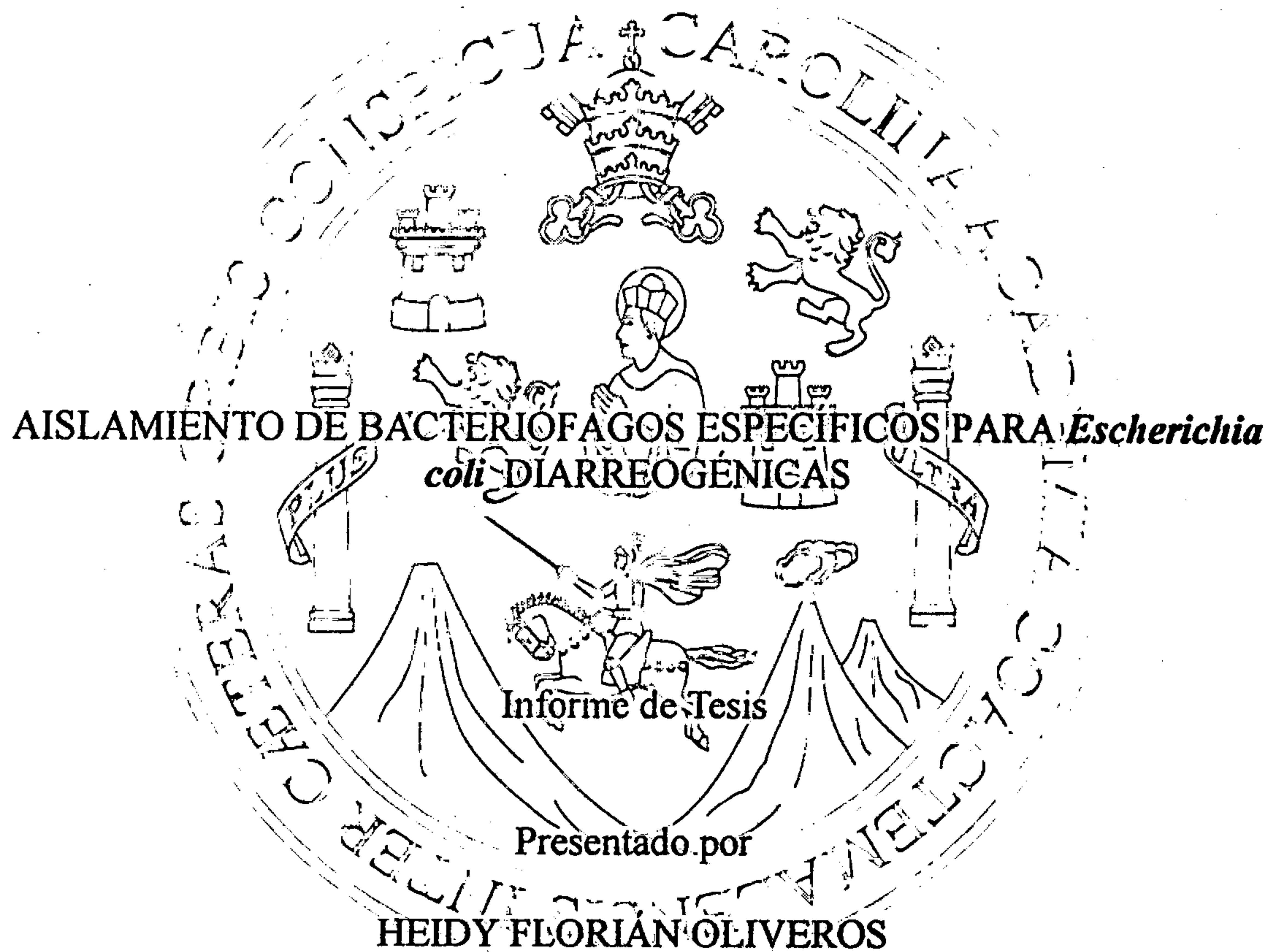


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Para optar al título de
QUÍMICA BIÓLOGA

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, Marzo del 2003

DL

06

T(958)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	M.Sc. GERARDO LEONEL ARROYO CATALÁN
SECRETARIA	LICDA. JANNETTE SANDOVAL DE CARDONA
VOCAL I	LICDA. GLORIA ELIZABETH NAVAS ESCOBEDO
VOCAL II	LIC. JUAN FRANCISCO PÉREZ SABINO
VOCAL III	DR. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTÍNEZ
VOCAL IV	BR. JORGE JOSÉ GARCÍA POLO
VOCAL V	BR. LIZA LEONOR CARRANZA JUÍ

ACTO QUE DEDICO

A DIOS EL SER SUPREMO QUE DIRIGE MI VIDA

- A mi madre Alma Azucena Oliveros Cámbara, quien con su amor, comprensión y sacrificio hizo posible la culminación de mi carrera.
- A mis abuelos Blanca Lidia Cámbara
Hector Oliveros
Nohelia Méndez (Q.E.P.D.)
Cruz Florián
Por su ayuda y amor constante
- A mis tíos René Oliveros, Tito Oliveros, Joel Oliveros, Osman Florián
Por su cariño
- A mis tías Ana Milagro Florián, Marena Oliveros, Mary Oliveros
Por su cariño
- A mis amigos Juan Ernesto Vossberg, Fabiola Morales, Ingrid Juárez, Julio Pernillo, Miriam Miyares, Claudia Hernández y Teresita Jiménez.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Mario González-Pérez, por su colaboración, asesoría y orientación, que me brindó para la elaboración del presente trabajo de investigación.

Lic. Rafael Pratdesabal por su colaboración en la elaboración del presente trabajo de investigación.

Licda. Támara Velázquez por su colaboración durante la elaboración de este estudio.

Claudia Mérida, Teresita Veliz, Susely Ixcot, Francisco Culajay, Tinita por su amistad y ayuda durante el transcurso del presente trabajo.

Claudia García, Sergio Sandoval por su amistad y apoyo moral para la realización de la investigación.

En especial a Juan Ernesto Vossberg por su amistad apoyo y ayuda incondicional durante el transcurso de mis estudios universitarios y en la realización de esta investigación.



INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
	A. <i>Escherichia coli</i>	3
	B. Patología	6
	C. Bacteriófagos	9
	D. Ciclo reproductivo	13
	E. Bacteriófagos de <i>E. coli</i>	19
	F. Aislamiento y cultivo de bacteriófagos	19
	G. Producción y titulación de bacteriófagos	20
	H. Aplicaciones de los bacteriófagos	20
IV.	JUSTIFICACIÓN	23
V.	OBJETIVOS	24
VI.	HIPÓTESIS	25
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
VIII.	RESULTADOS	33
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
X.	CONCLUSIONES	38
XI.	RECOMENDACIONES	39
XII.	REFERENCIAS	40
XII.	ANEXOS	43

I. RESUMEN

Los bacteriófagos son virus que infectan y se replican en bacterias, causando muerte celular por lisis. Esta capacidad lítica en bacterias, se ha empleado para tipificación, clasificación, tratamiento de aguas, desinfección, terapia, etc., en donde se requiere de una especificidad para eliminar hospederos potencialmente patógenos.

Los bacteriófagos también pueden poseer un ciclo de vida lisogénico, donde el genoma viral queda integrado al genoma bacteriano pasando a las progenies; posteriormente puede entrar al ciclo lítico, replicándose y liberando múltiples bacteriófagos que alcanzan a otros hospederos de la misma especie.

El propósito del presente estudio fue el aislamiento de bacteriófagos específicos para cepas de *Escherichia coli* implicadas en casos de diarrea en niños menores de dos años del área rural guatemalteca. Se utilizaron cuatro cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP) y cuatro cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET), identificadas por medio de la reacción de aglutinación en tubo y pruebas inmunoenzimáticas (EIA). Como cepas control se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC (American Tipe Culture Collection) 25923, *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *E. coli* ATCC 25922.

Para el aislamiento de los bacteriófagos se emplearon dos metodologías, las cuales fueron estandarizadas previamente en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Las metodologías fueron de plaqueo por goteo y lisis en caldo, siendo el método de plaqueo por goteo más efectivo y sensible para la detección de bacteriófagos, aunque los dos métodos empleados son útiles para la recuperación y purificación de fagos.

Se encontraron tres tipos de bacteriófagos distintos, que ejercen acción lítica en tres diferentes cepas de *E. coli*, de las cuales dos cepas pertenecen a ECET y una a ECEP. Los bacteriófagos fueron aislados en filtrados de aguas recolectadas en los ríos Las Vacas (Zona 16) y Villalobos (Zona 12). Del análisis bacteriológico de las aguas de los ríos se aisló *E. coli* no tipificada, lo que demuestra que los bacteriófagos pueden aislarse en ambientes donde exista su hospedero.

Ninguno de los bacteriófagos recuperados mostraron tener especificidad para las cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. flexneri* ATCC 12022 y *E. coli* ATCC 25922. Algunas de las bacterias de ECEP y ECET inicialmente sensibles mostraron ser capaces de crear resistencia a la acción lítica del fago, presumiéndose un ciclo lisogénico para el mismo o bien rearrreglos genéticos en el parásito u hospedero.

Finalmente, los bacteriófagos fueron purificados con cloroformo y almacenados a -20°C en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad diarreica en la población infantil, es un grave problema de salud en los países subdesarrollados, debido a que produce una alta tasa de morbilidad y mortalidad; la población infantil más afectada, es la menor de dos años. Entre los agentes bacterianos relacionados con enfermedades diarreicas se encuentran *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* y otros.

Las diarreas en niños del área rural de Guatemala han sido ampliamente estudiadas por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), donde se ha determinado que la etiología varía dependiendo de las condiciones climáticas, medidas de higiene y estado nutricional del individuo; se encontró que las bacterias que presentan una alta tasa de morbilidad son cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP) y *E. coli* enterotoxigénica (ECET).

Diferentes formas de tratamiento han sido utilizadas para combatir a los agentes bacterianos, pero desde hace mucho tiempo se habían iniciado estudios en bacteriófagos, los cuales son agentes vírales específicos de bacterias que presentan la capacidad de lisar a sus hospederos. Lastimosamente los estudios al respecto fueron abandonados debido a la introducción de agentes antibacterianos conocidos hoy en día como antibióticos.

El interés de retomar los estudios en bacteriófagos se ha incrementado en los últimos años, a consecuencia del aumento en los reportes de multirresistencia de bacterias patógenas, así como también la presencia de organismos reemergentes. Por lo que las aplicaciones de los bacteriófagos puede presentar una alternativa con un fuerte impacto en el control y erradicación de las mismas.

En el presente estudio se investigó la presencia de bacteriófagos específicos para *E. coli* diarreogénicas, asociadas a casos infantiles del área rural de Guatemala, con el aislamiento y purificación de estos agentes vírales se puede iniciar una etapa de investigación y desarrollo de este campo alterno, como un tratamiento potencial que tienda a disminuir la morbilidad de esta etiología y contribuir al bienestar de la población infantil.

III. ANTECEDENTES

A. *Escherichia coli*

1. Generalidades

Escherichia coli es un microorganismo ampliamente distribuido en todo el mundo. Suele encontrarse junto a muchos otros agentes bacterianos en el contenido intestinal del hombre y de animales, formando parte de la microbiota normal. En general *E. coli* no causa enfermedades, pero en algunas ocasiones actúa como una bacteria patógena de mucha importancia en la bacteriología médica y veterinaria (1,2).

Las infecciones que *E. coli* puede causar son múltiples entre ellas están: infecciones urinarias, en heridas, peritonitis, meningitis, endocarditis, neumonía y septicemia; además puede causar diarrea en niños menores de dos años (2,3).

En la actualidad se reconoce que el género *E. coli* posee varios cientos de tipos antigénicos. Los tipos se caracterizan por ser combinaciones diferentes de los antígenos, por lo que resultan varios miles de serotipos; los antígenos son:

- O, que es un antígeno lipopolisacárido de la pared celular,
- K, que es un antígeno polisacárido de la cápsula,
- H, antígeno proteínico flagelar (3,4).

E. coli es una bacteria bacilar, Gram negativo, indol positivo, oxidasa negativo, y anaerobia facultativa. Es activamente fermentativa con producción de gas a partir de la degradación de glucosa e incapaz de utilizar citrato como única fuente de carbono (5,6).

La *E. coli* es el microorganismo de vida libre mejor estudiado. De esta bacteria, se han identificado cuatro clases diferentes, las cuales provocan distintos tipos de diarrea (6).

Escherichia coli enterotoxigénica (ECET)

Escherichia coli enteroinvasiva (ECEI)

Escherichia coli enteropatógena (ECEP)

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH)

2. Historia

Por muchos años la diarrea ha sido considerada como la causa principal de morbilidad y mortalidad infantil (7,8). Aún cuando la diarrea asociada con morbilidad es actualmente un problema particular de países subdesarrollados, esta se incrementó con la revolución industrial y la urbanización (7).

Muchos autores atribuyen el descubrimiento de *E. coli* diarreogénica a John Bray, pero el primero en sugerir la patogenicidad intestinal de *E. coli* fue Laurelle, quien en 1889 indicó que este microorganismo podía ocasionar peritonitis si era liberado dentro de la cavidad peritoneal como resultado de perforación intestinal. Laurelle también propuso la posibilidad de que *E. coli* fuera la causa de diarrea y vómito (3).

En 1897 Lesage sugirió que existían cepas dañinas y no dañinas, las cuales podían ser diferenciadas las unas de las otras con base a pruebas serológicas. Lesage mostró que el suero de un paciente convaleciente de diarrea, aglutinaba bacterias obtenidas de otro paciente durante una epidemia. Este suero sin embargo no aglutinaba otros patógenos entéricos o cepas de *E. coli* obtenidos de niños sanos (3,9).

Entre los años de 1908 a 1910, Barh investigó 117 niños daneses con diarrea y concluyó que *Escherichia coli* jugaba un papel importante en la enfermedad. Davison, en Baltimore, cultivó el fluido duodenal en niños que murieron de gastroenteritis inespecífica. De este apareció un crecimiento masivo de *Escherichia coli*, pero Davison lo atribuyó a un acumulo de restos alimenticios no digeridos (3).

Aún cuando se habían acumulado datos acerca de la patogenicidad de *E. coli*, su papel como causante de diarrea en el humano fue establecido hasta 1945, cuando John Bray publicó un importante artículo, en el cual relacionó a *Escherichia coli* antigenicamente homogénea como la causante de la diarrea de verano (3,10,11).

Los hallazgos de Bray fueron confirmados por otros científicos. En 1949 Giles *et al.*, describieron un brote de diarrea causado por *E. coli*, que ocurrió en Aberdeen, Escocia, y que involucró 207 niños, de los cuales 150 habían muerto (12).

3. Serotipificación de *Escherichia coli*

Los estudios epidemiológicos iniciales de *E. coli* se vieron impulsados por Kauffmann, quien en los años 40 perfeccionó el esquema de serotipificación, basándolo en los antígenos **O** somático, **H** flagelar y **K** capsular (13).

Kauffmann y Dupont mostraron que muchas de las cepas asociadas con diarrea infantil pertenecían a los serogrupos O55 y O111. Subsecuentemente serogrupos adicionales fueron incrementados; para 1957 se conocían al menos 13 serogrupos **O** causantes de diarrea (3,13,14).

El término *E. coli* enteropatógena fue propuesto por Neter, para referirse a aquellas cepas de *E. coli* incriminadas epidemiológicamente con diarrea infantil. Los trabajos de Ewing *et al.*, son valiosos, pues entre los años de 1950-1961 investigaron más de 8000 cultivos, demostrando que no todos los serotipos de *E. coli* pertenecientes a un serogrupo **O** particular eran patógenos (3, 15).

Estudios recientes demuestran que cada serotipo individual de *E. coli*, no importando su origen geográfico comparten no sólo los antígenos O y H sino que también poseen antígenos comunes de las fimbrias y proteínas de la cubierta. Además cada serotipo O:H es un biotipo comúnmente reconocido, que puede ser tan característico como para permitir la predicción del serotipo a partir del biotipo y viceversa (16,17).

4. Epidemiología

La diarrea infecciosa es una causa común de enfermedad infantil. La etiología de esta varía de acuerdo con las condiciones climáticas, estado nutricional del individuo, y otras circunstancias. Estudios previos han demostrado que en poblaciones urbanas, las principales causa de diarrea, son los rotavirus y *Salmonella* sp., mientras que en áreas rurales, especialmente donde el agua es escasa y las medidas higiénicas son deficientes, ECET, *Shigella* sp., y otros agentes bacterianos asumen un papel importante (18).

En el continente asiático, particularmente en Bangladesh, *Escherichia coli* produce una infección que no es posible distinguir clínicamente del cólera, la cual se asocia con un alto índice de mortalidad, aún cuando esta enfermedad puede tratarse efectivamente con terapia de rehidratación oral. Los estudios que se han llevado a cabo en Etiopía y en la Republica central de África, la mayoría de *E. coli* involucrada en diarrea pertenece a las categorías ECEP y ECET (18).

En estudios hechos en Europa y Estados Unidos se encuentra a ECEP como causante de diarrea. Los serogrupos O55, O111 y O127 fueron aislados de niños con gastroenteritis y causaron diarrea en adultos voluntarios (18).

En los países desarrollados, *E. coli* no es una causa común de diarrea, ya que la transmisión de esta bacteria ocurre principalmente por comida y agua contaminada con heces fecales y la transmisión secundaria de persona a persona ocurre en casos muy limitados debido a que es necesario ingerir un número elevado de microorganismos (10^6 - 10^9), para causar la enfermedad. Sin embargo, se han descrito pequeños brotes en hospitales y en guarderías infantiles, así como epidemias por contaminación de agua como ocurrió en el Lago Crater, Oregon en 1978. La diarrea del viajero es un riesgo asociado con *E. coli* para personas que viajan a países subdesarrollados con medidas higiénicas deficientes (3, 8, 10).

En América Latina, la frecuencia de aislamiento de *E. coli* como agente causal de diarrea ha sido muy variable. En un estudio llevado a cabo en Costa Rica, ECET, aparece como un importante agente causal de diarrea en niños menores de 2 años, aislándose del 30% de los casos estudiados, mientras que en un estudio similar realizado en Brasil, se aisló ECET del 13.4% de los casos en niños de la misma edad (18).

En Guatemala la frecuencia de las diarreas es muy elevada, considerándose como la causa principal de muerte entre los niños de 1 a 4 años de edad. Los agentes biológicos son la causa principal en el desencadenamiento de casos de diarrea, la mayor parte de los estudios sobre el problema han sido enfocados desde ese punto de vista (19).

Sánchez Reyes, realizó una investigación de 112 casos de diarrea infantil en las salas - cuna del Hospital General de Guatemala. Encontró que la ECEP, estaba presente en 13 niños (11.6%) como agente etiológico responsable de diarrea infantil, en varias ocasiones asociada a otros microorganismos enteropatógenos, siendo los serotipos O111:B4, O26:B6, O127:B8, y O55:B5, los más frecuentes (19).

Gordon investigó una epidemia de diarrea en Santa María Cauqué, comunidad rural del departamento de Sacatepéquez, que afectó a gran parte de la población (559 casos), y originó 7 muertes. El examen bacteriológico reveló que el 21.3 por ciento de los casos de diarrea estaban infectados con bacterias enteropatógenas conocidas. Los agentes causantes fueron: *Shigella flexneri* (15 %), *Shigella dysenteriae* (2.2 %), *Salmonella* (0.2 %). La ECEP, se observó en un 3.4% (19).

Mata *et al.*, practicaron también un estudio bacteriológico en 60 niños, en su mayoría menores de 2 años, que presentaban cuadros diarreicos serios, motivo por el cual fueron admitidos en el Servicio de Hidratación y Emergencia del Hospital Roosevelt. La prevalencia encontrada para *Shigella*, *Salmonella* y ECEP es, hasta la fecha, la más alta en Guatemala, ya que estos microorganismos fueron hallados solos o asociados entre sí, en 38.3 % de los casos. La *Shigella* se encontró en un 25 %, la ECEP en un 16.6 % y la *Salmonella* en 10% de los casos (19).

Un estudio hecho en Guatemala en 1980 mostró a ECET productora de toxina estable en el 7% de 363 casos y ECET productora de toxina lábil en 13% de los casos en niños de 0-3 años (18).

Otro estudio, realizado también en Guatemala por Cruz *et al.*, en 1986 en un área marginal de la ciudad (colonia El Limón) con 1979 niños, permitió considerar que ECET se puede asociar al 17 % de los episodios, siendo la mayoría de ellos debidos a toxinas termolábil. La ECEP es el patógeno más importante en esta población, ya que el 35 % de los episodios de diarrea se deben a ella (18,20).

B. Patología

1. *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)

Estas cepas fueron las primeras de *E. coli* implicadas en enfermedades diarreicas y continúan siendo una causa importante de gastroenteritis infantil en muchas parte del mundo. La serotipificación es un excelente método para establecer la virulencia de ECEP, por lo que se utiliza como marcador epidemiológico. Actualmente, con ayuda del microscopio electrónico, se han observado lesiones histopatológicas típicas, en las cuales

las bacterias están adheridas a las células epiteliales con destrucción del borde de cepillo, pero sin invasividad (6,21).

ECEP provoca una diarrea grave y prolongada que aparece típicamente en bebés y niños menores de dos años. La enfermedad se caracteriza por una diarrea acuosa y una deshidratación de rápida evolución, además provoca fiebre, malestar y vómitos. La infección provocada por la ECEP puede producir deficiencias de crecimiento (6,21).

La susceptibilidad a la infección clínica al parecer se limita virtualmente a los lactantes de corta edad; sin embargo, no se sabe si ello se debe a la inmunidad o a factores específicos del hospedero con relación a la edad, dado que la diarrea puede inducirse experimentalmente en algunos adultos voluntarios. La infección por ECEP es poco común en pequeños alimentados al pecho (6,21).

El período de incubación es de 9 a 12 horas en estudios con voluntarios adultos. No se sabe si el mismo período de incubación es válido en los lactantes que adquieren la infección por transmisión natural (21).

2. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)

Es la segunda categoría más grande de *E. coli* asociada con diarrea y surgió a finales de los años 60 y principios de los 70, esta bacteria puede producir una de las mayores respuestas fisiológicas conocidas en una infección humana.

La ECET no invade la mucosa intestinal, ni causa cambios estructurales significativos en el tejido intestinal, sin embargo es capaz de causar grandes pérdidas de líquido extracelular al punto de provocar colapso y muerte en pocas horas. Estos cambios fisiológicos son provocados por la producción de enterotoxinas que alteran profundamente las funciones secretoras del intestino delgado (6,21,22).

Las cepas enterotoxigénicas constituyen una causa importante de diarrea de los viajeros de países industrializados que visitan a otros menos desarrollados; también constituye una causa importante de diarrea deshidratante en los lactantes y niños en los países menos desarrollados (21).

En la actualidad se conocen 2 tipos de toxinas de *E. coli*: una termolábil (TL) y otra termoestable (TE); ambas han sido aisladas y purificadas (6,23).

En *E. coli*, la propiedad de elaborar las toxinas TL y TE, se encuentran mediadas por plásmidos, que son elementos genéticos extracromosómicos de replicación autónoma en relación con el cromosoma de la bacteria. Estos plásmidos se han designado como Ent y se han encontrado en un alto porcentaje de las cepas toxigénicas en contraste con las cepas no toxigénicas que lo presentan en un bajo porcentaje (18).

La toxina lábil se encuentra relacionada funcional, estructural e inmunológicamente con la toxina de *Vibrio cholerae*. Ambas toxinas comparten antígenos entre sí, se unen a través de su región beta a los receptores de membrana que contienen gangliósido Gm y ambas activan la adenilato ciclasa, provocando un incremento de los niveles intracelulares de 3'-5'-adenosin-monofosfato cíclico (AMPC) (18).

La toxina estable muestra mayor heterogeneidad, por ello preparaciones purificadas por diferentes laboratorios han dado resultados variables, dificultando la preparación de un antisuero útil para la identificación de esta toxina, la cual se ha determinado que no es inmunogénica debido a su bajo peso molecular que se ha calculado en 1.5 a 5 kilodaltons (18).

Se ha demostrado que el cuadro clínico del paciente se encuentra relacionado con el tipo de enterotoxina producida. Así, la diarrea es más severa y de mayor duración en personas a las que se les aíslan cepas productoras de TL y TE, en relación con aquellas a quienes se les aíslan cepas productoras de TE únicamente (18).

La mayoría de cepas ECET poseen fimbrias en su superficie, las cuales actúan como verdaderos factores de virulencia a ayudar a la colonización del intestino delgado y por lo tanto la producción de diarrea (6).

En brotes y en estudios con voluntarios con algunas cepas que poseen solo TL y solo TS se han observado período de incubación cortos, incluso de 10 a 12 horas. En la diarrea por cepas TL/TS en estudios con voluntarios, la incubación por lo común ha sido de 24 a 72 horas (21).

3. *Escherichia coli* enteroinvasora (ECEI)

Este microorganismo produce diarrea sanguinolenta acompañada por fiebre, vómitos y dolor abdominal de tipo cólico. Invade y destruye el epitelio del colon, produciendo diarrea con sangre y leucocitos en las heces. La enfermedad se ha asociado a serotipos O específicos de *E. coli*, no obstante la clasificación serológica no permite identificar con precisión las cepas invasivas (6).

Su principal característica patogénica es la capacidad de invadir y proliferar dentro de las células epiteliales, causando eventualmente, la muerte de las mismas. La capacidad invasiva es similar al de *Shigella* sp., y esta depende de la presencia de un plásmido de aproximadamente 140 megadaltons, que codifica la producción de proteínas de la membrana externa responsables de la invasividad (18).

Las infecciones por ECEI son endémicas en los países en desarrollo y causan de 1 a 5% de los episodios de diarrea en las personas que acuden a centros de atención de salud. En los países industrializados se han notificado infecciones y brotes ocasionales de diarrea por ECEI (21).

El período de incubación obtenido en estudios con voluntarios y en brotes, son tan cortos como de 10 y 18 horas, respectivamente (21).

4. *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

Esta categoría de *E. coli* que causa diarrea se identificó en 1982, cuando surgió un brote de colitis hemorrágica en los Estados Unidos y se demostró que había sido causado por un serotipo no común de *E. coli*, O157:H7 que no se había considerado como patógeno entérico. La diarrea puede variar desde un cuadro benigno, con expulsión de heces sin sangre, hasta excrementos que son prácticamente hemáticos pero sin leucocitos (21,24).

La ECEH además de diarrea genera colitis hemorrágica y en ocasiones, síndrome urémico hemolítico (SUH), una enfermedad caracterizada por insuficiencias renales y nefropatías como la inflamación de los riñones, uretritis (inflamación de la mucosa que recubre la uretra), cistitis (inflamación aguda de la vejiga), pielitis (inflamación de la pelvis renal) y edemas. Además provoca una baja de los glóbulos rojos repentina.(6)

ECEH elabora citotoxinas potentes llamadas toxinas 1 y 2 de Shiga. La toxina 1 de Shiga es idéntica a la toxina de Shiga elaborada por *Shigella dysenteriae* 1. Anteriormente se llamó a tales toxinas verotoxinas 1 y 2 y toxinas I y II similares a la Shiga (21).

En América del norte casi todas las cepas del serotipo ECEH más común, O157:H7 se identifican en cultivos de excremento por su incapacidad de fermentar el sorbitol en medios como el MacConkey-sorbitol el cual es utilizado para identificar *E. coli* O157:H7. Se sabe que algunas cepas de ECEH fermentan sorbitol, razón por la cual hay que utilizar otras técnicas para detectar ECEH; ellas incluyen la demostración de la capacidad de elaborar toxinas de la Shiga (21).

El período de incubación en general es relativamente largo, de dos a ocho días, con una mediana de tres a cuatro días (21).

El período de transmisibilidad dura mientras persiste la excreción del agente patógeno, que en forma típica es de una semana o menos en los adultos, pero de tres semanas en un tercio de los niños (21).

C. Bacteriófagos

1. Generalidades

Hace más de un siglo, Hankin (1896) reportó que aguas de los ríos Ganges y Jumna en la India tenían un marcado poder antibacteriano el cual atravesaba filtros muy finos de porcelana; y era destruido por el calentamiento. Hankin estudió particularmente los efectos que tenía esta agua sobre el *Vibrio cholerae* y sugirió que esta sustancia era la responsable

de evitar los brotes epidémicos de cólera por ingestión de las aguas de estos ríos. Las investigaciones hechas por Hankin nunca se centraron en la exploración del fenómeno (25, 26).

Frederick Twort (1915) y Felix d'Herelle (1917) reportaron independientemente el aislamiento de un agente filtrable capaz de destruir los cultivos bacterianos y producir pequeñas áreas claras en las capas de bacterias que parecía involucrar que partículas muy pequeñas estaban involucradas con el fenómeno. A ellos se les da el crédito del descubrimiento de los bacteriófagos (25).

Felix d'Herelle trabajó en el Instituto Pasteur en París en donde les dio el nombre de Bacteriófagos (1,30,31). D'Herelle, trabajó 10 años en Guatemala, México y Argentina. En estos lugares trato con las disenterías epidémicas, fiebre amarilla, el hongo que ataca al café, y aislando bacterias que eran capaces de destruir a las langostas con lo que lograba el control de las plagas de langostas. En otros estudios aisló bacteriófagos con actividad en contra de la toxina Shiga. En Francia realizó estudios con bacteriófagos, los cuales incluyen ciclo lítico de los bacteriófagos, propiedades de los bacteriófagos, clasificación de bacteriófagos, ciclo infectivo, formación de placas de lisis en medios de cultivo, aislamiento de fuentes de aguas, factores para controlar la estabilidad de los bacteriófagos y aislamiento de agentes terapéuticos para enfermedades bacterianas que se daban en esos días (25).

Desde el descubrimiento de los bacteriófagos se consideraron sus aplicaciones médicas y fueron usados para curar disentería, tifus, paratífus cólera, e infecciones del tracto urinario. También fueron utilizados contra enfermedades como cálculos biliares, eczema las cuales no son causadas por infecciones bacterianas. Muchos ensayos fueron basados más en euforia que en conocimiento científico de bacteriófagos o microbiología (28).

Otras de las aplicaciones de los bacteriófagos, ha sido el uso de estos para la identificación bacteriana, cuyo proceso es llamado fago tipificación, el cual usa una batería de fagos con patrones ya conocidos para identificar cepas microbianas (25).

2. Estructura de los bacteriófagos

Casi todos los virus están contruidos de manera similar, tienen un nucleoide de ácido nucléico cubierto por una capa proteínica. El ácido nucléico está compuesto por una molécula de cadena sencilla o doble en forma de asa o filamento continuo. La cubierta de proteína varía de forma y tamaño (4,27).

La forma y tamaño de los bacteriófagos varía bastante de una especie a otra, pero al observarlos al microscopio electrónico, todos presentan una estructura básica que puede ser poliédrica o filamentosa (4,27).

Los virus se componen de un ácido nucleico que les da su capacidad infectante. Este ácido nucleico está rodeado por una cubierta proteínica llamada cápside, formada por subunidades llamadas capsómeros, además la cápside pueden poseer una envoltura lipoproteínica. Estas proteínas confieren especificidad al virus y le proporcionan la morfología (4,27).

Los virus bacterianos presentan seis tipos morfológicos:

- a. Los más complejos tienen una cabeza poliédrica, cola rígida con una vaina contráctil y fibras caudales.
- b. Similares a los primeros, excepto que carecen de una vaina contráctil; su cola es flexible y tienen o no apéndices terminales.
- c. Se caracterizan por tener cabeza poliédrica y cola más corta que la cabeza; su cola no es contráctil y puede o no tener apéndices.
- d. Poliédrico con un capsómero grande en cada vértice; no tiene cola.
- e. Un poliedro simple sin los grandes capsómeros del grupo anterior
- f. Un filamento sencillo y largo sin cabeza u otra estructura característica de la mayor parte de los bacteriófagos (4).

La forma predominante en los fagos es la estructura poliédrica de la cual el más común es el icosaedro (poliedro regular con 20 caras triangulares y 12 vértices). Generalmente van provistos de una cola que varía en cuanto a tamaño, forma y complejidad según las especies, esta cola puede poseer a su vez varios apéndices, como fibras o estructuras terminales. Los fagos que no poseen cola suelen tener pequeñas espículas ubicadas en los vértices del icosaedro. Los fagos filamentosos son bastante simples, pues carecen de apéndice, y su estructura es más bien cilíndrica, con el ácido nucleico ubicado en una cavidad helicoidal interna (29).

La morfología de los bacteriófagos y el tipo de ácido nucleico que posea predice el tipo de hospedero que infectará. Para la familia Enterobacteriaceae los bacteriófagos que la infectan pueden ser ARN o ADN, aunque los dos poseen una cabeza larga octaédrica con o sin fibras contráctiles (4).

3. Composición química

Los fagos están compuestos por un solo tipo de ácido nucleico y nunca por ambos. Según el tipo de ácido nucleico que contenga se les denomina fagos ADN o ARN. Las proteínas antes mencionadas son otro componente de la estructura de los fagos. Algunos

fagos contienen además poliaminas tales como espermina y espermidina, cuya función consiste en facilitar el empacamiento del ácido nucleico. En Chile se descubrió un fago que a diferencia de los demás poseía en su estructura también lípidos. Los lípidos de este fago, denominados PM₂, forman una membrana que envuelve a la nucleoproteína al igual que varios virus animales. El ácido nucleico del fago contiene información necesaria para la reproducción de éste en la bacteria sensible. Se encuentra alojado en el poliedro o filamento, protegido por las proteínas de la acción de nucleasas. El ácido nucleico de los bacteriófagos puede ser ADN o ARN, el ADN puede ser a su vez monoténico o biténico. Hasta ahora sólo se han descritos bacteriófagos con ARN monoténico, aunque se conocen virus animales con ARN biténico (30).

a. Bacteriófagos de ARN

Los virus bacterianos de ARN mejor conocidos tienen ARN de una sola cadena. Estos virus infectan solamente a células bacterianas que se comportan como donadores de genes a la recombinación genética. Esta restricción a las células bacterianas surge debido a que estos virus infectan a bacterias fijándose a los pelos específicos de la bacteria (31).

Todos los virus bacterianos de ARN son muy pequeños, miden alrededor de 26 nm y son icosaédricos con 180 copias de proteína capsular por partícula viral. Se conocen las secuencias completas de nucleótidos de varios genomas de fago ARN. En el fago de ARN MS2, que infecta a *E. coli*, el ARN viral tiene 3,569 nucleótidos de largo (31).

b. Bacteriófagos icosaédricos de ADN monoténico

Algunos virus bacterianos pequeños tienen genomas que constan de ADN de una sola cadena en configuración circular. Estos virus son muy pequeños, midiendo alrededor de 25 µm de diámetro y el principal bloque de construcción de su cubierta proteínica es una proteína sencilla que existe en 60 copias, a la cual se unen en los vértices del icosaedro otras proteínas distintas que forman estructuras semejantes a una espiga. En contraste con los virus de ARN ya existe en la célula gran parte de la maquinaria enzimática para la duplicación del ADN. Estos pequeños virus, de ADN tienen solamente una cantidad limitada de información genética en sus genomas y se utiliza la maquinaria de replicación del ADN de la célula hospedera en la replicación del ADN del virus (31).

c. Bacteriófagos de ADN biténico

Muchos virus bacterianos tienen genomas que contienen DNA biténico. Estos fueron los primeros virus descubiertos y han sido los más ampliamente estudiados. Los virus más conocidos y más representativos del grupo son el fago T4 y el T7 (31).

El bacteriófago T7 es un virus de ADN relativamente pequeño que infecta a *E. coli*. La partícula viral tiene una cabeza icosaédrica y una cola muy pequeña. La partícula viral es muy compleja, tiene 5 proteínas diferentes y de 3-6 proteínas diferentes en la cola. Una de las proteínas de la cola, la proteína fibrosa, es el medio por el cual la partícula viral se fija a la superficie de la célula bacteriana (31).

D. Ciclo reproductivo

En los bacteriófagos la reproducción se lleva a cabo dentro de las células bacterianas. Estos tienen un tipo de bacteria en específico a la cual atacan; y no pueden atacar células más complejas debido a las diferencias en los códigos de la maquinaria intracelular y las proteínas de superficie. La mayoría de los bacteriófagos poseen filamentos que le permiten la unión a la bacteria y la reproducción en ella (Ver Anexo No. 1), (4,27).

Los pasos básicos del ciclo reproductivo de los bacteriófagos son:

- adsorción
- penetración
- período de eclipse
- maduración o ensamblaje
- lisis

1. Adsorción

El primer paso en la reproducción de los fagos es la adsorción, esta se lleva a cabo cuando la punta de la cola viral se adhiere a la pared bacteriana. Aunque aún no está claro, se supone que la adsorción se debe a que determinados virus y sus células susceptibles tienen configuraciones moleculares complementarias en los sitios receptores opuestas. Esto ocurre además porque el huésped lleva una carga eléctrica negativa y debe ocurrir cierta concentración de cationes para que el fago y la célula se aproximen bastante y ocurra la adsorción (4,29,30).

La adsorción o fijación del fago a la bacteria se puede demostrar fácilmente por microscopía electrónica de las células infectadas. Esta técnica se ha usado ventajosamente en el examen detallado de las estructuras inherentes a la adsorción, aunque esta técnica no permite el estudio cuantitativo o cinético del proceso. La cinética de adsorción puede, en cambio, comprobarse midiendo el número de fagos no adsorbidos a distintos intervalos de tiempo después de agregarlos al cultivo de bacterias (30).

En todos los fagos la cinética de adsorción es de primer orden, es decir que:

$$\text{Log}_{10} P/P_0 = 1/2.3(kNt)$$

Donde P es el número de partículas no adsorbidas al cabo del tiempo t, P₀ el número de fagos iniciales, N la concentración de bacterias y k la constante de velocidad de adsorción. Se podría pensar que la reacción fuese de segundo grado, dado que hay dos reactantes, fago y célula bacteriana, pero la bacteria posee una infinidad de receptores específicos para el fago, este reactante se encuentra en exceso. Aunque la condición de segundo orden se da cuando se sobresatura la reacción con fagos. El número de fagos adsorbidos por bacterias se denomina multiplicidad de infección (30).

2. Penetración

El fago una vez adsorbido a la célula bacteriana, introduce en ella el material que transporta la información necesaria para la síntesis de su propia progenie, llamándose a este paso penetración que conlleva los siguientes pasos (30).

- Adhesión de fibras caudales a la membrana celular firmemente
- La vaina de la cola se contrae y la porción hueca interior de la cola penetra en la célula, esto se logra por la presencia de una lisosoma en la cola viral que hidroliza la capa rígida de la pared bacteriana.
- La inyección de ADN se hace como lo haría una jeringa al vacunar (30, 31).

La identificación lograda en 1952 del ADN como el componente viral inyectado en la célula atacada, sugirió que el ADN era el compuesto clave de la continuidad hereditaria de los virus y condujo a la aceptación de él como la base física de la herencia en los seres superiores (30, 31).

3. Período de eclipse

Durante el período latente, o sea el intervalo de tiempo comprendido entre la adsorción irreversible y la aparición de las primeras partículas infecciosas extracelulares, el ácido nucléico del fago debe desencadenar una secuencia de eventos que producirán finalmente las partículas infecciosas de la progenie. Durante la fracción de este período en que el fago no es infeccioso se denomina fago vegetativo, y el lapso, durante el cual no se encuentran partículas infecciosas en el interior de la célula, se denomina período de eclipse. Durante este período el ácido nucléico del fago induce la síntesis de los componentes virales y al posterior ensamblaje de éstos para formar fagos infecciosos. La secuencia y los mecanismos de estos eventos constituyen uno de los aspectos más fascinantes de la biología molecular (30, 31).

Durante la biosíntesis de los componentes virales, la célula atacada sirve de fuente de energía y además provee la mayoría de los precursores y la maquinaria para la síntesis de las macromoléculas virales. La síntesis de estas macromoléculas requieren ciertos cambios en la maquinaria normalmente destinada a la formación de los componentes celulares. Tales cambios se producen por la inducción de nuevas enzimas o de elementos estructurales que actúan en sitios claves del sistema (30).

Los fagos están formados por proteínas, ausentes en la bacteria no infectada, que se sintetizan después de la infección a partir de aminoácidos. Este hecho fue mencionado ya en relación con la ausencia de antígenos comunes al fago y a la bacteria atacada (30).

Las propiedades de las proteínas estructurales de los fagos no dependen de la bacteria hospedante, sino del ácido nucleico del fago. La prueba más convincente de este hecho radica en que es posible modificar las propiedades de estas proteínas, tratando el fago con agentes mutagénicos que alteren la secuencia de las bases en el ácido nucleico (30).

Para la formación de proteínas, la información necesaria para construirla es transcrita desde una de las cadenas helicoidales del ADN al ARN mensajero y, posteriormente, traducida en la secuencia de aminoácidos por la acción de los ribosomas, del ARN de transferencia y de varias enzimas. La información cifrada en el ARN, en tripletes, mediante un sistema de cuatro símbolos (adenina, uracilo, guanina y citosina), se traduce en la secuencia de aminoácidos de las proteínas con un código de 20 símbolos (los aminoácidos) por la acción ARNt, actúa de intérprete. Para este efecto, cada ARNt posee dos funciones, una que le permite reconocer un aminoácido específico o, exactamente, ser reconocido por la enzima que lo une o carga con el aminoácido, y otra para reconocer las tres bases contenidas en el triplete o codón que especifica el aminoácido que debe ser añadido (30).

Después de la infección ocurren varios cambios en la maquinaria celular de la síntesis de proteínas, que desvían su línea de producción hacia la síntesis de proteínas requeridas para la multiplicación del fago. El principal requerimiento para esto es la incorporación de ARN mensajero viral al sistema de sintetizante de proteínas, con frecuencia acompañado del desplazamiento del ARN mensajero bacteriano. Las modificaciones que provocan estos cambios son bastante sutiles, de tal manera que la mayoría de los componentes del sistema como ribosomas, ARNt y las varias enzimas, parecerían continuar funcionando en el mismo estado que tenían antes de la infección (30).

Las distintas proteínas inducidas por el fago no se sintetizan en forma simultánea, ni en cantidades equimoleculares; hay un eficiente mecanismo de regulación, tanto en la secuencia en el tiempo como de la cantidad en que se sintetizan diversas clases de proteínas. El bacteriófago T4, por ejemplo, sintetiza en secuencia al menos 4 clases de proteínas; apenas iniciada la infección, se puede detectar la inducción de varias proteínas; la síntesis de éstas es posteriormente inhibida y reemplazada por la de una nueva clase

formada de diferentes proteínas, este ciclo se repite varias veces. El bacteriófago F2 es un buen ejemplo de la regulación de la cantidad de proteína sintetizadas; este fago debe sintetizar una de las proteínas estructurales en mucha mayor cantidad que otra que funciona como enzima. Se requiere 180 moléculas de la proteína estructural por partícula madura; y tan solo unas pocas de la enzima para satisfacer los requerimientos en la duplicación (30).

La biosíntesis del ácido nucléico viral requiere una fuente de energía, así como precursores de bajo peso molecular, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos para ARN o ADN, respectivamente y la maquinaria sintetizadora. Experimentos de diversa índole han establecido que el fago depende de la bacteria hospedante en cuanto a suministro de subunidades requeridas para la síntesis de polinucleótidos. Cualquier mutante de una bacteria que requiera algún nucleótido será incapaz de sintetizar el ácido nucléico viral, a menos que el nucleótido sea suministrado a la bacteria infectada. Algunos fagos que contienen bases raras como el T4, son sin embargo capaces de inducir las enzimas necesarias para la síntesis de ellas. El fago T4 induce una hidroximetilasa dCMP (deoxicitidina monofosfato) que hidroliza el dCMP normalmente encontrado en la bacteria para dar el dHCMP (deoxihidroxicitidina monofosfato) que posteriormente se incorporará a su ADN. Algunos fagos entre ellos el T4, no sólo utilizan los nucleótidos sintetizados después de la infección sino también los presentes en el ADN bacteriano; con este objeto, hidrolizan extensamente el ADN bacteriano en nucleótidos que son usados posteriormente en la síntesis del ADN viral; la situación encontrada varía según la especie de fago (30).

La síntesis del ácido nucléico consiste en la formación de polinucleótidos con una secuencia determinada. Los precursores inmediatos del ácido nucléico son los nucleótidos 5-trifosfato que son hidrolizados durante la formación del polinucleótido, liberando pirofosfato. La secuencia en que los nucleótidos se unen es especificada por el ácido nucléico viral, que actúa como molde. Las enzimas que catalizan este proceso han sido identificadas en algunas especies de fagos. La síntesis del ácido nucléico viral no termina con la polimerización, sino que muchas veces se requiere la acción de otras enzimas para producir un ácido nucléico idéntico al del bacteriófago. Por ejemplo, el ADN de los fagos T pares debe ser flucosilado y metilado; el ADN monoténico del fago M13 debe unirse en sus extremos para formar una molécula circular como la encontrada en las partículas maduras (30).

El proceso de la biosíntesis del ácido nucléico viral conlleva los siguientes pasos:

- Nucleótidos monofosfato
- Nucleótido trifosfato
- Polifosfato de secuencia igual al molde
- Acido nucléico viral

Durante el período latente se producen múltiples copias de ácido nucléico y de proteína viral, formándose en el interior de las células varios fondos de los distintos

precursores del fago. La maduración consiste en el ensamblaje específico de estos componentes, sintetizados por separado para producir finalmente fagos infecciosos (30).

4. Maduración o ensamblaje

Durante el proceso de maduración los distintos componentes del fago que serán ensamblados, se toman de los varios fondos existentes para cada componente, sin otro requerimiento aparente que el poseer la estructura que le corresponde. Uno de los fenómenos que condujo a estas apreciaciones es el llamado mezcla fenotípica, que se puede observar al infectar una misma bacteria con dos mutantes de T4, distintos en cuanto a la especificidad de su hospedante. Al analizar la progenie resultante de la infección, se puede observar, además de fagos idénticos a los infectantes, otros que contienen genotipos de un mutante y fenotipo de otro; estos fagos poseen ADN de un mutante, pero las fibras de la cola tienen la especificidad del hospedante del otro (30, 31).

EL ensamblaje parece ser un proceso espontáneo, durante el cual los distintos componentes estructurales del fago se unen mediante enlaces no covalentes y en una secuencia ordenada. Con algunos fagos estructuralmente simples que contienen ARN, ha sido posible lograr su ensamblaje *in vitro* mezclando el ARN con las proteínas estructurales en condiciones apropiadas. Pero es más difícil imaginar que este proceso se lleve a cabo espontáneamente en fagos de estructuras complejas, donde deben ocurrir más de 30 ensamblajes, en perfecto orden, por lo que aun no se descarta la participación de algunas enzimas (30).

5. Lisis

El período latente termina con la lisis de las bacterias y la liberación de los nuevos fagos. En varios fagos se ha demostrado la acción de una enzima, capaz de desintegrar la pared rígida de las bacterias y provocar de esta forma la lisis. Estas enzimas, similares a la lisozima en su acción sobre el mucopéptido de la pared, se llaman lisinas. La lisis no es, sin embargo, concomitante con la aparición de esta enzima, sino que parece estar controlada por un sistema complejo, dependiente del estado fisiológico de la célula. Así, por ejemplo el bloqueo de la producción de energía o ATP en las células infectadas, en que ya ha aparecido la lisina, provoca una lisis prematura (30,31).

No todos los fagos provocan la lisis de la bacteria atacada al final del ciclo reproductivo. Los fagos filamentosos como el M13 y otros, se liberan a través de la superficie de la bacteria en previa disrupción de ésta. Aún más, una bacteria infectada con estos fagos puede seguir reproduciéndose y formar colonias de 10^7 o más células sobre la superficie de agar (30).

6. Ciclo lítico

Las diferencias entre los periodos de latencia y actividad de la infección viral se deben a un cambio en el modo de replicación viral. Algunos virus se pueden replicar por lo que se conoce como ciclo lítico. Ellos entran e inyectan a la célula huésped con su ADN, obligándola a fabricar nuevos virus, hasta que la célula huésped explota liberando los patógenos al medio (32). El ciclo lítico consiste en los siguientes pasos:

Adsorción: la mayoría de los bacteriófagos se adhieren a la pared bacteriana, aunque algunos son capaces de adherirse al flagelo o al pili. Cepas específicas de bacteriófagos pueden adherirse solamente a cepas específicas de bacterias hospederas (32,33).

Penetración: adheridos los fagos a la bacteria, por medio de una enzima abren un agujero en la pared celular y el fago inyecta su genoma dentro del citoplasma de la bacteria, dando inicio al periodo de eclipse (34).

Replicación: el genoma del fago se replica utilizando la maquinaria metabólica bacteriana (32,33).

Maduración: se ensamblan las partes del fago (32, 33).

Liberación: lisozimas del fago rompen el peptidoglucano bacteriano causando una lisis osmótica y se liberan los bacteriófagos intactos (Ver Anexo No. 1) (33).

7. Ciclo lisogénico

Otros virus operan diferentemente: ellos entran e inyectan su ADN en la célula huésped pero, en vez de tomar el control y fabricar más virus, el ADN inyectado puede tornarse inactivo por un cierto tiempo, hasta que un apropiado evento celular dispara el proceso nuevamente. Este último ciclo se denomina temperado o lisogénico (Ver Anexo No.1) (33,35).

El esclarecimiento del ciclo se basó en los cuidadosos experimentos de Lwoff realizados con la ponderada técnica de observar y tener paciencia. Él observó el desarrollo de una bacteria aislada: *Bacillus megaterium* (bacteria de un tamaño superior a las otras) en finas gotas de medio. La observación reveló el secreto, si bien nunca se encontró partículas de fagos flotando en gotas que contenían una sola célula, se los encontraba en las colonias derivadas de esa sola célula. Lwoff pudo obtener la respuesta: ocasionalmente, cuando una sola célula bacteriana era observada, explotaba espontáneamente liberando cerca de 100 fagos (35).

Lwoff concluyó, que la célula huésped no era enteramente inmune al fago. Cuando el fago se torna activo en una bacteria de un cultivo lisogénico, fuerza al huésped a manufacturar más fagos, que eventualmente matan al hospedador y liberan fagos al exterior

cuando la misma explota. Sin embargo el cambio del ciclo lisogénico al lítico, era la excepción más que la regla. La mayor parte del tiempo, en la mayor parte de las bacterias huéspedes el fago se encuentra en la forma inactiva. Más tarde, Lwoff encontró que era posible inducir artificialmente que todas las células de un cultivo lisogénico entren en el ciclo lítico simultáneamente exponiendo los cultivos a la luz ultravioleta o a Rayos X (35).

E. Bacteriófagos de *Escherichia coli*

El grupo de fagos más extensamente estudiado es el perteneciente a la serie T, numerados del 1-7, que infectan las cepas inmóviles de *Escherichia coli*. Todos estos fagos se componen exclusivamente de DNA y proteína en aproximadamente igual cantidad. El tamaño de los fagos T varía de unos 65 a 200 nm de longitud y de 50 a 60 nm de grosor (4).

La molécula continua de DNA de doble cadena, mide alrededor de 50µm de largo, está fuertemente empaquetada dentro de la proteína de la cabeza. Se debe hacer hincapié en que los fagos T pares (T2, T4, T6) tienen una base inusual en su DNA, la 5-hidroxi-metilcitosina en vez de la habitual citosina (4).

Hay otros bacteriófagos de *Escherichia coli* cuya morfología y composición química son muy diferentes a la de los fagos T. El fago f2, por ejemplo, es mucho más pequeño que el T y tiene una molécula lineal de RNA de una sola cadena, en vez de DNA. Hay fagos que poseen DNA de una sola cadena. Morfológicamente pueden ser icosaédricos o filamentosos (4).

Un fago icosaédrico después de infectar una célula susceptible, el DNA de una sola cadena se convierte en la forma replicativa de DNA de doble cadena, pero solamente una cadena es finalmente incluida en una cubierta proteínica y es la que se desprende de la bacteria como partícula infecciosa madura (4).

Los fagos filamentosos están continuamente siendo producidos por bacterias viables y en reproducción, lo cual los distingue de los fagos icosaédricos típicamente líticos, así que la placa fágica filamentosa es turbia. La única razón de que esta zona sea así es porque las bacterias que liberan partículas de fago se desarrollan más lentamente. Entre los fagos filamentosos de *Escherichia coli* se encuentran el bacteriófago M13, fd y fl (4).

F. Aislamiento y cultivo de bacteriófagos

Los bacteriófagos se cultivan y aíslan con facilidad en cultivos jóvenes de bacterias en desarrollo activo, en caldo o en placas de agar. En los cultivos líquidos, la lisis de las bacterias causa desde enturbimientto hasta aclaración del cultivo, mientras que en las placas de agar, las zonas claras son visibles a simple vista (35).

La mejor fuente para recolectar bacteriófagos y la más usual, es el hábitat del hospedero. Por ejemplo, los colifagos que son los fagos patógenos de *Escherichia coli*, se aíslan mejor del drenaje o del estiércol. Esto se hace por filtración del material original (35).

Una cantidad pequeña del material filtrado se introduce en una capa sobrepoblada de bacterias en división activa, sobre una placa de agar nutritivo produce una capa de lisis más o menos clara sobre la película opaca del crecimiento bacteriano. Esta zona de lisis recibe el nombre de placa y resulta del hecho de que la célula huésped inicialmente infectada se lisa y libera docenas de nuevas partículas de fagos, esta a su vez infecta células vecinas. Este proceso se repite cíclicamente hasta que cesa el crecimiento bacteriano sobre la placa como resultado del agotamiento de los nutrientes y la acumulación de productos tóxicos (35).

Para la purificación de bacteriófagos se inoculan cultivos del hospedero bacteriano en un medio líquido y se incuban hasta que el cultivo se lisa por completo. El líquido claro llamado lisado solamente contiene en suspensión virus y restos celulares. Estos materiales se separan por centrifugación, el sedimento que es la porción donde se encuentran los bacteriófagos puede ser lavado hasta tres veces (35).

G. Producción y titulación de bacteriófagos

Para enriquecer una suspensión de fagos virulentos, se mezclan con un cultivo de la bacteria susceptible de ser infectada o bacteria hospedera. Tras la infección, las bacterias se aislaran y soltaran nuevas partículas fágicas al medio que se centrifuga para retirar los restos celulares. Para calcular el número de partículas fágicas se mezcla la suspensión con un cultivo exponencial de la bacteria hospedadora y se coloca sobre la superficie de una placa de agar. Después de la incubación se observa un césped bacteriano sobre el que aparecen pequeñas áreas circulares, claras que corresponden a las denominadas placas. Estas placas de lisis representan áreas de reproducción del fago y lisis de las bacterias infectadas en esa área. Puesto que estas placas son resultado de la infección de una partícula fágica se podrá determinar el número de unidades formadoras de placas por mililitro de suspensión (UFP/ml) mediante el recuento de dichas placas de lisis (35).

H. Aplicaciones de los bacteriófagos

1. Fagoterapia

Una posible alternativa para el tratamiento de las infecciones bacterianas puede ser el uso de los bacteriófagos. Para cada tipo de bacteria hospedera se encuentra un fago específico, el cual puede ser encontrado siempre que la bacteria esté presente. Estos fagos

pueden ser seleccionados y aislados como un antídoto de aguas negras, heces, suelo o polvo. El procesamiento de los bacteriófagos depende de la forma de aplicación. Para uso externo, para sanar heridas, el proceso es simple, pero para un tratamiento interno la solución de bacteriófagos debe ser purificada, eliminando restos bacterianos. Comparado con los antibióticos químicos los bacteriófagos ofrecen varias ventajas (28,36).

- a. Impacto limitante: a diferencia de los antibióticos, los bacteriófagos se autorepican y se autolimitan. Los bacteriófagos se replican exponencialmente mientras que las bacterias están disponibles en abundancia. Pero al disminuir la cantidad de bacterias, el número de fagos declina también y son gradualmente eliminados del paciente y del ambiente (28).
- b. Desarrollo de resistencia limitada: las bacterias pueden desarrollar resistencia a los fagos. Sin embargo los fagos tienen muchas mutaciones durante su replicación, ellos pueden competir con las adaptaciones de la bacteria y desarrollar por lo tanto una limitación a la resistencia (28).
- c. Blancos específicos: el tratamiento con antibióticos químicos a menudo causa un desbalance bacteriano y puede llevar a una infección secundaria con *Pseudomonas* sp., o *Clostridium difficile*, las cuales causan una severa diarrea e infecciones del colon. Pero los bacteriófagos tienen como blanco una bacteria en particular siendo más específicos que los antibióticos químicos, por lo tanto causan menos daño en la microbiota intestinal humana (28).

2. Colifagos como indicadores

Los bacteriófagos que se hospedan en cepas de *E. coli* son llamados colifagos. Se ha observado que son ubicuos en hábitats como el tracto intestinal humano y animal, y se han encontrado siempre que ocurre una contaminación fecal. Guelin (1948) fue el primero en reconocer el potencial de los bacteriófagos como un sistema indicador y desde entonces numerosos reportes han indicado el potencial de los bacteriofagos/colifagos como indicadores de calidad microbiológica del agua (37).

Kenard y Valentine (1974) notaron una cercana correlación entre coliformes fecales y colifagos, y el modelo de colifagos provisto para el conteo de coliformes concordaba con el modelo actual de conteo (37).

Los colifagos han sido sugeridos como mejores indicadores de enterovirus, ya que han sido encontrados con enterovirus durante el proceso del tratamiento, ellos exhiben una variación estacional similar a la de los enterovirus como resistencia al estrés ambiental y cloración. Aunque la resistencia de los virus al cloro varía ampliamente, existen datos que sugieren que varios virus entéricos son considerados más resistentes al cloro que los

coliformes. Sin embargo se ha establecido que cualquier sistema de fago indicador es superior al sistema de coliformes totales y fecales (37).

3. Fagotipificación

El fagotipificado requiere, en primer lugar, sembrar la cepa bacteriana sobre la superficie de un medio sólido de agar, luego se debe aplicar la suspensión del fago específico sobre la superficie del agar. Tras la incubación, se observa la aparición de placas de lisis en aquellas áreas donde la infección fágica haya ocurrido; esto permite identificar aquellos fagos para los que la cepa bacteriana es huésped susceptible (37).

IV. JUSTIFICACIÓN

La diarrea continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil, particularmente en niños menores de dos años. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, afectando principalmente a los países subdesarrollados, ya que está asociada con falta de disponibilidad de recursos sanitarios y servicios de salud, pobreza y bajos niveles de educación en la población.

Las diarreas producidas por bacterias como *E. coli* son las más comunes en países subdesarrollados como Guatemala, debido a que las medidas de higiene son deficientes, y la forma de transmisión de este tipo de diarreas es por medio de alimentos y agua contaminada.

La búsqueda y aislamiento de bacteriófagos para *E. coli* diarreogénicas como *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica, es importante para iniciar el desarrollo de nuevas investigaciones sobre fagos, que en Guatemala han sido escasas, y que en un futuro se aproveche la capacidad lítica de éstos. Esta propiedad se podría utilizar para fagotipificación y fagoterapia como se ha hecho en otros países.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Estudiar y aislar bacteriófagos específicos para *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica productoras de diarreas en niños menores de dos años.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar bacteriófagos para *E. coli* a partir de aguas de río por medio de filtración para obtener el stock de fagos.
2. Determinar la proliferación de bacteriófagos por medio del enfrentamiento de cepas de *E. coli* con el stock de fagos, mediante la observación de placas de lisis.
3. Almacenar los bacteriófagos obtenidos en condiciones ideales para ser utilizados en investigaciones futuras.



VI. HIPÓTESIS

Este estudio por ser de carácter descriptivo, con muestreo a conveniencia, no aleatorio, no requiere hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Todas las cepas diarreogénicas aisladas de casos infantiles del área rural de Guatemala en estudios previamente realizados en Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).

1. Muestra

Las cepas utilizadas para llevar a cabo la investigación fueron seleccionadas del cepario del INCAP. Se utilizaron cuatro cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP), códigos O1142526, O1112948-59, 700532 O86 y 700844 O44. Y cuatro cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET), códigos 28C02 LT, 64111 ST, 75688, 64111b

2. Controles

Se utilizaron tres cepas ATCC, proporcionadas por el INCAP, como controles de especificidad de los bacteriófagos sobre las cepas de *E. coli*. Las cepas son: *Staphylococcus aureus* 25923, *Shigella flexneri* 12022, *Escherichia coli* 25922

B. Recursos

1. Humanos

Investigador: Br. Heidy Azucena Florián Oliveros
Asesor: Dr. Mario Gonzalez

2. Instituciones

Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
Laboratorio de Microbiología y Virología Dr. Leonardo Matta.
Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica, Departamento de Bioquímica

C. Materiales

1. Material Biológico

Agua de los ríos Villalobos (zona 12) y Las Vacas (zona 16).

Cultivo de *Escherichia coli* enteropatógena

Cultivo de *Escherichia coli* enterotoxigénica

Partículas de fago, obtenidas del agua de río.

2. Material de laboratorio

Pipeta de 5 ml.

Pipetas de 1 ml estériles

Tubo de ensayo estériles

Cajas de Petri

Vaso de precipitados de 250 ml.

Erlenmeyers de 1000 ml.

Gradilla

Mechero

Asa de nicromo

Incubadora

Centrifuga de mesa

Autoclave

Manguera de pie de largo para filtrar al vacío

Unidad de filtración

Papel indicador de pH, rango de 1-14

Papel aluminio

Papel Craft

Membranas de filtración de 0.45 μm Millex®-G S (Millipore Bedford, MA)

Filtros de 0.45 μm Millex®-HS (Millipore, Bedford, MA)

Jeringas de 10 cc

Bomba de vacío

Vortex

3. Reactivos

Cloroformo

Agar tripticasa soya

Caldo tripticasa soya

Agar MacConkey

Suplemento de extracto de levadura

Agua destilada

Cloruro de magnesio

Cloruro de sodio grado reactivo

D. MÉTODOS

1. Cultivo de Cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio, fueron proporcionadas por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), se conservaron en agar nutritivo, para su uso en el enfrentamiento con el stock de fagos se procedió de la siguiente manera:

- Tomar una muestra de cada cepa preservada en agar nutritivo y seguidamente sembrar en agar tripticasa soya incubar a 37°C por 24 horas.
- Resembrar tres veces en condiciones iguales, para que las bacterias crezcan adecuadamente y recuperen sus propiedades.
- El cultivo bacteriano para el enfrentamiento con el stock de fagos debe de tener de 18 a 24 horas de incubación a 37°C, para tenerlo en fase de crecimiento.

2. Identificación de cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* enteropatógenas (ECEP), fueron identificadas serológicamente antes de ser enfrentadas con el filtrado de aguas de ríos. También las cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET), fueron identificadas por medio de un ELISA.

La técnica serológica de aglutinación en tubo para la identificación de *E. coli* enteropatógena es la siguiente (Ver Anexo No. 2):

- Seleccionar tres colonias sospechosas de *E. coli* a partir del cultivo en estudio. Sembrar las colonias individualmente en caldo tripticasa soya e incubar los tubos a 37°C por 18-24 horas. Simultáneamente, sembrar cada colonia seleccionada en medios de confirmación bioquímica para *E. coli*.
- Hervir los caldos de cultivos de tripticasa soya durante una hora. Si se observa la formación de grumos indica que la cepa es rugosa (autoaglutinante) por lo que se elimina.
- Si la cepa no forma grumos se continua el procedimiento.
- Preparar un pool de los cultivos ya hervidos, mezclando un mililitro de cada uno. Luego ajustar con solución salina a una turbidez similar al tubo de McFarland No. 3.
- Preparar los tubos por pool para confirmar de la siguiente manera:

TUBO	Omnisuerio EPEC	Solución salina	Pool (suspensión bacteriana)
1	0.1 ml	--	0.9 ml
2 (control negativo)	--	0.1 ml	0.9 ml

- Agitar los tubos e incubar a 50°C en baño de María durante 18-20 horas.
- Observar los tubos en busca de aglutinación. Una prueba positiva está indicada por un precipitado en el fondo del tubo y un sobrenadante claro. El control negativo se observa turbio y ausencia de aglutinación.
- Si la prueba es positiva, informar como *E. coli* enteropatógena.

2. Aislamiento de bacteriófagos

Se realizaron cuatro recolecciones de aguas de río para aislar bacteriófagos de *E. coli*, se seleccionó este material por ser una de las fuentes más confiables para encontrar fagos para esta bacteria.

Los bacteriófagos se aislaron de las aguas recolectadas del río Las Vacas, ubicado en la zona 16 y el río Villalobos en la zona 12 de la Ciudad Capital de Guatemala (Ver Anexo No. 3).

Procedimiento:

- Recolectar el agua de la superficie del río.
- En cada muestreo recolectar 100 - 500 ml de agua.
- El agua se purifica primero por medio de filtración al vacío con papel filtro y después se filtra al vacío con una membrana de 0.45 µm para obtener el agua filtrada con fagos (9, 35).

3. Preparación del agar

- Colocar en un erlenmeyer de 1000 ml 40 gramos de agar tripticasa soya, 0.1 gramo de cloruro de sodio y 0.1 gramo de cloruro de magnesio.
- Disolver los ingredientes del agar en un litro de agua destilada.
- Calentar y llevar a ebullición. Luego colocar el erlenmeyer en el autoclave por 15 minutos a 121° C.
- Comprobar la calidad del medio midiendo el pH, con papel tornasol, este debe mantenerse en 7.3.
- Verter el agar en cajas de petri estériles. Dejar solidificar y guardar en una refrigeradora a 4°C.

4. Control de calidad del agar y caldo tripticasa soya

- A todo lote de agar o caldo preparado, realizar control de crecimiento bacteriano y de hongos por medio de incubación a 37°C por 24 horas.
- Si se observa la presencia de colonias de hongos o bacterias en el agar o bien turbidez del caldo, no utilizar los medios preparados.
- Si no se observa la presencia de colonias de hongos o bacterias en el agar o bien turbidez en el caldo, utilizar los medios preparados.

5. Métodos de detección de bacteriófagos

a. Método de plaqueo por goteo

- Incubar 10ml de caldo Tripticasa soya con la bacteria hospedera (*Escherichia coli*) por 24 horas a 37°C.
- Inocular con *E. coli* dos caja de agar tripticasa soya.
- Dispensar cuatro alicuotas de 0.1 ml de agua filtrada con fagos dentro de una caja de Petri. Dispersar en toda la caja el agua filtrada con fagos.
- Para el control negativo, no se agrega el agua filtrada con fagos.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Examinar las cajas de petri, para observar si el bacteriófago lisa las bacterias (38).

Interpretación de resultados

Identificación de placas de lisis: que son pequeñas áreas circulares claras que representan áreas de reproducción del fago y lisis de las bacterias.

No se encuentran placas de lisis: no hubo reproducción del fago y por lo tanto no se lisan las bacterias.

b. Por lisis del cultivo en caldo

- Inocular 2 tubos con caldo tripticasa soya (CTS) enriquecido con extracto de levadura con la bacteria hospedera (*E. coli*).
- Adicionar a un tubo de caldo 1 ml del agua filtrada con bacteriófagos o bien placas de lisis obtenidas del método de plaqueo por goteo.
- Incubar los dos tubos a 37°C y examinar la turbidez cada hora, comparando con el control negativo, cultivo inoculado con bacteria pero no con el fago (38).

Interpretación de resultados

Ausencia de turbidez: indica que el fago estaba presente, se reprodujo y liso las bacterias.

Presencia de turbidez: no hubo reproducción del fago.

6. Purificación de bacteriófagos

La purificación de bacteriófagos se realizó a partir de las placas de lisis obtenidas por el método de plaqueo por goteo.

- Remover las placas de lisis obtenidas y colocarlas en un tubo con caldo tripticasa soya (CTS) previamente inoculado con *E. coli*. Incubar a 37°C por 24 horas.
- Filtrar el CTS con un filtro de 0.45µm
- Realizar el procedimiento del método de plaqueo por goteo, utilizando cepas de *E. coli* en estudio, y las cepas ATCC, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *S. flexneri* 12022.
- Observar el apareamiento de placas de lisis, la presencia de estas en las cepas ATCC indica la presencia de un fago no específico para *E. coli*, aunque efectivo para su destrucción. Si no existe lisis de las cepas ATCC, es un bacteriófago específico para *E. coli*.

Luego de haber realizado estas pruebas se debe remover las placas de lisis obtenidas colocarlas en CTS previamente inoculado con *E. coli*. Incubar a 37°C por 24 horas. Filtrar el CTS con un filtro de 0.45 µm y se sigue el procedimiento de purificación con cloroformo:

- A 10 ml de filtrado agregar 0.5 ml de cloroformo, mezclar vigorosamente.
- Dejar sedimentar o centrifugar.
- Decantar el sobrenadante, dejar airear el botón hasta que no quede cloroformo. En el botón se encuentran los fagos (38).

Los bacteriófagos aislados, se guardaron en un recipiente sellado a una temperatura de -20°C (38). Para que se puedan utilizar posteriormente en futuras investigaciones.

E. Diseño de investigación

1. Tipo de Estudio

Estudio de carácter descriptivo, con muestreo a conveniencia, no aleatorio.

2. Análisis de Datos

Se tabuló los datos obtenidos por medio de tablas realizadas en el paquete Word versión 97 (Microsoft Corporation, USA). Reportando los resultados de manera descriptiva en presencia o ausencia de bacteriófagos.

VIII. RESULTADOS

A. Detección de bacteriófagos

Para la detección de bacteriófagos específicos para cepas de *E. coli* se recolectó cuatro muestras de aguas, dos del río Las Vacas (zona 16) y dos del río Villalobos (zona 12) de la Ciudad Capital de Guatemala. De los muestreos realizados en el río Las Vacas (zona 16), en la semana del 2 al 6 de septiembre del año 2002, se recolectaron 500 ml de agua en cada uno, de los análisis bacteriológicos se observó el crecimiento de *Escherichia coli* en agar MacConkey en ambos muestreos, la imagen bioquímica de la bacteria fue TSI: A/A,++, -; LIA: K/A, -, -; MIU :M+, I+, U-; y Citrato: -. Posteriormente para la detección de bacteriófagos, se enfrentaron los filtrados con las cepas de *E. coli* diarreogénicas utilizando el método de plaqueo por goteo, los resultados se muestran en la Tabla No. 1.

TABLA No. 1. Resultados de los muestreos del río Las Vacas (zona 16).
Cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas enfrentadas con el filtrado.

Número de cepa	Presencia de Bacteriófagos Primer Muestreo	Control Negativo Primer muestreo	Presencia de Bacteriófagos Segundo Muestreo	Control Negativo Segundo Muestreo
ECET 286C2 TL	N †	CN ‡	P (5 mm) *	CN
ECET 64111 TS	N	CN	N	CN
ECET 75688	N	CN	P (2 mm)	CN
ECET 64111B	N	CN	N	CN
ECEP O1142526	N	CN	N	CN
ECEP O1112948 -59	N	CN	N	CN
ECEP 700532 O86	N	CN	N	CN
ECEP 700844 O44	N	CN	N	CN

† N: indica que no se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con las bacterias y el filtrado.

‡ CN: indica crecimiento normal bacteriano en los controles negativos, inoculación de bacterias diarreogénicas sin filtrado.

* P: indica que se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con la bacteria y el filtrado. Entre paréntesis se indica el diámetro del halo observado.

De los muestreos realizados en el río Villalobos (zona 12), en la semana del 16 al 21 de septiembre del año 2002, se recolectaron 500 ml de agua en cada muestreo. Se evidenció la presencia de *E. coli* en los cultivos bacteriológicos, identificándose por medio de pruebas bioquímicas, indicadas anteriormente. Los resultados del enfrentamiento de los filtrados con las cepas de *E. coli* diarreogénicas se presentan en la Tabla No. 2.

TABLA No. 2. Resultados de los muestreos del río Villalobos (zona 12).
Cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas enfrentadas con el filtrado.

Número de cepa	Presencia de Bacteriófagos Primer Muestreo	Control Negativo Primer Muestreo	Presencia de Bacteriófagos Segundo Muestreo	Control negativo Segundo Muestreo
ECET 286C2 TL	N†	CN‡	N	CN
ECET 64111 TS	N	CN	N	CN
ECET 75688	N	CN	N	CN
ECET 64111B	N	CN	N	CN
ECEP O1142526	N	CN	N	CN
ECEP O1112948 -59	N	CN	N	CN
ECEP 700532 O86	P (2 mm)*	CN	N	CN
ECEP 700844 O44	N	CN	N	CN

† N: indica que no se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con las bacterias y el filtrado.

‡ CN: indica crecimiento normal bacteriano en los controles negativos, inoculación de bacterias diarreogénicas sin filtrado.

* P: indica que se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con la bacteria y el filtrado. Entre paréntesis se indica el diámetro del halo observado.

B. Recuperación de bacteriófagos

Se recuperaron los bacteriófagos a partir de las placas de lisis observadas al enfrentarse las cepas de *E. coli* diarreogénicas con los filtrados de las aguas. Las placas de lisis fueron removidas del agar y colocadas en caldo tripticasa soya (CTS) previamente inoculado con cada una de las cepas de *E. coli*, donde se obtuvo la placa de lisis. Posterior a la incubación el CTS se filtró. Del filtrado obtenido se aplicó sobre cajas de petri inoculadas con las mismas cepas de *E. coli*. Los resultados de la recuperación de bacteriófagos se presentan en la Tabla No. 3.

TABLA No. 3. Resultados de la recuperación de bacteriófagos

Número de cepa	Obtención de placas de lisis
ECET 286C2 TL	P*
ECET 75688	N†
ECEP 700532 O86	N

* P: indica que se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con la bacteria y el filtrado.

† N: indica que no se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con las bacterias y el filtrado.

Como un resultado adicional, en las resiembras efectuadas a partir del cultivo previamente enfrentado con el fago, dentro de las placas de lisis obtenidas, se observó la presencia de pequeñas colonias las cuales se identificaron bioquímicamente como *E. coli*, pero poseían características distintas a las colonias que no entraron en contacto con el stock de fagos. Las colonias que no entraron en contacto con los fagos son redondas, elevadas,

lisas y suaves, pero las colonias que quedaron dentro de las placas de lisis son redondas, elevadas, lisas y duras.

C. Especificidad del bacteriófago

Al utilizar las cepas de *E. coli* ATCC, *S. aureus* ATCC y *S. flexneri* ATCC se evidenció que los bacteriófagos aislados son específicos para cada uno de los tres serotipos de *E. coli* utilizados en el presente estudio, los resultados se muestran en la Tabla No. 4.

TABLA No. 4 Resultados de Especificidad de los bacteriófagos con cepas ATCC

Número de cepa	Presencia de placas de lisis	Control Negativo
ECET 286C2 TL	P*	CN‡
<i>E. coli</i> 25922	N†	CN
<i>S. aureus</i> 25923	N	CN
<i>S. flexneri</i> 12022	N	CN
ECET 75688	P	CN
<i>E. coli</i> 25922	N	CN
<i>S. aureus</i> 25923	N	CN
<i>S. flexneri</i> 12022	N	CN
ECEP 700532 O86	P	CN
<i>E. coli</i> 25922	N	CN
<i>S. aureus</i> 25923	N	CN
<i>S. flexneri</i> 12022	N	CN

* P: indica que se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con la bacteria y stock de bacteriófagos.

‡ CN indica crecimiento normal bacteriano en los controles negativos, inoculación de bacterias, sin stock de bacteriófagos.

† N: indica que no se observaron placas de lisis en las cajas de petri inoculadas con las bacterias y el stock de bacteriófagos.

D. Purificación de bacteriófagos

Cada uno de los tipos de bacteriófagos recuperados se pasaron a través de un filtro con poro de 0.45 μm con ayuda de una jeringa de 10 ml, se recuperó 3 ml de cada stock de fagos. Posteriormente se sometieron al tratamiento con cloroformo para su purificación, el botón obtenido de este procedimiento se almacenó a -20°C .

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio son comparables a otros estudios reportados, en donde el aislamiento de bacteriófagos se ha realizado a partir de aguas de ríos contaminados con aguas negras (25,26). Este fenómeno ha sido observado siempre y cuando exista en el medio el hospedero (35). La presencia de *E. coli* en los ríos Las Vacas (zona 16) y Villalobos (zona 12), aseguraba en cierto grado la existencia de los bacteriófagos; aunque la *E. coli* aislada no fue tipificada, los bacteriófagos que se recuperaron fueron específicos para tres cepas de *E. coli* implicadas en casos de diarrea en niños menores de dos años, provenientes del área rural de Guatemala.

Los fagos han sido utilizados para la tipificación por su especificidad para cada tipo de cepa bacteriana, esto es debido a que las bacterias poseen receptores en su superficie para un determinado tipo de fago, pero aún los fagos suelen ser altamente específicos diferenciando entre los diferentes serotipos de una bacteria (28, 35). Por lo que los fagos aislados en el presente estudio pueden considerarse específicos para cada una de las cepas en las cuales causaron lisis, debido a que el enfrentamiento de cada uno de los fagos con las diferentes bacterias ATCC y las otras bacterias empleadas dieron resultados consistentes en su especificidad.

Diversos métodos han sido utilizados para la recuperación de bacteriófagos, los más frecuentes son método de lisis del cultivo, doble plaqueo y plaqueo por goteo (4). En el presente estudio se utilizó el método de plaqueo por goteo para la detección y aislamiento de bacteriófagos, por ser una metodología simple, práctica y que proporciona buenos resultados. También se utilizó la metodología de lisis del cultivo en caldo, para la producción masiva de bacteriófagos, debido a que el caldo utilizado en esta metodología proporciona los nutrientes necesarios para que la bacteria se multiplique y el fago se reproduzca y lise las bacterias.

Los bacteriófagos han sido purificados desde su descubrimiento por medio de filtración y sedimentación (4, 35). En este estudio los bacteriófagos aislados fueron purificados por medio de filtración, cloroformo y centrifugación (38), esta técnica permite recuperar los bacteriófagos y eliminar restos bacterianos que pudieron quedar aún después de la filtración.

Los bacteriófagos que poseen ciclo lítico tienen la capacidad de replicarse y lisar las bacterias rápidamente, por este motivo son utilizados para desinfección, fagoterapia, fagotipificación y como indicadores de contaminación bacteriana (32); los bacteriófagos obtenidos en el presente estudio tienen características que los enmarcan en este tipo de ciclo, debido a que se multiplican con rapidez en un período de veinticuatro horas. Además se observó que algunas colonias de *E. coli* enfrentadas con los bacteriófagos, se transformaron en resistentes a la actividad lítica del fago esto puede ser debido a que una

vez el fago ha penetrado en una célula hospedera, su integración al genoma bacteriano genera un cuadro inmune a la reinfección por fagos de la misma u otra especie. Estas observaciones han sido reportadas previamente denominándose restricción (31), lo cual puede correlacionarse con la transformación morfológica que sufrieron las colonias, ya que las colonias que se utilizaron en el estudio fueron purificadas, y eran provenientes de clonas bacterianas.

Los bacteriófagos obtenidos en el presente estudio pueden ser utilizados en nuevas investigaciones tales como fagoterapia, desinfección, fagotipificación o indicadores, con el fin de evitar la propagación, contaminación e infección con cepas de *E. coli* diarreogénicas, contribuyendo a reducir las tasas de episodios diarreicos, principalmente en poblaciones infantiles y otras poblaciones susceptibles, como lo podrían ser pacientes con inmunocompromiso, personas de la tercera edad y turistas extranjeros. Por lo tanto, los bacteriófagos aislados fueron purificados y almacenados a -20°C en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

X. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se obtuvieron tres bacteriófagos específicos para cepas de *E. coli* diarreogénicas implicadas en casos infantiles del área rural de Guatemala, los fagos fueron recuperados de filtrados de aguas de los ríos Las Vacas (zona 16) y Villalobos (zona 12).
2. La característica de replicación rápida y de formación de placas de lisis observadas en los bacteriófagos recuperados, los clasifican como bacteriófagos líticos.
3. La presencia de cepas de *E. coli* en las aguas de los ríos muestreados, son indicadoras de la presencia de bacteriófagos género específicos.
4. La ausencia de una acción de transformación morfológica o de formación de placas de lisis en las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Shigella flexneri* ATCC 12022 utilizadas como controles demuestra la especificidad de los bacteriófagos para las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), y *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) aisladas en casos de diarrea infantil.
5. Los bacteriófagos recuperados en el presente estudio transformaron la morfología de las colonias bacterianas, lo que sugiere una integración de su genoma al bacteriano.
6. La presencia de bacteriófagos capaces de lisar cepas de ECET y ECEP, indican indirectamente la presencia de este tipo de cepas diarreogénicas en las aguas de los ríos Las Vacas y Villalobos, respectivamente.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios más profundos sobre el tipo de bacterias de *E. coli* diarreogénicas presentes en los ríos las Vacas y Villalobos, así como de sus efluentes para actualizar las políticas de saneamiento ambiental y tratamiento de aguas residuales, debido a la recuperación de bacteriófagos específicos para ECET y ECEP.
2. Investigar la presencia de bacteriófagos y de sus hospederos, principalmente patógenos, en otros ríos utilizados como vertederos de aguas negras, tanto en el área capitalina como en el área rural, donde los patógenos puedan estar implicados en brotes epidémicos.
3. Se recomienda la utilización de los fagos recuperados para aplicarlos en estudios de desinfección, tratamientos de aguas y fagotipificación, especialmente en áreas donde las cepas de *E. coli* diarreogénicas provoquen problemas de salud en niños y otros grupos poblacionales susceptibles.

XII. REFERENCIAS

- 1) Viñas R, *et al.* *Escherichia coli* verotoxigénica su transmisión por alimentos. Julio 2000 <http://www.ciencia.hoy.org/hoy55/Escherichia.htm>. Consultado en Octubre 2001.
- 2) Levin MM. *Escherichia coli* infections. N Engl J Med 1985;313:445-447.
- 3) Robins R. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Rev Infect Dis 1987;9:28-53.
- 4) Pelczar M, *et al.* Microbiología. 4ª. ed. México: McGraw-Hill. 1977. XVI + 950p. (p. 347-355).
- 5) Stratford B. An atlas of medical microbiology: common human pathogens. USA: Blackwell Scientific Publications. 1977. XV + 350p. (p.98-99).
- 6) *E. coli*. Octubre 2000. <http://www.telenoche-investiga.com/notas/28-06-00/aboratorio/ro2.asp>. Consultado en Octubre 2001.
- 7) Gordon JE, Chitkara ID, Wyon JB. Weanling diarrhea. J Med Sci 1963;245:77-80.
- 8) Walsh JA, Warren KS. Selective primary health care: an interim strategy for disease control in developing countries. N Engl J Med 1979;301:967-974.
- 9) Lesage AA. Contribution á létude des entérites infantiles séro-diagnostic des race de *E. coli*. In: Robins R. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Rev Infect Dis 1987;9:28-53.
- 10) Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic. J Infect Dis 1987;155:377-389.
- 11) Bray J. Isolation of antigenically homologous strain of *E. coli* neopolitanum from summer diarrhea of infants. J Pathol Bacteriol 1945;57:239-247.
- 12) Taylor J, Powell BW and Wright J. Infantile diarrhea and vomiting. A clinical and bacteriological investigation. Br. Med J 1949;2:117-125.
- 13) Kauffmann F. The serology of de coli group. J Immunol 1947;57:51-100.
- 14) Ewing WH. ECEP serotypes. An NY Acad Sci 1956;66:61-70.

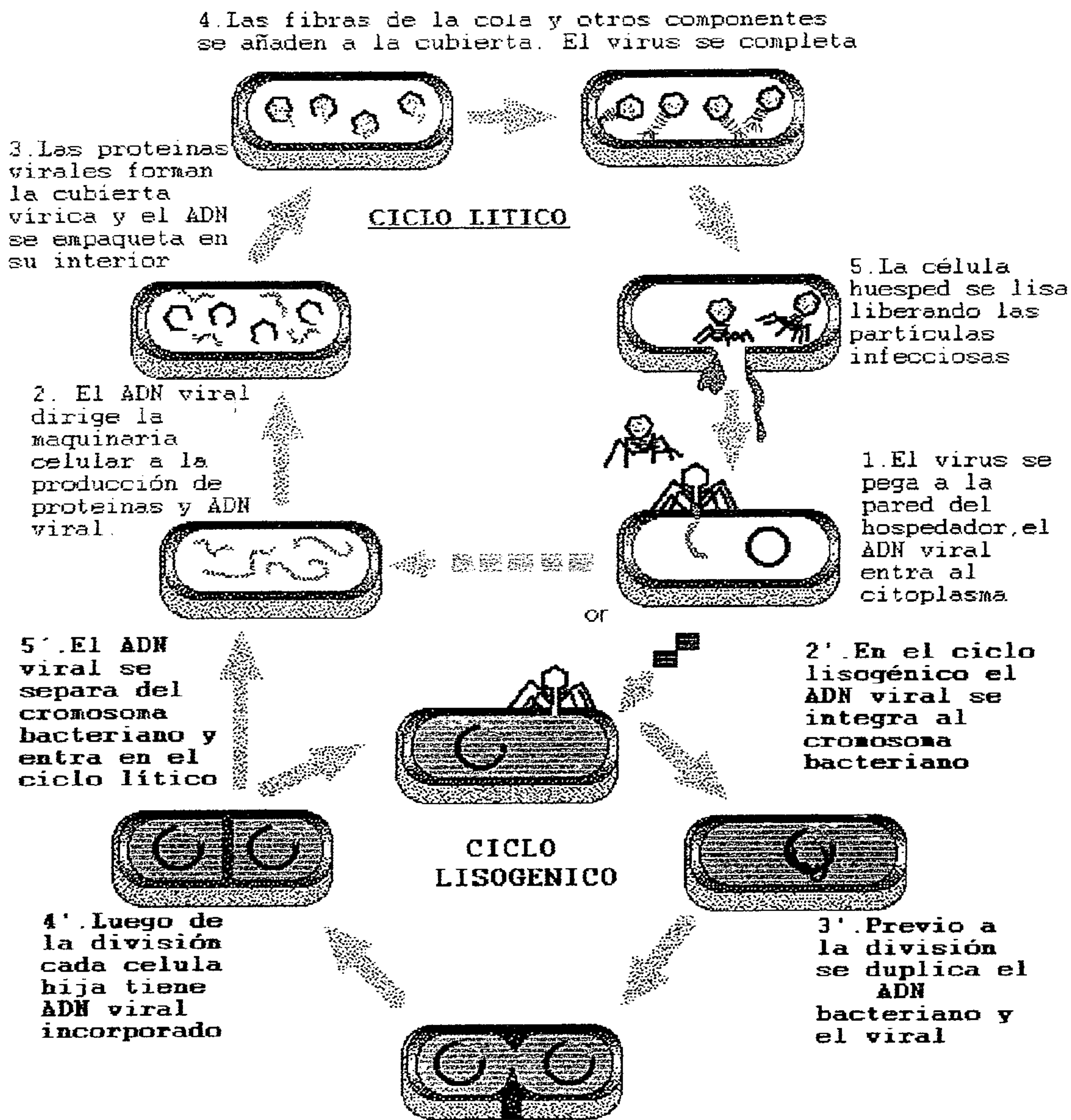
- 15) Nataro JP, *et al.* Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987;55:2370-2377.
- 16) Stenderup J, Orskov F. The clonal nature of ECEP strain. *J Infect Dis* 1983;148:1019-1024.
- 17) Edelman R, Levine MM. Summary of workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1983;147:1108-1118.
- 18) Herias L. Análisis bioquímico y genético de las tres subcategorías de *Escherichia coli* enteroadherentes. Guatemala: USAC, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990.
- 19) Negreros A. Anticuerpos neutralizantes de poliovirus y lincos de *Escherichia coli* enteropatógena en el suero de madres y de sus recién nacidos. Guatemala: USAC, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1964.
- 20) Cruz JR, *et al.* Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. Memorias III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, 2-6 Diciembre de 1986.
- 21) Organización Panamericana de la Salud. El control de las enfermedades transmisibles. James Chin (Ed). (17ª Ed.) Washington DC:OPS2011. Pp. 115-128.
- 22) Blanco S. Diarrea. Junio 2000. [Htt/www.Salulatina.com/Enfermedades/Diarrea](http://www.Salulatina.com/Enfermedades/Diarrea). Consultado en Octubre 2001.
- 23) Luna Z. Determinación de enterotoxinas producidas por cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea de edad pre-escolar en el área rural de Guatemala. Guatemala:USAC, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) Septiembre 1980.
- 24) Guiraldes L. Diarrea Aguda en la infancia. Febrero 1996 <http://www.geocities.com./detrsergio.geo/gastro/diarrea.html>. Consultado en Septiembre 2001.
- 25) Kutter E. Phage therapy. Bacteriophages as antibiotics. Junio 1997 T4 phage @ - elwha.evergreen.edu.evergreenStateCollege. Consultado en Septiembre 2001.
- 26) The importance of Bacteriophages. Septiembre 2000 <http://www.com.bacteriophages.htm>. Consultado en Octubre 2001.

- 27) Topley W, *et al.* Principles of bacteriology, virology and immunite. 6^a. ed. Vol. I. London: Edwar Arnold Publishers. 1976. 980p. (p 426-467).
- 28) Lorch A. Bacteriophages. Marzo 1999 [http://www.com. Biotechnology and develo-ment monitor,htm](http://www.com.Biotechnologyanddevelo-mentmonitor,htm). Consultado en Noviembre 2001.
- 29) Viruses general principles. Junio 2000. [http://www.com.MCB229 Spring2000virusge-neralprinciplesBacteriophages.hym](http://www.com.MCB229Spring2000virusge-neralprinciplesBacteriophages.hym). Consultado en Noviembre 2001.
- 30) Espejo R. Bacteriófagos. Programa Regional de desarrollo científico y tecnológico. Secretaría general de la Organización de los Estados Unidos. Washington, D.C. 1973. V + 65 (p. 1-60).
- 31) Brock T, Madigan M. Microbiología 7^a. ed. México: Prentice Hall Hispanoamericana, 1993. XX +956p. (p. 207 - 224)
- 32) Kaiser G. Ciclo de vida de los Bacteriófagos Abril 1999. [http://www.com. biol230Llectureguideunit2IIE Bacteriophage-lifeCycles.htm](http://www.com.biol230Llectureguideunit2IIEBacteriophage-lifeCycles.htm). Consultado en Octubre 2001.
- 33) Jawetz M. Microbiología Médica. 10^a. ed. México: Editorial El Manual Moderno S.A. México 1983. IX + 850p. (p150-155).
- 34) Bacteria can be ill. Julio 2000. [http://www.com.BacteriacanbeillBacteriophages 2.htm](http://www.com.BacteriacanbeillBacteriophages2.htm). Consultado en Octubre 2001.
- 35) Hans Z. Bacteriología de Zinsser. México: Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana 1951. XX + 980 (p. 230-233).
- 36) Bunting J. The virus that cures. Mayo 1997 [http://www.lobe.com. uk/horizon /virus.-Shtml](http://www.lobe.com.uk/horizon/virus.-Shtml). Consultado en Septiembre 2001.
- 37) International Development Centre, Ottawa, Canadá. Marzo 1998. Coliphago as an indicador. Reference @ idrc.ca. Consultado Octubre 2001.
- 38) Adams M. Bacteriophages. Estados Unidos: Intersciens Publishers. 1966. XVI + 885p. (p320-550).

XIII. ANEXOS

ANEXO No. 1

FIGURA No. 1



ANEXO No.2

OMNISUERO *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA
(ECEP)

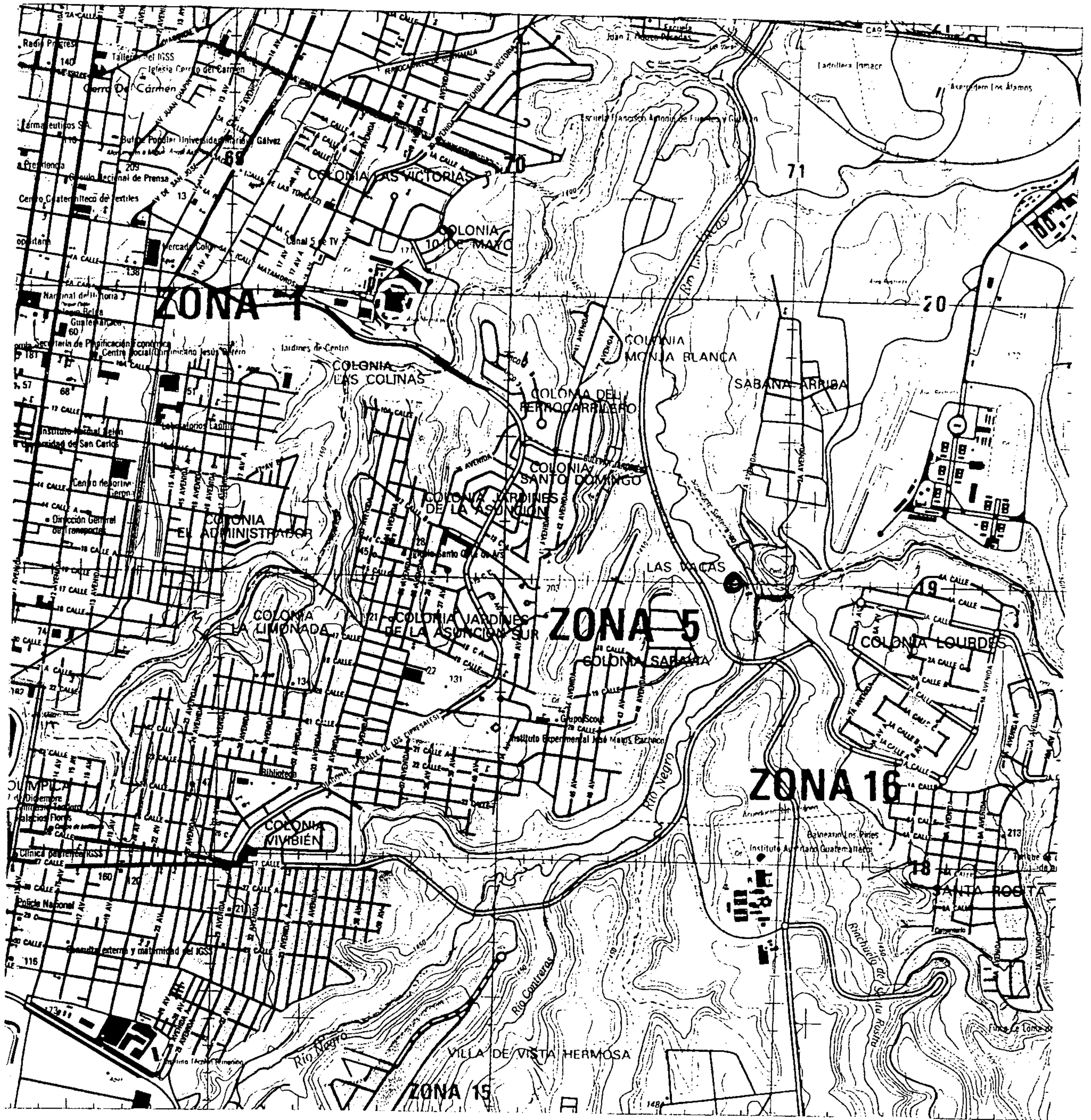
El antisuero utilizado en la técnica de aglutinación en tubo para la identificación de *E. coli* enteropatógena (ECEP) es preparado a partir de mezclas de antisueros monovalentes de cada uno de los serogrupos de ECEP. Estos antisueros son producidos por inmunización de conejos con antígeno somático (O) de cepas estandar, de acuerdo con la metodología del CDC (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia USA).

Este antisuero incluye los serogrupos que corresponden a *E. coli* enteropatógena: O18, O20, O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O148, O158.

Este antisuero se utiliza para el diagnóstico de cualquiera de los serogrupos de ECEP por la técnica de aglutinación en tubo. No establece serogrupo específico.

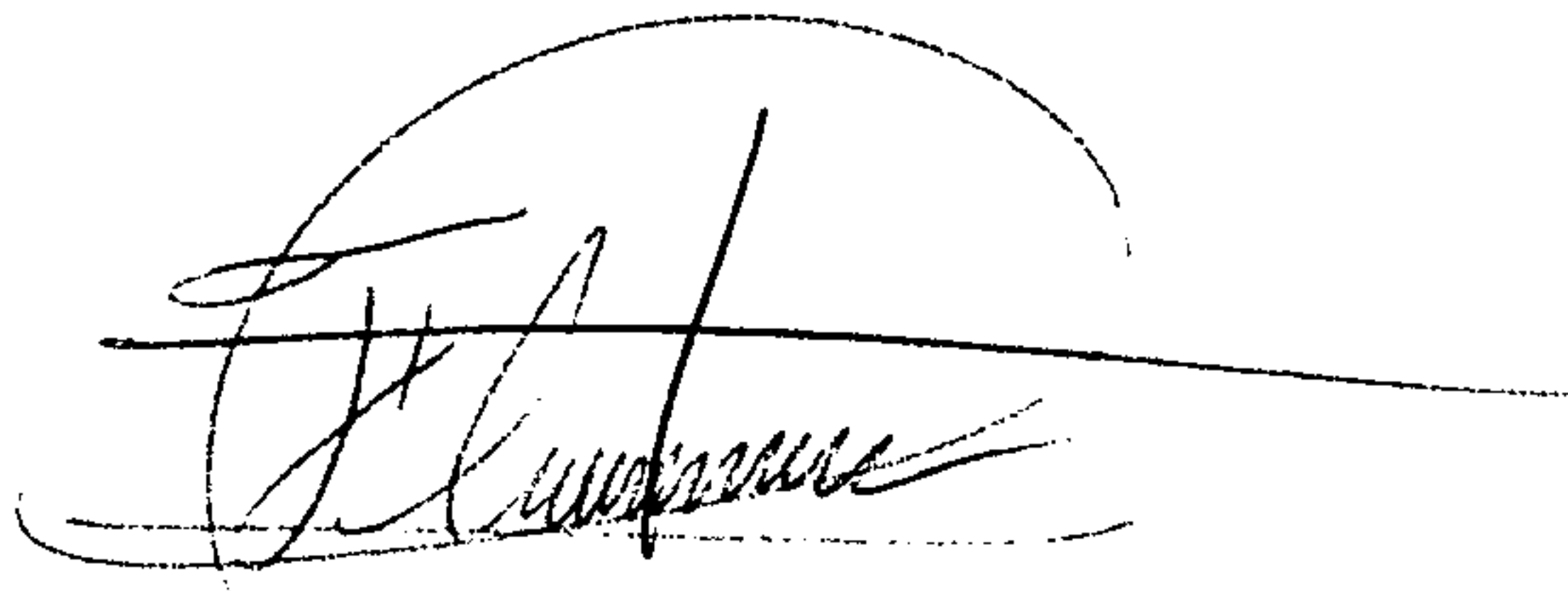
El antisuero fue producido en el Laboratorio de Microbiología del INCAP, Guatemala, Centro América.

ANEXO No. 3



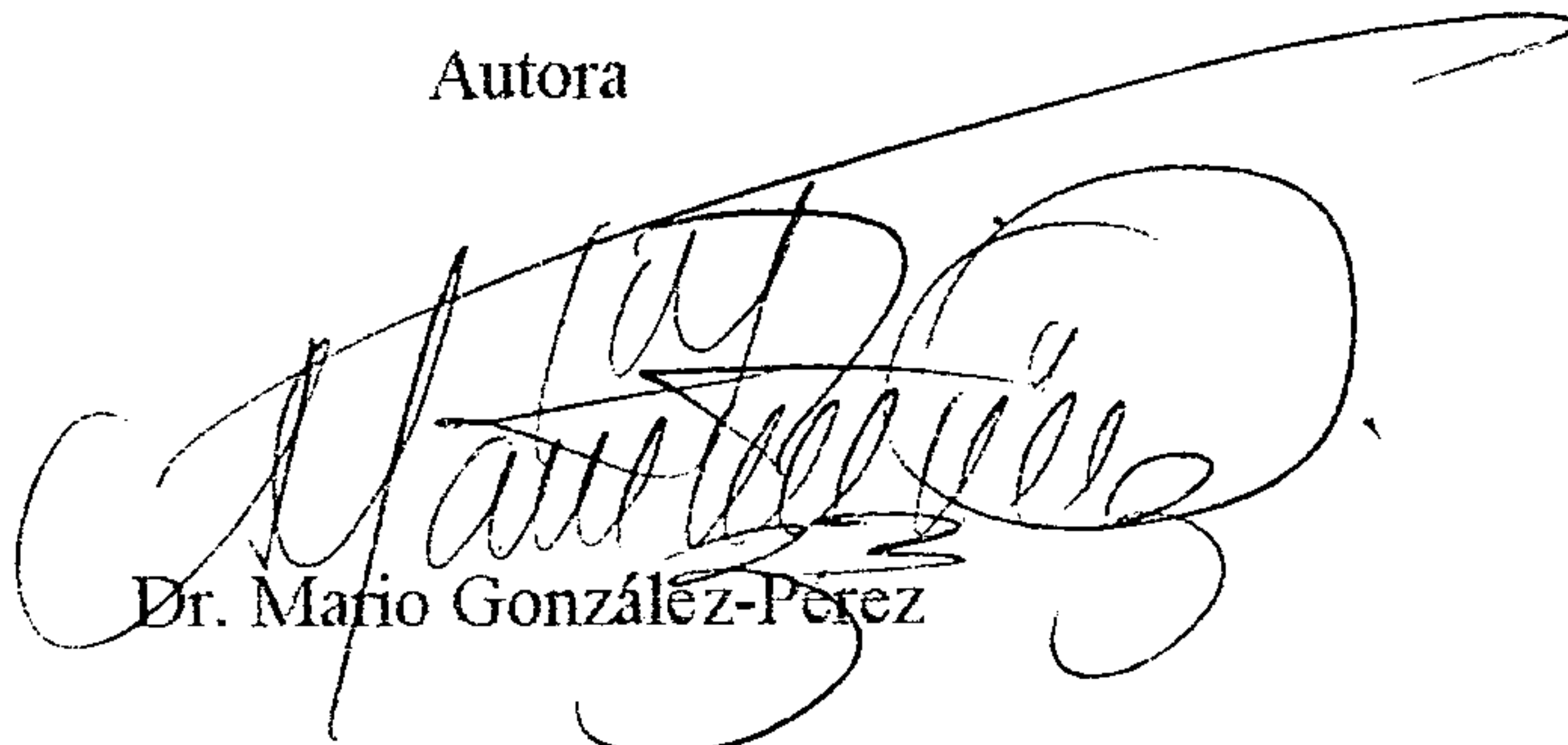
• PUNTOS DE MUESTREO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
Biblioteca Central



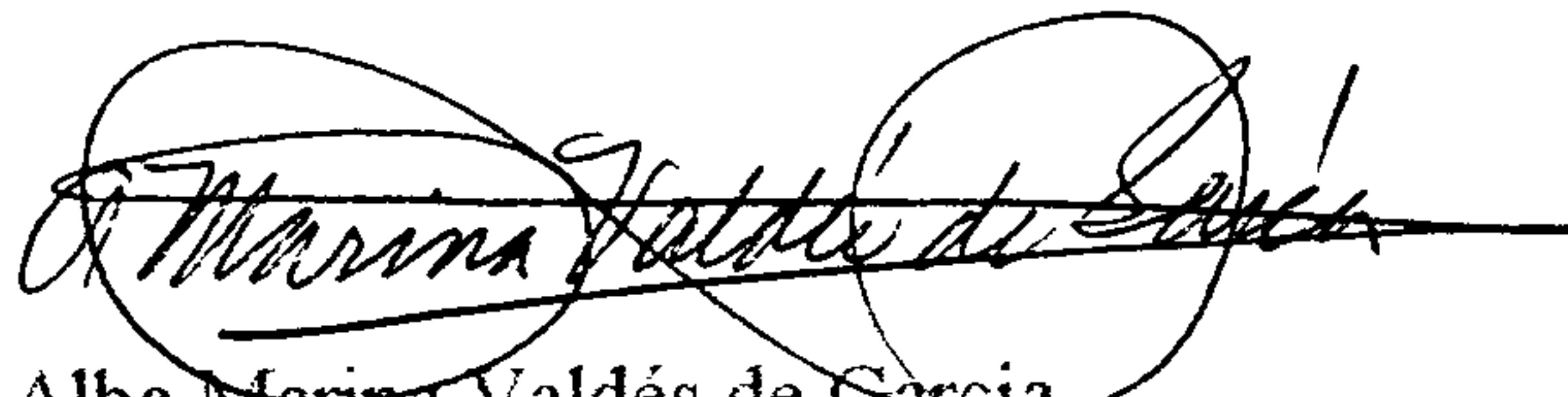
Heidy Azucena Florián Oliveros

Autora



Dr. Mario González-Pérez

Asesor



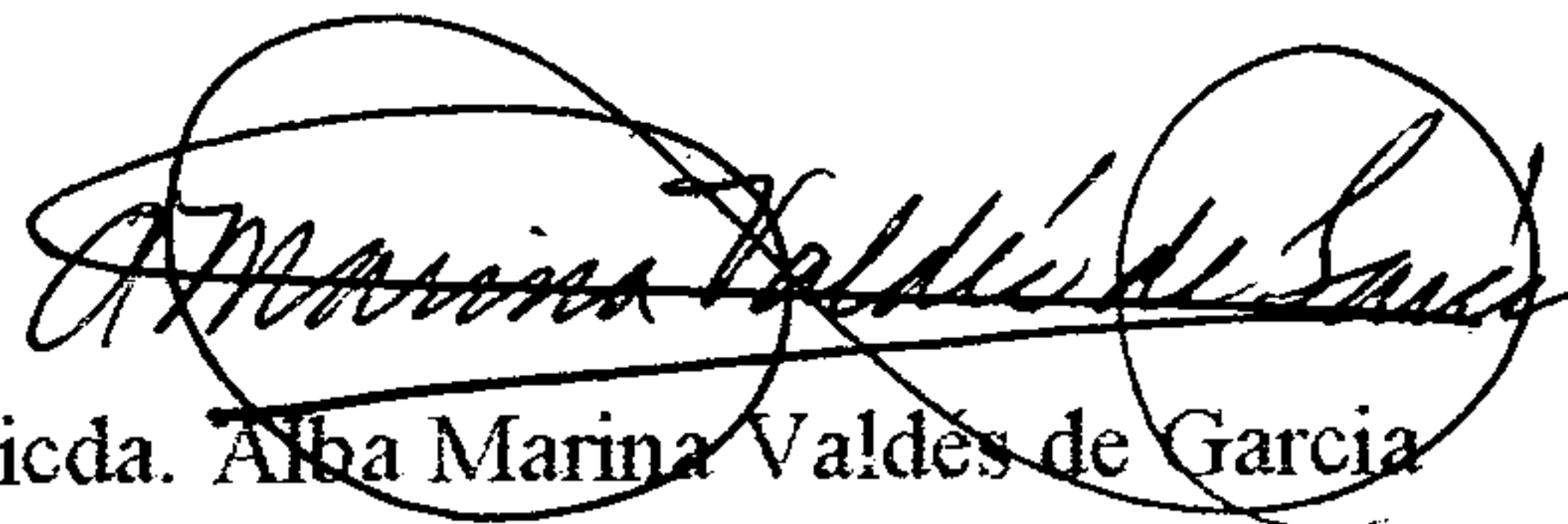
Licda. Alba Marina Valdés de García

Revisora



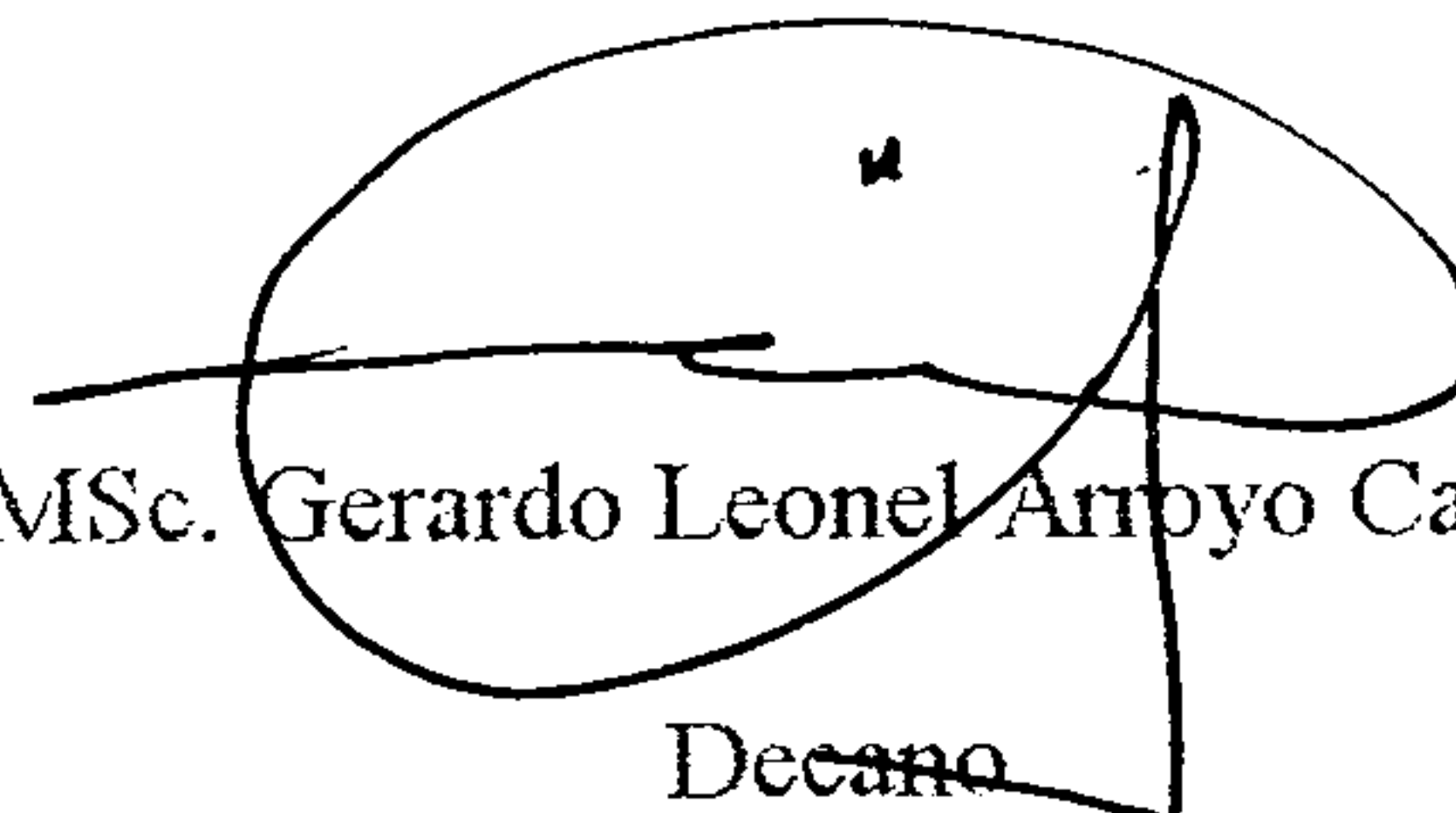
Lic. Martín Gil Carrera

Revisor



Licda. Alba Marina Valdés de García

Directora de Escuela



MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

Decano

