

22  
5



COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
Unidad Académica de los Ciclos  
Profesional y Posgrado

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Centro de Investigaciones sobre fijación  
de Nitrógeno

Universidad Nacional Autónoma de México

COMPORTAMIENTO DEL BACTERIOFAGO MU EN  
Salmonella typhi

T E S I S

Que para obtener el Título de  
Licenciado en Investigación Biomédica Básica  
P r e s e n t a:

MARIO SOBERON CHAVEZ

México, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

## INDICE :

### Introducción.

- a) Características generales de *Salmonella typhi*..... 1
- b) El bacteriofago Mu como herramienta para la manipulación de cepas sensibles al fago..... 4

Objetivos..... 14

Material y metodos.....15

### Resultados.

#### I.- Sensibilidad.

- a) Aislamiento de cepas sensibles de *Salmonella typhi* al fago Mu..... 22
- b) Sensibilidad vs resistencia al fago Mu..... 27

#### II.- Comportamiento de Mu en *Salmonella typhi*.

- a) Frecuencia de lisogenización y de inducción de auxotrofías en *Salmonella typhi*..... 30
- b) Caracterización de auxotrofías..... 31

#### III.- Transducción.

- a) Transducción en *S. typhi*.  $Mu^S \longrightarrow Mu^S$ ..... 34
- b) Transducción en *S. typhi*. La cepa JM1382 ("mu<sup>x</sup>") como donadora y receptora..... 37
- c) transducción interespecífica  
*S. typhi*  $\longrightarrow$  *E. coli*..... 39

Discusión..... 43

Bibliografía..... 46

## INTRODUCCION

### a) Características generales de *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* es el agente causal de la fiebre tifoidea. En México la fiebre tifoidea es un padecimiento endémico que alcanza tasas de mortalidad de 3 en 100,000 habitantes, además ha habido brotes epidémicos en los que la mortalidad alcanza 6 por 100,000 habitantes por lo que constituye un problema de salud pública (1).

Uno de los brotes epidémicos mas severos se dió en el año de 1973 en el que se alcanzaron a registrar tasas de mortalidad de 9.7 por 100,000 habitantes (2)

De las cepas de *Salmonella typhi* aisladas durante esta epidemia el 92% eran resistentes a altas concentraciones de cloranfenicol, el agente de elección para el tratamiento del padecimiento. Además de la resistencia a este antibiótico se encontró que estas cepas eran también resistentes a estreptomycin, tetraciclina y sulfonamidas, y que estas resistencias estaban codificadas por un plásmido conjugativo que pertenecía al grupo de compatibilidad H - (3, 4, 5, 6). Así mismo se observó que el fagotipo de la mayoría de las cepas multiresistentes aisladas durante 1973

era un tipo Vi degradado, a diferencia del fagotipo E-1 reportado para las cepas mexicanas en 1956 (7).

Con el fin de hacer un estudio epidemiológico de la fiebre tifoidea, en 1975 se fundó en México el Centro Nacional de Referencia de *Salmonella typhi*. Martuscelli y colaboradores han logrado reunir en este Centro un gran número de cepas de *S. typhi* aisladas de pacientes con tifoidea, que ha permitido el estudio de los patrones de resistencia a antibióticos y el fagotipo de las cepas -- aisladas anualmente. Así mismo Alfaro y Martuscelli (8) encontraron que en el año de 1978 el 92% de las cepas aisladas resultaron ser auxotrofas de cisteína. Posteriormente se encontró (9), que un alto porcentaje de las cepas de *S. typhi* aisladas en otros años presentaban esta misma auxotrofia. Soberón y Martuscelli (9), realizaron un estudio detallado de esta auxotrofia y encontraron que:

- 1.-La auxotrofia para cisteína era parcial ya que estas cepas crecían en medio mínimo pero con un tiempo de duplicación mayor; este fenotipo se llamó Cym.
- 2.-El fenotipo Cym en todas las cepas estudiadas se debía a mutaciones en la enzima sulfito reductasa.
- 3.- Las cepas de *Salmonella typhi* podían separarse en dos grupos de complementación (9).

Estudios posteriores, (Richell y Gama comunicación personal) mostraron que el fenotipo cym de *Salmonella typhi* era un fenotipo que dependía de la temperatura, ya que a baja temperatura (30°C) las cepas de *Salmonella typhi* eran prototrofas y a alta temperatura (42°C) presentaban un requerimiento absoluto por cisteína, metionina y tiosulfato de sodio. Estos datos explican el crecimiento residual de la cepa cym en medio mínimo observado previamente a 37°C -- (9).

La limitación mas importante para el análisis genético de *Salmonella typhi* ha sido el no contar con un sistema eficiente de transferencia génica.

Sin embargo se han tratado de implementar diferentes sistemas de transferencia génica como el aislamiento de cepas Hfr (10) capaces de transferir material genético de -- origen cromosomal. La manera como se aislaron fue transferir factores F de *E. coli* a *S. typhi*. Estos factores ---- poseen marcadores genéticos que permiten seleccionar su -- integración en el cromosoma bacteriano (Kan<sup>r</sup>). Las diferentes cepas Hfr así obtenidas fueron estudiadas respecto al sitio de integración del factor F y su estabilidad como donado-- res; se encontró que todas las cepas aisladas eran muy ----

inestables (10).

Otro sistema de transferencia génica que se trato de implementar fue la transducción con el fago P1 (Gloria - Soberón comunicación personal). Para esto se trataron de aislar cepas sensibles de *S. typhi* a P1 utilizando un fago P1 que confiere la resistencia a el antibiótico cloranfenicol. De las cepas resistentes a cloranfenicol así obtenidas no fue posible propagar el fago.

b) El bacteriofago Mu como herramienta para la manipulación genética de cepas sensibles al fago.

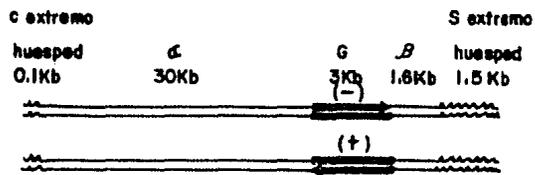
El bacteriofago Mu es un fago temperado: Después de infectar a su hésped natural *Escherichia coli*, tiene dos posibilidades que son el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. En el ciclo lítico, las funciones de replicación y morfogenesis del fago Mu se expresan y la bacteria muere. Este proceso genera de 50 a 100 partículas fágicas, por cada bacteria infectada. Durante el ciclo lisogénico las funciones necesarias para el crecimiento de Mu se reprimen. Durante este proceso el ADN fágico se integra linealmente (11) en el genoma del hésped permaneciendo inactivo como

profago. La represión de las funciones fágicas funciona en trans, cuando cepas lisogenas son infectadas el fago superinfectante no puede expresar sus funciones líticas.

La integración de Mu durante el ciclo lisogenico - puede ocurrir en un gran número de sitios, originando mu taciones en los sitios de integración (por ejemplo auxotrofías). La frecuencia de reversión de mutaciones inducidas por Mu es menor a  $10^{-10}$  (12). Esta integración de Mu al genoma del huésped es independiente del sistema de recombinación de éste y genera una duplicación de cinco pares de bases en el lugar de la inserción (13, 14, 15). Además se sabe que el ADN de Mu al extraerse de partículas virales esta covalentemente ligado en sus dos extremos a secuencias bacterianas de  $\pm 0.1$  kb en el extremo - c y de  $\pm 2$  kb en el extremo S (ver figura 1) por lo que se le considera un elemento transponible (16, 17).

El bacteriófago Mu es un fago que realiza transducción generalizada como el fago P1 de *Escherichia coli* -- (18), sin embargo la frecuencia de transducción de marca dores bacterianos por Mu es aproximadamente diez veces - menor que la de P1 (19). La frecuencia de transducción - con Mu puede elevarse de diez a cien veces si se uti lizan cepas previamente lisogenizadas por el fago Mucts

Fig. 1



Estructura del ADN de Mu. Segmento G en sus dos posibles orientaciones.

y mini Mu (éste último tiene una gran delección interna que lo incapacita para lisar a la célula conservando, sin embargo, su capacidad de transponer y de ser encapsidado) (20, 21).

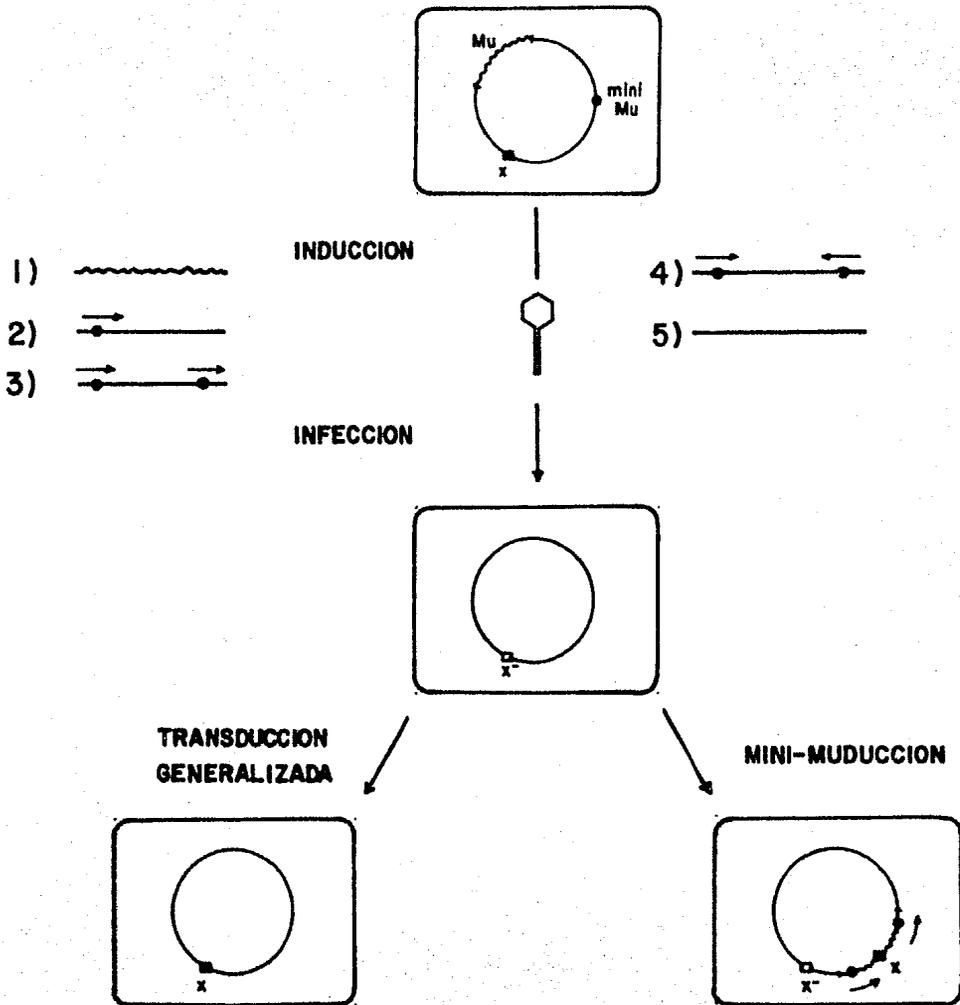
La razón por la que el miniMu aumenta la frecuencia de transducción se explica en el mecanismo que tiene el fago Mu para encapsidar su DNA:

- 1.- El DNA de Mu se empaqueta en las cabezas virales a partir de precursores maduros covalentemente ligados a DNA del huésped.
- 2.- El empaquetamiento comienza específicamente en el extremo c del DNA de Mu y procede unidireccionalmente al otro extremo del genoma del fago.
- 3.- El genoma de Mu por sí solo no puede llenar las cabezas virales y por lo tanto algo del DNA del huésped se empaqueta (22).

Como se dijo antes del miniMu no pierde su capacidad de transponer de manera que cuando se induce el ciclo lítico aumentan las copias de este fago, aumentando el número de sitios (extremos c) capaces de ser encapsidados (ver tipo de partícula No.2 en la Figura 2) aumentando de esta manera la frecuencia de transducción

Este sistema permite la transducción de caracteres

Figura 2-



Tipos de partículas que se encuentran a la inducción de una cepa (Muets) / mini-Mu:

- 1) ADN de Mu
- 2) ADN de mini-Mu + ADN bacteriano (transducción generalizada)
- 3) ADN bacteriano en cuyos extremos hay dos mini-Mu's con la misma orientación (mini-Muducción).
- 4) Igual que las partículas de tipo 3 pero los mini-Mu's tienen diferente orientación (transducción generalizada)
- 5) ADN bacteriano (transducción generalizada)

Partículas tipo 1) 90%; 2) y 3) +/- 10%

genéticos entre diferentes especies bacterianas sensibles a Mu ya que un tipo de partículas no requiere homología - entre la partícula transductante y el DNA del huésped para su integración por tener intactos los dos extremos de Mu (partícula No. 3 en la figura 2) (23). La transducción con este tipo de partículas se llama miniMuducción (21).

Otra característica del fago Mu es su capacidad de inducir rearrreglos cromosomales de diferentes tipos durante su ciclo lítico ya sea por inducción del profago o por infección. Los rearrreglos incluyen: deleciones que siempre están ligadas a un profago, inversiones donde el segmento invertido esta entre dos copias de Mu con orientación opuesta, fusión de replicones en donde estos se fusionan mediante la recombinación de dos profagos con la misma orientación y transposición de segmentos de DNA del huésped en donde el DNA que transpone esta entre dos profagos con la misma orientación (20). Este último rearrreglo ha permitido la transposición de diferentes genes bacterianos a plásmidos conjugativos dando grandes posibilidades para el aislamiento y mapeo de genes (24).

El bacteriofago Mu se aisló originalmente de la bacteria *E. coli*, sin embargo puede infectar diferentes especies de bacterias gram negativas. Su especificidad de

infección esta controlada por lo menos por dos genes. Estos genes mapean en el genoma de Mu en una región de DNA llamada "región invertible G". Esta región de DNA de Mu tiene la característica de poderse encontrar en las 2 orientaciones posibles con respecto al genoma de Mu (ver figura 1). La inversión de este segmento esta controlada por genes propios del fago Mu. De esta manera la expresión de los genes que controlan la especificidad de infección esta controlada por la orientación del segmento G ( 25, 26). *E. coli* K12 y una cepa de *Erwinia chrysanthemi* adsorben fagos que tengan la especificidad que corresponde a la orientación (+) del segmento G, mientras que otras cepas de *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia uredovora* y *Erwinia amulovona* adsorben Mu con la especificidad que corresponde a la orientación (-) del segmento G (27).

El comportamiento del bacteriofago Mu se ha estudiado casi exclusivamente en su huésped natural *E. coli*. Sin embargo se ha reportado que el fago Mu tiene un comportamiento diferente en otras especies bacterianas, en cuanto a su capacidad de inducir mutaciones, replicación y morfogenesis del mismo. *E. cloacae* adsorbe Mu G (-) y su comportamiento es parecido al que tiene en *E. coli* -

K 12; en *E. cloacae* se encontró que Mu tiene, al igual que en *E. coli*, capacidad de inducir mutaciones en diferentes sitios del cromosoma. Se aislaron 29 auxotrofos inducidos por Mu y se encontraron 5 diferentes requerimientos (28).

En cuanto a la lisogensación por Mu en otras especies bacterianas, se reportó que *Serratia marcescens* permite el crecimiento de Mu<sub>cts</sub> 62 a 40°C pero no se puede -- lisogenisar a 30°C. En *A. tumefaciens* no se han podido -- encontrar lisogenos a 30°C, sin embargo se observa lisis confluyente a 42°C. La lisis que se observa no se debe al desarrollo de Mu, ya que al hacer diluciones de lisados -- de Mu para ver placas de lisis estas no se ven (28).

Utilizando como criterio la lisis de una capa de -- bacterias por un lisado de Mu, se concluyó que la mayoría de las enterobacterias son resistentes a Mu. No obstante se observó que el fago Mu, una vez introducido en las -- bacterias resistentes con un plásmido conjugativo en el cual esta integrado puede ser inducido y desarrollarse líticamente en estas cepas (29).

Entre las especies bacterianas que son resistentes

a Mu se encuentra *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*, de las cuales se han aislado cepas sensibles a Mu.

En *Klebsiella pneumoniae* se aislaron cepas sensibles al fago Mu al aislar cepas que fueran resistentes a fagos naturales. La razón por la que estas cepas son sensibles al fago Mu es que ya lo pueden adsorber (31). La explicación que dan los autores es que las cepas resistentes sufrieron una mutación que afectó la estructura de su pared celular y que por lo tanto cambió la adsorción de los fagos. La mutación que confiere la sensibilidad a Mu en *K. pneumoniae* mapea cerca de his -- (55% de contrasducción) (31). Otro ejemplo de esto se encuentra en cepas de *Salmonella typhimurium* que son resistentes al fago P22 y sensibles al fago P1 (30).

En *Salmonella typhimurium* Faalen et.al encontraron fortuitamente una cepa sensible a Mu. El alelo que confería la sensibilidad a esta cepa se le llamó musA1 y se observó que estaba ligado al operon de histidina (4% de contrasducción con his G). También se encontró que cepas que presentaban grandes deleciones en esa región (his rfb) eran sensibles a Mu, por lo que se concluyó que la sensibilidad conferida por musA1 era - - - - -

debido a la pérdida de una función. A partir de esta mutante se aisló una cepa Hfr capaz de donar el operón his tempranamente y que tiene una inserción en his G de un Tn10 que ya no puede transponer (his G9224::Tn10 $\Delta$ 4 $\Delta$ 11). Esta cepa Hfr ha hecho posible la introducción del carácter Mu<sup>S</sup> a otras cepas (32).

Los datos arriba mencionados muestran que existen diferentes estrategias experimentales que permiten el aislamiento de cepas sensibles a Mu como el aislamiento de cepas resistentes a fagos naturales, o la transferencia génica de la sensibilidad por conjugación con la cepa Mu<sup>S</sup> de *S. typhimurium* arriba mencionada.

El interés primordial de contar con un sistema genético en *Salmonella typhi* es el poder identificar aquellas funciones involucradas en la patogenidad de este microorganismo para poder hacer un análisis molecular del mismo; para esto se plantearon los siguientes objetivos que nos permitirían utilizar el fago Mu para montar un sistema de transferencia génica en *S. typhi*.

**OBJETIVOS:**

Los objetivos del siguiente trabajo consisten en:

- 1.- Determinar la sensibilidad de *Salmonella typhi* a Mu.
- 2.- El aislamiento de cepas sensibles al fago
- 3.- El estudio del comportamiento de Mu en esta especie bacteriana y la implementación de métodos que permitan la manipulación genética de *Salmonella typhi*.

## MATERIAL Y METODOS

### Cepas Bacterianas y Bacteriófagos.

Las cepas Bacterianas y los Bacteriófagos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1.

### Medios de cultivo.

Los medios de cultivo usados en este trabajo fueron: Medio rico se utilizó medio Luria (triptona 1%, extracto de levadura .5% y NaCl 1%) salvo para la lisogenización y prueba de sensibilidad a Mu en que se utilizo medio Fry (extracto de carne 1%, Bacto-peptona de Bioxon .5%, NaCl 1%); medio minimo 132 (Na HPO<sub>4</sub> .7%, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> .3% NH<sub>4</sub> - - 11.04%, Citrato de Na .05%, MnCl<sub>2</sub> Sol 10<sup>-2</sup> M .1ml, FeCL<sub>3</sub> Sol 10<sup>-2</sup> M .1ml, Vit B1 sol 1 mg/ .05ml .05ml) glucosa - como fuente decarbono 0.2%; todos los aminoácidos se -- agregaron a 40µg/ml salvo glutamina serina y prolina que se agregaron a 150µg/ml, tiosulfato de Na se agrego a - 100µg/ml. La concentración de agar que se utilizó fue -- del 1.5% salvo para el agar suave se utilizo medio Luria con 0.7% de agar. Para detectar la presencia del plásmi- do F' lac pro (Mu 18A1) en *S. typhi* se utilizó medio -

Tabla 1

CEPAS Y FAGOS

<u>E. COLI</u>	Genotipo	Referencia
C600	leu thr gal lac supE	Appleyard, et al
C600 (Mucts62)	liso	
MXR (MuctspAp1)	$\Delta$ ( <u>lac pro</u> ) <u>galE</u> <u>thiA</u>	Faelen et al (1978)
MXR (MuctspAp1)		" "
/F <u>lac pro</u> (Mu18A1)		
HB94	<u>hsr-</u>	Guillermo Alfaro
<u>S. typhimurium</u>		
MA766	<u>thr</u> <u>hisG::Tn10</u> $\Delta$ 4 $\Delta$ 11 <u>musA1</u>	Faelen et al (1981)
ZJ1001	derivada Thr <sup>+</sup> MA766	este trabajo
<u>S. typhi</u>		
JM1382	<u>cym ts</u> Nal <sup>r</sup>	Guillermo Alfaro
ZJ1	JM1382 <u>hisG::Tn10</u> $\Delta$ 4 $\Delta$ 11 <u>musA1</u>	Este trabajo " "
ZJ2	JM1382 <u>musA1</u>	" "
ZJ1 (Mucts62)		" "
ZJ2 (Mucts62)		" "
JM1382 (MucstspAp1)		" "
ZJ (Mucts62)	lac <sup>+</sup>	" "
/F <u>lac pro</u> (Mu18A1)		
ZJ2 (Mucts62)	lac <sup>+</sup>	" "
/F <u>lac pro</u> (Mu18A1)		
JM1382 (MuctspAp1)	lac <sup>+</sup>	" "
/F <u>lac pro</u> (Mu18A1)		
ZJ11	JM1382 <u>his G</u> S. <u>typhimurium</u>	" "
<u>FAGOS</u>		
Mucts62	represor <u>ts</u>	Howe (1973)
MuctspAp1	derivado Mucts62 marcador Ap segmento G	Leach (1979)
Mu18A1	represor <u>ts</u> marcador Ap $\Delta$ 24.6 +/-0.8 KB	Faelen et al (1978)
Mucts62 <sub>com</sub> 3452	Modificación deficiente	Toussaint (1976)

Mc Conkey lac (Mc agar lactosa de Difco 5%) Las bacterias se diluyeron en  $Mg SO_4 10^{-2} M$ , los fagos en Tris - - HCl  $10^{-2} M$  pH7.5

Los antibióticos se agregaron a las siguientes concentraciones: ampicilina (amp) 25 $\mu$ g/ml, ácido nalidíxico (nal) y tetracina (Tc) a 100 $\mu$ g/ml

El crecimiento celular se siguió por aumento en la densidad óptica del cultivo en un aparato Bausch and Lomb a 550nm.

Aislamiento de cepas de *S. typhi* sensibles a Mu.

Las cepas sensibles a Mu se aislaron de la manera reportada (32). Las cepas ZJ1001 y JM1382 se cultivaron hasta una concentración final de  $2 \times 10^8$  células/ml y se mezclaron en una proporción 1:10, se incubaron 30 minutos a 37°C sin agitación, la conjugación se interrumpió con agitación violenta y se plateó la mezcla directamente en placas de Luria Tc Nal, en las conjugantes resultantes se examinaron las resistencias a estos antibióticos, autotrofia por histidina, fagotipo y sensibilidad a Mu.

### Preparación de lisados de Mu.

Se cultivo la cepa lisogenizada hasta saturación en medio Luria a 30°C y se diluyó 30 veces en 10 ml de medio Luria y se agitó a 30°C hasta que alcanzó una densidad óptica de .22, se cambió a 42°C con agitación durante 20 minutos y después a 37°C hasta que se observó lisis bacteriana, el cultivo se mezcló con cloroformo y se centrifugaron los restos celulares. El sobrenadante se tituló en la cepa de *E. coli* HB94. Este método da lisados con títulos de aproximadamente  $1 \times 10^9$  fagos /ml.

### Aislamiento de cepas lisogenizadas por Mu.

La cepa a lisogenizar se cultivó toda la noche en Luria a 37°C y se diluyó 30 veces en medio Luria fresco, se creció a una densidad óptica de 0.22, se sembró una capa de bacterias en una caja de medio Fry con agar suave. Se le agregó una gota de un lisado fresco de Mu y se incubó a 30°C toda la noche; al día siguiente se estriaron las células que estuvieron en contacto con el fago y se les determinó la presencia del fago a 42°C usando una cepa indicadora.

## Aislamiento y caracterización de cepas auxotrofas inducidas por Mu

Para aislar auxótrofos se probó el crecimiento de las cepas lisógenas en medio mínimo replicando las celulas en medio mínimo y medio Luria.

Las cepas auxótrofas se resuspendieron en .02 ml de  $\text{MgSO}_4$   $10^{-2}$  M y se replicaron en 10 diferentes medios que tenían cada uno 5 aminoácidos en los que cada aminoácido está presente en 2 medios, después de identificar el requerimiento, las auxótrofas se probaron en medios con el aminoácido que requerían.

## Sensibilidad al Fago Mu

Se creció la cepa a probar hasta una densidad óptica de .02 y se sembró una capa de la misma con agar -- suave en medio sólido Fry. Se infectó la capa con una - gota de un lisado fresco de Mu<sub>cts62</sub> y se incubó a 42°C toda la noche. Al día siguiente se observó si había -- lisis confluyente.

### Aislamiento de cepas lisógenas Mu/miniMu.

La cepa MXR (MuctspAp1) /F' lac pro (Mu18A1) se creció a una densidad óptica de .22 al igual que la cepa receptora y mezclaron .01 ml de cada cepa en placas de Luria, se incubó la mezcla a 30°C por toda la noche y se estriaron las células en L amp nal, las conjugantes se probaron en medio Mc lac luria amp y luria nal.

### Transducción.

La transducción se hizo de la manera descrita por - Faelen et al (21).

Se infectaron  $5 \times 10^9$  células con un lisado Mu/miniMu previamente preparado de la cepa donadora a una -- multiplicidad entre 0.5 y 1 en presencia de  $\text{CaCl}_2$   $10^{-2}$  M y se sembraron sobre varias placas de medio selectivo. Las placas se incubaron a 30°C 48 a 72 horas.

### Fagotipos

La fagotipia se hizo de la manera descrita por - - Anderson y Williams (37). Los fagos fueron obtenidos por

medio del Dr. E. S. Anderson, International Reference -  
Laboratory, Londres. Se infectó una capa de bacterias de  
la cepa a probar con la colección de 100 fagos, incuban-  
do las placas a 37°C 12 horas. Se observó el patrón de  
lisis.

## RESULTADOS

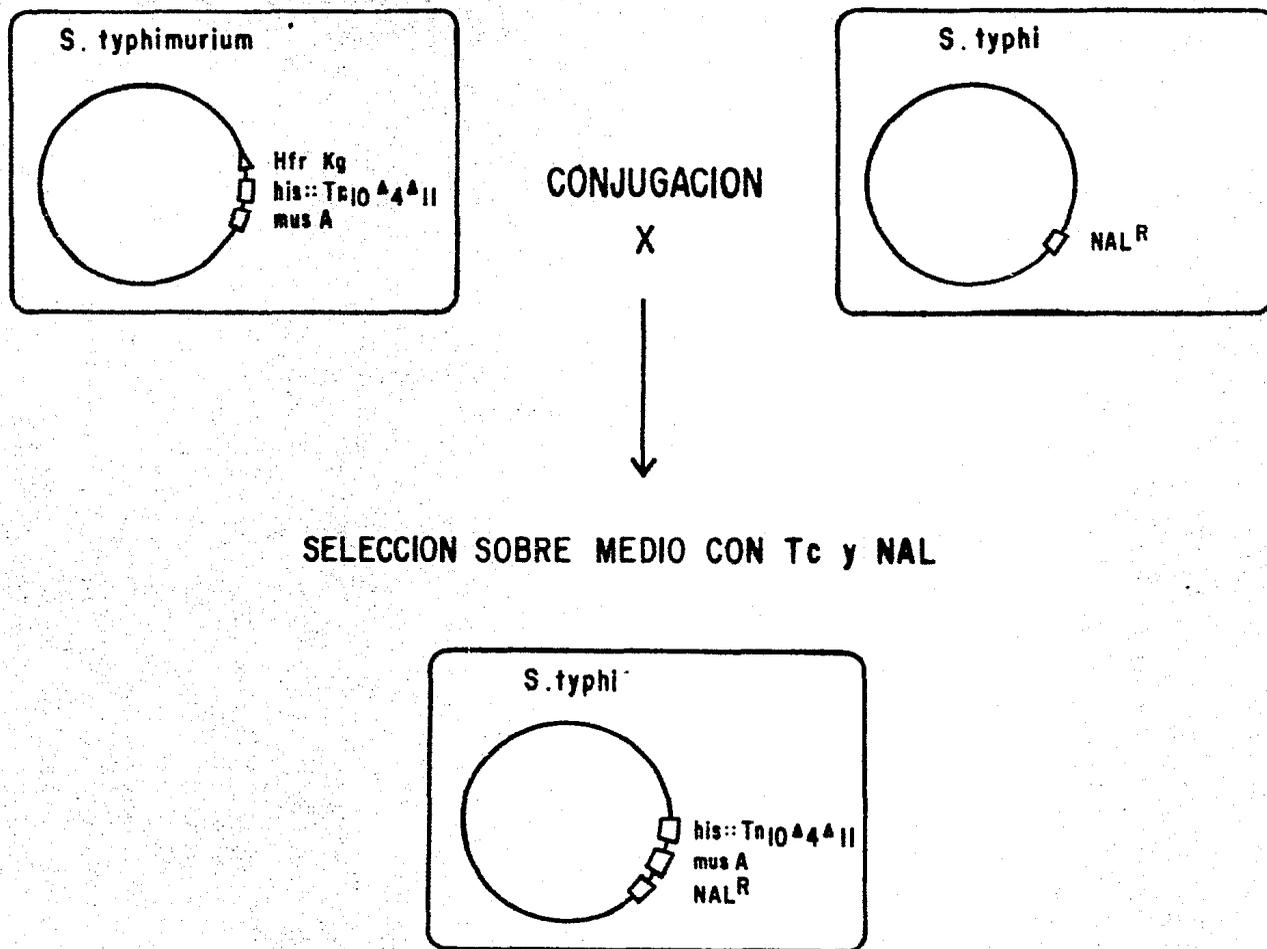
### I.- Sensibilidad

Utilizando como criterio la lisis de una capa de bacterias por lisado de Mucts 62 a 42°C encontramos que *Salmonella typhi* es resistente a Mu.

#### a) Aislamiento de cepas sensibles de *S. typhi* al fago Mu

La cepa de *S. typhi* sensible a Mu (ZJ1) se aislo - al hacer una conjugación entre una cepa Hfr de *Salmonella Typhimurium* sensible al fago que confiere tempranamente la sensibilidad a Mu (32), y la cepa de *Salmonella thypi* resistente a Mu (JM1382). La manera en como se seleccionaron las transconjugantes esta ilustrado en la figura 3. Como se puede ver en esta figura la cepa Hfr de *Salmonella typhimurium* confiere tempranamente la resistencia a tetraciclina que esta codificada por un transposon Tn10 -- que esta insertado en el gene hisG, este transposon tiene una deleción que le impide transponer. Entre las transconjugantes aisladas como Tc<sup>r</sup> y Nal<sup>r</sup> (caracter receptora) se probó la sensibilidad al fago Mu de la manera descrita en material y metodos; entre estas cepas se aislo la

Fig. 3



Aislamiento de cepas de S. typhi sensibles al fago Mu

cepa ZJ1 cuyo fenotipo es  $Tc^R$ ,  $Nal^R$ ,  $His^-$  y  $Mu^S$ .

Para hacer más simple la manipulación de la cepa de *S. typhi*  $Mu^S$  se aisló la cepa ZJ2 a partir de la cepa ZJ1. La cepa ZJ2 ya no tiene el requerimiento por histidina por haber perdido el  $Tn10$  que tenía insertado en el gene hisG. La manera como se aisló esta cepa fue seleccionar aquellas cepas que ya no requirieron histidina -- para crecer aislandolas en placas de medio mínimo. El fenotipo de la cepa ZJ2 es  $Tc^S$ ,  $Nal^R$ ,  $His^+$  y  $Mu^S$ .

Ya que en *Klebsiella pneumoniae* las cepas sensibles a Mu habían alterado la adsorción de fagos naturales, debido probablemente a algún cambio en su pared celular -- (31), probamos el fagotipo de la cepa sensible a Mu de *S. typhi* (ZJ2) para establecer si la mutación que confiere la sensibilidad al fago Mu había alterado la adsorción de otros fagos a *S. typhi*. Se encontró que el fagotipo de esta cepa es el mismo que el de la cepa  $Mu^R$  -- (JM1382) de la cual se aisló (fagotipo Vi degradado).

Este dato sugiere que la sensibilidad a Mu de la cepa ZJ2 no se debe a cambios en su pared celular ya que esta cepa sigue siendo sensible a los mismos fagos que la cepa JM1382.

Dado que la resistencia al fago Mu de la cepa --

JM1382 parecía no deberse a que los fagos no se adsorbieran a su pared celular, decidimos medir la frecuencia de lisogenización en esta cepa y en la cepa sensible a Mu - (ZJ2). Para medir la frecuencia de lisogenización utilizamos un fago que confiere la resistencia al antibiotico ampicilina (MuctspAp1) (33), de manera que las cepas resistentes a este antibiótico a 30°C son lisogenas. Observamos que la frecuencia de lisogenización es 5 a 10 veces menor en la cepa resistente (JM1382) con respecto a la cepa sensible. También observamos que al inducir las cepas lisógenas tenemos la misma producción de fagos en la cepa resistente y en la sensible, aproximadamente  $1 \times 10^9$  fagos/ml , ver tabla 2.

Estos resultados indican que aunque las cepas resistentes tienen una frecuencia de lisogenización menor, la frecuencia de transposición es la misma (dado que el mecanismo que se propone para la replicación del fago es la transposición) en la cepa resistente y en la sensible ya que producen la misma cantidad de fagos a la inducción.

Además estos resultados indican que *Salmonella typhi* al igual que *E. coli* K12 adsorbe fagos del tipo G (+) ya que el fago MuctspAp1 solo presenta esta orientación del segmento G (33).

Tabla 2

Infección Mu<sub>ctspAp1</sub>

	JM1382 (Mu <sup>r</sup> )	ZJ2 (Mu <sup>s</sup> )
No de lisogenas )Ap)	$7.7 \times 10^3$	$9 \times 10^4$
% inducción auxotroffias	3%	3%
No. de fagos Inducción de una Lisogena	$1 \times 10^9$	$9.5 \times 10^8$

b) Sensibilidad vs resistencia al fago Mu.

Dado que la cepa JM1382 ( $Mu^r$ ) tiene una frecuencia de lisogenización menor y la misma frecuencia de transposición, decidimos comparar la adsorción del fago Mu en la cepa sensible vs la resistente, además de la mortalidad de estas cepas a la infección del fago, producción de centros infectivos (bacterias en donde se está desarrollando el fago) y producción de fagos a la infección.

Para esto se siguió la siguiente estrategia: Se infectaron la cepa resistente y la sensible con la misma multiplicidad, (número de partículas formadoras de placas de lisis/ no. de bacterias) se incubaron 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con el fago y se centrifugaron las células, se titularon los fagos en el sobrenadante para ver el número de fagos no adsorbidos, las células se lavaron y parte se dejaron incubando a  $42^{\circ}\text{C}$  para ver producción de fagos a la hora y veinte minutos y en la otra parte de las células se titularon los sobrevivientes a la infección a  $30^{\circ}\text{C}$  y los centros infectivos en una capa de bacterias a  $42^{\circ}\text{C}$

Para poder distinguir los centros infectivos de los fagos acarreados durante la centrifugación de las células se utilizó un fago Mu<sub>cts62</sub>mom3452 crecido en la cepa de

*E. coli* C600. Este fago tiene una mutación en su sistema de modificación de manera que los fagos producidos tienen solamente la modificación del huésped, (34) así al titular los centros infectivos en una cepa de *E. coli* deficientes en su sistema de restricción (HB94) y en una cepa con el alelo silvestre de restricción (C600) los podíamos distinguir ya que los fagos producidos por los centros infectivos estarían modificados por *S. typhi* y serían restringidos por *E. coli* y los fagos acarreados no serían restringidos por *E. coli*.

En la tabla 3 se muestra el resultado de tal experimento en el que se ve que:

- 1) La adsorción de los fagos por la cepa sensible y la resistente es la misma. Las dos cepas adsorbieron  $6.9 \times 10^8$  fagos /ml.
- 2) La cepa sensible produce mas centros infectivos que la cepa resistente.
- 3) La cepa sensible produce mas fagos a la infección que la cepa resistente; la diferencia que se observa corresponde a la diferencia observada para los centros infectivos.
- 4) La cepa resistente sobrevive mas a la infección por el fago que la sensible.

Tabla 3

Desarrollo del bacteriofago Mucts62mon3452 en las cepas sensibles y resistentes.

	JM1382 ("Mu <sup>r</sup> ")	ZJ2 (Mu <sup>s</sup> )
No de Bacterias	$4.4 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8$
Titulo del fago	$9 \times 10^8$	$9 \times 10^8$
Multiplicidad	2	2.5
No. de fagos no adsorbidos	$2.1 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$
No de sobrevivientes a la infección	$2.25 \times 10^8$	$4 \times 10^7$
Centros infectivos titulados en R <sup>-</sup> M <sup>+</sup>	$7.3 \times 10^7$	$2.8 \times 10^8$
Centros infectivos titulados en R <sup>+</sup> M <sup>+</sup>	$1.46 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
No de fagos producidos a la cepa 1°20' en:		
CEPA R <sup>-</sup> M <sup>+</sup>	$1.2 \times 10^9$	$4 \times 10^9$
CEPA R <sup>+</sup> M <sup>+</sup> *	$1.48 \times 10^7$	$1 \times 10^8$

\*R= restricción

M= modificación

Para ver si la diferencia en muerte celular de la cepa ZJ2 y la cepa JM1382 se debía a la expresión temprana de algunas funciones de Mu, las 2 cepas se infectaron con el fago Mucts62 Bamb que no se puede replicar (34) y observamos que no hay muerte celular y que por lo tanto esta se debe a la replicación y morfogénesis del fago.

Nuestros datos muestran que las cepas "resistentes" - aunque adsorben los fagos igual que las sensibles, tienen una frecuencia de lisogenización, producción de centros infectivos y producción de fagos a la infección menor que las sensibles y que esta diferencia no se debe a que el ciclo lítico del fago este alterado ya que las cepas "resistentes" tienen la misma producción de fagos que las sensibles a la inducción de una lisógena.

Por otra parte muestran también que el criterio generalmente utilizado para determinar si una cepa es sensible o resistente al bacteriofago Mu es inadecuado, ya que la cepa JM1382 en las condiciones descritas es sensible a Mu.

## II.- Comportamiento de Mu en *Salmonella typhi*

a) Frecuencia de lisogenización y de inducción de auxotrofías en *Salmonella typhi*

En *E. coli* se ha observado que al infectar esta -- bacteria con el bacteriofago Mucts en placa a 30°C alrededor del 40% de las células sobrevivientes a la infección son lisógenas. De estas lisógenas el 2% al 5% tienen algún requerimiento nutricional (no crecen en medio mínimo) (12).

Para establecer la frecuencia de lisogenización y la frecuencia de inducción de auxotrofias por Mu en *S. typhi* infectamos la cepa de *S. typhi* con el fago Mucts 62 o con el fago MuctspApI y observamos que la frecuencia de lisogenización, esta entre el 30% y el 40% entre las células sobrevivientes, y de estas lisógenas la inducción de auxotrofias esta entre el 2% y el 5%. En contraste observamos que la cepa JM1382 al infectarla con el fago MuctspApI tiene una frecuencia de lisogenización entre el 2% y el 4% y de éstas la proporción de inducción de auxotrofias es igual que la de la cepa ZJ2.

#### b) Caracterización de auxotrofias

Otro aspecto interesante en cuanto al comportamiento de Mu es la inespecificidad de integración del fago al lisogenisar. Por esto decidimos buscar los requerimi-

entos de las cepas auxotrofas que habiamos aislado para ver si Mu en *S. typhi* tenia algun sitio preferente para su integraci3n o si la integraci3n de Mu ocurria en muchos sitios como en *E. coli*.

Para la caracterizaci3n de cepas aux3trofas se caracterizaron las aux3trofas aisladas de la cepa ZJ2 ya que como se mencion3 antes tiene una frecuencia de liso genizaci3n mayor y por lo tanto es m3s f3cil la obtenci3n de aux3trofos inducidos por Mu.

Se aislaron 60 auxotrofos y se pudo establecer el requerimiento de 26 aux3trofos de la manera descrita en material y m3todos. Los resultados estan ilustrados en la tabla 4. De las 26 aux3trofas encontramos 11 requerimientos diferentes, lo que nos sugiere que la integraci3n del DNA f3gico se da en un gran n3mero de sitios - al igual que en *E. coli*.

Una de las caracteristicas de las mutaciones inducidas por Mu en *E. coli* es que tienen una frecuencia de reversi3n menor a  $10^{-10}$ , esto se debe a que el fago Mu no se escinde de su sitio de integraci3n (12). Para establecer si las mutaciones que tenian las cepas auxotrofas - estaban inducidas por el fago Mu, decidimos establecer la frecuencia de reversi3n de las veintiseis - -

Tabla 4

<u>CEPA</u>	<u>FAGO UTILIZADO</u>	<u>REQUERIMIENTO</u>	<u>CEPA</u>	<u>FAGO UTILIZADO</u>	<u>REQUERIMIENTO</u>
MS1	Mucts62	FENILALANINA	MS14	MuctspAp1	TREONINA
MS2	Mucts62	SERINA	MS15	MuctspAp1	CISTEINA
MS3	Mucts62	FENILALANINA	MS16	MuctspAp1	METIONINA
MS4	Mucts62	CISTEINA Y METIONINA	MS17	MuctspAp1	METIONINA
MS5	MuctspAp1	ARGININA	MS18	MuctspAp1	METIONINA
MS6	MuctspAp1	METIONINA	MS19	MuctspAp1	HISTIDINA
MS7	MuctspAp1	TRIPTOFANO	MS20	MuctspAp1	ARGININA
MS8	MuctspAp1	ARGININA	MS21	MuctspAp1	ARGININA
MS9	MuctspAp1	METIONINA	MS22	MuctspAp1	URACILO
MS10	MuctspAp1	CISTEINA Y METIONINA	MS23	MuctspAp1	METIONINA
MS11	MuctspAp1	LEUCINA	MS24	MuctspAp1	METIONINA
MS12	MuctspAp1	LEUCINA	MS25	MuctspAp1	SERINA
MS13	MuctspAp1	TREONINA	MS26	MuctspAp1	SERINA

cepas auxótrofas, los resultados estan ilustrados en la tabla 5. De las 26 auxótrofas hay 21 que tienen una frecuencia de reversión menor a  $10^{-10}$ , lo que sugiere que las mutaciones estan inducidas por Mu. Las otras 5 cepas que tienen frecuencia de reversión mayor a  $10^{-10}$ , estan probablemente inducidas por el fago Mu ya que en *E. coli* se ha reportado reversión de mutaciones inducidas por Mu por mutaciones que mapean en otro sitio del cromosoma - (36).

### III.- Transducción

Para transducir marcadores génicos de *Salmonella typhi* por el bacteriofago Mu se aislaron cepas donadoras lisógenas por el fago Mucts62 (MupAp1 para la cepa JM1382) y el Mu18A1 (miniMu), ya que este sistema aumenta la frecuencia de transducción por Mu de 10 a 100 veces (20,21). El fago Mu18A1 se introdujo por medio de un plásmido conjugativo en el que esta insertado F' lac pro (Mu18A1).

a) Transducción en *S. typhi*  $Mu^S \longrightarrow Mu^S$

Empezamos a estudiar la transferencia de dos marcadores:

Tabla 5

<u>CEPA</u>		<u>FRECUENCIA DE REVERSION</u>	<u>CEPA</u>		<u>FRECUENCIA DE REVERSION</u>
MS1	<	$3.6 \times 10^{-10}$	MS14	<	$4.3 \times 10^{-10}$
MS2	<	$3.6 \times 10^{-10}$	MS15	<	$4.8 \times 10^{-10}$
MS3	=	$3.5 \times 10^{-8}$	MS16	=	$1 \times 10^{-8}$
MS4	<	$1 \times 10^{-10}$	MS17	<	$4.1 \times 10^{-10}$
MS5	=	$2.6 \times 10^{-6}$	MS18	<	$2.8 \times 10^{-10}$
MS6	<	$4.3 \times 10^{-10}$	MS19	<	$4.7 \times 10^{-10}$
MS7	<	$1.2 \times 10^{-10}$	MS20	<	$4.8 \times 10^{-10}$
MS8	<	$1.3 \times 10^{-10}$	MS21	<	$5 \times 10^{-10}$
MS9	=	$1.4 \times 10^{-8}$	MS22	<	$5 \times 10^{-10}$
MS10	=	$6.6 \times 10^{-8}$	MS23	<	$4.1 \times 10^{-10}$
MS11	<	$1.3 \times 10^{-10}$	MS24	<	$1.1 \times 10^{-10}$
MS12	<	$4.6 \times 10^{-10}$	MS25	<	$5.2 \times 10^{-10}$
MS13	<	$9 \times 10^{-10}$	MS26	<	$4.7 \times 10^{-10}$

- 1.- El marcador que confiere la resistencia a tetraciclina de la cepa ZJ1 y la auxotrofia a histidina ( $his^- G:: Tn10\Delta 4\Delta 11$ ) a la cepa protrótofa ZJ2 aislando las colonias tetraciclina resistentes.
- 2.- El caracter  $His^+$  de la cepa ZJ2 a la ZJ1 seleccionando las colonias protrótofas (medio mínimo)

Los resultados de estas transducciones están ilustrados en la tabla 6.

Encontramos que la mejor eficiencia de transducción la tenemos con multiplicidades que van de .5 a 1.

A partir de la tabla no. 6 se puede concluir:

- 1) Que además de la transducción generalizada tenemos -- mini-Muducción, pues en la transducción No. 1 tenemos 7 transductantes resistentes a Tc que conservan el fenotipo  $His^+$  (carácter de la receptora) que además son lisógenas para el fago Mu18A1 (el fago Mu18A1 confiere la resistencia a ampicilina). Esto sugiere que el marcador his  $G:: Tn10\Delta 4\Delta 11$  no se integró por homología nucleotídica.
- 2) La frecuencia de transducción con este sistema en -- *Salmonella thypi* es bastante elevada ( $9 \times 10^{-6}$ ), lo que indica que tenemos una buena probabilidad de poder transducir cualquier marcador de *S. typhi*.

b) Transducción en *S. typhi*. La cepa JM1382 ("Mu<sup>r</sup>") como donadora y receptora.

Otro aspecto interesante era ver si la cepa JM1382 podría ser donadora y receptora en una transducción mediada por Mu ya que como se mencionó antes esta cepa es sensible a Mu.

1) JM1382 como donadora. Se hizo una transducción de la cepa JM1382 (MuctspAp1) /F lac pro (Mu18A1) a la cepa MS22 que es una auxótrofa de uracilio inducida por Mu seleccionando las Ura<sup>+</sup> (medio mínimo)

Los resultados de esta transducción se muestran en la tabla No. 7: ahí se puede ver que un porcentaje de los transductantes ya no tienen el fago lo que sugiere que la mutación estaba inducida por Mu. Aparte se encontró que la frecuencia de la transducción en la cepa JM1382 es muy parecida a la frecuencia de transducción de la cepa ZJ2 ( $1 \times 10^{-5}$ ).

2) JM1382 como receptora. Se transdujo el marcador que confiere resistencia a tetraciclina de la cepa ZJ1 a la cepa JM1382. En esta transducción encontramos muy pocas transductantes debido probablemente a la poca homología nucleotídica entre el marcador his G:: - -

Tabla 6

Transducción en *S. typhi*.

	CEPAS RECEPTORAS	
	1 ZJ2	2 ZJ1
CEPAS Donadoras	ZJ1 (Mucts62) /F lac pro (Mu18A1)	ZJ2 (Mucts62) /F lac pro (Mu18A1)
Multiplicidad*	0,5	0,5
Selección	Tc <sup>r</sup>	his <sup>+</sup>
N° transductantes /0.1ml	135	132
N° Lisógenas (Mucts62)	11/50	18/20
N° Lisógenas (Mu18A1) Ap <sup>r</sup>	13/50	ND
Cotransducción	43/50 his <sup>-</sup>	_____
mini-Muducción	7/50 Tc <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> his <sup>+</sup>	_____
Frecuencia Transducción°	9 x 10 <sup>-6</sup>	8.5 x 10 <sup>-6</sup>

\*Número de partículas formadoras de placas de lisis/número de bacterias

°Número de transductantes/1 partícula formadora de lisis.

Tn10Δ4Δ11 de la cepa ZJ1 y el gene his G de la cepa -- JM1382 ya que el primero proviene de *S. typhimurium* -- (ver figura 3). Por ésto aislamos una cepa de *S. typhi* que fuera resistente a Mu y que tuviera el gene silvestre his G de *S. typhimurium* (cepa ZJ11) de la manera como se aisló la cepa ZJ2 solo que la cepa ZJ11 es "resistente" a Mu.

Utilizando la cepa ZJ11 como receptora se transdujo el marcador  $Tc^R$  de la cepa ZJ1. Se seleccionaron las - transductantes en medio Luria Tc y las mini-Muductantes en medio Luria Tc Amp. ver tabla 8.

Observamos que la frecuencia de mini-muducción es 7.1 veces menor en la cepa ZJ11 con respecto a la cepa ZJ2, dato que podemos relacionar con lo observado en -- cuanto a la frecuencia de lisogenización de esta cepa, observamos tambien que la frecuencia de transducción generalizada en 7 veces menor en la cepa ZJ11 con respecto a la cepa ZJ2.

c) Transducción interespecífica. *S. typhi* —————→ *E. coli*

Para demostrar que este sistema permite transferencia interespecífica utilizando *S. typhi* como donadora se hizo la transducción del marcador que da la resistencia

Tabla 7

Cepa JM1382 ( $\text{Mu}^{\text{r}}$ ) como donadora en una transducción mediada por Mu

Cepa receptora, MS22 ( $\text{ura}^-$ inducida por MuctspAp1)	
Cepa donadora	JM1382 (MuctspAp1) /F <u>lac pro</u> (Mu18A1)
Multiplicidad	0.5
Selección	Ura <sup>+</sup>
Nº transductantes /.1 ml	100
Nº Lisógenas	7/20
Nº Ap <sup>r</sup>	3/20
Frecuencia Transducción	$1 \times 10^{-5}$

Tabla 8

Cepa ZJ11 ( $\text{Mu}^{\text{r}}$ ) como receptora en una transducción mediada por Mu

	ZJ11	ZJ2
Frecuencia mini-Muducción	$1.6 \times 10^{-7}$	$1.4 \times 10^{-6}$
Frecuencia transducción generalizada	$1.1 \times 10^{-6}$	$7.8 \times 10^{-6}$

a tetraciclina de la cepa de *S. typhi* ZJ1 a la cepa de *E. coli* C600 (ver tabla 9).

Como se puede observar la mayoría de las transductantes son mini-Muductantes (90 de 100 colonias son tetraciclina y ampicilina resistentes). El hecho de tener un porcentaje de mini-Muductantes más elevado que de -- transductantes es explicable ya que *S. typhi* y *E. coli* tienen probablemente poca homología nucleotídica.

Tabla 9

Transducción interespecifica  
Cepa receptora (*E. coli*)

	C600
Cepa donadora ( <i>S. Typhi</i> )	ZJ1 (Muets62) /F <u>lac pro</u> (Mu18A1)
Multiplicidad	.5
Selección	Tc <sup>r</sup>
N° transductantes /.1 ml	10
N° Lisógenas (Muets62)	0/100
N° Lisógenas (Mu18A1) Ap <sup>r</sup>	97/100
Mini-Muducción	90/100 Tc <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> his <sup>+</sup>
Frecuencia Transducción	3.3 x 10 <sup>-7</sup>

## DISCUSION

En este trabajo reportamos el aislamiento de cepas de *S. typhi* sensibles al bacteriófago Mu al transferirles un alelo de *S. typhimurium* (musA1) que confiere la sensibilidad al fago (32). Esto significa que la resistencia al bacteriofago Mu de *S. typhi* se debe al mismo mecanismo que opera en *S. typhimurium*, además de que ofrece una manera para aislar cepas sensibles en otras especies bacterianas que esten relacionadas a *S. typhimurium*.

La sensibilidad o resistencia a fagos generalmente se relaciona a la adsorción de los fagos, y esta adsorción depende de la estructura de la pared celular. En este trabajo mostramos que la resistencia de *S. typhi* al bacteriofago Mu no se debe a la estructura de la pared celular ya que la cepa resistente y la sensible siguen siendo sensibles a los mismos fagos y adsorben la misma cantidad de partículas Mu, además la cepa sensible y la resistente -- producen la misma cantidad de fagos a la inducción. La única diferencia observada entre estas cepas es la frecuencia de lisogenización que es 5 a 10 veces menor en la cepa resistente, esta diferencia no se debe a que en esta cepa

el mecanismo de integración de Mu al genoma de *S. typhi* este alterado ya que cuando se transduce algún marcador - por Mu en esta cepa, la frecuencia de transducción es también 5 a 10 veces menor y el mecanismo de integración del DNA transductante es diferente a la integración de Mu (el primero sí requiere el sistema de recombinación del huésped). Esto sugiere que la frecuencia de liso-genisación baja se debe a que algún mecanismo involucrado en la entrada del DNA infectante está alterado en las cepas "resistentes". Por otra parte mostramos también que la cepa "resistente" JM1382 se puede manipular genéticamente con Mu, estos datos plantean la reconsideración de la resistencia a Mu de otras especies bacterianas donde es atractivo utilizar este fago, para esto planteamos el utilizar como -- criterio de sensibilidad a Mu el aislamiento de cepas lisógenas al fago utilizando un fago que confiere la resistencia a ampicilina (MucstspApl)

Por otra parte también mostramos que el comportamiento de Mu en *S. typhi* con respecto a su frecuencia de liso-genisación, inducción de auxotroffias, integración por todo el cromosoma bacteriano y de la frecuencia de reversión -- de mutaciones inducidas por Mu es similar al comportamiento de Mu en *E. coli*.

Por último se montó la transducción mediada por Mu - en *S. typhi* utilizando el sistema Mu/miniMu (21), este -- sistema ofrece la posibilidad de aislar cualquier marca-- dor génico de *S. typhi* complementando mutaciones de *E.coli* por miniMuducción, entre los genes atractivos para su ais-- lamiento se encuentran los relacionados con la patogenicidad de *S. typhi* lo que abriría la posibilidad de un análisis molecular de este fenómeno.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- De la Loza A y Moreno, M. L. (1975) Salud Publ. Mex. 17: 181.
- 2.- Verduzco, E. Calderón, C. Velázquez E. (1974) Salud Pub. Mex. Epoca V 16 (1):9.
- 3.- Calderón, E., Gilman, R.H., Snyder, M.J., Vázquez, V., Gómez, D., Iegorreta, J. Rodríguez, R., Martínez, E., Hornick, R. y Woodward, T.L., (1974) Rev.Latin. Amer. Microb. 16: 131.
- 4.- Gangorosa, E. J. Bennet, J.V. Wyatt, C. Pierce, P.E., Ovarte, J., Mendoza, P. Vázquez, V. y Bessudo, D. - (1972) J. Inf. Dis. 126: 215.
- 5.- Olarte, J. y Galindo E. (1973) Antimicrob. Ag. Chem. Nemoth 4: 597.
- 6.- Bessudo, D., Olarte, J., Mendoza, P., Galindo E, - - Carrillo, J., Gutierrez, G. y Kumate, J. (1973) Biol. OF Sanit. Panam. 74: 1.
- 7.- Varela, G. Mendoza P. y Vázquez, V. (1956) Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop. 16: 23.
- 8.- Alfaro, G. y Martuscelli, J., en Temas Bioquímicos de actualidad, Eds. Pina, E., Peña., A., Chagoya de -

- Sánchez, V. y Martuscellu, J. (1978) UNAM pag: 281.
- 9.- Gloria Soberón (1980) Tesis prof. UNAM.
- 10.- González A., Gama, M.J. y Martuscelli, J. XII Congreso Nacional de Microbiología Merida Yuc. (1981)
- 11.- Martuscelli, J.L. Taylor, A.L., Cummings, D.J., - -  
Chapran, V.A., De Long, S.S., and Cañedo, L. (1971)  
J. Virol 8 :551
- 12.- Taylor, A.L. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50:  
1043
- 13.- Hsu, M-T., and Davidson, N. (1974) Vir. 58: 229
- 14.- Allert, B. (1979). Cell 16:123
- 15.- Kahnann, R., and Kamp, D. (1979) Nature (London)  
280: 247
- 16.- Allet, B. and Bukhari, A.I. (1975) J. Mol. Biol.  
92: 529
- 17.- Bukhari, A.I., Froshauer, S., Botchan, M. (1976)  
Nature 264: 580
- 18.-Howe, M. (1973) Vir. 54: 93
- 19.- Howe, M., Bade, E. (1975) Science 190: 624
- 20.-Faelen, M., Resibois, A., Toussant, A. (1978)  
Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 43: 1169
- 21.-Faelen, M., et al (1979) Mol. Gen. 176: 191
- 22.- Bukhari, A.I., Taylor, A.L. (1975) Proc.Nat. Acad.  
Sci. 72: 4399.

- 23.- Lefebvre, N., Toussaint, A. (1981) *Mol. Gen.* 181: 268
- 24.- Faelen, M. (1976) *J. Mol. Biol.* 104: 525
- 25.- Roesner, J.L. (1972) *Vir.* 48: 679
- 26.- Van de Putte, P., Crame, S., Giphant-Gassler, M. (1980) *Nature* 286: 218
- 27.- Faelen M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeny, M., Braipsothiny, J., and Thiny, G. (1981) *Arch. Internat. Physiol. Bioch.* 89: B55
- 28.- Kamp, D., Kahmann, R. (1980) *Cold Spring Harbor Sym Quant. Biol.* 45: 329
- 29.- Murooka, Y., Tazikawa, N. and Harada, T. (1981) *J. Bacteriol* 145: 358
- 30.- Okada, M., and Watanabe, T. (1968) *Nature (London)* 218: 185
- 31.- Bachhuber, M., Brill, J.W., Howe, M. (1976) *J. Bacteriol.* 128: 749
- 32.- Faelen, M., Mergeay, M., Geritz, J., Tossaint, A., Lefebvre, N. (1981) *J. Bacteriol.* 146: 914
- 33.- Leach, et al (1979) *Mol. Gen. Gen.* 172: 179
- 34.- Toussaint, A. (1976) *Vir.* 70: 17
- 35.- Razzaki, T., Bukhari, A. I. (1975) 122: 437
- 36.- Bukhari, I.A., Taylor, A.L. (1971) *J. Bacteriol* 105: 844.

37.- Anderson, E.S. and Williams, R.E.O. (1956) J. Clin. Patl. 9: 94.

38.- Appleyard. et al (1954) Genetics 39: 429.