



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
BACTERIOFAGOS DE Escherichia coli
INDUCTORES DE CITOTOXINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A ;
BEATRIZ LETICIA DAVILA SOLIS



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 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.

A mis Padres:

Sra. Ines Solis de Dávila y

Sr. Luis Dávila Elizalde.

Como un modesto testimonio de

gratitud y cariño.

A mi Hermano:

Luis Dávila Solis.

Que con su ejemplo y apoyo

me ha sabido orientar por

el sendero del esfuerzo y

de la responsabilidad.

A mi Cuñada:

Lourdes Villarreal.

Por su compañía y

comprensión.

A mi asesor:

Dra. Carmen Soler Claudín.

Mi más sincero reconocimiento y admiración, por su valiosa dirección, paciencia y amistad que tú vo connigo a lo largo de este -- trabajo.

Al doctor:

Gerardo Kono Yaico.

Quien me brindó en todo momento sus profundos conocimientos y su entusiasmo sincero.

A la maestra Q.F.B:

Maria del Carmen Basualdo S.

Por la comprensión, y estímu lo que en ella encontré para alcanzar esta meta.

I N D I C E

		Pág.
Capítulo I	I NTRODUCCION	1
Capítulo II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	30
Capítulo III	MATERIALES Y METODOS	32
Capítulo IV	RESULTADOS	43
Capítulo V	DISCUSION Y CONCLUSIONES	60
	APENDICE	63
	BIBLI OGRAFIA	69

CAPITULO I
INTRODUCCION

A.-) DATOS HISTORICOS.

Escherichia coli es el gérmen facultativo más común que se encuentra en el tubo digestivo del hombre y de los animales, fué descubierto por Escherich en 1886 durante sus investigaciones sobre la composición de la flora bacteriana normal del niño recién nacido (1,4).

Las cepas de E.coli incluyen un gran número de serotipos. Algunos de estos serotipos son miembros de la flora intestinal normal del hombre y otros son causantes de infecciones e intoxicaciones tanto en el hombre como en los animales (2).

Los serotipos de E.coli causantes de patología intestinal en el hombre se han dividido en cuatro grupos:

- 1.- E.coli enterotoxigénica (ETEC)
- 2.- E.coli enteroinvasiva (EIEC)
- 3.- E.coli enteropatogénica (EPEC)
- 4.- E.coli asociada a colitis hemorrágica (2).

La designación de Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es dada a los bioserotipos de E.coli dotados de la capacidad de producir las enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST) (3).

Además las cepas ETEC pueden producir estructuras superficiales fimbriadas o fibrilares denominadas factores de colonización, cuya función es promover la fijación de la bacteria a la mucosa

intestinal (4,5).

Las ETEC causan diarrea en humanos (niños y adultos), y en varias especies animales como cerdos, bovinos y ovinos.

Inicialmente las ETEC se fijan al epitelio intestinal por medio de su factor de colonización para enseguida proliferar y producir su o sus toxinas, siendo la adherencia a la mucosa un prerequisite para que ocurra colonización (6).

Los bioserotipos de ETEC varían de una región geográfica a otra (7,8). En los países en desarrollo, estas bacterias han sido encontradas en un porcentaje relativamente elevado en niños con diarrea aguda endémica (9,10). La frecuencia de diarrea endémica en adultos no ha sido investigada sistemáticamente, más los datos existentes sugieren que puede ser bastante elevada (9).

La denominación Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) es dada a ciertos colibacilos que invaden la mucosa intestinal humana ocasionando diarrea semejante a la causada por Shigella (11) y que son capaces de provocar querato-conjuntivitis en el cobayo (prueba de Sereny). La infección causada por los colibacilos invasores se localiza en el íleo terminal del intestino grueso. La bacteria penetra a la célula epitelial y prolifera en su interior destruyéndola. El paciente puede presentar desde una diarrea leve a un síndrome disentérico grave. Aparentemente la infección se limita a la mucosa intestinal (12).

Hasta el momento poco se conoce sobre los factores que determinan la invasividad de estas bacterias. Datos recientes sugieren

que la capacidad invasora es mediada por genes cromosómicos y por genes localizados en un plásmido semejantes a los descritos en las cepas de Shigella (13,14).

La primera ETEC fué aislada de macacos con diarrea (15). Ha sido demostrado que las infecciones por estos microorganismos pueden ser transmitidas por alimentos, agua o probablemente por contacto directo (15).

Otros estudios han demostrado que los colibacilos invasores son más frecuentemente encontrados en niños mayores y en adultos (16). También se ha observado que algunos bioserotipos son más comunes en ciertas areas geográficas (17).

El término Escherichia coli enteropatógena (EPEC) ha sido utilizado para designar ciertos serotipos de E.coli asociados a diarrea infantil, que no producen las enterotoxinas LT y ST y tampoco tienen la capacidad de invadir la mucosa intestinal. Fue hasta 1940 que se estableció que estos gérmenes eran capaces de causar diarrea en niños, específicamente en el primer año de vida (18).

Las primeras evidencias de que las EPEC causaban diarrea tuvieron por base estudios epidemiológicos en los cuales fué demostrada la asociación entre ciertos serotipos y casos de diarrea, tanto epidémica como esporádica (4). Recientemente, surgieron dudas sobre la patogenicidad de este grupo de bacterias (19), sin embargo la enteropatógenidad de varios serotipos fue confirmada por estudios experimentales en niños y en adultos voluntarios (20)

Se considera, en general, que las EPEC son causantes de diarrea en niños menores de un año. Sin embargo se han registrado casos epidémicos de diarrea causados por EPEC en personas hospitalizadas y en adultos normales que ingieren alimentos contaminados (21).

Fue verificado recientemente que las EPEC pueden colonizar el intestino grueso (22). Es necesario realizar más estudios para dilucidar si la diarrea afecta solamente el intestino delgado o también el grueso.

La producción de toxinas por algunas cepas enteropatógenas ha sido demostrada por el efecto de los sobrenadantes de cultivos bacterianos en cultivos de tejidos (24) y en intestinos de animales (25). En cultivos de tejidos, el efecto es de tipo citotóxico, produciendo muerte celular.

En 1983, Riley y colaboradores (26) publicaron los resultados de sus estudios sobre dos casos de colitis hemorrágica que afectaron por lo menos a cuarenta y siete personas en Oregon y Michigan en Estados Unidos los meses de Mayo y Junio de 1982. Las principales características de esta colitis hemorrágica fueron cólicos abdominales, severas diarreas acuosas, deposiciones sanguinolentas y fiebre discreta o ausencia de ella. Las investigaciones epidemiológicas revelan que los dos casos estaban relacionados con la ingestión de hamburguesas adquiridas en una misma cadena de restaurantes.

Un estudio bacteriológico de las heces, realizado durante los cuatro días siguientes al inicio del cuadro clínico, mostró que

nueve de doce pacientes eran portadores de un serotipo raro de E.coli 0157:H7 el cual fue también responsable de un caso de colitis hemorrágica, descrito por Lior y Gill (27) en Canada. La E.coli 0157:H7 aislada parece provenir también de la ingestión de una hamburguesa contaminada.

Hasta el momento, no son claros los factores de virulencia de E.coli 0157:H7, responsables de las manifestaciones de colitis hemorrágica, sin embargo se sabe, en concreto, que la mayoría de las cepas de esta bacteria producen una citotoxina llamada verotoxina la cual fué descrita por Konowalchuck y colaboradores en 1977, ellos reportan la presencia de una toxina en las cepas de E.coli, diferente a las conocidas, ST y LT que causan efecto citopático en cultivos de células Vero (23,28).

La posibilidad de que exista otra toxina diferente a ST y LT que este involucrada con la patogenicidad de E.coli 0157:H7 también es sugerida por Johnson y colaboradores en 1983 (30).

Karmali y colaboradores, estudiando pacientes con síndrome urémico hemolítico (29) demostraron que las cepas involucradas producen actividad citotóxica en células Vero. Posteriormente O'Brien y colaboradores reportan que esta citotoxina puede ser neutralizada por antisuero preparado frente a toxina Shiga purificada (55).

O'Brien y colaboradores en 1983 purifican la toxina de E.coli 933(0157:H7) la cual muestra una actividad biológica similar a la toxina de Shigella dysenteriae tipo 1 (Shiga) ambas toxinas son

tóxicas para líneas celulares in vitro, ocasionan parálisis y muerte en ratón, y son enterotóxicas en segmentos ileales de conejos (31). Ellos lograron la purificación utilizando algunos procedimientos previamente reportados para la toxina purificada de la cepa E.coli 026 (H30) (30,31,32).

La producción de elevados niveles de citotoxina en algunas cepas de E.coli es actualmente asociada con un bacteriófago temperado (31).

E.coli H19 fue la causante de una epidemia de diarrea infantil en la Gran Bretaña, no es invasiva y no produce enterotoxinas ST y LT (32), pero produce grandes cantidades de citotoxina parecida a la toxina de Shigella dysenteriae 1(Shiga-like) (23,33).

Scotland y colaboradores en 1983 describen la presencia de una toxina codificada por un bacteriofago en la cepa H19 de E.coli (Serogrupo 026). Además observaron que al cultivar esta cepa conjuntamente con una cepa de E.coli K-12, se transfiere la toxigenicidad (33).

Trabajando con esta misma cepa Smith y colaboradores aislaron dos fagos diferentes que codifican para la producción de citotoxina (fago H19A y fago H19B), que son liberados espontáneamente por la E.coli H19. También aislaron otros fagos que codifican para la producción de citotoxina en otras cepas de E.coli (34).

O'Brien y colaboradores en 1984 reportan que la cepa 0157:H7 (933) de E.coli; es causante de diarrea hemorrágica y produce grandes cantidades de toxina tipo-Shiga, también encontraron que

alberga dos fagos diferentes designados 933J y 933W,(36).

En este mismo trabajo presentan su morfología, bioquímica y evidencias genéticas de que el fago 933J de la cepa 933 esta íntimamente relacionado con el fago H19A, lo que parece indicar que existen en la naturaleza una familia de toxinas codificadas por bacteriofagos en cepas de E.coli (36). La citotoxina producida en grandes cantidades por E.coli K-12 lisogenizadas con el fago 933J es neutralizada por el antisuero contra toxina Shiga (36).

Newland y colaboradores en 1985 clonaron el DNA del fago 933J que codifica para los genes estructurales de esta toxina encontrando que existe una homología con el DNA de Shigella dysenteriae tipo 1 y Shigella flexneri (37).

Strockbine y colaboradores en 1986 demostraron que la citotoxina producida por E.coli K-12 (933W) no es neutralizada por anti -- toxina Shiga. Además al determinar la homología de los genes estructurales de 933J y 933W y la especificidad antigénica de ambas toxinas, encontraron que estas citotoxinas codificadas por los fagos 933J y 933W estan genéticamente relacionadas pero son antigénicamente distintas con una actividad biológica similar; proponen para estas citotoxinas los nombres de Shiga-like I y Shiga-like II; asociandolas con síndrome diarreico, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (38).

B.-) GENERALIDADES DE BACTERIOFAGOS.

Los virus, han sido descritos con toda propiedad como estructuras situadas en el "umbral de la vida", son partículas compuestas principalmente por ácido nucleico y cierto número de subunidades de proteínas específicas (39). Los virus pueden agruparse dentro de tres principales clases de acuerdo a la naturaleza de sus hospederos:

Clase I.- Virus de Animales.

Clase II.-Virus de Plantas.

Clase III.-Virus de bacterias (40).

En esta sección dirigiremos toda nuestra atención a los virus bacterianos, también llamados bacteriófagos (41).

Los virus bacterianos fueron descubiertos durante la primera guerra mundial por el francés F.d'Herelle quién les dió el nombre de bacteriófagos (comedores de bacterias).

Delbruck se dió cuenta de que estos entes pequeñísimos que se multiplicaban dando origen a progenies idénticas, podrían ser utilizados como material experimental para estudiar el problema de la replicación de los genes y en 1938 inició los primeros experimentos con bacteriófagos. En 1940 se sabía ya que los fagos estaban constituidos exclusivamente por proteínas y DNA. Las primeras microfografías electrónicas obtenidas de ellos mostraban que consistían de una cabeza y una cola formadas de proteínas y que dentro de la primera se encontraba empacado el DNA (41,42,43,44,45).

En la actualidad el término bacteriófago es dado para los virus que se replican en cualquier bacteria y que son incapaces de multiplicarse en ausencia de un hospedero sensible (46).

Los colifagos son bacteriofagos cuyo único hospedero es Escherichia coli (54). La complejidad de los bacteriofagos varía gradualmente, en proporción al tamaño de sus genomas (39)Tabla # 1. La cabeza de el fago puede presentar tanto DNA como RNA capaz de replicarse unicamente en presencia de una bacteria hospedera. Las proteínas de la cubierta actúan más o menos como un vehículo pasivo de transporte de el material genético del virus (47).

Los bacteriófagos fueron clasificados de acuerdo con la forma de interaccionar con la bacteria huésped y de esta manera se dividen en dos grandes grupos:

- a.-)Bacteriófagos virulentos.
- b.-)Bacteriófagos temperados (54).

Los bacteriófagos virulentos se caracterizan porque invariablemente lisan a la bacteria que infectan y no existe otra alternativa que seguir lo que se ha denominado como ciclo lítico o vegetativo, por lo cual también se le conoce como fagos líticos (Figura # 1).

A diferencia de estos; los bacteriófagos temperados tienen dos alternativas a seguir: a) Siguen el ciclo lítico a semejanza de los bacteriófagos virulentos ó b) Se establece una asociación "semipermanente" entre el cromosoma de el fago y el hospedero, de modo que siempre, que se replica el cromosoma bacteriano se repli

Tabla Nº 1

Composicion de Algunos Virus

Bacteriofagos de E.Coli.	Peso del Virus (Megadaltones)	Acido Nucleico	Nº de Cadenas	% de A.N.	Forma	Dimensión Longitudinal en nm.
T ₂ , T ₄ , T ₆	220	DNA	2	61	Renacuajo	18
T ₇	38	DNA	2	41	Renacuajo	6
φ X-174	6	DNA	1 ó 2	26	Politédrico	15
λ	50	DNA	2	64	Renacuajo	20
MS2	36	RNA	1	32	Politédrico	175

tomado de Lehningeer
Bioquímica

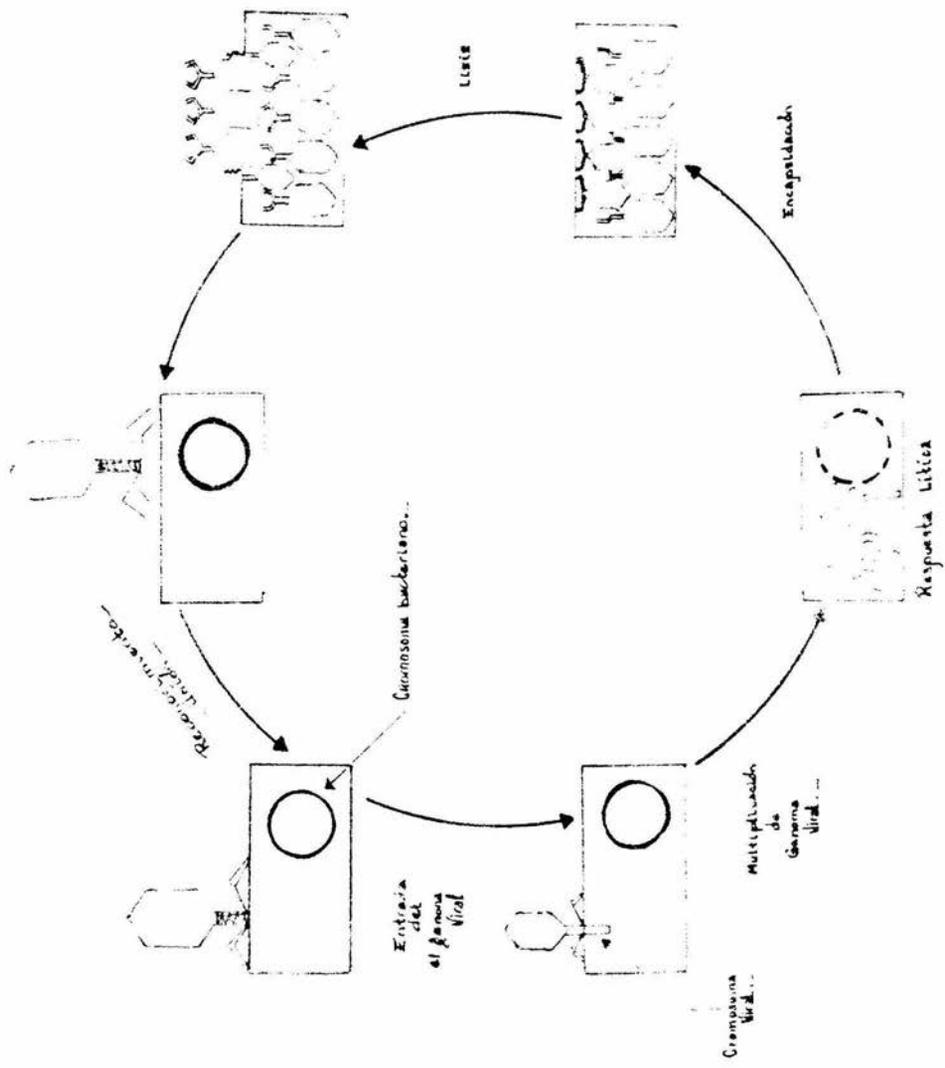


Figura # 1. Ciclo lítico: Primero se produce el reconocimiento entre el fago y la bacteria susceptible, el ácido nucleico viral es inyectado al interior de la bacteria, donde puede multiplicarse, y al producirse proteínas virales por la expresión de los genes del fago se integran nuevas partículas de virus que provocan la lisis de la célula huésped.

Tomado de Gene Function.

Robert. E . Glass.

ca también el cromosoma fágico, Al genoma del fago se le llama entonces "Profago" y permanece asociado al cromosoma bacteriano ó insertado a él (Figura # 2a y 2b), y a la bacteria se le conoce como bacteria lisogénica.

Las células lisogénicas difieren de las células sensibles en dos aspectos importantes:

- 1.- Son inmunes a la superinfección lítica por el mismo bacteriófago o por otros que estén íntimamente relacionados con él.
- 2.- Las bacterias lisogénicas liberan fagos al medio en forma espontánea; característica que es heredable(44).

Los virus bacterianos pueden ser incluidos en grupos pequeños de acuerdo a sus características morfológicas, la naturaleza y tamaño del material genético y la dependencia sobre el hospedero (48,49,50,51).

a.-) MORFOLOGIA: Los bacteriófagos pueden presentar una cápside con estructura icosaédrica, aparentemente poliédrica, tienen tamaño variado, hay fagos con DNA largo que tienen una cola larga y angosta la cual puede ser o no contractil, existen otros que tienen cola corta presentando un DNA circular o una cadena de RNA lineal, los hay con DNA pequeño con cola parecida a perno, también los hay filamentosos que contienen RNA dando la apariencia de no tener cabeza, pueden existir modificaciones en

FIGURA # 2a.

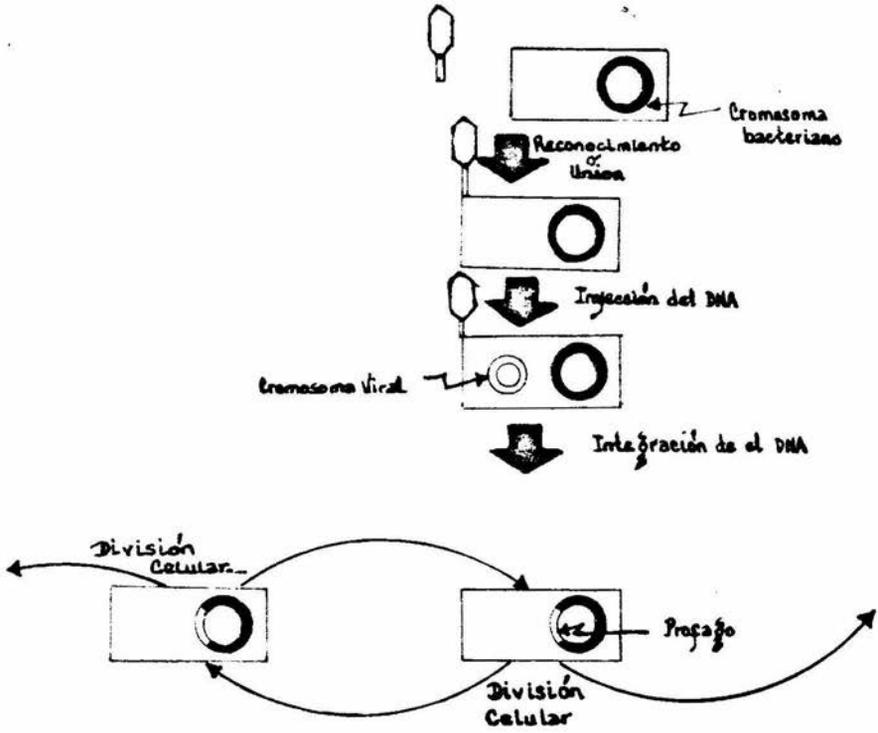


Figura # 2a. Ciclo lisogénico: Los primeros pasos son similares a los del ciclo lítico, diferenciándose en que el genóma viral en lugar de multiplicarse independientemente se integra al cromosoma bacteriano perpetuándose así con la división celular.

Tomado de Gene Function.

Robert. E . Glass.

FIGURA # 21

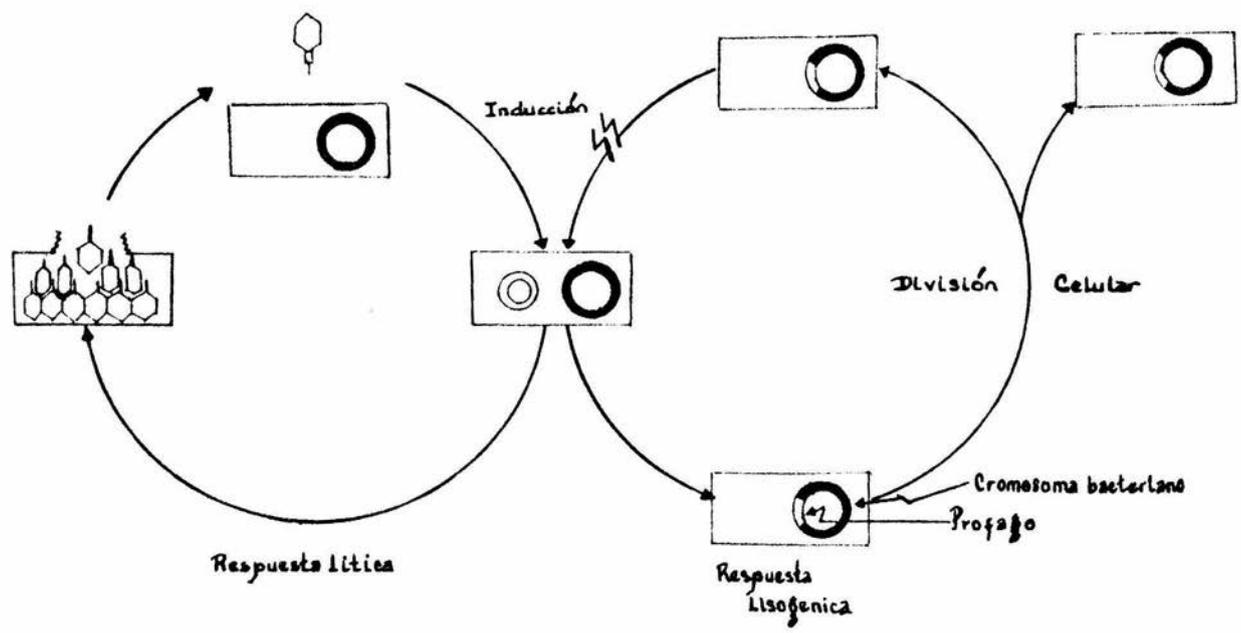


Figura # 2b. Ciclo de vida de un bacteriófago temperado:
Los fagos temperados al infectar una bacteria generalmente establecen lisogenia, pero pueden entrar a fases de ciclo lítico a través de un mecanismo de inducción que permite la multiplicación del genoma viral.

Tomado de Gene Function.

Robert. E. Glass.

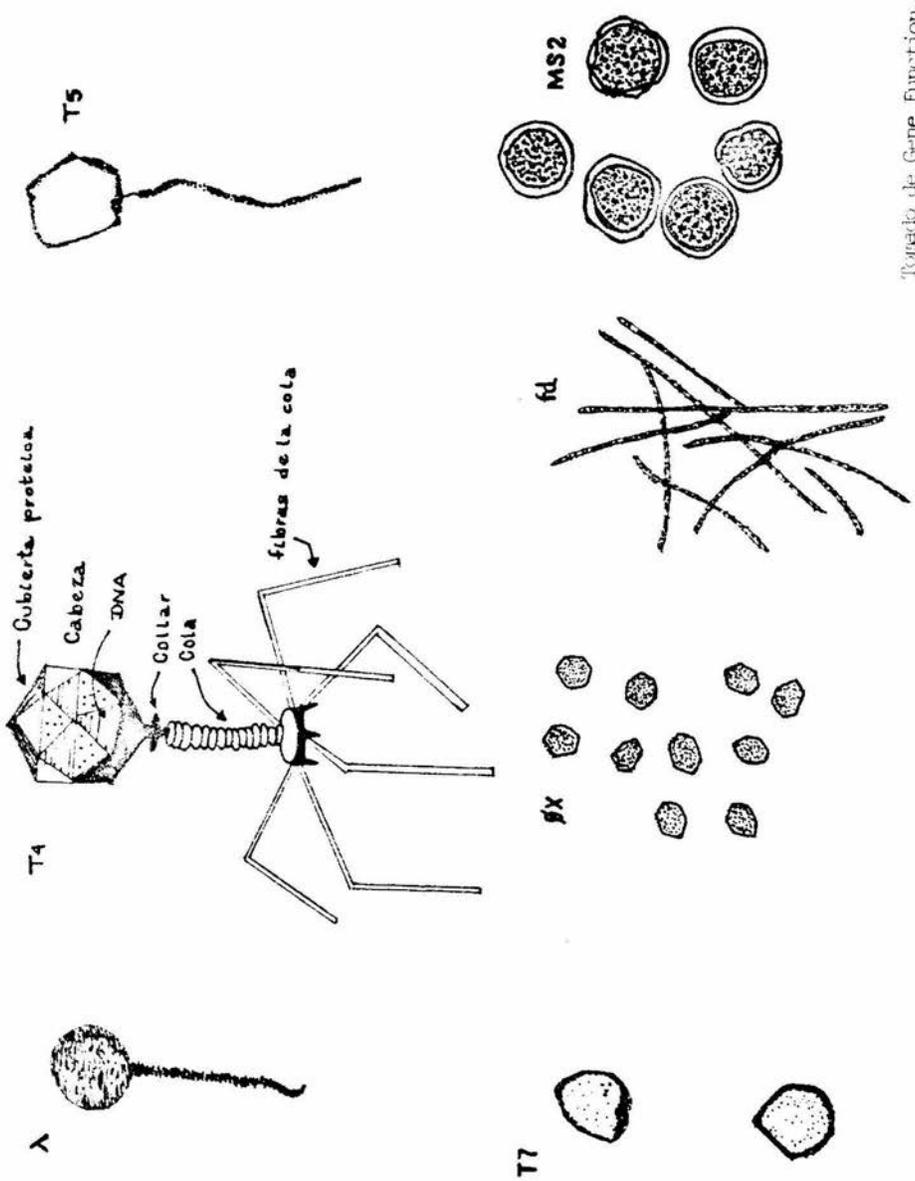
las fibras de la cola (fibras apendices proteínicos) importantes para determinar el rango del hospedero.

Como se puede observar en la tabla # 1 y Figura # 3 los virus varían considerablemente en forma, tamaño y composición química.

b.-) EL GENOMA VIRAL: Los bacteriófagos presentan diferencias en cuanto al tipo de ácido nucleico (DNA ó RNA) que contienen y el tamaño del mismo; pero hay correlación entre el tamaño del genoma y el grupo al que pertenecen; por ejemplo los siete fagos virulentos conocidos como la serie T (T_1 - T_7) ; se agrupan de la siguiente manera

Los T pares (T_2 , T_4 y T_6), los cuales son muy similares tanto en sus propiedades serológicas como en su constitución genética y son caracterizados por dos aspectos importantes; 1.-) Su desarrollo intracelular es independiente de la integridad del cromosoma bacteriano y por lo cual han sido denominados como virulentos autónomos y 2.-) El DNA contiene 5 hidroximetil-citosina en lugar de citosina. El fago T_5 se asemeja a los T pares en ser virulento autónomo, pero retiene citosina en su DNA.

Los bacteriófagos T_1 , T_3 y T_7 , por otro lado no están relacionados ni serológica ni genéticamente a los T pares, contienen citosina en su DNA y demandan para su desarrollo que el cromosoma de la bacteria se encuentre



Torneo de Gene Function.
Robert, E. Glass.

FIGURA # 3

intacto, por lo que son denominados virulentos dependientes.

Existen grupos de fagos filamentosos con DNA circular, virus con RNA semiesférico (MS2, F2, R17), ambos grupos son semejantes con respecto al tamaño de el genoma del virus. Los hay también muy pequeños con DNA circular (46, 47, 51).

En la tabla #2 se muestran algunos fagos pertenecientes a los diferentes grupos anteriormente mencionados.

c.-) INFECCION VIRAL: La infección del fago ocurre en tres principales etapas:

- 1.-) Colisión.
- 2.-) Adsorción.
- 3.-) Inyección.

La primera etapa de infección es un choque al azar entre el fago y la bacteria que es lo que se llama colisión.

La adsorción ocurre normalmente en la superficie celular, existiendo especificidad de reconocimiento en cuanto a receptores del fago y la bacteria.

Los metales iónicos, particularmente los cationes divalentes, son requeridos para que el fago se sujete eficientemente, también existen los lipopolisacáridos implicados como sustancias receptoras (48). Cabe mencionar que la adsorción es irreversible.

Tabla N^o 2

ANATOMIA COMPARADA DE FAGOS

Fago	Clase	Ciclo Infeccioso	<u>Características de el Virus</u>			<u>Genoma Viral</u>		
			Cabeza morfológica	Cabeza Tamaño (nm)	Cola (nm)	Tamaño (Kb)	Forma	Terminación
λ	Lamboide	Temperado	Isométrica	60	135x15	48.6	Lineal	Cohesivo (12nucl)
P 1	—	Temperado	Isométrica	65	150x12	91.5	Lineal	Redonda;permutada
P 2	—	Temperado	Isométrica	60	135x10	33	Lineal	Cohesivo(19nucl)
μ	—	Temperado	Isométrica	54	100x18	38	Lineal	Secuencia de hospederos heterogeneos
T 4	T par	Virulento	Anisométrica	80x110	98x20	166	Lineal	Redonda;permutada
T 7	T impar ♀	Virulento	Isométrica	58	20x19	40	Lineal	Redonda (160bp)
ϕ X174	Isométrica	Virulento	Isométrica	25	—	5.4	Circular	—
M 13	Filamentosa ♂	Virulento	—	—	900x 9	6.4	Circular	—
MS-2	RNA fago ♂	Virulento	Isométrica	26	—	3.6	Lineal, RNA	—

En cuanto a la inyección del DNA, la cola del bacterio fago parece una jeringuilla hipodérmica provista de un resorte; posee una vaina contráctil que rodea a un conducto central por el cual el DNA es inyectado a la célula huésped (Figura # 4).

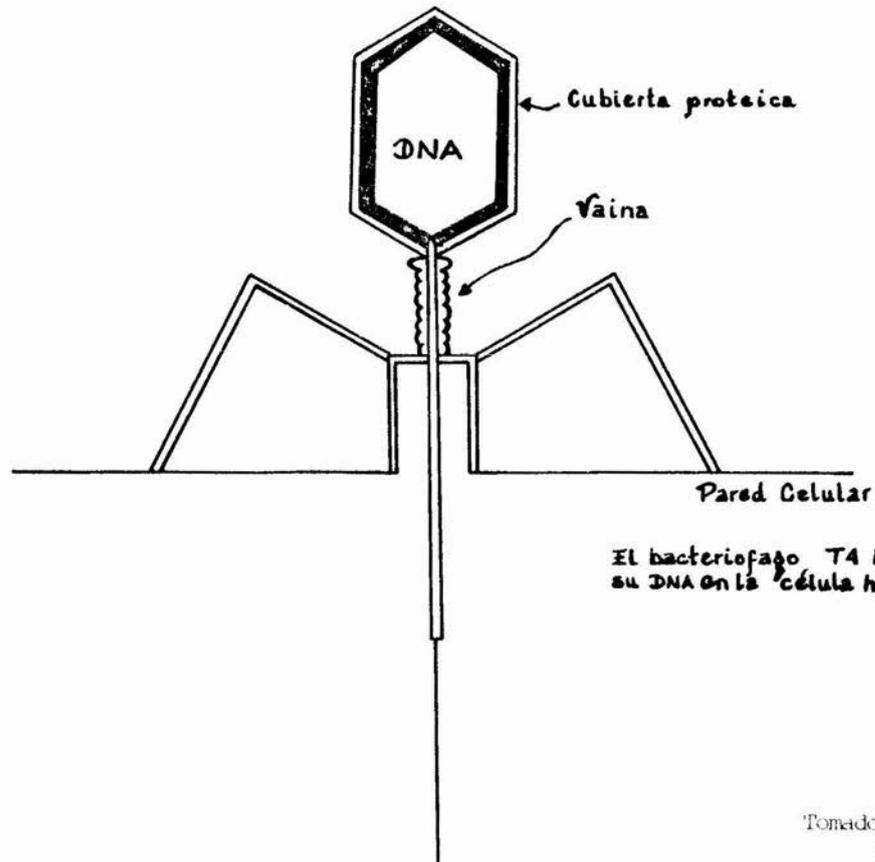
d.-) CINÉTICA DE PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE FAGOS:

En cuanto a la cinética de producción intracelular de fagos se puede observar que después de la adsorción del fago, existe un período de eclipse que abarca cerca de la mitad de la vida media de la bacteria infectada donde no ocurre la lisis y no existen partículas infectivas de fagos dentro de la célula.

Por lo tanto, el período de eclipse (perdida transitoria de la infectividad) es el tiempo requerido para que se lleve a cabo la síntesis de DNA ó RNA del fago (54).

Por otro lado, el período de latencia es el tiempo requerido desde la infección hasta la maduración de los fagos y su liberación de la bacteria infectada, esto por consiguiente incluye el período para que el fago produzca la endolisina necesaria para la lisis desde adentro de la bacteria (54). En la Figura #5 se pueden observar claramente las dos etapas mencionadas anteriormente.

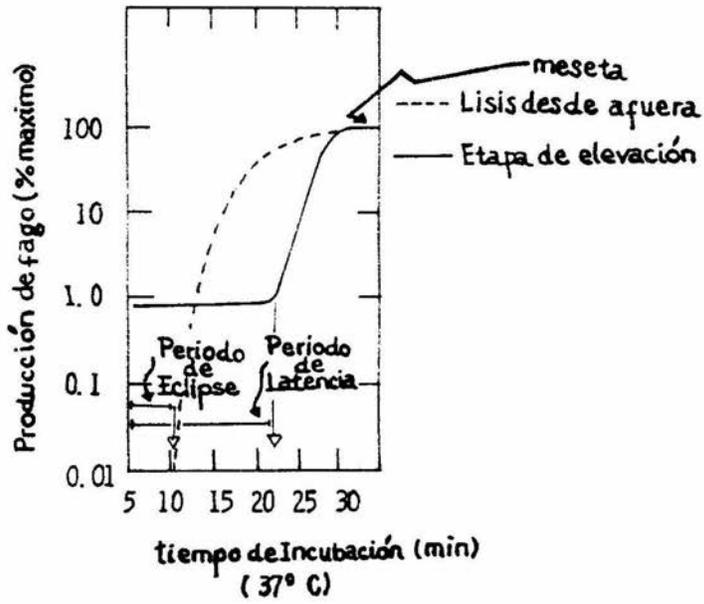
e.-) MORFOGENESIS: Se aplica el nombre de morfogénesis a un grupo de procesos por medio de los cuales los organis-



Tomado de Lehninger,
Bioquímica.

FIGURA # 4

FIGURA # 5.



Cinética Intracelular de el fago.

Figura #5. Cinética intracelular de un fago.

Para estudiar el comportamiento de un fago se realizan experimentos llamados de "un paso". Para ello, se infectan bacterias susceptibles con el fago en estudio, después de permitir la adsorción se eliminan, en general por dilución, el exceso de fagos que no hayan sido adsorbidos en ese "paso"; determinando entonces los tiempos en los cuales se producen fagos progenie.

La curva punteada marcada como lisis desde afuera, indica el número de partículas virales encontradas al tratar las bacterias con un agente como cloroformo (o sea inducir la lisis externamente); la línea continua es la determinación de fagos en el sobrenadante del cultivo.

Tomado de Gene Function.

Robert. E. Glass.

mos vivos crecen y se desarrollan en el espacio y en el tiempo, obedeciendo a una programación genética.

El proceso de morfogénesis del fago (maduración) es considerado un problema Físico-químico acerca del cual poco es conocido. Wood y Edgard (52) construyeron el mapa de los distintos genes del virus en la célula huésped de Escherichia coli.

La morfogénesis de bacteriófagos es un proceso altamente organizado en el cual tanto los genes bacterianos como de los fagos actúan secuencialmente y en puntos precisos en el camino para el ensamblaje. (48).

f.-) INTEGRACION DEL PROFAGO: En 1962, Allan Campbell propuso un elegante modelo para explicar la inserción del profago dentro del cromosoma bacteriano; o en forma más general, la inserción de los episomas dentro de los cromosomas. De acuerdo a este modelo, el profago se integra por un evento de recombinación recíproca que ocurre entre un sitio especial de adosamiento sobre el cromosoma circular del fago (att^f) y el sitio correspondiente sobre el cromosoma circular bacteriano (att^b); el resultado es que el DNA del fago se inserta dentro de la continuidad del cromosoma bacteriano, Figura #6; la escisión del profago puede presentarse como un proceso exactamente inverso. Una característica esencial de este modelo, es que el

AB . . . HIJ $\overline{\text{PP}'}$ NQI . . . QR

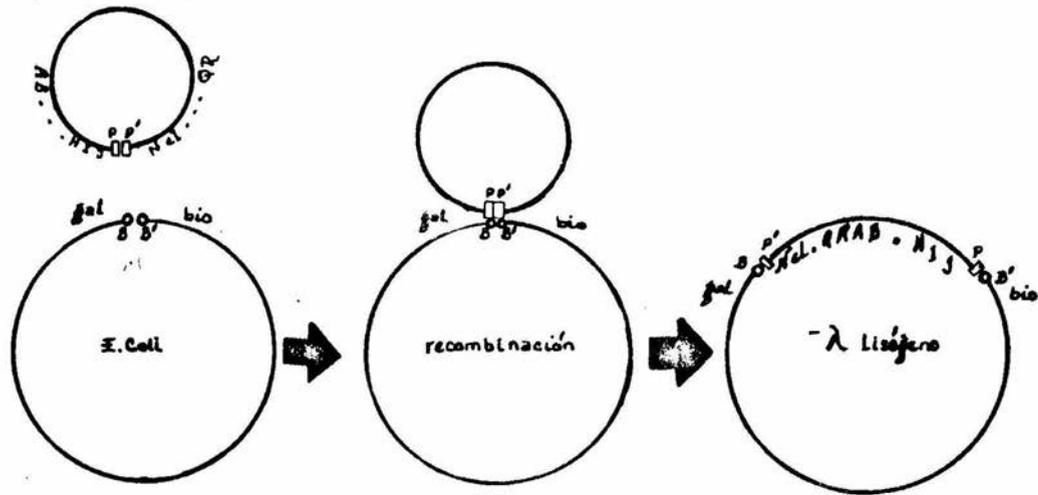


FIGURA # 6.

Figura # 6. Lisogenización; la integración de λ dentro del cromosoma de E. coli, al penetrar en la célula bacteriana, el cromosoma de λ se circulariza y y la integración tiene lugar como resultado de un solo entrecruzamiento entre sitios específicos de los cromosomas del fago y la bacteria (att^{ϕ} y att^{λ} , respectivamente). Cada uno de estos sitios parece ser una estructura doble, representada por P y P' en el cromosoma del fago y B y B' en el cromosoma bacteriano, y el evento de recombinación existente se presenta entre estos dos pares de sitios.

Notese que después de la integración el orden de los genes, a lo largo del profago, es diferente del orden en el fago vegetativo infectante y que la recombinación produce dos nuevos pares híbridos de sitios de adosamiento. La escisión del profago se lleva a cabo por el proceso inverso. Tomado de Smith- Kery.

Genética.

cromosoma del fago es circular en el momento de la integración. En 1962 se pensaba que el cromosoma era lineal, sin embargo, al año siguiente, en 1963, se encontró que el cromosoma tenía extremos cohesivos complementarios para formar una molécula circular de DNA.

Los puntos importantes que advertir son:

- 1.-) Para que los sitios att^{\dagger} y att^{\bullet} se apareen y pueda ocurrir entre ellos la recombinación debe haber reconocimiento entre sus secuencias de nucleótidos. Se ha observado que la integración siempre sucede entre estas regiones específicas de los cromosomas (53).
- 2.-) Debido a que att^{\dagger} no se localiza dentro de los extremos cohesivos, el orden de los genes a lo largo del profago integrado puede diferir del orden en el cromosoma lineal vegetativo. Los cromosomas profago y vegetativo son permutaciones cíclicas uno de cada otro.
- 3.-) El modelo de Campbell requiere que los cromosomas del fago y la bacteria sean colineales (53).

CAPITULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

A.-) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Smith y colaboradores (34) estudiando una cepa de E.coli 026(H19), causante de una epidemia de diarrea infantil en la Gran Bretaña, encontraron que dicha cepa era capaz de producir grandes cantidades de una citotoxina semejante a la toxina de Shigella dysenteriae (23,35). Esta citotoxina, que se ha llamado "semejante a Shiga" (Shiga-like), es producida en cantidades variables por distintas cepas de E.coli (36), y se encuentra codificada genéticamente, en la cepa H19, por bacteriófagos. Los autores mencionados aislaron dos fagos diferentes (H19A y H19B) de dicha cepa.

Posteriormente, O'Brien y colaboradores (32) han reportado que E.coli 0157:H7 cepa 933, causante de colitis hemorrágica, produce grandes cantidades de toxina Shiga-like, y tiene dos fagos inductores de toxinas. Estos investigadores describen la morfología, bioquímica y genética de uno de estos fagos, el 933J.

Los datos anteriores indican la posibilidad de que exista una familia de fagos inductores de toxina Shiga-like en cepas de E.coli presentes en la naturaleza.

Este estudio está orientado a probar si la citotoxina producida por una cepa de E.coli, aislada de un caso de diarrea infantil estudiado en México, es también codificada por fagos. Esta cepa de E.coli (P119) no pertenece a ninguno de los serogrupos considerados

enteropatógenos y es alta productora de citotoxina detectable en células Vero.

B.-) OBJETIVOS:

- 1.-) Aislamiento de el (los) bacteriófago (s) presentes en la cepa (P119) de E.coli.
- 2.-) Caracterizar el (los) bacteriófago (s) en cuanto a su morfología, su inmunidad lisogénica y su genoma; peso molecular de su DNA y patrones de restricción del mismo.

CAPITULO III

A.-) MATERIAL BIOLÓGICO;

1.- CEPAS BACTERIANAS:

Cepa tipo 0157:H7 Causante de colitis hemorrágica.

Cepa P119: Es una cepa aislada de un paciente con diarrea aguda en el Hospital Infantil de Mexico *Federico Gómez*.

Cepa CSH 57r-: Es una cepa tipo de E.coli ; sexo F⁻
Genotipo: ara, leu, lacY, purE, gal, trp, his, argG, malA,

strA, xyl, mtl, ilv, metA o B, thi.

Fenotipo: Ara⁻, Leu⁻, Lac⁻, Ade⁻, Gal⁻. Trp⁻, His⁻, Arg⁻, Mal⁻, Str, Xyl⁻,

Mtl⁻, Ile⁻, Met⁻, Ile⁻, Met⁻, B1⁻.

Cepa C600: es una cepa de E.coli K-12.

Genotipo: F⁻, thr⁻, leu⁻, thi⁻, lac⁻.

2.- CELULAS VERO:

La cual es una línea celular establecida obtenida de riñón de mono verde africano. Se utilizaron para realizar ensayos de citotoxicidad.

Todas las cepas y la línea celular fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas. (U.N.A.M.).

B.-) TÉCNICAS DE AISLAMIENTO:

El aislamiento de fagos de la cepa P119 se realizó por los dos métodos siguientes:

1.-) Cultivo mixto con E.coli K-12.

2.-) Inducción por luz ultravioleta.

1.-) Cultivo mixto:

a) En tubos de 16 X 150 mm con 5.0 ml de medio Luria-CaCl₂ a una concentración final de 0.001M, se inoculó la cepa donadora (P119 ó 0157) y la cepa receptora por separado (CSH57r- ó C600).

b) Se incubó 18 horas a 37°C sin agitación.

c) Se hicieron diluciones de la cepa donadora y de la cepa receptora, mezclandose 2.5 ml de cada una de ellas, para tener 5.0 ml de volumen total.

Las diluciones óptimas se determinaron experimentalmente, encontrando que para las distintas cepas fueron:

P119 dilución 1:50 (Donadora) + C600 dilución 1:25 (Receptora)=5.0 ml.

0157 dilución 1:25 (Donadora) + C600 dilución 1:25 (Receptora)=5.0 ml.

d) Se incubó 5 horas a 37°C con agitación (200 r.p.m).

e) Se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 minutos en tubos Eppendorf.

f) Se plaqueó sobre un césped de bacterias sensibles.

El método de plaqueo consistió en: detectar los fagos por su capacidad de producir placas líticas en "céspedes" de bacterias sensibles, utilizandose las cepas de E.coli K-12 CSH57r- y C600.

a) Se prepararon diluciones seriadas 10X(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , etc) de los sobrenadantes obtenidos por cultivo mixto, se utilizaron suspensiones de la cepa detectora, como diluyente, para ello, se colocaron 0.9ml de un cultivo estacionario de 5 horas a 37°C de la cepa detectora en una serie de tubos, se añadieron 0.1 ml de sobrenadante de un cultivo mixto, obteniéndose una dilución 1:10 (10^{-1}), se tomó 0.1 ml de esta dilu --

- ción y se pasó al segundo tubo (10^{-2}) y así sucesivamente,
- b) Se incubaron las mezclas 20 minutos a 37°C sin agitación.
- c) Se agregó 0.1 ml de la mezcla incubada, a un tubo de 13 X 100 mm que contenía 3.0 ml de agar 0.7%, se agitó vigorosamente (cuidando de no hacer burbujas) y se vertió esta mezcla en una caja Petri que contenía agar Luria modificado.
- d) Se distribuyó homogéneamente la muestra sobre el agar y se dejó solidificar aproximadamente por 10 minutos.
- e) Se invirtieron las cajas y se incubaron toda la noche a 37°C .
- f) Para calcular el título, se contaron las placas líticas en las diluciones que resultaron más adecuadas, y se expresó en unidades formadoras de placas por mililitro.

Por ejemplo: Sabemos que la dilución 10^{-1} tiene 0.1 ml de sobrenadante, la dilución 10^{-2} , 0.01 ml, etc Por lo tanto si la caja de dilución 10^{-1} tiene 100 placas, podemos calcular:

100 placas-----0.1 ml.

X placas-----1.0 ml.

X=1000 placas.

1.0×10^3 U.F.P / ml.

2.-) Inducción por luz ultravioleta:

- a) Un tubo de 16 X 150 mm con 5.0 ml de medio Luria con CaCl_2 a una concentración final de 0.001M, se inoculó con la cepa donadora.
- b) Se incubó 18 horas a 37°C sin agitación.
- c) Se ajustó la densidad óptica del cultivo a 0.5 (600nm).

- d) Se centrifugó a 12,000 r.p.m por 15 minutos.
- e) Se quitó el sobrenadante y se resuspendió en igual volumen de medio Luria con CaCl_2 a una concentración final de 0.010M.
- f) Se vertió la suspensión en una caja Petri estéril.
- g) Se irradió con lámpara de luz ultravioleta (a una altura de 30 cm) 60 segundos. a una longitud de onda de 2537 Å.
- h) Se diluyó la bacteria irradiada 1:10 con medio Luria con calcio.
- i) Se determinó la densidad óptica y se incubó 5 horas, volviendo a determinar la densidad óptica.
- J) Se centrifugó a 12,000 r.p.m. de 10 a 15 minutos.
- K) Se plaqueó el sobrenadante sobre la cepa detectora igual que se hizo para cultivo mixto.

C.-) OBTENCIÓN DE CEPAS LISOGENICAS:

Para obtener cepas de E.coli k-12 lisogenizadas por los fagos en estudio, se procedió a realizar lo siguiente:

- a) Se adicionó 0.1 ml de la cepa receptora que se deseaba lisogenizar (con una concentración de 10^8 bacterias) a 3.0 ml de agar 0.7% fundido y manteniendose a una temperatura de 48°C.
- b) Se agitó vigorosamente cuidando de no hacer burbujas.
- c) Se vertió la mezcla en una caja de Petri que contenga agar Luria modificado.
- d) Se distribuyó homogéneamente la muestra.
- e) Se dejó solidificar 10 minutos.

- f) Se colocó una gota de lisado con alto título de fago, sobre el "césped" de la bacteria receptora,
- g) Se incubaron las cajas a 37°C hasta que se secaron las gotas, cuidando de no moverlas.
- h) Se incubaron las cajas invertidas durante toda la noche a 37°C.
- i) Se picó con una pipeta pasteur la parte central de la zona de lisis producida por el fago, en donde se encuentran colonias provenientes de bacterias lisogénicas que se hicieron inmunes a la infección por el fago, cuidando de no tomar bacterias sensibles. Este material se inoculó en un tubo con 5.0 ml de medio Luria con calcio.
- j) Se incubó con agitación (200 r.p.m.) a 37°C durante 2 ó 3 horas.
- k) Se sembró por estria para separar colonias en una caja de agar MacConkey.
- l) Se escogieron al azar 10 colonias y se crecieron en medio Luria con calcio durante toda la noche a 37°C sin agitación.
- m) Se purificaron las colonias 2-3 veces.
- n) Se hicieron cultivos mixtos para probar la presencia del fago.

D.-) CLONACION DE FAGOS:

- a) Se picó con una pipeta pasteur una placa lítica aislada, obtenida de un plaqueo de cultivo mixto.
- b) Se puso una placa en 5.0 ml de caldo Luria con calcio en un matraz de 50 ml y se agregó 0.1 ml de bacteria sensible crecida toda la noche a 37°C sin agitación en 5.0 ml de caldo Luria con calcio.

- c) Se incubó durante 5 horas a 37°C agitando (200 r.p.m.)
- d) Se centrifugó a 12,000 r.p.m. 5 minutos en tubos Eppendorf,
- e) Se plaqueó el sobrenadante obtenido como se describió anteriormente.
- f) Se repitió este mismo procedimiento por lo menos cuatro veces.

E.-) TINCION NEGATIVA PARA OBSERVACION DE FAGOS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA:

- a) Se colocó una gota de suspensión de fagos en una rejilla para microscopio electrónico (la rejilla debe de estar previamente cubierta con una membrana de Formvar la cual puede o no estar reforzada por una capa de carbón evaporado.).
- b) Se dejó de 2 a 3 minutos.
- c) Se quitó cuidadosamente el exceso de líquido con papel filtro.
- d) Se llevó a cabo la tinción, colocando una gota de Fosfotungstato de potasio al 2% sobre la rejilla.
- e) Se dejó 10 segundos y se secó la rejilla con papel filtro.
- f) Se observó al microscopio electrónico.

F.-) OBTENCION DE DNA:

- a) 50 ml de medio Luria con calcio a una concentración final de 0.001M se inoculó con 0.5 ml de un crecimiento estacionario de cepa receptora.
- b) Primera Etapa: Se agregaron 5 placas obtenidas de una lisis confluyente de la cepa problema y se incubó con agitación por 10 horas.

- c) Se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 minutos en tubos Eppendorf, del sobrenadante se tomó una alícuota para plaqueo.
- d) Segunda Etapa: Se separó el sobrenadante y se procedió a infectar 2 matraces con la cepa receptora diluída 1:1000 y 1:100 usando iguales volúmenes de sobrenadante y receptora.
- e) Se incubó por 12 horas a 37°C, con agitación (200 r.p.m.).
- f) Se centrifugó a 12,000 r.p.m. y se separó una segunda alícuota para plaqueo.
- g) Se agregó 1 μ l de DNAasa y RNAasa con una concentración de (100%) por cada mililitro de sobrenadante y se incubó 30 minutos a 37°C.
- h) Se centrifugó a 32,000 r.p.m. durante 4 horas en tubos de celulosa 12 X 2.5 mm (Rotor de ultracentrifuga SW40) Modelo: L8 70 Beckman.
- i) Se tiró el sobrenadante y se dejaron los tubos invertidos. Se secaron con aire.
- j) Se agregaron 100 μ l de solución salina isotónica por cada tubo.
- k) Se resuspendieron y se pasaron a un tubo Eppendorf nuevo.
- l) Se agregaron 5 μ l de SDS 10% y 5 μ l de EDTA 0.5M pH=8.0.
- m) Se incubó el tubo a baño María a 68°C por 15 minutos.
- n) Se sacó el tubo y se le agregó igual volumen de fenol destilado y estabilizado con TE (Tris-EDTA). Se agitó suavemente.
- o) Se centrifugó 5 segundos para separar las dos fases.
- p) Se extrajo la fase acuosa y se le agregó igual volumen de fenol--cloroformo (50%). Se centrifugó 5 segundos en Eppendorf.
- q) Se extrajo la fase acuosa y se agregó igual volumen de cloroformo,

se centrifugó por 5 segundos.

- r) Se extrajo la fase acuosa y se agregó igual volumen de isopropanol.
- s) Se dejó precipitando a -20°C . Toda la noche.
- t) Al otro día se centrifugó a 12,000 r. p. m. durante 15 minutos a 4°C .
- u) Se lavó con etanol al 70% (previamente enfriado a -20°C).
- v) Se dejó secar aproximadamente 10 minutos.
- w) Se resuspendió en 50 μl de TE pH=8.0.
- x) Se selló con parafilm y se almacenó a -20°C .

G.-) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para la cuantificación y seguimiento de el DNA del fago se utilizaron minigeles horizontales de agarosa 0.8% y 1.0% preparados sobre portaobjetos de (6X8 cm). Para los patrones de restricción se utilizaron geles horizontales de agarosa 0.8% y 1.0% preparados sobre vidrios de (10X12cm) ó una cámara horizontal.

- a) Se preparó la agarosa en buffer Tris-Borato-EDTA.
- b) Se calentó hasta disolver.
- c) Se vertió el agar sobre la base de vidrio con una pipeta.
- d) Se colocó el peine cuidando de no derramar la agarosa.
- e) Se dejó solidificar.
- f) Se quitó el peine y se puso el gel dentro de la cámara de electroforesis.
- g) Se llenó la cámara con solución amortiguadora TBE (Tris-Borato-EDTA) hasta la mitad.

- h) Se colocó de 4-8 μ l de las muestras que se deseaban correr en los pozos con 5,0 μ l de indicador (colorante para geles).
- i) Se corrió el gel aplicando una corriente de 100 volts (20 miliamperes).
- j) Cuando se observó que el colorante empezó a entrar a el gel se cubrió totalmente con TBE.
- k) El tiempo de corrida se controló por la movilidad de los colorantes añadidos.
- l) Se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ l) durante 15 minutos.
- m) Se observaron las bandas de DNA bajo una lámpara de luz ultravioleta.
- n) Se procedió a fotografiar.

H.-) PATRONES DE RESTRICCIÓN DE DNA:

Se utilizó DNA aislado de un fago purificado por clonación. Se utilizó la misma técnica descrita anteriormente pero el DNA se digirió con enzimas de restricción.

- a) Se tomarón de 2-6 μ l de DNA problema y se agregaron 1.2 μ l de buffer de alta, media ó baja fuerza ionica de acuerdo a la enzima utilizada.
- b) Se agregó la enzima correspondiente diluída 1:10 en TE pH=8.0.
- c) Se incubó el DNA problema con la enzima de diversos tiempos a 37°C.
- e) Se agregó colorante a cada muestra problema (5,0 μ l).
- f) Se colocaron las muestras en los pozos y se procedió a correr la electroforesis como se mencionó anteriormente.

I.-) SENSIBILIDAD A CLOROFORMO.

- a) Se crecieron las cepas P119 y CSH57r- en 3.0ml de caldo Luria con calcio a una concentración final de 0.001M, se incubaron a 37°C toda la noche.
- b) Se diluyeron ambas cepas 1:20 en caldo luria con calcio y se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación (200 r.p.m.).
- c) Se mezclaron 5.0 ml de cada una de las cepas y se incubaron 5 horas con agitación (200 r.p.m.).
- d) Se tomó la mezcla y se le agregó 1.0 ml de cloroformo.
- e) Se centrifugó a 4,000 r.p.m. (20 minutos).
- f) Se tomó el sobrenadante y se plaqueo sobre la cepa sensible.

J.-) PREPARACION DE PLACAS DE CELULAS VERO.

Todos los procedimientos se realizaron en condiciones estériles (Campana de flujo laminar).

- a) En una botella de 25 cm² con una confluencia de células Vero de 80-90%(las células debían de tener más ó menos 48 horas de crecimiento).
- b) Se quitó el medio y se puso 1.0 a 1.5 ml de tripsina 1.25%.
- c) Se incubó 5 minutos a 37°C a una atmósfera de CO₂ al 5%.
- d) Se desprendieron las células a 37°C, se neutralizó la tripsina con 3.0 ml de MEM FLOW completo para células Vero y se centrifugó a 1200 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.

- e) Se resuspendió el sedimento en un mililitro de medio MEM FLOW completo para células Vero.
- f) Se tomó 0.3 ml del resuspendido anterior, para subcultivo y se colocó en una botella de 25 cm² que contenía 4.0 ml de medio MEM FLOW completo para células Vero.
- g) Se añadieron 10.0 ml de medio MEM FLOW completo para células Vero a 0.2 ml de resuspendido, se prepararon las placas de 96 pozos.
- h) Se agregó en una placa de 96 pozos a razón de 0.1 ml por cada pozo (1.4×10^4 células aproximadamente), se cuidó de que la suspensión celular fuera homogénea.
- i) Se incubó 24 horas a 36°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

K.-) DETERMINACION DE ACTIVIDAD CITOTOXICA.

- a) Se observó que la placa tuviera una confluencia de células más o menos de 90%.
- b) Se hicieron diluciones al doble de la muestra con medio MEM FLOW completo para células Vero desde 1:2 hasta 1:262,144.
- c) Se inocularon 25 μ l en cada pozo de cada una de las diluciones.
- d) Se incubó 96 horas, posteriormente se leyó el % de desprendimiento de las células CD₅₀ en relación al control positivo y negativo.

CAPITULO IV

RESULTADOS

Este estudio se realizó con un aislado de E.coli 07:H(No determinada), de una paciente de 18 meses con diarrea aguda. Esta cepa se caracterizó por tener una alta citotoxicidad para células Vero. A lo largo de este trabajo se ha denominado P119.

El aislamiento de posibles fagos presentes en la cepa P119 se intentó originalmente haciendo extracciones con cloroformo, obteniéndose resultados negativos. Por medio de cocultivo del aislado original con E.coli K-12 y sin tratar con cloroformo, se lograron aislar dos tipos de fagos, seleccionados exclusivamente por la morfología de las placas líticas producidas en céspedes de E.coli K-12.

Estos dos aislados se denominaron P119g y P119ch. Se utilizó como control la cepa 0157:H7; previamente reportada en la literatura como citotóxica y portadora de fagos. De esta cepa referencia y por la misma metodología se aisló un fago que fué utilizado como control.

Se probó que los fagos aislados por cocultivo, tanto de la cepa problema P119 como de la cepa control 0157:H7, son lábiles a cloroformo, perdiendose toda la infectividad de los lisados si estos son tratados con el mismo.

Con los fagos aislados se infectaron dos cepas receptoras de E.coli K-12 (C600 y CSH57r-) obteniéndose las cepas lisogénicas respectivas , a las cuales se les determinó título de toxina y unidades formadoras de placas (U.F.P/ml), utilizando las cepas C600 y CSH57r- no lisogenizadas como controles. (Ver Materiales y Metodos.) Estos resultados se pueden observar en la tabla # 3.

TABLA # 3.

CEPA	TOXINA EXTRACELULAR*	TOXINA INTRACELULAR*	U.F.P/ml.
C600(P119)	32	2	5.0×10^4
C600(P119g)	32	2	5.0×10^4
C600(P119ch)	32	2	4.0×10^4
CSH57r-(P119)	256	2	1.0×10^4
CSH57r-(P119g)	256	2	1.0×10^6
CSH57r-(P119ch)	1024	512	5.0×10^5
C600	---	---	----
CSH57r-	---	---	----

*Expresado como el inverso de la dilución máxima que presenta citotoxicidad CD_{50} en células Vero en cultivo.

La designación de las cepas lisogénicas corresponde a la cepa K-12 receptora utilizada, seguido de la cepa donadora del fago.

El procedimiento seguido consistió en cultivar la cepa correspondiente durante toda la noche, en matraces Erlen Meyer de 50 ml, conteniendo 10 ml de medio Luria con calcio. Se incubó a 37°C y con una

agitación continua de 200 r.p.m. Los cultivos se centrifugan a 10,000 r.p.m. en una Sorvall RS5B por 30 minutos. Se separa el sobrenadante y se esteriliza por filtración en Millipore de 0.45μ . La pastilla se resuspende en un volumen igual (10 ml) de PBS estéril, se sonica usando 30 ciclos de sonicación de 10 segundos cada uno, procediéndose a esterilizar por filtración en las mismas condiciones. En el sobrenadante (extracelular) y el sonicado (intracelular) se determinan título de citotoxina en células Vero y unidades formadoras de placas por mililitro. (Ver Materiales y Metodos). Los controles fueron tratados igual que las cepas lisogénicas.

Al medir la infectividad de un lisado almacenado por una noche en refrigeración se observó que la pérdida de actividad llegaba a ser total. Para responder la pregunta de si esto se debía a destrucción de las partículas virales o solamente de su capacidad infecciosa se checaron por microscopia electrónica los lisados.

Encontramos que lisados sin fago detectable por plaqueo contenían partículas virales completas, aunque las colas de las mismas no se observaban claramente.

Se procedió entonces a determinar las condiciones experimentales que permitieran estabilizar estos fagos.

METODO DE PLAQUEO:

Se evaluó primeramente el efecto de la metodología de plaqueo empleada en la detección. Inicialmente se utilizó la reportada en la literatura (56,57) para fagos lambdoides. Encontrándose resultados poco repetitivos, razón por la cual se modificó y estandarizó esta metodología.

Las principales modificaciones fueron: substituir la solución con la cual se realizaban las diluciones del lisado, empleándose en lugar de medio SM como esta reportado comunmente, una suspensión de ($10^{8.5}$ cel/ml) 0.5 de D.O, de bacteria detectora. El siguiente factor evaluado fué el efecto del tiempo de adsorción entre virus y bacteria transcurrido antes del plaqueo. Estos datos se muestran en la tabla # 4.

TABLA # 4.

TIEMPO	C600(P119)	C600(0157)
25'	1.2×10^5	3.0×10^5
30'	3.0×10^4	2.0×10^4
40'	1.3×10^5	2.0×10^4

Se prepararon las diluciones de lisado viral con una suspensión de 0.5 D.O de bacteria detectora en un volumen final de 1.0 ml. Se incubaron por el tiempo marcado, se mezclaron con 3.0ml de agar de superficie 0.7%. Se agitaron cuidadosamente y se vertieron sobre cajas Petri con agar Luria modificado. Se incubaron las cajas invertidas toda la noche y se contaron el número de placas líticas (centros

infectivos) en las diluciones correspondientes.

Los resultados son difíciles de interpretar, en el caso de la cepa P119, a los 30 minutos se observa una disminución en el número de U.F.P./ml, que no se observa a los 40 minutos. Puesto que con la cepa 0157:H7 si es definida la disminución de unidades formadoras de placas con el tiempo de adsorción se estandarizó el tiempo para experimentos futuros, utilizándose 20 minutos en todos los casos.

EFECTO DE DIVERSOS FACTORES EN LA ESTABILIDAD:

Se determinaron las condiciones óptimas para estabilizar nuestras preparaciones "Stock" y evitar dentro de lo posible la pérdida de infectividad. Se probaron distintas temperaturas y medios de conservación, los resultados se muestran en la tabla # 5. Como se observa no existe una diferencia significativa entre las distintas temperaturas y los diferentes medios de conservación, empleados.

La mayor estabilización se obtuvo con sulfato de magnesio 0.1M a una temperatura de 2-4°C; aunque los resultados no son muy significativos.

CONDICIONES DE PROPAGACION:

Para obtener soluciones "Stock" con alta concentración de partículas virales se partió del método reportado en la literatura para λ (56,57). Brevemente consiste en "picar" placas líticas produci-

	Primer Día			Tercer Día			Septimo Día		
	TEMPERATURA AMBIENTE	2-4°C	-20°C	TEMPERATURA AMBIENTE	2-4°C	-20°C	TEMPERATURA AMBIENTE	2-4°C	-20°C
GLICEROL	8.0×10^5	2.3×10^5	2.0×10^5	4.0×10^5	6.0×10^3	1.0×10^3	2.1×10^4	1.0×10^2	2.0×10^2
SULFATO DE MAGNESIO 0.1M	5.0×10^4	3.4×10^5	1.5×10^5	4.0×10^5	7.0×10^4	3.0×10^4	4.0×10^4	3.0×10^4	1.0×10^3
GELATINA	4.0×10^5	1.4×10^5	1.0×10^5	4.0×10^5	1.0×10^5	5.0×10^5	1.0×10^3	1.4×10^4	5.0×10^4
MEDIO SM	1.5×10^5	4.0×10^4	3.0×10^5	-----	5.0×10^4	5.0×10^5	-----	2.0×10^3	5.0×10^4
CONTROL	1.0×10^4	4.1×10^4	1.4×10^4	1.2×10^3	9.0×10^2	1.4×10^3	2.0×10^2	5.0×10^2	-----

TABLA # 5 Título inicial de la cepa lisogénica C600(P119g) 4.5×10^5 .

das en un césped, eluir las en medio y utilizar esta preparación para infectar bacterias sensibles. Al emplear este método los títulos más altos obtenidos fueron de 5.0×10^2 , observándose muy poca reproducibilidad en distintas preparaciones.

Con el mismo propósito, se probó la técnica de inducción por luz ultravioleta, descrito en la literatura (36). Los títulos más altos fueron de: 1.0×10^6 .

Por estos resultados se probó la técnica de cultivo mixto utilizando cocultivo de la cepa donadora (P119, 0157 ó cepas lisogénicas) con cultivos frescos de cepa receptora (C600 ó CSH57r-).

Se determinaron las concentraciones óptimas relativas de ambas cepas. Los resultados para las cepas lisogénicas, se muestran en la tabla # 6.

TABLA # 6.

NUMERO DE BACTERIAS DONADORAS	NUMERO DE BACTERIAS RECEPTORAS	U.F.P / ml.
CSH57r-(P119) 2.0×10^6	CSH57r- 4.0×10^6	1.9×10^5
C600(P119) 4.0×10^6	C600 4.0×10^6	2.0×10^5

Para obtener estos datos, los cultivos mixtos se realizaron con las concentraciones indicadas, de cada una de las cepas. En todos los casos la incubación fué de 5 horas, al cabo de las cuales se centrifugaron y plaquearon los sobrenadantes.

CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO MIXTO:

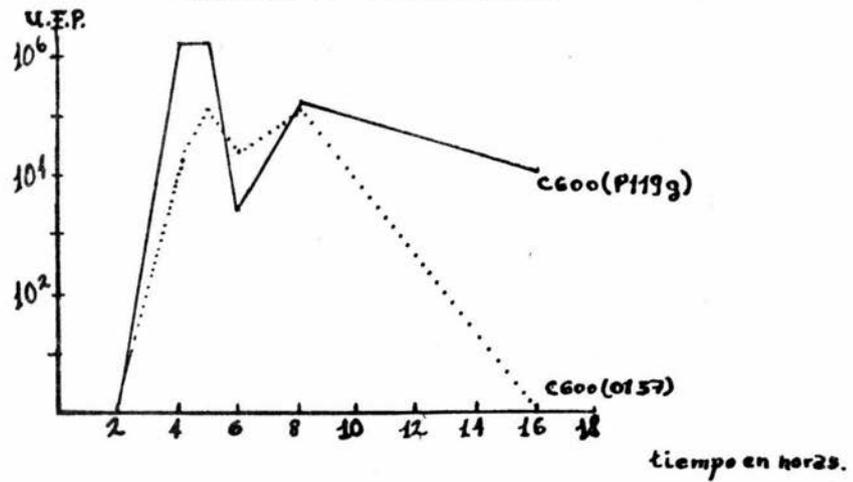
Se llevó a cabo una cinética de crecimiento de cultivos mixtos en la cual se observó, que entre las cuatro y cinco horas no hay una diferencia significativa en cuanto a U.F.P. como se muestra en la gráfica #1 y tabla #7. A las seis horas hay una disminución en el título seguido de un nuevo aumento a las ocho horas, lo que nos indica que tal vez un nuevo ciclo infectivo está llevándose a cabo, a las 16 horas se observa ya una disminución muy marcada.

Entre las cuatro y cinco horas se obtuvo un título óptimo de U.F.P. tiempo en el cual se estandarizaron nuestros cultivos mixtos.

TABLA # 7.

TIEMPO	CEPA LI SOGENICA C600(P119)	U.F.P /ml.
2 HORAS		-----
4 HORAS		1.2×10^6
5 HORAS		1.1×10^5
6 HORAS		3.0×10^3
8 HORAS		2.0×10^5
16 HORAS		1.0×10^4
2 HORAS	CEPA LI SOGENICA CSH57r-(0157)	-----
4 HORAS		3.0×10^3
5 HORAS		1.0×10^5
6 HORAS		3.5×10^4
8 HORAS		1.4×10^5
16 HORAS		-----

Cinética de Crecimiento.



GRAFICA # 1.

Se preparan cultivos mixtos de las cepas lisogénicas, se incuban a 37°C con agitación (200 r.p.m.), se toman alícuotas a diferentes tiempos las cuales se centrifugan en Micro-Centrífuga Fisher modelo 235B y se plaquean como esta descrito. (Ver Materiales y Métodos).

PREPARACION DE LISADOS CONCENTRADOS:

Con el fin de obtener lisados con alta concentración de virus infeccioso, se probó el efecto de realizar etapas sucesivas de infección, esto se hizo infectando cultivos frescos de la cepa receptora con el sobrenadante de la etapa anterior. Estos cultivos se hicieron utilizando los tiempos y concentraciones óptimas establecidas anteriormente.

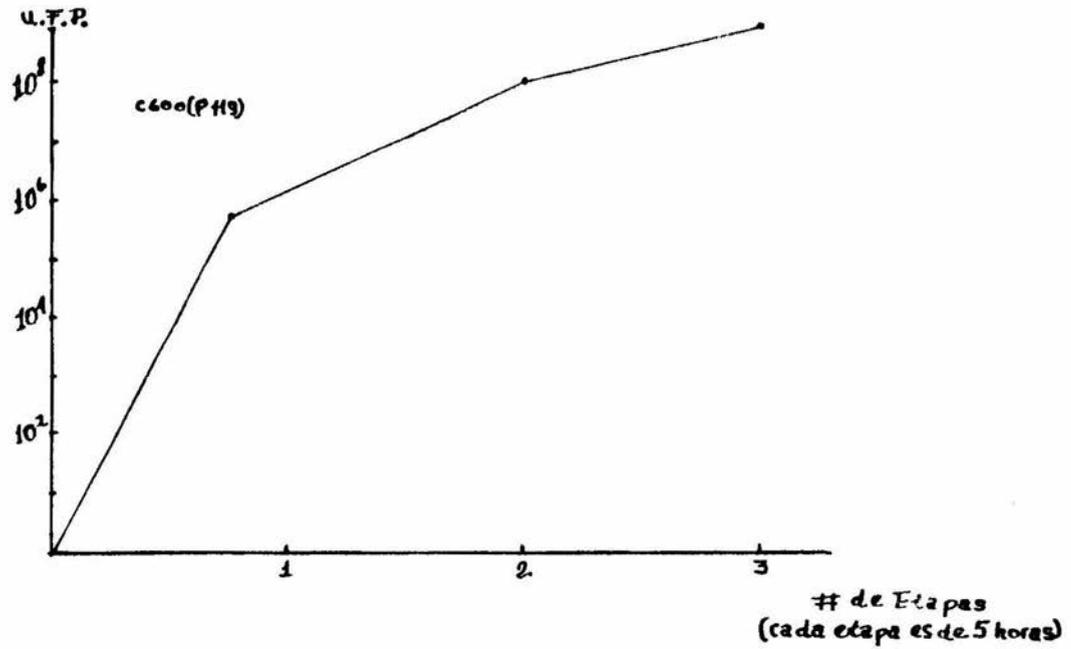
Se observó un aumento substancial de U.F.P/ml al llegar a una tercera etapa de infección sucesiva. Estos datos para la cepa CSH57r-(P119), se presentan en la gráfica #2 y tabla #8.

TABLA # 8.

No. DE ETAPAS	CEPA LI SOGENICA CSH57r-(P119)	U.F.P /ml.
PRIMERA ETAPA		7.0×10^5
SEGUNDA ETAPA		1.0×10^6
TERCERA ETAPA		1.0×10^6

Se realizaron tres etapas de infección. Cada una de ellas con

Periodos de incubación
en etapas consecutivas



sistió, en incubar cinco horas (a las concentraciones reportadas de cepa donadora y receptora) a 37°C con agitación. Se centrifuga a 10,000 r.p.m. en Sorval RS5B por 30 minutos. El sobrenadante así obtenido se utiliza para la siguiente etapa de infección. En cada etapa se separó una alícuota de sobrenadante para evaluar el número de partículas infecciosas.

INMUNIDAD LISOGENICA:

Se sabe que la inmunidad lisogénica es un parámetro que se determina para la caracterización de diversos bacteriófagos, por lo que se realizaron pruebas de inmunidad lisogénica de los fagos (P119g, P119ch, y 0157). Estos datos se muestran en la tabla # 9. Todas las cepas lisogénicas resultaron inmunes a todos los fagos lo que indica que tienen el mismo sistema de represión.

TABLA # 9.

INMUNIDAD LISOGENICA

CEPA	FAGO		
	0157	P119g	P119ch
CSH57r-	+	+	+
CSH57r-(0157)	-	-	-
CSH57r-(P119g)	-	-	-
CSH57r-(P119ch)	-	-	-

Los símbolos (+)= Zonas de lisis, (-)= No hay lisis.

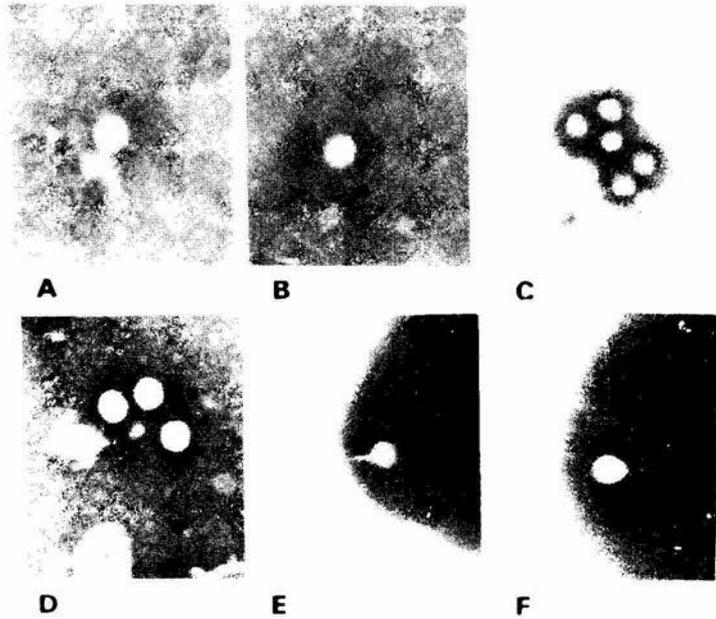
Se agrega 0.1 ml de la cepa correspondiente a 3.0 ml de agar de superficie 0.7%, se agita y se vierte en una caja Petri que contenga agar Luria modificado, se deja solidificar aproximadamente 10 minutos. Con una pipeta pasteur estéril se agrega una gota del fago problema sobre el agar. Se incuban las cajas invertidas durante toda la noche a 37°C, y se observa si hay o no presencia de zonas de lisis.

MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Al inicio del trabajo se realizaron diversas preparaciones para observar en el microscopio electrónico.

Se prepararon rejillas de lisados "Stock" no purificados, obtenidos de las cepas originales (P119 y 0157) y de concentrados de los mismos, obtenidos por empaquetamiento a (32,000 r.p.m.) en un rotor(SW40) por (3 horas) en una ultracentrifuga Beckman modelo L8-70.

Las preparaciones mostraron fagos de distintas morfologías, las cabezas observadas fueron de forma icosaédrica y con respecto a las colas se observaron distintos tamaños. En la figura # 1, se muestran algunas preparaciones con morfologías similares, aunque debe notarse que las colas de las partículas son diferentes, y en algunos casos no son visibles. Las preparaciones presentadas tienen una amplificación de 30,000 X, y puede observarse que las partículas presentes en C y E son de menor tamaño.



FOTOGRAFIA # 1. Fotomicrografía electrónica de preparados directos o concentrados de los fagos presentes en P119 y 0157. La amplificación es de 30,000 X.

A.-0157ch directo; B.-0157ch concentrado; C.-0157 directo; D.-P119g concentrado; E.-P119g directo; F.- P119g directo.

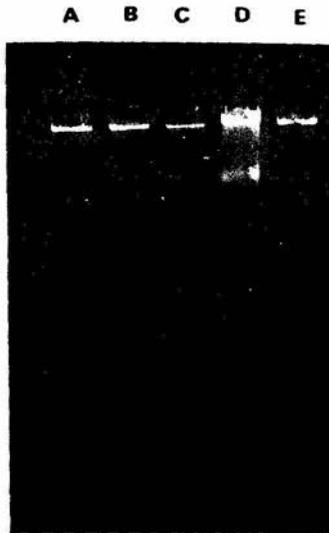
PATRONES DE RESTRICCION;

Partiendo de preparaciones de alto título (aproximadamente 10^{10} fagos por mililitro), obtenidas por cultivos en etapas sucesivas, se extrajo el DNA de cada uno de los fagos en estudio. (Ver Materiales y Métodos). Al ser corrido dicho DNA en gel de agarosa al 0.8% se observa un peso molecular similar al del fago λ , lo que nos indica un tamaño aproximado de 50 Kb (46) fotografía # 2.

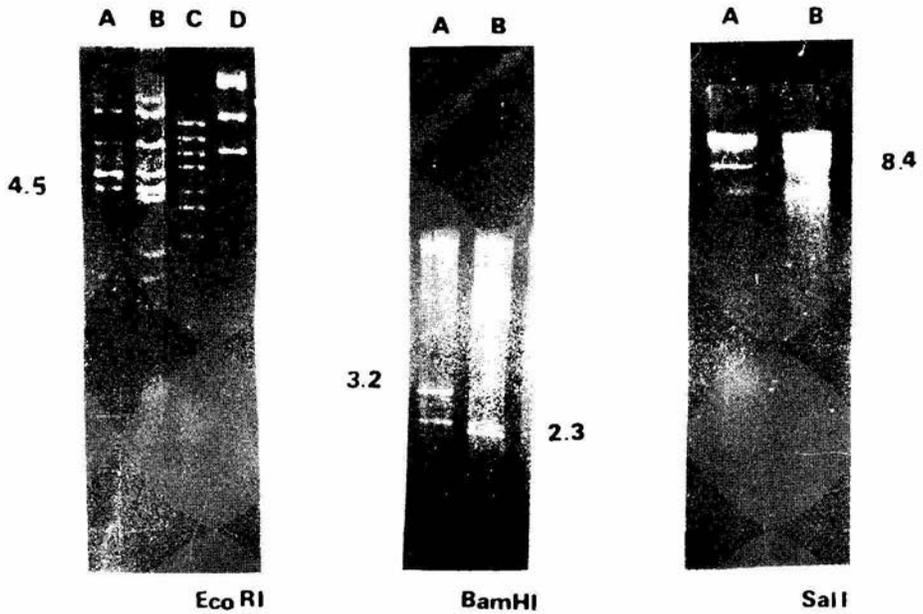
Los patrones de restricción obtenidos con las enzimas EcoRI, BamHI y Sall (Ver Materiales y Metodos) son muy similares para ambos fagos (P119g y P119ch), sin embargo con las tres enzimas se encuentra por lo menos una diferencia.

Con EcoRI P119g presenta una banda adicional de aproximadamente 4.5 Kb. Con BamHI P119ch presenta una banda de aproximadamente 3.2 Kb que no se encuentra en P119g y este a su vez tiene una banda menor de aproximadamente 2.3 Kb, que esta ausente de P119ch. Con Sall, aunque no esta perfectamente definido el patrón se observa en P119ch una banda de aproximadamente 8.4 Kb, que no se encuentra en P119g (fotografía # 3).

(58)



FOTOGRAFIA # 2. Electroforesis en geles de Agarosa 0.8%, se observa un peso molecular similar al del fago λ : linea A F119ch; linea B F119g; linea C P119; linea D 0157; linea E λ comercial.



FOTOGRAFIA: # 3. Electroforesis en geles de Agarosa 0.8%, donde se muestran los patrones de restricción del DNA de los fagos aislados, con las diferentes enzimas utilizadas.

EcoRI: línea A F119ch; línea B F119g.

Controles de Peso Molecular: línea C λ digerido con BstII; línea D λ digerido con HindIII.

BamHI: línea A F119ch; línea B F119g.

Sall: línea A F119g; línea B F119ch.

CAPITULO V

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A.-) DISCUSION DE RESULTADOS:

Se aislaron dos fagos, sensibles a cloroformo, de la cepa de Escherichia coli en estudio (P119), los cuales se denominaron P119g y P119ch. Estos fagos tienen la misma inmunidad y son similares en cuanto a: tiempos de adsorción, producción de U.F.P. en etapas consecutivas, cinética de crecimiento, estabilidad con sulfato de magnesio y temperatura. Sin embargo, sus patrones de restricción aun siendo similares no son iguales.

Ambos fagos codifican la producción de citotoxina tanto intracelular como extracelular; cabe mencionar que los títulos de citotoxina extracelular son más elevados, sobre todo en el caso de P119ch.

Con las tres enzimas de restricción utilizadas para digerir el DNA de los fagos P119g y P119ch (EcoRI, BamHI, Sall), los patrones de restricción de ambos fagos muestran variación por lo menos en un sitio directo de corte a lo largo de todo el genoma.

Al comparar los patrones de restricción de los fagos P119g y P119ch con reportes en la literatura de los fagos H19A y H19B (36), aislados de una E.coli 026 asociada con diarrea infantil, se encontró que H19B y P119ch cortados con la misma enzima presentan patrones muy similares entre si y ambos se diferencian de P119g por la ausencia de una banda de aproximadamente 4.5 Kilobases. Ninguno de nuestros fagos aislados corresponden al fago H19A previamente reportado (36). Estos

datos sugieren la posibilidad de la existencia de una familia de fagos convertidores a citotoxicidad.

Nuestros datos indican que P119ch y P119g tienen propiedades biológicas similares, diferenciándose exclusivamente por sus patrones de restricción, esto podría indicarnos que en realidad dichos fagos son del mismo origen y que uno de ellos sufrió alguna modificación en su genoma que se reflejó en la aparición o desaparición de uno de los sitios de corte, sin que este cambio afecte a las propiedades biológicas del fago. --

Por datos previamente reportados en la literatura se sabe de la existencia de otros dos fagos denominados 933J y 933W, ambos fagos codifican para la producción de citotoxina, estos fagos son aislados de una cepa de Escherichia coli enterohemorrágica causante de diarrea. Uno de estos fagos el 933J es similar al H19A que ya ha sido mencionado.

La importancia de estos fagos convertidores a citotoxicidad como factores de patogenia no está bien definida. No se conoce su prevalencia en la población ni se ha comprobado que en todos los casos produzcan diarreas en los individuos infectados con cepas de E.coli que los contengan. Por lo que se recomienda realizar futuras investigaciones para dilucidar la importancia de estos fagos convertidores a citotoxicidad como posibles factores de patogenia.

B.-) CONCLUSIONES:

De la cepa original en estudio (P119) se pudieron aislar dos fagos inductores de citotoxina con las siguientes características:

- 1.- Su morfología no fué claramente establecida, sin embargo por microscopia electrónica de los fagos presentes en la cepa original, encontramos morfologías diferentes de fagos.
- 2.- El peso molecular del DNA de los fagos en estudio es similar y corresponde aproximadamente a 50 Kilobases.
- 3.- Los patrones de restricción con diversas enzimas indican una gran similitud entre el DNA de ambos fagos, aunque se encuentra por lo menos una diferencia entre ellos con cada una de las enzimas.
- 4.- Concluimos que encontramos dos fagos los cuales pertenecen a la familia de fagos que codifican para la producción de citotoxinas existentes en la naturaleza.

APENDICE

MEDIO LURIA.

Triptona 10 gr.

Extracto de Levadura 5 gr.

Cloruro de Sodio 5 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Mezclar los reactivos con el agua, distribuir en frascos de -- 100 ml y esterilizar quince minutos a quince libras.

AGAR LURIA MODIFICADO CON CALCIO.

Medio luria

Agar 10 gr.

Vitamina B al 1.5% 1.0 ml.

Cloruro de calcio 1.0 molar 10 ml.

Preparar el medio luria sin esterilizar en un matraz de 2.0 Li tros, añadir 1.0 ml de vitamina B al 1.5%, ajustar a pH de 7.0, agregar el agar. Esterilizarlo en autoclave, a 121°C quince minutos dejar que enfrie a 47°C y agregar la solución de calcio, verter el medio en cajas Petri y dejar solidificar.

AGAR DE SUPERFICIE AL 0.7%

Medio luria modificado 100 ml

Agar 0.7 gr.

Poner el agar en un frasco de tapón de rosca, agregarle el medio luria modificado, tapar dejando los tapones flojos y esterili zar a 121°C quince minutos.

VITAMINA B 1.5%.

Vitamina B 1.5 gr.

Agua destilada 100ml

Mezclar perfectamente la vitamina con el agua y esterilizar a quince libras, quince minutos en frasco de 100 ml con el tapón flojo.

AGAR DE MANTENIMIENTO.

Peptona 2.0 gr.

Cloruro de Sodio 0.5 gr.

Agar 1.5 gr.

Agua 1000 ml.

Mezclar todos los reactivos, disolver por ebullición y distribuir en viales o tubos pequeños. Esterilizar quince minutos a quince libras.

MEDIO SM (Mantenimiento de Fagos).

Cloruro de Sodio 5.8 gr.

Sulfato de Magnesio 2.0 gr.

Tris-HCl 1.0 molar pH=7.5 (50ml).

Gelatina 2% 5.0 ml.

Pesar los reactivos y agregarle el Tris-HCl y la gelatina previamente disuelta, aforar con agua destilada a 1000ml, repartir alícuotas de 100ml en frascos individuales y esterilizar a quince libras, quince minutos.

BUFFER TRIS-BORATO-EDTA (TBE).

Tris Base 54.0 gr.

Acido Bórico 27.5 gr.

EDTA 0.5M pH=8.0 20 ml.

Agua destilada a 1000 ml.

Pesar cuidadosamente los reactivos, colocarlas en un matraz de 1.0 litro, agregar los 20ml de EDTA, aforar con el agua destilada a 1000 ml esterilizar a quince libras, quince minutos.

INDICADOR PARA GELES.

Xilen Cianol 1 pizca.

Naranja G 1 pizca

Azul de Bromofenol 1 pizca.

Buffer de Corrida (TBE) 7.0 ml.

Glicerol 3.0 ml.

Mezclar y almacenar en frasco ambar.

GEL DE AGAROSA

Agarosa 0.8 gr o 1.0 gr.

TBE 100ml.

Disolver la agarosa en TBE con calor, verter sobre una base de vidrio y colocar el peine de plástico para que se hagan los pozos, dejar solidificar, quitar el peine poner el gel dentro de la cámara de electroforesis y correr la muestra problema con TBE.

SULFATO DE MAGNESIO 0.1M.

Sulfato de magnesio 24,64 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Pesar cuidadosamente el sulfato de magnesio, colocarlo en un matraz de 1.0 litro, agregar los 1000 ml de agua destilada. Mezclar -- hasta disolver completamente el sulfato con el agua y distribuir alícuotas de 100 ml en frascos de vidrio con tapón de rosca. Esterilizar 15 minutos a 15 libras.

SODIO-DUODECIL-SULFATO 10% (SDS).

SDS 10 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Agregar los 10 gramos de SDS, en un matraz, que contenga los 1000 ml de agua destilada, disolver lo mejor posible y repartir alícuotas de 100 ml en frascos de vidrio con tapón de rosca. Esterilizar 15 minutos a 15 libras.

TRIS - EDTA (TE).

Tris-Cl 0.1576 gr.

EDTA 0.0372 gr.

Agua bidestilada 100 ml.

Pesar cuidadosamente los reactivos, depositarlos en un matraz, agregar aproximadamente la mitad del agua bidestilada, ajustar a pH= 8.0 y aforar a 100 ml. Esterilizar 15 minutos a 15 libras.

MEDIO PARA CONGELAR CELULAS VERO

MEM con solución salina balanceada de Earles 25 hepes 100,0 ml.
Suero fetal de bovino inactivado 15,0 ml 30 minutos a 56°C.
Glicerol estéril 3 veces 15,0 ml
L-Glutamina 29.23 μ g/ml 1.5 ml.
Antibioticos: Penicilina 250 μ g/ml,
Estreptomycinina 150 μ g/ml 1.0ml

TRIPSINA 10X PARA DESPRENDER CELULAS VERO.

Tripsina (Estéril) 5.0 ml.
PBS pH=7.2 0.01M (Estéril) 94.0 ml
EDTA 4% (Estéril) 1.0 ml.

PBS (Evans)

Solución 1
0.01M Na_2HPO_4
0.15M NaCl
Aforar a un litro.

Solución 2
0.01M NaH_2PO_4
0.15M NaCl
Aforar a medio litro.

En un vaso de 1500ml se coloca la solución 1 y se agrega la solución 2 hasta tener un pH= 7.2.

LISTA DE MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS.

Agarosa TipoII	No.A-6877	Sigma.
Agar Mac-Conkey	No. 0075-01-09	DI FCO.
Agar	No. A-0085	DI FCO.
Bacto-Tripton	No. 0123-01	DI FCO.
Bromuro de etidio	No. E-8751	Sigma.
BamHI		Sigma.
Cloruro de sodio	No. 3625	Baker.
Cloruro de calcio	No. 1309	Baker.
Cloroformo	No. L-9180-60-1	Baker.
DNAasa		Sigma.
EcoRI		Sigma.
EDTA	No. 8993	Baker.
Etanol	No. 3252	Baker.
Extracto de levadura	No. 0127-01	DI FCO.
Fenol	No. 2858	Baker.
Hidróxido de sodio en lentejas	No. 6498	Merck.
Propanol	No. 9634	Merck.
SalI		Sigma.
SDS	No. 161-0301	BIO-RAD.
Tripsina	No. 001-0893	Sigma.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Back, E., Mollby, R., Kaijser, B., Stintzing, G., Wadstrom, T., and Habte, D. Enterotoxigenic Escherichia coli and other gram negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen and loss of enterotoxigenicity. J.infect.Dis 142:318-327(1980).
- 2.- Evans, A.S., Feldman, H.A. Bacterial infections of humans Epidemiology and Control. Plenum Medical Book Company 219-234 (1986).
- 3.- Gross, R.J. Escherichia coli diarrhoea J. of Infect. 6: 177-192 (1983).
- 4.- Trabulsi, L.R., Toledo, R.F., Prado, V. E.coli enteropatogénica. Adel. Microbiol. Enf. Infec. 3:62-95 (1984).
- 5.- Evans, D.G. New surface associated heat-labile colonization factor antigen CFA (II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogrup 06 and 08. Infect. Immun. 21:638-647 (1978).
- 6.- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Cur.Microbiol 3:95-99(1979).

- 7.- Merson, M.H., Orskov, F., Orskov, I., Sack, R.B., Hug, I., Koster, F.T. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 23:325-329 (1979).
- 8.- Reis, M.H., Matas, D.P., Pestana de Castro, A.F., Toledo, M.R., Trabulsi, L.R., Relations among enterotoxigenic phenotypes, and sources of strains in enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 28: 24-27 (1980).
- 9.- Merson, M.H., Black, R.E. Enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea. Infect. Immun. 20:81-92 (1981).
- 10.- Reis, M.H., Guth, B.E., Gonees, T.A., Murahovschi, J., Trabulsi, L.R. Frequency of Escherichia coli strains producing heat-labile toxin or heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in Sao Paulo. J. clin Micro. biol. 15:1062-1064 (1982).
- 11.- Darrell, E., Griffin., Gemaki, P. Release of shiga toxin from Shigella dysenteriae 1 by Polymyxin B. Infect and Immun. 40:425-428 (1983).
- 12.- Trabulsi, L.R. Experimental Kerato-conjunctivitis of the guinea-pig by enterobacteria. Rev. Inst. Med. trop. 7: 16-23. (1965).
- 13.- Silva, R.M., Toledo, M.R., Trabulsi, L.R. Is virulence plasmid-mediated in all Shigella species? J. Infect Dis. 146: 199 (1982).

- 14.-Silva, R.M., Toledo, M.R., Trabulsi, L.R. Invasiveness in enteroinvasive Escherichia coli strains in plasmid correlated. J. Infect. Dis. 146:706 (1982).
- 15.-Ewing, W.H., Davis, B.R., Montague, T.S. Studies of the occurrence of Escherichia coli serotypes associated with diarrheal disease. J. Bact. 53: 191-195 (1963).
- 16.-Sakaza, K.R., Tamura, K., Saito, M. Enteropathogenic Escherichia coli associated with diarrhea in children and adults. J. Med. Sci. Biol. 20:387-399 (1967).
- 17.-Silva, R.M., Toledo, M.R., Trabulsi, L.R. Biochemical and cultural characteristics of invasive Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 11:441-444 (1980).
- 18.-Taylor, J., Powell, B.M., Wright, J. Infantile diarrhea and vomiting. A clinical and bacteriological investigation. Brit.Med.J. 2:117-125 (1949).
- 19.-Goldschmidt, M.C., Dupont, H.L. Enteropathogenic Escherichia coli: lack of correlation of serotype with pathogenicity. J. Infect. Dis. 133:153-156(1976).
- 20.-Levine, M.M., Berquist, E., Nalin, D.H., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., Sotman, S., Rowe, B. Escherichia coli strains that cause diarrhea but do not produce heat labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet 1:1119-1122 (1978).

- 21.-Schroeder, S., Caldwell, J.R., Vernon, T.M., White, P.C., Grainger, S.I., Bennett, J.V. A water-borne outbreak of gastro-enteritis in adults associated with Escherichia coli. Lancet 1:737-740 (1968).
- 22.-Rothbaum, R., Mc.Adams, A.J., Gianella, R., Partin, J.C., Gastroenterology A clinicopathologic study of enterocyte adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infants. Infect.Immun. 83: 441-454 (1982).
- 23.-Konowalchuck J., Speirs, J.I., Stravrics. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 18: 775-779 (1977)
- 24.-O'Brien, A.D., Laveck, G.D., Thompson, M.R., Formal S.B. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli.J.Infect.Dis.146:763-769 (1982).
- 25.-Kliptein, F.A., Rowe, B., Engert, R.F., Short, H.B., Gross, R.J. Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of Escherichia coli isolated from infants with epidemic diarrhea. Infect.Immun.21:171-178 (1978).
- 26.-Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGree, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Helbert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.m., Hargrett, N.T., Blake, P.A.,Cohen, M.L. Hemorrhagic colitis associated with

- a rare Escherichia coli serotype. N. Engl. J. Med. 308: 681-685 (1983).
- 27.-Lior, H., Gill, P. Cytotoxic Escherichia coli 0157:H7 and gastroenteritis in Canada. Proceedings of the International Congress for Infectious Diseases. Vienna Austria. 19 (1983).
- 28.-Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokolow, R., Morris, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype. J. Clin. Microbiol. 18:512-520 (1983).
- 29.-Karmali, M.A., Steele, B.T., Petri, M., Lim, C. Sporadic Cases of hemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools. Lancet I:619-620 (1983).
- 30.-Johnson, W.M., Lior, H., Bezanson, G.S. Cytotoxic Escherichia coli 0157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet I:76 (1983).
- 31.-O'Brien, A.D., LaVeck, G.D. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. Infect.Immun. 40:675 (1983).
- 32.-O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chang, T.W., Gorbach, S.L. Purification of Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like toxin from Escherichia coli 0157:H7 strains associated

- with haemorrhagic colitis, Lancet II: 573 (1983).
- 33.-Scotland, S.M., Smith, H.R., Wills, G.A., Rowe, B. Vero cytotoxin production in strain of Escherichia coli in determined by genes carried on bacteriophage. Lancet II: 216 (1983).
- 34.-Smith, H.W., Green, P., Parsellz. Vero cell toxins in Escherichia coli and related bacteria: transfer by phage and conjugation an toxic action in laboratory animals, chickens and Pigs. J. Gen. Microbiol. 129: 3121 (1983).
- 35.-O'Brien, T.A., Lively, M.E., Chen, S.W., Rothman., Formal, S.B. Escherichia coli 0157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like citotoxina. Lancet I: 702 (1982).
- 36.-O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.H., Smith, H.W., Formal, S.B. Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226: 694-696 (1984).
- 37.-Newland, J.W., Strackbine, N.A., Miller, S.F., O'Brien A.D., Holmes, R.K. Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of Escherichia coli. Science 230: 179-181 (1985).

- 38.-Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, W., Smith, H.W., Holmes, R.K., O'Brien, A.D. Two Toxin-Converting Phages from Escherichia coli 0157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins with Similar Biologic Activities. Infect. Immun. 53:135-140(1986).
- 39.-Lehninger, A.L. Bioquímica.Las bases moléculares de la estructura y función celular. Editorial Omega.S.A. México D.F. p.p. 1023-1043 (1982).
- 40.-Haynes,R.H., Hanawalt, P.C. The molecular basis of life. An Introduction to Molecular Biology. San Francisco and London.p.p. 10-14 (1974).
- 41.-Stent, G.S. Papers on Bacterial Viruses. Little Brown and Company.p.p. 3- 402 (1960).
- 42.-Peña, A. La Biología Contemporanea.Universidad Nacional Autónoma de México. México.D.F.p.p.91-117 (1983).
- 43.-Carpenter, P.L. Microbiología. Editorial Interamericana na Mexico.D.F.p.p. 143-163 (1979)
- 44.-Winchester, A.M. Genética un estudio de los principios de la herencia. Editorial C.E.C.S.A. México D.F. p.p. 289-336 (1981).
- 45.-Gardner, E.J. Principios de Genética. Editorial Limusa-Wiley,S.A. México D.F.p.p. 277-509 (1975).

- 46.-Hayes, W. The Genetics of Bacteria and their Viruses.
Klackwell Scientific Publications, p.p. 407-479(1974).
- 47.-Delbruck, B.M. Bacterial Viruses and Sex. Scientific
American 110-115 (1948).
- 48.-Stent, G. The Multiplication of Bacterial Viruses.
Scientific American 116-119 (1953).
- 49.-Horne, R.W. The Structure of Viruses. Scientific
American 121-129 (1963).
- 50.-Benzer, S. The fine Structure of the gene. Scientific
American 130-144 (1962).
- 51.-Epstein, R.H. The Genetics of a Bacterial Virus.
Scientific American 145-152 (1965).
- 52.-Wood, W.B., Edgar, R.S. Building a Bacterial Virus.
Scientific American 153-163 (1967).
- 53.-Smith-Keary, P.F. Genetica estructura y Función
Publicaciones Cultural S.A. México D.F. p.p. 147-164
(1982)
- 54.-Glass, R.E. Gene Function E.coli and its heritable
elements. university of California Press Berkeley
and the Angeles. 193-229 (1982).
- 55.-O'Brien, A.D., LaVeck, G.D. Production of Shigella dysenteriae
Type 1-Like Cytotoxin by Escherichia coli. J.infect.Dis 146:
763-769(1982).

- 56.-Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. Molecular Cloning. Editorial C.S.H. Estados Unidos de Norteamérica.p.p. 75-85 (1982).
- 57.-Miller, J.H. Experiments in Molecular Genetics. Editorial C.S.H. laboratory. Estados Unidos de Norteamérica.p.p. 31-56 (1972).