 - Vertir la mezcla en la charola y dejar solidificar a temperatura ambiente.
- 5 - Retirar la cinta adhesiva y el peine y colocar la charola con el gel en la cámara de electroforesis conteniendo amortiguador TAE 1X.
- 6 - El gel debe quedar ligeramente sumergido en la solución y orientado de tal manera que los pozos queden del lado del electrodo negativo (negro).
- 7 - Sobre un trozo de papel parafilm poner gotitas de 1 µl del regulador de carga de acuerdo al número de muestras.
- 8 - Tomar de 1 - 4 µl de muestra y mezclar con una de las gotitas y colocar todo en uno de los pozos del gel.
- 9 - Repetir el paso anterior para todas las muestras. En uno de los pozos colocar un marcador de peso molecular como referencia.
- 10 - Aplicar una corriente de 120 V, hasta que el primer colorante llegue al extremo del gel (aprox. 1 - 2 h).
- 11 - Sacar el gel de la cámara y colocarlo sobre un transiluminador de luz UV para analizar el corrimiento.

Tomado de Olivera y cols. 1995. (43).

Diagrama 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.



APENDICE

Preparación del Fenol saturado.

- 1- Calentar 500 g de fenol redestilado (o grado biología molecular) en un baño a 68°C hasta que se disuelva.
 - 2- Añadir un volumen igual de Tris-HCL 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente.
 - 3- Agitar con una barra magnética durante 15 min y permitir que se separen las dos fases, eliminar la fase superior (acuosa).
 - 4- Repetir los pasos 2 y 3.
 - 5- Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCL 0.1 M, pH 8.0.
 - 6- Agitar de igual forma que antes y remover la fase acuosa.
 - 7- Repetir el paso 5, hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente un pH 8.0).
- El fenol también puede comprarse ya saturado. (43).

RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron un total de 100 muestras de aguas negras, como se indica en la tabla 6. De éste total, 54 muestras fueron positivas a V. cholerae 01 y 46 muestras fueron negativas al mismo microorganismo. De las 54 muestras que dieron cultivo positivo, 41 muestras no presentaron placas líticas, lo mismo que 29 muestras de las 46 muestras con cultivo negativo; resultando un total de 70 muestras que no presentaron placas líticas al enfrentarlas con cepas receptoras de V. cholerae 01. Hubo un total de 30 muestras que sí presentaron placas líticas sospechosas a fagos. De éstas 30 muestras, 13 muestras habían revelado cultivo positivo a V. cholerae 01 y 17 muestras fueron negativas al cultivo de dicha bacteria. Posteriormente se trabajaron las 30 muestras que presentaron placas líticas dudosas con el fin de propagar los fagos que dieron lugar a los halos de inhibición observados. De esto se obtuvo que solo en 3 de las 30 muestras se pudieron propagar fagos.

Estos 3 bacteriófagos de V. cholerae 01 fueron designados como 41 INDRE, 670 INDRE y 672 INDRE.

Es necesario mencionar que 2 de los 3 fagos (670 y 672 INDRE), se aislaron de aguas que habían dado cultivo positivo a V. cholerae 01; mientras que 41 INDRE proviene de agua negra negativa a ésta bacteria, como se observa en la tabla 6.

Después de haber obtenido los vibriofagos de las muestras de aguas negras, era necesario saber hacia donde se dirijía su comportamiento lítico; por lo cuál se procedió a enfrentarlos a cepas de V. cholerae 01 salvajes o de campo, aisladas y conservadas en el cepario del laboratorio del INDRE.

Revisando los patrones líticos dados por los fagos de referencia IV y V, notamos que la cepa de V. cholerae 01 eltor es la cepa específica para el fago V eltor; y contrario a ésto, las cepas eltor no son susceptibles al fago IV clásico. Ahora, observando el patrón dado por los 3 fagos recién obtenidos, podemos considerar un comportamiento lítico equivalente dado por el fago V; es decir, poseen igual afinidad hacia cepas de V. cholerae eltor; como se observa en la tabla 7, en donde los bacteriófagos INDRE y los F-IV y V se desafían con cepas de V. cholerae 01 de campo ó silvestres para comparar sensibilidades.

Por otro lado, se quiso comprobar si el comportamiento lítico de los F-INDRE era el mismo para los tres serotipos de cepas O1 eltor. De esto se obtuvo que al enfrentarlos a las cepas de V. cholerae O1 eltor inaba, éstas resultaron sensibles al ataque de los fagos INDRE, produciéndose así los halos de inhibición ó placas líticas; mientras que al enfrentarlos con las cepas ogawa, dió como resultado la misma sensibilidad que la mostrada por las cepas inaba; al igual que al enfrentarlos con cepas hikojima. Al desafiarlos con una cepa clásica de V. cholerae se observó que, al contrario de los tres biotipos eltor anteriores, hubo resistencia hacia los tres fagos INDRE; por lo que reafirmamos un comportamiento muy semejante al del fago V eltor de Basu y Mukerjee; que como se sabe, lisa los tres serotipos de cepas eltor, como se observa en la tabla 8.

Con esto podemos estar seguros del comportamiento y biotipo de los fagos aislados y así sumarlos al esquema para que, junto con el fago IV y el fago V de referencia, sean tres parámetros más con la finalidad de diferenciar los dos biotipos de V. cholerae O1. Tabla 9.

En la tabla 10 se señala la fuente de obtención de las cepas silvestres a las que se enfrentaron los F-INDRE. Se utilizaron 103 cepas inaba, 38 cepas de origen ambiental y 65 cepas de humanos. De 102 cepas ogawa, 1 cepa era ambiental y 101 cepas eran de humanos. De las 109 cepas hikojima, 13 cepas eran ambientales y 96 cepas eran de humanos. Sumadas dieron un total de 314 cepas ensayadas.

Para caracterizar por biología molecular el DNA de los fagos, era necesario conocer el peso molecular individual aproximado del DNA de los tres fagos INDRE (41, 670 y 672) y compararlo con el peso molecular del DNA de los fagos IV y V. Esto para saber si los fagos aislados en éste trabajo comparten el mismo peso molecular de su genoma entre sí, y si el peso molecular es igual o diferente comparados con los pesos moleculares de fago IV y fago V.

Se realizó la técnica de extracción de DNA a los fagos 41, 670, 672, IV y V, y se logró extraer el DNA viral. Ver la figura 4.

Se corrió una electroforesis en gel de agarosa de todas las extracciones de DNA sometiéndolas a una corriente de 120 volts por 30 min, y se observó que la banda

de DNA del F-IV, al igual que la banda de DNA del F-V y que las bandas de DNA de los tres fagos INDRE corrieron la misma distancia en el gel de agarosa; lo que significa que todos tienen un genoma del mismo tamaño.

Se calcularon los valores correspondientes a los pesos moleculares de los genomas de los fagos y se obtuvo un valor de 13,894 pb. Esto significa que tanto los fagos de referencia IV clásico y Veltor, como los fagos INDRE 41, 670 y 672 tienen un genoma con el mismo peso molecular.

Tabla 6: Obtención de placas líticas en un sembrado de Vibrio cholerae 01 a partir de filtrados libres de bacterias de aguas negras con cultivo positivo y negativo.

| No. de aguas negras utilizadas | Cultivo a <u>V. cholerae</u> 01 | Muestras que no presentaron placas líticas | Muestras que presentaron placas líticas sospechosas a fagos. | Muestras que presentaron placas líticas después de propagar |
|--------------------------------|---------------------------------|--|--|---|
| 54 | + | 41 | 13 | 2 |
| 46 | - | 29 | 17 | 1 |
| <hr/> | | <hr/> | <hr/> | <hr/> |
| 100 | | 70 | 30 | 3 |

Tabla 7: Afinidad hacia cepas de Vibrio cholerae 01 de los vibriofagos INDRE y los fagos IV y V estandard.

| Cepa de <u>V. cholerae</u> 01. | Vibriofagos | | |
|-----------------------------------|-------------|-----|---------|
| | F-IV | F-V | F-INDRE |
| Clásico | S | R | R |
| Eltor | R | S | S |

S = sensible

R = resistente

Tabla 8: Bacteriófagos INDRE frente a los tres serotipos de Vibrio cholerae 01 eltor y una cepa clásica.

| Cepa de <u>V. cholerae</u> 01 | No. de cepas ensayadas | Vibriofagos | | |
|-------------------------------|------------------------|-------------|----------|----------|
| | | 41INDRE | 670INDRE | 672INDRE |
| Eltor Inaba | 103 | S | S | S |
| Eltor Ogawa | 102 | S | S | S |
| Eltor Hikojima | 109 | S | S | S |
| Clásico | 1 | R | R | R |

S= Sensible

R= Resistente

Tabla 9 :Diferenciación de biotipos de V. cholerae 01 por fagos.

| Fago | Biotipo | |
|------------|--------------|----------------|
| | Clásico | Eltor |
| IV clásico | + | - |
| V eltor | - | + |
| 41 INDRE | - | + |
| 670 INDRE | - | + |
| 672 INDRE | - | + |
| | + = Sensible | - = Resistente |

Tabla 10: Fuente de donde se obtuvieron las cepas de V. cholerae 01 eltor que se enfrentaron a los fagos INDRE.

| Fuente | Serotipo de cepas de <u>V. cholerae</u> 01 eltor. | | | Total |
|--------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Inaba | Ogawa | Hikojima | |
| Aguas negras | 38 (12.1%) | 1 (0.32%) | 13 (4.14%) | 52 (16.56%) |
| Humanos | 65 (20.7%) | 101 (32.16%) | 96 (30.57%) | 262 (83.44%) |
| Total | 103 (32.80%) | 102 (32.48%) | 109 (34.71%) | 314 (100.0%) |



Figura 4 . Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del DNA de fagos.

Carril 1: Marcador de peso molecular de DNA de fago lambda digerido con *HindIII*.

Carril 2: DNA de F-IV clásico de Mukerjee.

Carril 3: DNA de F-V eltor de Basu y Mukerjee.

Carril 4: DNA de fago 41 INDRE.

Carril 5: DNA de fago 670 INDRE.

Carril 6: DNA de fago 672 INDRE.

Carril 7: Marcador de peso molecular ϕ X174 digerido con *HaeIII*.

Se utilizó una corriente de 120 volts por 30 minutos.

DISCUSION

De las muestras de aguas negras que se trabajaron en éste trabajo, solo se lograron aislar los tres bacteriófagos que se reportan en la tabla 6. Pudiera ser que por inexperiencia no se hayan logrado aislar más fagos, o que los halos de inhibición que se indican fueran alguna otra sustancia que inhibió el crecimiento de la bacteria; ya que existen sustancias con actividad antibiótica altamente específicas; como son las bacteriocinas, descubiertas en *E. coli* y que en 1946 le dieron el nombre de colicinas (16).

Las bacteriocinas de *V. cholerae*, designadas como vibriocinas, fueron descubiertas hasta 1962 (16).

La historia de los vibriófagos comenzó prácticamente con el descubrimiento del "ciclo lítico", estudiado en filtrados de heces de enfermos de cólera por d'Herelle en 1922. Las investigaciones a gran escala acerca de los vibriófagos comenzaron en la India en 1927, bajo la conducción de d'Herelle y bajo el auspicio de la Asociación de Investigación de la India (41).

En 1979, fué propuesto por Bystriy y Drozhevkina (11), un esquema de clasificación para los fagos de *V. cholerae*, incluyendo los pertenecientes al biotipo eltor; no se incluyó la morfología y algunas propiedades serológicas y solo fueron clasificados en un género como "Fagovirus de Vibrio", y en la única especie "Fagovirus cholerae", como se puede imaginar, tal esquema tuvo muy poco valor taxonómico y a éste le siguieron una serie de esquemas que se han seguido publicando (3,6). Estudios en laboratorio mostraron que el fago IV, 149, a su RTD es lítico para todas las cepas biotipo clásico de *V. cholerae*, pero todas las cepas del biotipo eltor fueron resistentes a éste fago (16). Basándose en ésta observación, se desarrollo una prueba utilizando dicho fago para la diferenciación de los dos biotipos de los vibrios 01 (40). Cinco años después se complementó el proceso de biotipificación con la implementación del fago V eltor, que es lítico para todas las cepas del biotipo eltor de *V. cholerae* 01 pero todas las cepas del biotipo clásico ensayadas fueron resistentes a la acción lítica de éste fago (9). Estas observaciones coinciden con los resultados

reportados en la tabla 7 del presente proyecto; ya que los fagos 41, 670 y 672 INDRE mostraron el mismo patrón lítico que en 1968, Basu y Mukerjee reportaron para el fago V eltor (9, 40). También se comprobó que la acción lítica de los fagos 41, 670 y 672 INDRE no tienen preferencia sobre alguno de los tres serotipos de V. cholerae 01 eltor; es decir, lisan al serotipo ogawa, inaba e hikojima por igual; como se puede ver en la tabla 8.

Monsur et al., en 1965, estudiaron el efecto del fago IV en V. cholerae eltor y concluyeron que aunque el fago IV infecta a vibrios eltor, no hay indicios de que se establezca una multiplicación de fagos durante el proceso. Se ha reportado que el fago IV (ϕ 149) se adsorbe irreversiblemente a células del biotipo eltor; 50 % del DNA inyectado se une a la membrana celular y se continúa con la síntesis de DNA monomérico de una forma similar a la que se lleva a cabo en su cepa hospedera. Sin embargo, los intermediarios de DNA concatenado producidos fueron inestables y no llegaron a formar DNA fágico maduro (20). No obstante, se lograron sintetizar gran número de las proteínas tempranas y solo algunas de las proteínas tardías. Así, algunas funciones presentes en el biotipo eltor y no en el biotipo clásico pueden estar específicamente involucradas en la desestabilización del DNA concatenado durante la replicación del fago IV en cepas de V. cholerae biotipo eltor (20).

Siddhartha K. Biswas y cols., en 1992, reportaron que los factores involucrados son una proteína de membrana interna de 14,000 Da y posiblemente otra proteína de 22,000 Da presentes en cepas del biotipo eltor. Estas proteínas parecen ser las responsables de causar la desestabilización del DNA concatenado y conferir así la resistencia de las cepas biotipo eltor a la infección del fago IV. Cuando el gen que codifica para estas proteínas fue implantado dentro de cepas de V. cholerae clásico, la síntesis del DNA concatenado, posterior a la infección por fago IV, fue inestable y por lo tanto no llegó a formarse un DNA maduro (49).

El patrón diferente dado en la susceptibilidad a fagos IV y V presentada por V. cholerae 01, ha sido utilizado para la diferenciación de biotipos desde hace varios años. (9,40,42).

Para la diferenciación de los dos biotipos, la fago-sensibilidad es la que ofrece los resultados más consistentes (41).

Barua y Gomez en 1967, reportaron sus observaciones en la caracterización de biotipos, y concluyeron que la tipificación con el fago IV junto con el fago V permitía obtener resultados mucho muy aceptables (41). Basándose en las observaciones anteriores, una vez que se conoció a fondo el comportamiento lítico de los fagos INDRE, se procedió a incorporarlos al esquema de fagotipificación para que, junto con los fagos de referencia puedan ser de utilidad en el afán de comprender la naturaleza y comportamiento epidemiológico del V. cholerae. Tabla 9.

Como se plantea en los objetivos de éste proyecto, se trabajaron con muestras ambientales o aguas negras que fueron recolectadas de diferentes sitios de la Ciudad de México por personal de la DGCOH, una dependencia del Departamento del Distrito Federal. Las aguas negras fueron enviadas al INDRE para llevar a cabo el monitoreo de Vibrio cholerae 01 circulante para detectar y atacar con eficiencia algún posible brote de cólera, ya que 1991, México pasó a ser un país afectado por la séptima epidemia de cólera. Se reportó que en unas pocas semanas, después del primer caso, se iniciaron otros brotes en diversos puntos del altiplano central, para luego extenderse a los estados del sureste y de allí a otros sitios del país (27).

En cuanto a la tabla 10, es donde se aclara la fuente de obtención de las cepas a las que se enfrentaron los fagos INDRE para conocer todo lo que en éste trabajo se reporta de ellos. Son un total de 314 cepas. De las 103 cepas inaba, 38 son de origen ambiental y 65 son de muestras humanas. De las 102 cepas ogawa, 1 cepa es ambiental y 101 cepas son de humanos y, de 109 cepas hikojima, 13 son cepas ambientales y 96 cepas son de humanos.

En relación a las determinaciones de biología molecular, era necesario conocer el peso molecular individual aproximado del DNA de los tres fagos INDRE (41, 670, y 672) y compararlo con el peso molecular del DNA de los F - IV y F - V. Esto para saber si los fagos aislados en éste trabajo comparten el mismo peso molecular de su genoma entre sí, y si el peso molecular es igual o diferente comparados con los pesos moleculares de F-IV y F-V.

Se realizó la técnica de extracción de DNA con la metodología propuesta por Popovic, et al. (44) a los fagos 41, 670, 672, IV y V, y se lograron extraer los genomas virales, figura 4.

Se corrió una electroforesis en gel de agarosa de los extractos a 120 volts por 30 min , y se observó que la banda de DNA del F-IV tiene un peso molecular de 13,894 pb, lo mismo que el DNA del F-V que también resultó ser de 13,894 pb.

La distancia recorrida por las bandas de DNA de los fagos INDRE nos muestran que los tres tienen un genoma del mismo tamaño; es decir , la simple técnica de electroforesis no es suficiente como para mostrar alguna diferencia genética entre ellos.

Al compararlos con la banda dada por el DNA de F-IV clásico y la banda de DNA de F-V eltor, se observó que corrieron la misma distancia. Esto quiere decir que los fagos 41, 670 y 672 INDRE también tienen el mismo peso molecular de 13,894 pb.

Es necesario aclarar que el peso molecular de los fagos mencionados, se calcularon por el método de mínimos cuadrados y tomando en cuenta solamente las bandas de 23130 pb, 9416 pb y la de 6557 pb del marcador de peso molecular de *lambda-HindIII*. Esto para conseguir más exactitud en los cálculos ya que en la fotografía, son las tres bandas más cercanas al valor de nuestras bandas problema.

Hoy en día existe la probabilidad de evitar posibles epidemias de grandes magnitudes, gracias a la aplicación de medidas higiénicas y de reglas internacionales para el control de cólera y otras enfermedades diarreicas; a fin de erradicar uno de los mas grandes problemas que afectan el bienestar de la humanidad (13).

ESTA TESIS NO DEBE

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

Se lograron obtener y propagar 3 vibriofagos a partir de los sobrenadantes de aguas negras con cultivo positivo (2 fagos) y cultivo negativo (1 fago) a Vibrio cholerae 01, recolectadas de diferentes sitios de la Ciudad de México. Esto nos demuestra que el agua negra es un medio adecuado para la subsistencia, transporte, propagación de la bacteria y de éste tipo de bacteriofagos hacia su célula hospedera.

Los fagos 41 INDRE, 670 INDRE y 672 INDRE tuvieron el mismo comportamiento y afinidad hacia las cepas de Vibrio cholerae 01 biotipo eltor, que el fago V eltor aislado por Basu y Mukerjee en 1968. Es decir, tanto los fagos INDRE como el fago V eltor tuvieron la misma especificidad hacia cepas de V. cholerae 01 eltor como cepa hospedera.

Los fagos 41 INDRE, 670 INDRE y 672 INDRE, al igual que el fago V eltor de Basu y Mukerjee, lisaron los tres serotipos de V. cholerae 01 eltor en este trabajo ensayados; es decir, lisan tanto el serotipo inaba como al serotipo ogawa y al serotipo hikojima. No se observó especificidad en cuanto al serotipo dentro del biotipo eltor de Vibrio cholerae 01.

Se trabajó a nivel de extracción de DNA, tanto de los fagos de referencia (IV de Mukerjee y el V de Basu y Mukerjee) como de los fagos INDRE (41, 670 y 672) para comparar los pesos moleculares de DNA. Después de las comparaciones, se afirma que el peso molecular del DNA del F-IV y el peso molecular del DNA del F-V tienen el mismo valor.

La comparación de los pesos moleculares entre los DNAs de los fagos INDRE nos señala que poseen , los tres, un DNA con el mismo peso molecular de 13,894 pb.

En conjunto, podemos concluir que los fagos IV clásico, V eltor, 41 INDRE, 670 INDRE y 672 INDRE poseen un genoma con el mismo peso molecular, y que se necesitaría realizarles mas técnicas de biología molecular para poder captar diferencias genotípicas entre ellos y poder afirmar con certeza si son genéticamente iguales o diferentes.

REFERENCIAS

1. Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers.
2. Ackermann, H.W. 1976. La Classification des phages caudés des entéro bactéries. Path. Biol., Paris 24:359-370.
3. Ackermann, H. W.; 1983. Current problems in bacterial virus taxonomy; In: Matthews, A critical appraisal of virus taxonomy, 105-123 (Karger, Basel 1983).
4. Ackermann, H.W.; Kasatiya, S.S.; Kawata, T. 1984. Classification of *Vibrio* Bacteriophages. Intervirology 22 : 61-71.
5. Ackermann, H.W.; Eisenstark, A.; 1974. The present state of phage taxonomy. Intervirology. 3: 201-219.
6. Ackermann, H.W.; Audurier, A.; Berthiaume, L.; Jones, L.A.; Mayo, J.A.; Vidaver, A. K; 1978. Guidelines for bacteriophage characterization. Adv. Virus Res. 23 : 1-24.
7. Albert, M.J.; Siddique, A.K.; Islam, M.S. 1993. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. Lancet 341: 704.
8. Anonymous; 1981. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IUSB. Int. J. Syst. Bact. 31: 215-218.
9. Basu, S; Mukerjee, S. 1968. Bacteriophage typing of *Vibrio* eltor. Experientia. 24:299-300.
10. Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31: 230- 314.

11. Bystryi, N.F.; Drozhevskina, M.S.; 1979. Basic criteria and classification scheme for bacteriophages acting against cholera vibrios of the classical and El Tor biotypes. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun.* **23**: 85-94.
12. Cano, M.P. 1989. Obtención y estudio de fagos de cepas citotóxicas de *E. coli*. Tesis (QBP) ENCB. IPN. México.
13. CDC. 1994. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. OPS/OMS. pp.1-148.
14. Crick, F.H.; Watson, J.D. 1956. Structure of small viruses. *Nature* **177**: 473-475.
15. Chatterjee, S.N.; Das, J.; Barua, D. 1965. Electron microscopy of cholera phages. *Indian J. Med. Res.* **53**: 934-937.
16. Chatterjee, S.N.; Maiti, M. 1984. Vibriophages and vibriocins: physical, chemical and biological properties. *Adv. Virus Res.* **29**: 263-312.
17. Chattopadhyay, D.J.; Sarkar, B.L.; Ansari, M.Q.; Chakrabarti, B.K.; Roy, M.K.; Gosh, A.N. 1993. New phage typing scheme for *Vibrio cholerae* O1 biotype El tor strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1579-1585.
18. Chowdhury R., Das J.; 1986. Infection by cholera phage ϕ 138: bacteriophage DNA and replicative intermediates. *J. Virol.* **57**: 960-967.
19. Chowdhury R., Sengupta A., Ray P., Das J.; 1987. Replication and packaging of cholera phage ϕ 149 DNA. *J. Virol.* In press.
20. Chowdhury, R., SK. Biswas., J. Das. 1989. Abortive replication of cholera phage ϕ 149 in *Vibrio cholerae* biotype el tor. *J. Virol.* **63**: 392-397.
21. Davis - Dulbecco. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat. 2a. ed. España, 1983.

22. Epstein, PR. 1992. Cholera and the environment. *Lancet*. 339: 1167-1168.
23. Feeley, J.C.; Pittman, 1963. Studies on hemolytic activity of El Tor vibrios. *Bull. W.H.O.* 28:347-356.
24. Finkelstein, R.A. 1973. Cholera. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 2:552-623.
25. Freeman, B. *Tratado de Microbiología*. Ed. Interamericana. 21a. edición. México, 1984.
26. Giono, C. S.; Gutierrez C. L.; Hinojosa M. A. 1991. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1, México: Publicación técnica No. 10 del INDRE, Secretaría de Salud.
27. Giono, C. S. 1994. *Vibrio cholerae*. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. S. Giono, A. Escobar, J.L. Valdespino (ed). México. INDRE. SSA. pp.: 309-350.
28. Horne, R.W.; Wildy, P. 1961. Symmetry in virus architecture. *Virology* 15: 348-373.
29. Jawetz, E. *Microbiología Clínica*. Ed, El Manual Moderno. México.
30. Kaper, J.B.; Morris, J.G.; Levine, M.M. 1995. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 8: 48- 86.
31. Leclerc, H. *Microbiologie Générale*. Ed. Doin. Paris, 1975.
32. Levine, M.M.; Kaper, J.B.; Black, R.E. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47:510-550.
33. Lewin, B. *Genes*. Ed. Reverté. 3a. edición. Barcelona, 1989.

34. Lwoff, A.; Anderson, T.F.; Jacob, F. 1959. Remarques sur les caractéristiques de la particule virale infectieuse. *Ann. Inst. Pasteur* 97: 281-289.
35. Maiti, M.; Chatterjee, S.N. 1971. Characteristics of a group IV cholera phage. *J. Gen. Virol.* 13: 327-330.
36. Majumdar S., Dey SN., Chowdhury R., Dutta Ch., Das J.; 1988. Intracellular Development of Cholera phage ϕ 149 under Permissive and Nonpermissive Conditions: An Electron Microscopic Study. *Intervirology.* 29:27-38.
37. Matthews, R.E.F.; 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology.* 17: 1-200.
38. Miller, C.J.; Faechem, R.G.; Drasar, B.S. 1985. Cholera epidemiology in developed and developing countries: new thoughts on transmission seasonality, and control. *Lancet* i:261-263.
39. Mukerjee, S. 1963. Bacteriophage typing of cholera. *Bull. W.H.O.* 28: 337-345.
40. Mukerjee, S. 1963. The bacteriophages-susceptibility test in differentiating Vibrio cholerae and Vibrio el tor. *Bull. W.H.O.* 28: 333-336.
41. Mukerjee, S. 1978. Principles and practice of typing Vibrio cholerae. *Meth. Microbiol.* 12: 74-115.
42. Newman, E.S.; Eisenstark, A. 1964. Phage-host relationships in Vibrio cholerae. *J. Infect. Dis.* 114: 217-225.
43. Olivera, H. 1995. Diagnóstico por biología molecular. En : Manual de técnicas de laboratorio. Vol III. A. Escobar G. (ed). Secretaria de Salud. México.

34. Lwoff, A.; Anderson, T.F.; Jacob, F. 1959. Remarques sur les caractéristiques de la particule virale infectieuse. *Ann. Inst. Pasteur* 97: 281-289.
35. Maiti, M.; Chatterjee, S.N. 1971. Characteristics of a group IV cholera phage. *J. Gen. Virol.* 13: 327-330.
36. Majumdar S., Dey SN., Chowdhury R., Dutta Ch., Das J.; 1988. Intracellular Development of Cholera phage ϕ 149 under Permissive and Nonpermissive Conditions: An Electron Microscopic Study. *Intervirology.* 29:27-38.
37. Matthews, R.E.F.; 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology.* 17: 1-200.
38. Miller, C.J.; Faechem, R.G.; Drasar, B.S. 1985. Cholera epidemiology in developed and developing countries: new thoughts on transmission seasonality, and control. *Lancet* i:261-263.
39. Mukerjee, S. 1963. Bacteriophage typing of cholera. *Bull. W.H.O.* 28: 337-345.
40. Mukerjee, S. 1963. The bacteriophages-susceptibility test in differentiating Vibrio cholerae and Vibrio el tor. *Bull. W.H.O.* 28: 333-336.
41. Mukerjee, S. 1978. Principles and practice of typing Vibrio cholerae. *Meth. Microbiol.* 12: 74-115.
42. Newman, E.S.; Eisenstark, A. 1964. Phage-host relationships in Vibrio cholerae. *J. Infect. Dis.* 114: 217-225.
43. Olivera, H. 1995. Diagnóstico por biología molecular. En: Manual de técnicas de laboratorio. Vol III. A. Escobar G. (ed). Secretaría de Salud. México.

44. Popovic, T.; Bopp, C.; Olsvic, O.; Wachsmuth, K. 1993. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *V. cholerae* O1. *J Clin Microbiol.* **31**:2474-82.
45. Ray P, Sengupta A., Das J.; 1984. Phosphate repression of phage protein synthesis during infection by cholera phage ϕ 149. *Virology*.**136**:110-124.
46. Ray, R.; Ganguly, U. 1987. The protein receptor for cholera bacteriophage ϕ 149. *FEB* **213**:81-84.
47. Sengupta A., Ray P, Das J.; 1985. Characterization and physical map of the cholera phage ϕ 149 DNA. *Virology*. **140**:217-229.
48. Shimada, T.; Nair G.B.; Deb, B.C.; Albert, M.J.; Sack, R.B.; Takeda, Y. 1993. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet* **341**: 1347.
49. Siddhartha K. Biswas; Rukhsana Chowdhury; Jyotirmoy Das. 1992. A 14 KDa Inner Membrane Protein of *Vibrio cholerae* Biotype El Tor Confers Resistance to Group IV Cholera phage Infection to Classical Vibrios. *J.Bacteriol.* **174**: 6221-6229.
50. Takeya, K.; Shimodori, S. 1963. Prophage-typing of Eltor *Vibrios*. *J. Bacteriol.* **85**: 957-958.
51. Tamplin, M.L.; Carrillo, P.C. 1991. Environment spread of *Vibrio cholerae* in Perú. *Lancet*. **338**: 1216-1217.
52. Valdespino J.L.; García, M.L. 1991. Epidemia de cólera en América. *Ciencia y Desarrollo*. **17**:55-64.