



**Universidad de Barcelona**  
**Departamento de Microbiología**  
**Facultad de Biología**

## **Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas**

Vº Bº del Director de la tesis

Dr. Joan Jofre Torroella

Memoria presentada por  
M<sup>a</sup> Teresa Muniesa Pérez  
para optar al grado de  
Doctor en Biología

Barcelona, Julio de 1998

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología  
Bienio: 94-96

3.3.2.5.2.- Experimentos de inactivación natural "in situ"

A continuación se presentan los resultados de inactivación de los diferentes tipos morfológicos de colifagos somáticos, obtenidos en los experimentos de inactivación natural "in situ" presentados en el apartado 3.3.1.1.2 de este capítulo.

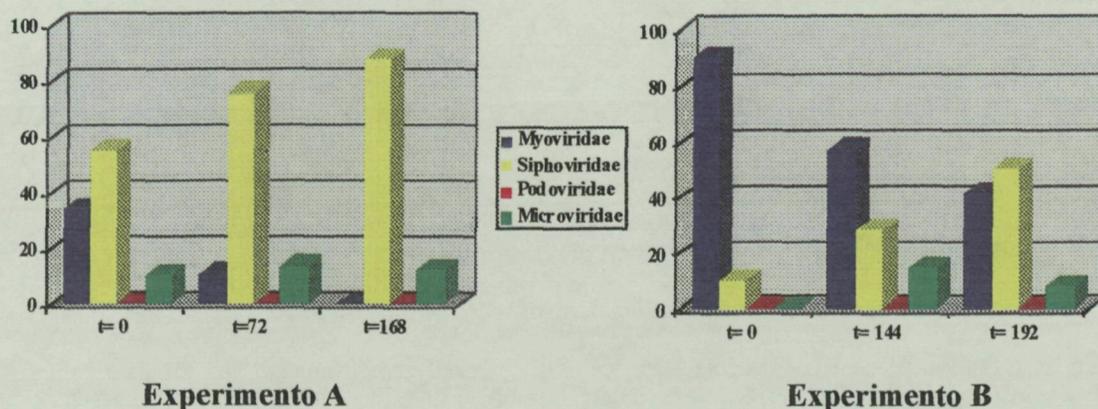
**Tabla 3.11.-** Enumeración de colifagos somáticos (ufp/ml) en los experimentos A y B de simulación de inactivación natural "in situ", a los diferentes tiempos de muestreo.

	Experimento A			Experimento B		
	t <sub>0</sub>	t <sub>72</sub>	t <sub>168</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>144</sub>	t <sub>192</sub>
ufp/ml <sup>(a)</sup>	350	18	0,8	320	14	8,5

(a) Aislamientos realizados con medio de triptona.

En ambos experimentos se observó un incremento en la proporción de fagos con morfología *Siphoviridae* a medida que transcurría el tiempo desde el inicio del experimento (Gráfica 3.9).

**Gráfica 3.9.-** Porcentajes de morfologías de bacteriófagos halladas en los experimentos A y B de inactivación "in situ" a los distintos tiempos.



En ambos experimentos el porcentaje de bacteriófagos *Myoviridae* disminuyó a medida que aumentaba el tiempo de exposición a la inactivación y por el contrario aumentó el porcentaje de bacteriófagos de morfología *Siphoviridae*.

Como ya se indicó anteriormente, en la muestra filtrada (experimento A) el porcentaje de bacteriófagos *Myoviridae* al inicio del experimento, fue menor que el porcentaje de bacteriófagos *Siphoviridae* y en consecuencia el porcentaje final en números absolutos también fue diferente. No obstante el efecto global de descenso de *Myoviridae* y aumento de *Siphoviridae* fue el mismo en ambos experimentos.

De nuevo la distribución de morfologías internas de cada grupo de bacteriófagos varió sensiblemente en cada uno de los tiempos estudiados (Tabla 3.12).

**Tabla 3.12.-** Porcentajes de morfologías correspondientes a los subtipos internos de los dos morfotipos mayoritarios observados en los experimentos simulación de inactivación natural "in situ".

Morfotipo	Subtipo	Experimento A			Experimento B		
		t <sub>0</sub>	t <sub>72</sub>	t <sub>168</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>144</sub>	t <sub>192</sub>
<i>Myoviridae</i>	cápside isométrica <sup>(a)</sup>	90,0	50,0	-	92,6	68,7	40,0
	cápside alargada <sup>(b)</sup>	10,0	50,0	-	7,4	31,3	60,0
	Total <sup>(c)</sup>	34,5	10,8	0,0	90,0	57,2	40,0
<i>Siphoviridae</i>	cola recta <sup>(d)</sup>	68,7	10,7	0,0	100	50,0	30,8
	cola curvada <sup>(e)</sup>	31,3	50,0	42,9	0,0	37,5	46,2
	cola rizada <sup>(f)</sup>	0,0	39,3	57,1	0,0	12,5	23,0
	Total <sup>(g)</sup>	55,2	75,7	87,5	10,0	28,6	52,0

(a,b) Porcentaje de fagos de cápside isométrica y alargada respectivamente del total de colifagos somáticos de morfología *Myoviridae* observado en estas muestras.

(c) Porcentaje total de colifagos somáticos de morfología *Myoviridae* observado en estas muestras.

(d, e, f) Porcentaje de fagos de cola recta, curvada o rizada respectivamente, del total de colifagos somáticos de morfología *Siphoviridae* observado en estas muestras.

(g) Porcentaje total de colifagos somáticos de morfología *Siphoviridae* observado en estas muestras.

Estos resultados de nuevo parecen indicar que dentro de cada tipo morfológico, ciertos subtipos se seleccionan por acción de la inactivación natural.

Conociendo los valores correspondientes al conjunto de colifagos somáticos en cada tiempo de muestreo, así como los porcentajes de los diferentes morfotipos, se pudo calcular la reducción decimal para las dos morfologías más representativas en estos experimentos a los diferentes tiempos de muestreo. En ambos casos, la reducción decimal fue superior para los bacteriófagos de morfología *Myoviridae* que para los *Siphoviridae* (Tabla 3.13).

**Tabla 3.13.-** Reducción decimal de los tipos morfológicos colifagos somáticos mayoritarios, en los experimentos de inactivación “*in situ*”.

	Experimento A		Experimento B	
	t <sub>72</sub> <sup>(a)</sup>	t <sub>168</sub>	t <sub>144</sub>	t <sub>192</sub>
Colifagos somáticos	1,3	2,6	1,4	1,6
<i>Myoviridae</i> <sup>(b)</sup>	1,8	>3,0	1,6	1,9
<i>Siphoviridae</i> <sup>(c)</sup>	1,1	2,4	0,9	0,9

(a) Tiempo transcurrido (horas) desde el inicio del experimento de inactivación.

(b) Colifagos somáticos con la morfología *Myoviridae*.

(c) Colifagos somáticos con la morfología *Siphoviridae*

### 3.3.2.5.3.- Experimentos de inactivación por efecto del tratamiento con cloro

#### 3.3.2.5.3.1.- Inactivación de las diferentes morfologías de colifagos somáticos por efecto del tratamiento con cloro

El efecto del tratamiento con cloro produjo una variación de los porcentajes de los tipos morfológicos más representativos de colifagos somáticos (*Myoviridae* y *Siphoviridae*) observados antes y después del tratamiento. Se produjo un incremento en el porcentaje de fagos del tipo *Siphoviridae*, respecto a los *Myoviridae*, después del tratamiento con cloro. Este efecto se observó tanto para agua residual bruta como para el efluente secundario (Tabla 3.14).

El descenso de los valores de colifagos somáticos fueron superiores en estos experimentos a los observados en el apartado 3.3.1.2.1. Como ya se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos, en estos experimentos se utilizó un tiempo de tratamiento con cloro de 30 minutos en tanto que en los experimentos mostrados anteriormente fue de 20 minutos.

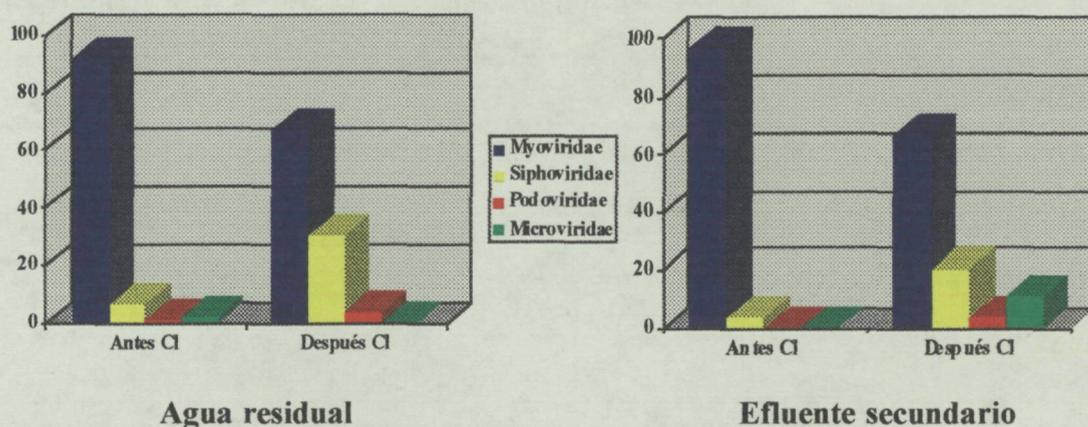
**Tabla 3.14.-** Efecto del tratamiento con cloro en la distribución de tipos morfológicos de colifagos somáticos en agua residual y en un efluente secundario.

	Cloración del agua residual		Cloración del efluente secundario	
	Antes de la cloración	Después de la cloración	Antes de la cloración	Después de la cloración
ufp/ml	18000	1200	1200	110
n <sup>(a)</sup>	100	30	30	30
% <i>Myoviridae</i>	91,0	66,7	96,7	66,7
% <i>Siphoviridae</i>	6,0	30,0	3,3	20,0
% <i>Podoviridae</i>	1,0	3,3	0,0	3,3
% <i>Microviridae</i>	2,0	0,0	0,0	10,0

(a) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

Estos resultados pueden visualizarse de nuevo gráficamente

**Gráfica 3.10.-** Variación en los porcentajes de morfologías de bacteriófagos por efecto del tratamiento con cloro, en muestras de agua residual y de efluente secundario.



La distribución, en agua residual y en efluente secundario, de los diferentes subtipos dentro de los dos tipos morfológicos principales (aspecto de la cápside en morfología *Myoviridae* y aspecto de las colas en morfología *Siphoviridae*), también presentó variaciones. Se observó que el **100 %** de los aislamientos de bacteriófagos de morfología *Myoviridae* presentaron cápside alargada después del tratamiento con cloro, mientras que antes de aplicar el tratamiento, era mayoritario el subtipo de cápside isométrica. En el caso de los *Siphoviridae*, aparecieron bacteriófagos de cola curvada después del tratamiento, calculándose para este subtipo porcentajes que oscilaron entre el **55** y el **60 %**.

Conociendo los números del conjunto de colifagos somáticos, así como los porcentajes de los diferentes morfotipos, se pudo calcular la reducción decimal para las dos morfologías más representativas en estos experimentos antes y después del

tratamiento con cloro. En ambos casos, la reducción decimal fue superior para los bacteriófagos de morfología *Myoviridae* que para los *Siphoviridae* (Tabla 3.15).

**Tabla 3.15.-** Reducción decimal de los tipos morfológicos mayoritarios de colifagos somáticos después del tratamiento con cloro.

	Cloración del agua residual	Cloración del efluente secundario
Colifagos somáticos	1,2	1,0
<i>Myoviridae</i> <sup>(a)</sup>	1,3	1,2
<i>Siphoviridae</i> <sup>(b)</sup>	0,5	0,3

(a) Colifagos somáticos con la morfología *Myoviridae*.

(b) Colifagos somáticos con la morfología *Siphoviridae*.

### 3.3.2.5.3.2.- Inactivación de las diferentes morfologías de los bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 por efecto del tratamiento con cloro

Dado que los resultados anteriores indicaron que en su inicio, *E. coli* O157:H7 detectó un mayor número de bacteriófagos *Siphoviridae* que *E. coli* CN13, se quiso estudiar la inactivación morfológica diferencial de los fagos aislados con *E. coli* O157:H7. Para ello se aprovecharon los experimentos de inactivación por tratamiento con cloro descritos en el apartado 3.3.1.3.1 y se calcularon los porcentajes de las diferentes morfologías que infectan a O157:H7 antes y después de la cloración (Tabla 3.16). De nuevo se quiere recordar que, como ya se ha indicado en el apartado de Material y Métodos de este capítulo, en estos experimentos se realizó el aislamiento de los fagos infecciosos para O157:H7 con medio de triptona antes y después de someterlos a un tratamiento con cloro durante 20 minutos.

**Tabla 3.16.-** Efecto del tratamiento con cloro en la distribución de tipos morfológicos de bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 en agua residual.

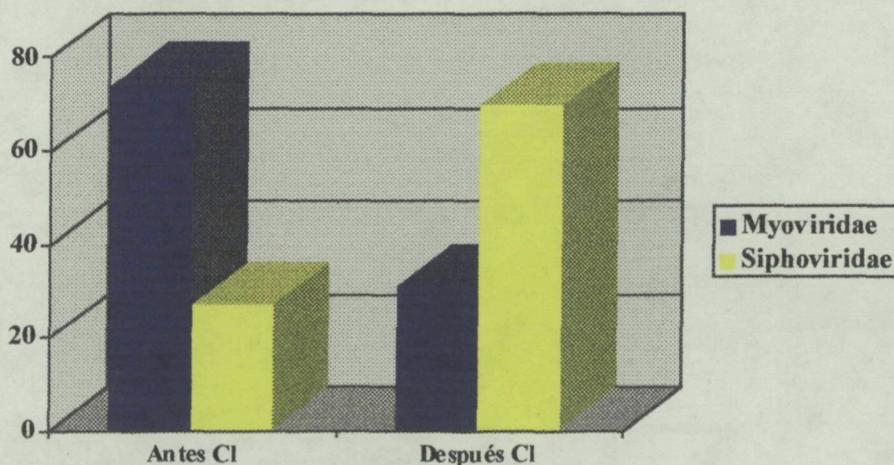
	Cloración del agua residual <sup>(a)</sup>		Reducción decimal
	Antes de la cloración	Después de la cloración	
ufp/ml	1,1.10 <sup>2</sup>	2,5.10 <sup>1</sup>	0,64
n <sup>(b)</sup>	45	39	
% <i>Myoviridae</i>	73,3	30,8	1,0
% <i>Siphoviridae</i>	26,7	69,2	0,3

(a) El tiempo empleado para el tratamiento con cloro fue de 20 minutos.

(b) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

Se observó que, de nuevo, se producía mayor inactivación de los bacteriófagos de morfología *Myoviridae* y un aumento en el porcentaje de bacteriófagos de morfología *Siphoviridae* (Gráfica 3.11).

**Gráfica 3.11.-** Variación en los porcentajes de morfologías de bacteriófagos infecciosos para O157:H7 por efecto del tratamiento con cloro en muestras de agua residual.



Estos resultados no son directamente comparables con los obtenidos con *E. coli* CN13, dado que los tiempos utilizados para el tratamiento con cloro son diferentes (30 minutos en el caso de los colifagos somáticos y 20 minutos en estos experimentos). No obstante, el efecto de incremento de porcentaje de fagos del tipo *Siphoviridae* después del tratamiento con cloro es similar para los aislamientos de bacteriófagos realizados con las dos cepas.

## Capítulo 3

### 3.4.- Discusión

En los ensayos descritos en este capítulo se determinó la persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para *E. coli* O157:H7 frente a diferentes procesos de inactivación. Puesto que es conocido que los bacteriófagos persisten mejor que las bacterias a los procesos de inactivación (IAWPRC Study Group on Health Related Microbiology. 1991), se comparó la persistencia que presentó *E. coli* y *E. coli* O157:H7 respecto a la persistencia que presentaron los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 que infectan a *E.coli* O157:H7 ATCC 43888, frente a los diversos procesos de inactivación.

Asimismo se estudió la diferente persistencia a los procesos de inactivación de los dos morfotipos predominantes de colifagos capaces de infectar a *E. coli* O157:H7 (*Myoviridae* y *Siphoviridae*). Para ello se realizó un amplio estudio sobre la inactivación diferencial de los diferentes morfotipos de colifagos somáticos frente a diferentes procesos de inactivación, utilizando los colifagos capaces de infectar a *E. coli* CN13.

Primeramente se estudió la presencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en muestras de agua de el río Llobregat. Como ya se indicó en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, el agua del río Llobregat en el punto analizado tiene unos niveles de contaminación fecal muy inferiores a los de las aguas residuales de nuestra zona, como consecuencia de cierto proceso de dilución y depuración natural. Los resultados obtenidos indicaron que los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7, están presentes en el agua de río y que, por tanto, tienen un elevado nivel de persistencia en el medio acuático

La enumeración de colifagos somáticos indicó que estos han disminuido aproximadamente 2 logaritmos respecto a los valores detectados para estos fagos en agua residual del área urbana de Barcelona. Sin embargo, el conjunto de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 mostraron una reducción menor, tal y como se observa por los resultados obtenidos en la enumeración de estos fagos en agua de río, tan sólo un logaritmo por debajo de los valores detectados en agua residual.

Los análisis realizados en agua del río Llobregat indicaban la presencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua de río, pero no permitían realizar un estudio sobre la persistencia de estos fagos ante procesos de inactivación natural. Tampoco daban información sobre si estos fagos se inactivan en mayor o menor medida que otros grupos de fagos, ni permitían determinar si eran más persistentes que *E. coli* O157:H7 frente a la inactivación natural. Con el fin de evaluar con mayor concreción la persistencia de estos fagos frente a procesos de inactivación natural, se realizaron los experimentos de inactivación natural "*in situ*".

La simulación de los procesos de inactivación natural se realizó mediante dilución del agua residual inoculada en agua de río. Posteriormente se sumergió esta mezcla en la cubeta de análisis "on line", descrita en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, que recibe un influjo constante de la misma agua de río y que por tanto puede considerarse como parte del río. De este modo, se sometió a la contaminación presente en el agua residual a los mismos procesos de inactivación natural que tienen lugar cuando, desde un foco de contaminación, se vierte agua residual a un río.

Los resultados obtenidos indicaron que los bacteriófagos (fagos infecciosos para CN13 y fagos infecciosos para O157:H7) presentan patrones de inactivación muy similares y que, en ambos casos, presentaron una inactivación muy inferior a la de las bacterias. Teniendo en cuenta que en estos experimentos, la población bacteriana mayoritaria correspondía a *E. coli* O157:H7, puesto que fue inoculada

---

artificialmente, se puede afirmar que los fagos presentes en la muestra de agua residual y en concreto los fagos que infectan a O157:H7, presentaron mayor persistencia a los procesos inactivación natural que la cepa bacteriana que son capaces de infectar.

Se observó que la inactivación que presentaron los dos grupos de bacteriófagos estudiados (colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7) fue sensiblemente superior el primer experimento (A) que en los otros dos experimentos (B y C). No obstante, hay que tener en cuenta que el experimento A se realizó a una temperatura del agua de río de 25 °C, mientras que la temperatura del agua en los otros dos experimentos fue inferior (16 y 14 °C respectivamente). Asimismo, la insolación que tuvo lugar en las fechas en que se realizó el primer experimento fue también superior a la que se dio durante la realización de los otros dos experimentos. Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, la luz solar es un factor determinante en los procesos de inactivación natural. Por tanto, parece que la radiación solar y la temperatura influyeron considerablemente en la inactivación de los bacteriófagos. Al mismo tiempo que se realizaron estos experimentos, miembros de nuestro grupo de investigación llevaron a cabo experimentos paralelos con otros parámetros microbiológicos y realizados siguiendo idéntica metodología. Estos experimentos mostraron que la insolación y la temperatura influyeron sobre la inactivación de las poblaciones bacterianas presentes en las muestra diluida de igual modo que sucedió con los bacteriófagos (datos no presentados en esta memoria).

En estos mismos estudios, los resultados obtenidos en los análisis de detección de los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7, indicaron que estos fagos presentan, al igual que el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7, mayor persistencia frente a los procesos de inactivación que *E. coli* y en concreto que *E. coli* O157:H7. Si bien la aproximación experimental realizada no permite cuantificar con precisión el número de fagos portadores del gen de la Stx 2, la comparación entre las reducciones logarítmicas del conjunto de fagos que infectan a *E. coli* O157:H7 frente a los volúmenes mínimos de agua utilizada para realizar enriquecimientos en los

que se detectó presencia de los fagos portadores del gen de la toxina, parecen indicar que, al menos en los experimentos A y B, estos fagos persisten a la inactivación natural como mínimo igual que el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7. En el experimento C, no pudo confirmarse esto mismo, dado que no pudieron detectarse fagos portadores del gen de la Stx 2 después del inicio del experimento.

En el experimento A los fagos portadores del gen de la Stx 2 fueron en el inicio (tiempo cero) superiores que en los otros dos experimentos (B y C). En el primer experimento la reducción presentada por el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7 fue a las 168 horas de 2,4 logaritmos. Sin embargo, la reducción presentada por los fagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la toxina fue menor a dos logaritmos, dado que se detectaron en el sobrenadante de cultivos infectados con fagos purificados con un volumen de muestra sólo diez veces superior al del inicio del experimento.

Resultados similares se observaron en el experimento B, donde la reducción de 1,4 logaritmos presentada por el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7 no se reflejó en los fagos portadores del gen de la Stx 2, los cuales mostraron una reducción de menos de un logaritmo.

En el experimento C, como ya se indicó anteriormente, no se pudo comparar la inactivación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 con el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7, dado que éstos no se detectaron después del inicio del experimento. No obstante, considerando que al inicio se detectaron en volúmenes correspondientes a 10 ml y que después no se detectaron, se puede estimar que se produjo un descenso mayor o igual a un logaritmo, lo que indicaría que se inactivaron igual o más que el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7.

Los resultados obtenidos en el experimento C para los fagos portadores del gen de la Stx 2 no coinciden totalmente con los obtenidos en los dos experimentos

anteriores. No obstante, existen diferencias entre los tres experimentos que podrían explicar esta falta de coincidencia. Por un lado, si se compara con el experimento A, se observa que en éste, los niveles iniciales de fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en la muestra eran diez veces superiores (se detectaron en sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de 1 ml de muestra, mientras que en el experimento C sólo se detectaron en 10 ml). Dado que, a las 168 horas desde el inicio del experimento A se observó que se detectaban en un volumen de muestra diez veces mayor, lo que indicaría que se inactivaron del orden de un logaritmo, es explicable que no se detectaran en el experimento C, donde se tendría que haber realizado el análisis de 100 ml de muestra para poder observar la misma inactivación. Por otro lado, si se compara el experimento C con el experimento B, se ha de tener en cuenta que el tiempo de análisis en que se realizó la detección de los fagos portadores del gen de la Stx 2 fue superior (168 horas), lo que podría explicar el mayor grado de inactivación de estos fagos.

En resumen, los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7 parecen ser, cuanto menos, igual de persistentes que el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7 y que los colifagos somáticos y, en cualquier caso, son mucho más persistentes a la inactivación natural que *E. coli* O157:H7.

Los siguientes estudios se realizaron a fin de estudiar la persistencia de fagos infecciosos para O157:H7 y de la propia bacteria frente a uno de los tratamientos más comúnmente aplicado en los procesos de potabilización de aguas y depuración de efluentes secundarios: el tratamiento con cloro.

En los experimentos de cloración, se observó una inactivación de las bacterias muy superior que la de los bacteriófagos. Las cepas de *E. coli* presentes en el agua residual siguieron los mismos patrones de inactivación que *E. coli* O157:H7 y, por su parte, los colifagos somáticos presentaron el mismo patrón de inactivación que los

fagos infecciosos para O157:H7. En aquellos experimentos de tratamiento con cloro en que se incorporó al estudio la detección de los fagos portadores del gen de la Stx 2, los resultados indicaron que estos fagos presentaban, al menos, la misma persistencia a la inactivación por cloro que el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7 y que, por tanto, presentaban mayor persistencia que *E. coli* O157:H7.

Los siguientes estudios se estudió la persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7 y de *E. coli* O157:H7 frente a un tratamiento de pasteurización. Como ya se indicó en la introducción de este capítulo, este proceso es comúnmente utilizado en el tratamiento de alimentos destinados al consumo. Puesto que los alimentos son uno de los principales vehículos de transmisión de *E. coli* O157:H7, se consideró interesante estudiar la inactivación que presentaban la cepa y los fagos portadores del gen de la Stx 2 que la infectan frente a este tratamiento. Dado que todos los estudios realizados estaban dirigidos a evaluar la persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas, se estudió el tratamiento de pasteurización aplicándolo en una muestra de agua residual.

Los resultados obtenidos indicaron una fuerte inactivación de *E. coli* O157:H7 inoculada en las muestras, así como de las cepas de *E. coli* presentes en el agua residual analizada. Por el contrario, la inactivación que presentaron los bacteriófagos (colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7) fue casi imperceptible. Del conjunto de fagos infecciosos para O157:H7, aquéllos portadores del gen de la toxina no mostraron inactivación, puesto que fueron detectados en los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de los mismos volúmenes de agua residual antes y después del tratamiento.

Después de esta serie de experimentos, quedó demostrada la mayor persistencia de los fagos infecciosos para O157:H7 y portadores del gen de la Stx 2 en comparación a la inactivación mostrada por *E. coli* O157:H7 frente a diferentes procesos de inactivación. Asimismo, se confirmaron los resultados obtenidos por

otros autores que destacaron la mayor persistencia de los bacteriófagos respecto a las bacterias frente a diferentes procesos de inactivación y depuración de aguas (Bell y col., 1976; Sobsey, 1989; Jofre y col., 1995).

Los resultados discutidos anteriormente indican que los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 constituyen sólo una fracción del conjunto de bacteriófagos infecciosos para O157:H7. Asimismo, en los datos anteriores se puede intuir que los bacteriófagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la Stx 2 podrían ser más resistentes a la inactivación que el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7.

Se ha descrito que los fagos portadores del gen de la Stx 2 son fagos tipo lamboide (Datz y col., 1996), y como se ha indicado en la introducción de este capítulo, el fago lambda pertenece a la familia *Siphoviridae* (Franki y col., 1991). Algunos estudios preliminares mostraban que los fagos del tipo *Siphoviridae* presentan gran persistencia ante procesos de inactivación natural y procesos de tratamiento de aguas (Lasobras y col., 1997). Por ello se quiso comparar la resistencia a la inactivación de los bacteriófagos con morfología lamboide respecto a otros grupos de bacteriófagos.

Este estudio de inactivación de diferentes morfotipos de bacteriófagos infecciosos para O157:H7 se podía haber llevado a cabo directamente con *E. coli* O157:H7 pero, como se ha señalado en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, se eligió la cepa CN13 de *E. coli*. La cepa CN13 de *E. coli*, utilizada para la detección de colifagos somáticos (Pedroso y Martins, 1995), detecta, según estudios previos (Lasobras y col., 1997), principalmente fagos del tipo *Myoviridae* y *Siphoviridae*, de igual modo que sucede con O157:H7. Asimismo detecta grandes cantidades de bacteriófagos en aguas contaminadas con heces humanas y animales (Payment y col., 1993). Es por ello que se eligió esta cepa para estudiar la inactivación de los diferentes morfotipos de bacteriófagos frente a diferentes procesos de

inactivación, ya que al ser mucho más abundantes que aquéllos que infectan O157:H7, permitía encontrar, después de los procesos de inactivación, números aún detectables de bacteriófagos.

Ante la posibilidad de que ciertas variaciones en la metodología pudieran ejercer una cierta influencia sobre los bacteriófagos detectados, como consecuencia de cambios en la superficie de la célula o la influencia de iones en la adsorción de diferentes grupos de bacteriófagos, se realizaron algunas pruebas para determinar la influencia de la metodología sobre la distribución de morfotipos de bacteriófagos que infectan una especie bacteriana, en este caso *E. coli*. Como era previsible, se detectó dicha influencia y como consecuencia se eligió aquel método que a nuestro entender daba aquella distribución de morfotipos que nos permitiría una mejor observación de los cambios que pudieran tener lugar y además se utilizó siempre la misma metodología.

Con esta metodología se estudiaron diferentes tipos de muestras. Inicialmente se analizaron muestras que supuestamente presentaban contaminación reciente, entendiendo por ésta la que presentan una proximidad temporal y espacial al foco de la contaminación. Los datos obtenidos con este grupo de muestras indicaron que no existían diferencias significativas entre ellas. Tanto en aguas residuales con contaminación de origen humano o animal, los porcentajes de cada tipo morfológico de colifago fueron similares. Asimismo, las muestras de efluente de depuradora se pudieron incluir en este grupo, lo que indica que los procesos aplicados en esta estación de tratamiento de aguas residuales, si bien producen una reducción aproximada del 90 % en el recuento de bacteriófagos, no influyen en la distribución de los diferentes tipos morfológicos.

Los resultados demuestran que el tipo morfológico dominante en muestras de agua con contaminación reciente, correspondió al tipo *Myoviridae*. Esta observación está de acuerdo con estudios anteriores (Ackermann y col., 1983). La segunda

morfología más abundante, a gran distancia de la primera, fue la morfología *Siphoviridae*, mientras que las otras dos morfologías *Podoviridae* y *Microviridae*, se detectaron en proporciones inferiores. Los subtipos más frecuentes en muestras de contaminación reciente indicaron la presencia de cápsides isométricas en fagos de la familia *Myoviridae* y fagos de colas rectas en la familia *Siphoviridae*.

Los análisis realizados con *E. coli* O157:H7 como cepa huésped mostraron que ésta detectó diferentes proporciones de los diferentes tipos morfológicos de colifagos que *E. coli* CN13, aunque se continuó observando una mayor proporción de fagos del tipo *Myoviridae*.

El siguiente paso fue estudiar la inactivación de las diferentes morfologías de bacteriófagos presentes en muestras sometidas a diferentes procesos de inactivación.

En primer lugar, se estudió la variación en los porcentajes de los diferentes tipos morfológicos de fagos presentes en aguas presumiblemente sometidas a procesos de inactivación natural. Para este estudio se utilizó un ecosistema natural, las aguas del río Ter, y un sistema de inactivación natural "*in situ*". Los resultados obtenidos en ambos grupos de experimentos mostraron un cambio significativo en la distribución de los porcentajes de las diferentes morfologías de bacteriófagos, si se comparan con la que presentaban en aguas con contaminación reciente. La morfología *Myoviridae* sufrió un descenso de sus proporciones a favor de la morfología *Siphoviridae*. Además, parece que entre los fagos de morfología tipo *Myoviridae* pasaron a predominar subtipos de cápside alargada en detrimento de los subtipos de cápside isométrica, más frecuentes en aguas de contaminación reciente, por lo que se sugiere también la menor resistencia de éstas últimas a los procesos de inactivación. Asimismo, aumentaron las proporciones de los fagos de la morfología *Siphoviridae* en estas muestras. Dentro de este grupo, se detectaron subtipos que mostraron colas menos rígidas, más curvadas que las que se observaban en muestras de contaminación reciente, apareciendo incluso

lo que se ha denominado “colas rizadas”. Esta última morfología es la que presenta mayor persistencia a los procesos de inactivación natural.

Las pruebas realizadas con muestras provenientes del río Ter resultaron muy útiles como modelo de estudio de la inactivación natural. El primer punto mostró un patrón típico de las muestras con contaminación reciente, mientras que el segundo punto aparece como un estadio intermedio. En el tercer punto se observa el final del proceso de inactivación natural, donde el porcentaje de las morfologías de bacteriófagos se invirtió claramente a favor del tipo *Siphoviridae* de colas curvadas.

Las pruebas de inactivación “*in situ*” realizadas indicaron también un efecto similar a pequeña escala. En el experimento B, la muestra inicial presentó la distribución de morfotipos típica del agua residual, lo que era esperable. A medida que estos valores de titulación disminuyeron por efecto de la inactivación natural, se observó el cambio de los morfotipos predominantes, aumentando de nuevo el porcentaje de fagos *Siphoviridae*, como ocurría con las muestras de río alejadas del foco de contaminación principal.

En el experimento A, la filtración previa de la muestra indicó, al inicio del experimento, valores distintos a los correspondientes a un agua de contaminación reciente, efecto ya demostrado causado por la filtración. A pesar de ello, el patrón de selección de morfotipos es idéntico al experimento B, favoreciéndose la selección de la morfología *Siphoviridae*.

Estos resultados sugieren que la persistencia de los bacteriófagos en ambientes acuáticos está fuertemente relacionada con su morfología, aunque posiblemente no sea ésta la única causa de las diferencias observadas. De entre todos, los fagos de la familia *Siphoviridae* con colas curvadas parecen ser los más capaces de persistir bajo condiciones de inactivación natural. Ésta podría ser una de las razones por las que

muchos bacteriófagos descritos, aislados del medio ambiente, corresponden a ésta morfología (Francki y col, 1991).

Los estudios de tratamiento con cloro se realizaron para observar si los procesos de tratamiento artificiales influían de igual modo que los procesos de inactivación natural. Se observó de nuevo una inactivación diferencial de los tipos morfológicos, así como un incremento en el porcentaje de fagos del tipo *Siphoviridae* y una consiguiente disminución de fagos de tipo *Myoviridae*. Asimismo se incrementó el porcentaje de fagos *Myoviridae* con cápside alargada y de fagos del tipo *Siphoviridae* con colas curvadas después del tratamiento con cloro.

En los resultados obtenidos los experimentos de tratamiento con cloro, se puede observar también que los resultados comparativos entre las muestras de agua residual y las muestras provenientes del efluente de la estación de tratamiento que depura éstas mismas aguas, indican que la inactivación diferencial de los tipos morfológicos presentes en ambas muestras fue muy similar.

La inactivación diferencial de los fagos infecciosos para O157:H7 por acción del tratamiento con cloro mostró un efecto global de aumento de la proporción de fagos del tipo *Siphoviridae* respecto a los *Myoviridae* después de la cloración. Este mismo efecto ya se observó con los colifagos somáticos, demostrándose de nuevo que este tipo morfológico se selecciona favorablemente en muestras sometidas a un tratamiento con cloro.

Los resultados obtenidos en el estudio de inactivación de los diferentes morfotipos de bacteriófagos indican claramente que los fagos de la familia *Siphoviridae* son los que presentan mayor persistencia ante procesos de depuración e inactivación natural y, dentro de este grupo, parece que se seleccionan favorablemente aquéllos que muestran colas curvas o rizadas.

Resulta interesante destacar que un 25 % de los fagos que infectan a *E. coli* O157:H7 son precisamente del tipo *Siphoviridae* de cola curva. Esto indica que una cuarta parte de los fagos que infectan a ésta cepa presentan una elevada persistencia a la inactivación.

Como ya se ha indicado anteriormente, del conjunto de fagos que infectan a O157:H7, un porcentaje corresponden a fagos portadores del gen de la Stx 2, y por los experimentos realizados en la primera parte de este capítulo, éstos presentan alta persistencia a los procesos de inactivación.

La bibliografía indica que los fagos portadores del gen de la Stx 2 son fagos del tipo lamboide, que corresponden a la familia *Siphoviridae*. Por tanto, los fagos portadores del gen de la Stx 2 presentan, tanto por su morfología como por los resultados obtenidos en los estudios de inactivación realizados, una elevada persistencia a los procesos de inactivación, tanto natural como artificial.

En contraposición con los resultados obtenidos en este capítulo, el fago 933 W, obtenido por inducción lisogénica con Mitomicina a partir de *E. coli* C600(933W) (tal como se indica en el Capítulo 1 de esta memoria de tesis), mostró una elevada inestabilidad una vez activado su ciclo lítico. Ello parece indicar que dicho bacteriófago debe ser defectivo en alguna característica que le impide permanecer estable fuera de la cepa que lo transporta como profago.

Los resultados obtenidos indican claramente que los fagos son un reservorio de genes que codifican para la Stx 2 en ambientes naturales. Por ello debe ser posible aislar bacteriófagos portadores de la toxina presentes en muestras ambientales. No obstante, los intentos realizados hasta el momento para obtener un clon de fagos portadores de la toxina, a partir de muestras de agua residual, no han dado resultados satisfactorios (datos no presentados). En estos estudios se ha utilizado *E. coli* O157:H7 como cepa huésped para aislar fagos portadores del gen de la Stx 2. Los

fracasos en estos experimentos parecen indicar que posiblemente O157:H7 podría no ser el huésped adecuado para detectar estos fagos. Por lo que se sugiere que *E. coli* O157:H7 no es el origen de los fagos portadores de la toxina. Es posible que otros serotipos de *E. coli* o incluso otras especies bacterianas sean el auténtico origen de los fagos portadores del gen de la Stx 2. Es conocido que bacteriófagos infecciosos para *Shigella* son capaces de infectar a *E. coli* O157:H7 y viceversa (Kasatiya, 1987), por tanto la utilización de *Shigella* como cepa huésped podría permitir en subsiguientes estudios realizar el aislamiento de un clon de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales.



*Discusión Final*

---



#### 4.- Discusión Final

Los bacteriófagos portadores de genes están relacionados con la patogenicidad de las bacterias a las que infectan. Concretamente en el caso de Stx 2, este hecho se confirma puesto que la inducción de fagos lisogénicos produce incrementos de producción de la toxina en las bacterias que lisogenizan. Los fagos representan pues, potenciales elementos móviles entre especies bacterianas filogenéticamente cercanas. La producción de Stx se ha demostrado en otras enterobacterias distintas de *E. coli*, por tanto, la transferencia del carácter mediada por lisogenización de los fagos portadores del gen de la Stx 2, podría explicar la presencia de las toxinas Stx en diferentes cepas bacterianas, así como el amplio rango de variabilidad de la familia de las toxinas de *Shigella*.

Hasta el momento, ningún estudio previo permitía estimar la cantidad de fagos portadores de genes implicados en patogenicidad circulantes en el medio ambiente. Los resultados que aquí se muestran, dan información sobre la cantidad de estos fagos en muestras de agua residual, que por los niveles de contaminación que presentan, son representativas de las aguas residuales de los países desarrollados.

Utilizando los métodos descritos en esta memoria, basados en la técnica de la PCR, los fagos portadores del gen de la Stx 2 han sido detectados en agua residual del área urbana de Barcelona, en cantidades elevadas.

Se pretendió comprobar, además, si los fagos portadores del gen de la Stx 2 eran infecciosos para una cepa de *E. coli* O157:H7. La infectividad de estos fagos para O157:H7 quedó demostrada con el hecho de que se detectaran en volúmenes de 0,1 ml de agua residual (llegando en una ocasión a ser detectados en 0,02 ml), después de haber infectado un cultivo de O157:H7, mientras que no se detectaban en los mismos volúmenes cuando se analizaba directamente la muestra, sin enriquecimiento previo.

La caracterización complementaria de los amplímeros obtenidos así como el estudio de las secuencias de dichos amplímeros mostraron que, efectivamente, se detectó el gen de la toxina presente en el genoma de fagos purificados de agua residual.

La detección de la toxina en el sobrenadante de los cultivos de O157:H7 infectados con fagos purificados de agua residual, así como las pruebas de citotoxicidad realizadas demostraron que algunos de estos fagos transportaban el gen completo en su genoma y que esten se expresa en su totalidad.

La estimación del número de fagos, aplicando la técnica del NMP, si bien debe ser tenida en cuenta sólo como una aproximación, indicó que el número de fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7 en aguas residuales del área urbana de Barcelona oscila entre 1 y 10 fagos/ml de agua residual. Esto representa aproximadamente el 1 % del conjunto de fagos infecciosos para O157:H7. La información existente sobre la presencia de *E. coli* O157:H7 en aguas residuales es muy escasa, no obstante los datos disponibles indican que *E. coli* O157:H7 no es tan abundante en ambientes naturales como los fagos que la infectan, detectados en este estudio.

Se ha podido detectar también la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales de origen animal. Asimismo se han detectado en aguas residuales de distintos orígenes geográficos. Por ello hay que considerar la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual como un hecho general, aunque más variable que la presencia de *E. coli*, colifagos somáticos o los fagos que infectan a O157:H7. Estos mismos estudios indican que los fagos portadores del gen de la Stx 2 no son una fracción constante entre el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7, para todas las aguas analizadas, habiéndose observado variación en la cantidad de fagos portadores del gen de la toxina en las diferentes muestras estudiadas, independientemente del número total de fagos que infectan a O157:H7.

---

Este estudio abre la posibilidad de que existan fagos portadores de genes que codifican para alguna variable de la Stx 2, por lo que consideramos que la metodología empleada podría ser útil para determinar la presencia de fagos portadores de los genes que codifican para las variables de la Stx 2.

Se ha podido observar una gran persistencia de estos fagos ante diferentes procesos de depuración respecto a *E. coli* O157:H7. Asimismo, y teniendo en cuenta que los fagos portadores del gen de la Stx 2 corresponden a la familia *Siphoviridae*, estos fagos presentan mayor persistencia a los procesos de inactivación que otros tipos morfológicos de bacteriófagos. Dado que los bacteriófagos son, en general, más resistentes que *E. coli* a la desinfección (Sobsey y col., 1989), a tratamientos de depuración (Jofre y col., 1995) y a la inactivación natural en aguas (Bell, 1976; Kott y col., 1968), se puede pensar que, en realidad, los bacteriófagos son los que actúan como reservorio natural de genes en el medio ambiente.

La inestabilidad del fago 933 W obtenido por inducción lisogénica de la cepa de *E. coli* C600(933W), en contraposición a la elevada persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 detectados en este estudio, parecen indicar que ni *E. coli* C y posiblemente tampoco *E. coli* O157:H7 son los huéspedes naturales de los fagos portadores del gen de la toxina presentes en aguas naturales. Esta aseveración conjuntamente con los elevados niveles detectados de fagos portadores del gen de la Stx 2 sugieren que otras cepas de *E. coli* o incluso otras enterobacterias pueden ser el origen de los fagos portadores del gen de la toxina en el medio ambiente.

Creemos que este trabajo abre interesantes perspectivas sobre el estudio de fagos que son portadores de genes que codifican para la Stx, y que debe determinarse la importancia de los fagos en la transferencia de estos genes entre diferentes especies de enterobacterias en condiciones naturales. Pensamos que sería interesante determinar el papel de los fagos como reservorio de estos genes en el medio ambiente y que la

ingestión de fagos por si misma, bien sea por humanos o por animales puede incluso causar la conversión de *E. coli* presente en la flora intestinal del mismo modo que ocurre en el medio ambiente. Otros autores (Datz y col., 1996; Martins y col., 1992, Beutin y col., 1997) sugieren asimismo que serían interesantes más estudios encaminados a determinar la distribución de los bacteriófagos en ambientes acuáticos y determinar el papel que juegan como elementos de transmisión entre diferentes cepas bacterianas. Mayor conocimiento del tema puede dar información sobre la transferencia horizontal de este tipo de genes.

Subsiguientes investigaciones en este campo podrían dar información sobre los bacteriófagos y la transferencia de genes englobados en su genoma en el medio ambiente. Esta información podría dar lugar a que la política sanitaria actual, referida tanto a tratamientos de depuración de aguas como a prácticas sanitarias con alimentos, sea ajustada a fin de minimizar riesgos, teniendo en cuenta las posibilidades que reflejan estudios como el que se ha presentado en esta memoria de tesis doctoral.

*Conclusiones*

---



## 5.- Conclusiones

1.- La metodología empleada, basada en la técnica de la PCR, ha permitido llevar a cabo la detección de fagos portadores del gen de la Stx 2 en muestras de agua residual.

2.- Incorporando un paso previo de enriquecimiento de los bacteriófagos presentes en el agua residual, la técnica utilizada ha permitido detectar aquellos fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7.

3.- Los fagos portadores del gen de la Stx 2 se encuentran presentes en agua residual del área urbana de Barcelona en elevada cantidad. La estimación realizada indica que los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7 se encuentran presentes en agua residual del área urbana de Barcelona en números que oscilan entre 1 y 10 fagos por ml de agua residual.

4.- Los fagos portadores del gen de la Stx 2 son una fracción del total de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7. Mediante la estimación realizada, se calcula que corresponden aproximadamente al 1 % del conjunto de fagos que infectan a *E. coli* O157:H7.

5.- La infección por parte de estos fagos de un cultivo de una cepa inicialmente no productora de la toxina Stx 2, permite que en dicho cultivo se produzca la toxina después de realizada la infección, la cual se reconoce mediante anticuerpos específicos.

6.- La toxina presente en los sobrenadantes de cultivos de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) infectados con fagos portadores del gen de la Stx 2 presentes en agua residual, es activa sobre un cultivo de células Vero.

7.- Los fagos portadores del gen de la Stx 2, infecciosos para *E. coli* O157:H7 se encuentran presentes en muestras de agua residual geográficamente alejadas y diversas. Por ello se concluye que la presencia de estos fagos en aguas residuales es un hecho generalizado.

8.- La técnica utilizada puede ser utilizada en futuros estudios a fin de detectar fagos portadores de los genes de las variables de la Stx 2.

9.- Los fagos portadores del gen de la Stx 2 muestran una mayor persistencia ante procesos de inactivación natural y tratamientos de desinfección que *E. coli* O157:H7.

10.- Los resultados obtenidos parecen indicar que los fagos portadores del gen de la Stx 2, infecciosos para O157:H7, son como mínimo tan persistentes ante procesos de inactivación natural y tratamientos de desinfección como el conjunto de fagos infecciosos para O157:H7.

11.- Los fagos de morfología *Siphoviridae* muestran mayor persistencia ante procesos de inactivación natural y tratamientos de desinfección que otros grupos morfológicos de bacteriófagos. Dado que los fagos portadores del gen de la Stx 2 son del tipo lambda y por tanto se incluyen dentro del grupo de fagos *Siphoviridae*, la potencial persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 se ve sustentada atendiendo a su morfología.

12.- Por todo lo expuesto anteriormente, se concluye que los fagos portadores del gen de la Stx 2 podrían actuar como reservorio del gen en el medio ambiente. Serán necesarios posteriores estudios a fin de evaluar el papel que juegan los bacteriófagos en el fenómeno de transferencia horizontal de genes en el medio ambiente.

*Materiales y Métodos Generales*

---



## **6.- Materiales y Métodos Generales**

En los estudios presentados en esta memoria de tesis doctoral se han utilizado protocolos previamente descritos por otros autores. Algunos de estos protocolos han sido adaptados para poder aplicarlos a los estudios realizados.

### **6.1.- Purificación parcial de bacteriófagos a partir de agua residual**

Se realizó una adaptación del método descrito por Puig y col. en 1994 para la concentración de virus animales a partir de muestras de aguas residuales.

- 1.- Centrifugar el volumen que se desea estudiar de agua residual durante 3 horas y 45 minutos a 48.000xg.
- 2.- Descartar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 4 ml tampón Glicina 0,25 M pH 9,5 (Anexo 2)
- 3.- Mantener en hielo durante 30 minutos, agitando la muestra a intervalos de 5 minutos.
- 4.- Añadir 4 ml de tampón fosfato salino PBS 2X (Anexo 2) a cada tubo. Centrifugar 20 minutos a 12.000xg.
- 5.- Recuperar el sobrenadante y filtrarlo por membranas de 0,22  $\mu$ m de baja afinidad para proteínas ( Millex™-GV Millipore).
- 6.- Centrifugar las muestras a 161.000xg 1 hora a 4 °C. (Ultracentrífuga Beckman, rotor 70iTI).
- 7.- Resuspender el producto centrifugado en 100  $\mu$ l de tampón fosfato salino (PBS) 1X (Anexo 2).

### **6.2.- Purificación de bacteriófagos por gradientes de CsCl**

(Adaptación del método de Sambrook y col., 1989)

- 1.- Añadir 0,5 g de CsCl (Boehringer Mannheim) sólido a 1 ml de suspensión de concentrado de bacteriófagos. Disolver mediante agitación.

2.- Para realizar el gradiente se utilizan 3 soluciones de CsCl que representan tres densidades diferentes cada una ( 1,3 g/ml, 1,5 g/ml y 1,7 g/ml). Preparar las soluciones de CsCl a las densidades adecuadas como se indica en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.- Preparación de las soluciones de CsCl a las densidades utilizadas para la realización del gradiente.**

Densidad	CsCl (g)	H <sub>2</sub> O (ml)
volumen	1 ml	1 ml
1,7 g/ml	1,124	0,875
1,5 g/ml	0,908	1,09
1,3 g/ml	0,624	1,375

3.- Esterilizar las soluciones por filtración. Realizar el gradiente añadiendo en un tubo 2 ml de sacarosa al 20 % (Anexo 2). Posteriormente añadir 1 ml de cada una de las soluciones empezando por la correspondiente a una densidad de 1,3 g/ml y después las otras por orden creciente de densidad. La solución más densa (1,7 g/ml) se situará en el fondo del tubo, por encima de la sacarosa al 20 %, y por encima de ésta las siguientes soluciones ( 1,5 y 1,3 g/ml respectivamente). Para formar el gradiente se recomienda utilizar una pipeta Pasteur estéril colocada dentro del tubo e introducir con cuidado los gradientes por el interior de la pipeta, al finalizar retirar la pipeta con cuidado Asimismo se recomienda marcar en la superficie del tubo la zona correspondiente a la interfase entre el gradiente de 1,3 y el de 1,5. (\*).

4.- Sobre el gradiente verter con ayuda de una pipeta estéril la solución conteniendo el concentrado de bacteriófagos.

5.- Centrifugar el gradiente y la muestra a 22.000 rpm durante 2 horas a 4 °C (ultracentrifuga Beckman, rotor SW41 de ángulo variable).

6.- Observar la presencia de una banda gris-azulada, formada por los bacteriófagos presentes en la muestra, situada cerca de la interfase entre las densidades de 1,3 g/ml y 1,5 g/ml. Recuperar esta banda con una pipeta (en caso de utilizar tubos blandos se puede recuperar la banda pinchando el tubo con una aguja hipodérmica).

(\* ) **NOTA:** En un gradiente de CsCl, la mayoría de los bacteriófagos existentes se sitúan aproximadamente entre estas dos densidades (Francki y col., 1991). Es interesante localizar la zona correspondiente a la interfase entre las dos densidades como orientación de la zona donde se detectaran los bacteriófagos posteriormente.

---

### **6.3.- Diálisis de las muestras**

#### **6.3.1.- Preparación de bolsas de diálisis**

Las membranas de diálisis se presentan como un tubo largo cilíndrico. Para preparar las bolsas, cortar el tubo de diálisis en fragmentos de longitud variable, abiertas por los dos extremos. Manipular las bolsas con pinzas y si no es posible con guantes de latex, para evitar que las grasas de la piel obstruyan los poros.

Introducir las bolsas en un gran volumen de la solución de lavado de membranas de diálisis (Anexo 2). Hervir 10 minutos en la solución de lavado. Retirar las bolsas y lavarlas con agua bidestilada. A continuación hervirlas 10 minutos en la solución 1 mM de EDTA (Anexo 2). Dejar enfriar la solución de EDTA con las membranas y guardarlas a 4 °C.

Las bolsas dentro de la solución de EDTA pueden guardarse a 4 °C durante mucho de tiempo hasta su utilización. Antes de utilizarlas lavarlas por dentro y por fuera con agua bidestilada.

#### **6.3.2.- Diálisis de las muestras**

- 1.- Cerrar uno de los extremos de la bolsa con una pinza de diálisis, si es necesario doblar el extremo para que cierre mejor.
- 2.- Introducir la muestra que se pretende dializar en la bolsa y cerrarla por el otro extremo con otra pinza. Dejar 1/3 del volumen total de la bolsa de diálisis sin llenar.
- 3.- Preparar 1 litro de la solución de diálisis y enfriarla a 4 °C. Colocar la bolsa conteniendo la muestra en un vaso de precipitados y llenarlo con 500 ml de la solución de diálisis (\*).
- 4.- Mantener el tampón de diálisis en agitación durante aproximadamente 4 horas a 4 °C.

(\*) **NOTA:** Se recomienda fijar por uno de los extremos la bolsa de diálisis al vaso de precipitados donde se realiza la diálisis. Ésta se realiza en agitación y es importante que la bolsa se mantenga estática para favorecer el flujo del tampón de diálisis.

5.- Eliminar el tampón y sustituirlo por 500 ml de tampón de diálisis fresco. Mantener en agitación toda la noche a 4 °C.

6.- Abrir la bolsa por un extremo y, con cuidado, recuperar la muestra dializada.

#### **6.4.- Tratamiento con Nucleasas**

(Sambrook y col., 1989)

##### **6.4.1.- Protocolo para el tratamiento con ADNasa**

1.- Disolver 1 mgr ADNasa I liofilizada (Farmacia) en 1 ml de tampón para ADNasa (Anexo 2) obteniendo de este modo una solución de ADNasa a una concentración de 1 unidad de ADNasa I / $\mu$ l.

2.- Añadir a la muestra un volumen de la solución de ADNasa I para obtener una concentración final de  $10^{-3}$  unidades de ADNasa I/ $\mu$ l de muestra. Incubar la muestra a 37 °C durante 30 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

##### **6.4.2.- Protocolo para el tratamiento con ARNasa**

1.- Añadir la nucleasa para ARN (Farmacia) a una concentración final de  $10^{-3}$  unidades/ $\mu$ l de muestra.

2.- Incubar la muestra a 37 °C durante 30 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

#### **6.5.- Extracción de ADN**

En estos estudios se han seguido diferentes protocolos para la extracción de ADN, según fuera ADN de bacteriófagos o ADN de bacterias. A continuación se describen ambos protocolos.

##### **6.5.1.- Extracción de ADN de bacteriófagos**

(Sambrook y col. 1989)

La extracción se realiza a partir de una suspensión de bacteriófagos, preferiblemente con un número elevado de fagos por ml de suspensión.

**6.5.1.1.- Tratamiento con proteinasa K**

1.- En un microtubo estéril añadir 422,5 µl de la suspensión de bacteriófagos y a continuación los reactivos que se describen a continuación (Tabla 6.2):

**Tabla 6.2.-** Reactivos utilizados para el tratamiento con proteinasa K

Reactivo <sup>(a)</sup>	Volumen	Concentración final
EDTA 0,2 M	50µl	20 mM
Proteinasa K10 mgr/ml (Sigma)	2,5 µl	50µg/ml
SDS 10%	25µl	0,5%
.....		
Volumen final de la mezcla	500µl	

(a) La preparación de los reactivos se describe en el Anexo 2.

2.- Agitar suavemente por inversión. Incubar la mezcla a 45 °C durante 1 hora. Dejar enfriar.

**6.5.1.2.- Lavado del ADN**

1.- Añadir 500µl de biofenol (\*) a la solución obtenida después de la digestión con Proteinasa K. Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar el tubo 2 minutos a 16.000xg.

2.- Transferir la fase acuosa (fase superior) a un nuevo microtubo estéril (evitando recuperar residuos de la interfase). Añadir 500µl de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico en una relación de 24:1 (v/v). Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar el tubo 2 minutos a 16.000xg.

3.- Transferir la fase acuosa (fase superior) a un nuevo microtubo estéril. Añadir 500µl de cloroformo. Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar el tubo 2 minutos a 16.000xg. Transferir la fase acuosa a un nuevo microtubo estéril.

(\*) NOTA: El biofenol es un producto altamente tóxico y volátil, por lo que es necesario tomar las medidas de seguridad pertinentes.

### 6.5.1.3.- Precipitación de ADN

- 1.- Mezclar la fase acuosa obtenida en el apartado anterior con acetato sódico 3 M (Anexo 2) en relación 1:10 (v/v). Mezclar suavemente por inversión.
- 2.- (Opcional). Añadir 3  $\mu$ l de glicógeno por cada 500  $\mu$ l de muestra (\*). Mezclar suavemente por inversión
- 3.- Añadir etanol absoluto a (-20) °C a la mezcla, en relación 2:1 (v/v). Mezclar suavemente por inversión.
- 4.- Dejar precipitar el ADN presente en la muestra en un refrigerador a (-20) °C durante un tiempo mínimo de 2 horas, si se ha utilizado glicógeno, o durante toda la noche en el caso contrario. Centrifugar el tubo 10 minutos a 16.000xg (en caso de que la precipitación se haya realizado con adición de glicógeno realizar la centrifugación durante 30 minutos). Decantar el sobrenadante (con cuidado de no perder el precipitado, que quizá no sea visible).
- 5.- Añadir etanol al 70% a (-20) °C al precipitado, en relación 2:1 (v/v). Centrifugar el tubo 10 minutos a 16.000xg a 4 °C. Decantar el sobrenadante.
- 6.- (Opcional) Añadir etanol al 80% a (-20) °C al precipitado, en relación 1:1 (v/v). Mezclar por inversión. Centrifugar 2 minutos a 16.000xg a 4 °C. Decantar el sobrenadante
- 7.- Secar la muestra utilizando una centrífuga de tipo Speed Vacuum (Speedvac SC100, al nivel más bajo de absorción por vacío) durante el tiempo necesario hasta que el ADN esté totalmente seco.
- 8.- El ADN precipitado se puede guardar a 4 °C hasta su utilización. Antes de utilizarlo resuspenderlo en 20  $\mu$ l de agua bidestilada estéril.

(\*) NOTA: El glicógeno favorece la precipitación del ADN

**6.5.2.- Extracción de ADN de las cepas bacterianas**

(Hofmann y col., 1991)

1.- Realizar una solución en 20,5µl de agua bidestilada estéril con 2µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y 2,5 µl de tampón 10 X para Taq polimerasa, (ambos productos se suministran en el "kit" de amplificación de Perkin Elmer). Resuspender 2-3 colonias de la cepa bacteriana (las colonias se obtienen a partir de un crecimiento de la cepa correspondiente en una placa del agar adecuado).

2.- Incubar la muestra a 95 °C durante 15 minutos. Realizar un "shock" térmico introduciendo la muestra en hielo picado con alcohol absoluto durante 5 minutos. Centrifugar a 16.000xg durante 5 minutos.

3.- Guardar el sobrenadante conteniendo el ADN de la cepa bacteriana a (-20) °C hasta su utilización.

**6.6.- Realización de una PCR estándar**

(Perkin Elmer, instrucciones del fabricante)

Para la realización de una PCR se ha de preparar una mezcla de reacción tal como se indica a continuación (Tabla 6.3)

**Tabla 6.3.- Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de la PCR**

Reactivo	Volumen	Concentración final
Agua bidestilada estéril	Variable	
Tampón 10X	5µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4µl	2 mM
Nucleótidos 25 mM	0,4 µl	200 µM
Cebador cadena directa	Variable	0,3 pM
Cebador cadena reversa	Variable	0,3 pM
ADN molde	1 µl	Variable

El volumen utilizado para los cebadores varia según la concentración de éstos, que generalmente depende del fabricante que los sintetiza. Se han de ajustar los volúmenes necesarios para obtener una concentración final de 0,3 pM. Una vez calculado el volumen necesario de los cebadores, se ajusta el volumen de agua bidestilada para que el volumen final de la mezcla de reacción sea de 50 µl.

Una vez preparada la mezcla, se introduce en microtubos y se aplican los ciclos de amplificación en un termociclador. Los ciclos utilizados dependen del ADN que se pretende amplificar y deben ajustarse en cada caso.

#### **6.7.- Análisis del ADN . Electroforesis en gel de agarosa.**

(Sambrook y col. 1989)

En los estudios presentados en esta memoria de tesis se han utilizado dos protocolos de electroforesis en gel de agarosa, de gel horizontal y de gel vertical. El primer caso ha sido el más utilizado y se describe a continuación. El segundo caso, la electroforesis de gel vertical, se utiliza como parte del protocolo de la electrotransferencia por "Sandwich" y se describe en la sección correspondiente a dicho protocolo.

1.- Preparar el gel de agarosa realizando una solución de agarosa (\*) en 100 ml de tampón TBE 1X, obtenido a partir de diluir diez veces una reserva de TBE 10X (Anexo 2). Disolver la agarosa calentándola mediante la utilización de un horno microondas. Esperar a que se haya enfriado (aproximadamente a 55 °C) antes de verterla en el soporte.

(\*)NOTA: La concentración del gel de agarosa utilizado depende del tamaño del ADN que se pretende estudiar (Ver descripción de las concentraciones utilizadas en el Anexo 2).

Vertir un volumen suficiente de la solución de agarosa que cubra toda la superficie del soporte hasta un nivel de 0,5 cm aproximadamente. Inmediatamente colocar un peine para configurar los pocillos a 1 cm del extremo superior del soporte. Dejar polimerizar la agarosa a temperatura ambiente.

2.- Separar el peine y colocar el soporte con el gel de agarosa dentro de una cubeta de electroforesis. Rellenar la cubeta con el volumen necesario de TBE 1X para que el gel quede cubierto por el tampón.

3.- Mezclar 5  $\mu$ l de la solución conteniendo el ADN que se pretende analizar con 1  $\mu$ l de un tampón de carga 6X (Promega). Homogeneizar la mezcla.

4.- Cargar los 6  $\mu$ l de esta mezcla con una micropipeta en el interior de los pocillos del gel de agarosa.

5.- Reservar uno de los pocillos para cargar un marcador de pesos moleculares. El tipo de marcador dependerá del tamaño de ADN en estudio. Asimismo el marcador debe diluirse en un tampón que dependerá del tipo de muestra que se estudia (\*).

A continuación se resumen los tipos de marcador utilizados en estos estudios y las condiciones utilizadas:

(\*)NOTA: El objetivo es diluir el marcador de pesos moleculares con el mismo tampón con el que se han diluido las muestras, a fin de que las condiciones de electroforesis sean lo más similares posibles y los resultados del marcador y de las muestras sean comparables.

**Tabla 6.4.-** Tipos de marcadores utilizados para cada tipo de muestra.

Tipo de muestra	Tipo de marcador	Rango del marcador	Tampón de elución
ADN obtenido de la extracción de bacteriófagos y bacterias	ADN de fagos Lambda digerido con Hind III y Eco RI	21.200 pb	- 1 µl tampón de-carga 6X
		125 pb	- 1 µl marcador - 4 µl agua bidestilada.
ADN obtenido de amplificación por PCR	ADN de fagos φX174 digerido con Hae III.	1.358 pb	- 1 µl tampón de carga 6X - 1 µl marcador
		72 pb	- 0,6 µl tampón 10X de Taq polimerasa (Perkin Elmer). -3,4 µl agua bidestilada.

6.- Iniciar la electroforesis aplicando a la cubeta un voltaje de entre 60-90 V. El voltaje aplicado varía según se estudie un fragmento de ADN de gran tamaño o fragmentos más pequeños.

El tiempo de la electroforesis depende del tamaño de la muestra, la concentración y el tamaño del gel de agarosa. Se puede utilizar como referencia las bandas que aparecen durante la electroforesis en el tampón de carga.

7.- Una vez finalizada la electroforesis, sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio (Anexo 2) durante 15-20 minutos.

8.- Recuperar el gel y observarlo a través de un transiluminador de luz ultravioleta (se visualizan así las bandas correspondientes al ADN). Fotografiar los resultados obtenidos.

## **6.8.- Protocolos de fijación del ADN a una membrana**

### **6.8.1.- "Dot blot"**

(Sambrook y col. 1989)

- 1.- Equilibrar una membrana de nylon Hybond-N (Amersham), sumergiéndola en tampón SSC 6X (Anexo 2).
- 2.- Depositar una gota de 15 µl de la solución conteniendo el ADN amplificado que se pretende estudiar sobre la membrana. Dejar secar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.
- 3.- Fijar el ADN a la membrana mediante una exposición a la luz UV. Exponer la membrana a la radiación ultravioleta durante 2 minutos por cada cara de la membrana. La membrana está lista para ser hibridada (\*).

### **6.8.2.- "Southern blot"**

Este protocolo ha sido realizado utilizando dos metodologías distintas. Bien partiendo de un gel de agarosa vertical mediante el protocolo "Sandwich", o bien partiendo de un gel de agarosa horizontal mediante un protocolo "semy-dry". A continuación se describen ambos protocolos.

#### **6.8.2.1.- Electrotransferencia de ADN "Sandwich"**

(Sambrook y col. 1989)

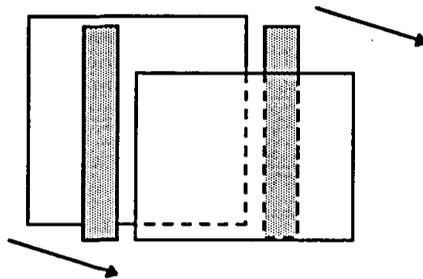
Este protocolo se volvió a utilizar más tarde para la preparación de geles de poliacrilamida en la electroforesis SDS-PAGE y posterior electrotransferencia de éstos a membranas de nitrocelulosa para realizar "Western blot". Se inicia el protocolo mediante la realización de una electroforesis de gel vertical

(\*) NOTA: Si la hibridación no se realiza inmediatamente, la membrana con el ADN fijado se puede conservar durante largo tiempo a 4 °C hasta su utilización.

### 6.8.2.1.1.- Electroforesis de gel vertical

Para realizar una electroforesis de gel vertical es necesario preparar el gel de agarosa vertical. El montaje de un gel de agarosa vertical es sensiblemente diferente al horizontal aunque el principio es el mismo.

1.- Montar el gel en una cassette de cubeta tipo Miniprotean (Bio-Rad). Colocando los dos vidrios (uno grande y uno pequeño) separados por dos separadores colocados a lo largo de los laterales de los vidrios. Ambos vidrios han de quedar al mismo nivel.



2.- Se colocan en la cassette y ésta sobre el soporte de geles. Entre los dos vidrios se coloca una solución de TBE 1 X con agarosa al 1.5 % a 55 °C, el volumen utilizado debe ser suficiente para alcanzar el nivel del extremo superior del vidrio pequeño. Se coloca el peine en la parte superior, entre los dos vidrios y se deja polimerizar. Posteriormente sacar el peine con cuidado y lavar los pocillos con agua destilada.

3.- Montar la cubeta tipo Miniprotean siguiendo las instrucciones del fabricante. Llenar completamente la cubeta con TBE 1X.

4.- Repetir los pasos descritos en los puntos 3, 4 y 5 del protocolo de electroforesis de gel horizontal. Conectar un voltaje de 60 V durante 1 hora.

5.- Una vez realizada la electroforesis, desmontar las cassettes, y separar los vidrios. Recuperar el gel y teñirlo con bromuro de etidio tal como se ha descrito para la electroforesis de gel horizontal. Visualizar el ADN y realizar la fotografía.

### 6.8.2.1.2.- Electrotransferencia de ADN a una membrana por el método "Sandwich"

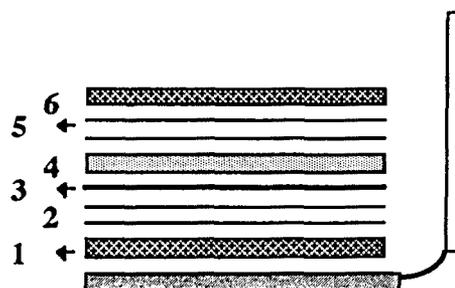
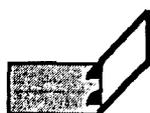
1.- Desnaturalizar el ADN en estudio, sumergiendo el gel conteniendo el ADN, obtenido como se describe en el apartado anterior, en una solución de NaOH 0,25 M. Mantener la solución en agitación durante 15 minutos. Lavar con agua bidestilada. Sumergirlo en TBE 0,5X (Anexo 2) a 4 °C durante 10 minutos. Repetir el proceso dos veces.

2.- Simultáneamente cortar cuatro trozos de papel "Whatman" a un tamaño que presente 1 cm más de arista que el tamaño del gel. Cortar una membrana de nylon Hybond-N al mismo tamaño del gel.

3.- Sumergirlo todo, junto con dos esponjas de electrotransferencia, en TBE 0,5X. Mantener los elementos en el tampón a 4 °C durante un mínimo de 15 minutos.

4.- Montar el "Sandwich". Siguiendo el siguiente orden:

- 1- esponja
- 2- 2 papeles "Whatman"
- 3- Membrana de Nylon
- 4- Gel de agarosa
- 5- 2 papeles "Whatman"
- 6- esponja



5.- Cerrar el "Sandwich" y colocarlo dentro de los electrodos de electrotransferencia siguiendo las instrucciones del fabricante. Introducirlo dentro de la cubeta. Poner un recipiente con hielo en el espacio reservado en el interior de la cubeta. Llenar la cubeta de TBE 0,5X a 4 °C. Mantener en agitación el tampón mediante un agitador magnético mientras dura la electrotransferencia. Conectar una corriente de 80V durante 1 hora.

6.- Desmontar el "Sandwich", recuperar y dejar secar la membrana de nylon a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente. Fijar el ADN tal como se ha descrito en el punto 3 del protocolo de "dot blot". En este punto la membrana está lista para proceder a la hibridación.

6.8.2.1.3.- Electrotransferencia de ADN a una membrana por el método de "semi-dry"

(Bio-Rad, instrucciones del fabricante)

Se inicia el protocolo a partir de un gel de agarosa horizontal en el que se ha realizado una electroforesis del ADN que se pretende analizar.

- 1.- Desnaturalizar el gel sumergiéndolo en una solución de NaOH 0,25M durante 10 minutos.
- 2.- Equilibrar el gel sumergiéndolo en tampón TBE 0,5X aproximadamente 10 minutos.
- 3.- Cortar una membrana de nylon Hybond-N y cuatro papeles de transferencia (Bio-Rad) a la medida del gel. Equilibrar la membrana y los papeles de transferencia sumergiéndolos en tampón TBE 0,5X aproximadamente 10 minutos.
- 4.- Colocar dos láminas de papel de transferencia (Bio-Rad) sobre un aparato de transferencia semi seca (Semi Dry Blotter 5010, Kem-En-Tec A/S, Copenhagen), sobre éstas colocar la membrana de nylon, el gel y los otros dos papeles de transferencia. Durante la colocación de cada elemento, añadir 10 ml de tampón TBE 0,5X entre cada uno. Cerrar el aparato.
- 5.- Realizar la transferencia durante 1,5 horas, aplicando una intensidad de 230 mA. Una vez finalizada la transferencia, dejar secar la membrana a temperatura ambiente y fijar el ADN tal como se ha descrito en el punto 3 del protocolo de "dot blot". En este punto la membrana está lista para proceder a la hibridación.

**6.9.- Marcaje de un oligonucleótido con  $^{32}$  P por el método de la T4 Kinasa**

(Modificación sobre el método descrito por Sambrook y col., 1989)

1.- Preparar la mezcla de reacción como se indica a continuación (Tabla 6.5).

**Tabla 6.5.-** Reactivos utilizados para la reacción del enzima T4 kinasa.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Oligonucleótido 15 pmol	1.1 $\mu$ l	0,3 pmol/ $\mu$ l
10X Tampón Kinasa (Promega)	5 $\mu$ l	1X
T4 PN Kinasa 10 unidades/ $\mu$ l (Promega)	1 $\mu$ l	0,5 unidades/ $\mu$ l
$\gamma$ $^{32}$ P-dATP 3.000 Ci/mmol (Amersham)	5 $\mu$ l	60 Ci/mmol
Agua bidestilada	37,9 $\mu$ l	-
Volumen final de la mezcla	50 $\mu$ l	-

2.- Incubar a 37 °C durante 30-45 minutos. Precipitar el oligonucleótido tal como se ha descrito en el protocolo de precipitación de ADN. Secar el oligonucleótido.

3.- Una vez precipitado y seco, resuspender el oligonucleótido con 50  $\mu$ l de agua bidestilada.**NOTA:** Los protocolos en que se manipula material radiactivo se han realizado dentro de una instalación autorizada para el trabajo con isótopos radiactivos, siguiendo la normativa establecida.

## **6.10.- Hibridación y detección de una sonda**

(Sambrook y col. 1989)

Como se describe en el apartado de Materiales y Métodos del capítulo 1 se realizaron hibridaciones de ADN con sonda marcada radiactivamente y con sonda marcada con digoxigenina, a continuación se presentan ambos protocolos.

### **6.10.1.- Hibridación del ADN con una sonda marcada radiactivamente**

- 1.- Preparar bolsas de plástico con un tamaño de 2 cm más por lado al tamaño de la membrana que contiene el ADN que se ha hibridado con la sonda, tal como se ha descrito en los apartados correspondientes. Introducir la membrana, utilizando pinzas, dentro de las bolsas de plástico. Cerrar uno de los extremos de la bolsa sellándolo con calor.
- 2.- Añadir un volumen de tampón de hibridación (Anexo 2). en una proporción de 1 ml de tampón/ por 10 cm<sup>2</sup> de membrana. Cerrar el otro extremo de la bolsa sellándolo por calor.
- 3.- Equilibrar la membrana incubándola con tampón de hibridación a la temperatura de hibridación adecuada para la sonda utilizada. Mantener en agitación durante 1 hora.
- 4.- Después de equilibrarla, cortar un extremo de la bolsa, cambiar el tampón de hibridación por idéntico volumen de tampón nuevo y añadir un volumen de 3.5 µl de sonda marcada radiactivamente por cada ml de tampón de hibridación (concentración).
- 5.- Volver a cerrar el extremo abierto de la bolsa sellándola por calor. (Se recomienda guardar esta bolsa dentro de otra bolsa externa y cerrarla a su vez a fin de evitar posibles fugas de tampón contaminado radiactivamente).
- 6.- Incubar en agitación toda la noche a la temperatura de hibridación.
- 7.- Extraer la membrana de la bolsa, sumergirla en un volumen de tampón de lavado (Anexo 2), suficiente para que cubra la membrana. Mantenerlo en agitación durante un

periodo de 10 minutos a temperatura ambiente y dos periodos de 10 minutos a la temperatura de hibridación.

8.- Eliminar el tampón e introducir la membrana dentro de una bolsa de hibridación. Cerrar la bolsa alrededor de la membrana sellándola por calor.

9.- Introducir la bolsa con la membrana dentro de una cassette de autorradiografía. Exponer una placa de autorradiografía tal como se indica en el apartado de detección de la sonda.

#### **6.10.2.- Hibridación del ADN con una sonda marcada con digoxigenina**

(Boehringer Mannheim, instrucciones del fabricante)

1.- Equilibrar la membrana durante un mínimo de 1 hora con tampón de hibridación para sondas marcadas con digoxigenina (Anexo 2), tal como se ha indicado anteriormente en el protocolo de hibridación de una sonda radiactiva. Eliminar el tampón utilizado y añadir tampón de hibridación nuevo conteniendo la sonda a una concentración de 5 pmoles/ml.

2.- Dejar hibridando toda la noche en agitación a la temperatura de hibridación adecuada para la sonda utilizada.

3.- Lavar la membrana, sumergiéndola en tampón SSC 5X +1% SDS (Anexo 2) manteniéndola en agitación durante dos periodos de 15+30 minutos a la temperatura de hibridación.

4.- Lavar la membrana sumergiéndola en tampón SSC 2X +1% SDS (Anexo 2) manteniéndola en agitación durante dos periodos de 15+30 minutos respectivamente a temperatura ambiente.

5.- Lavar la membrana sumergiéndola en tampón de lavado (Anexo 2) manteniéndola en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente.

6.- Equilibrar la membrana sumergiéndola en tampón nº 2 (Anexo 2) manteniéndola en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- 7.- Conjugar la membrana con el anticuerpo sumergiéndola en tampón nº 2 conteniendo el anticuerpo suministrado en el "kit" de detección (concentración 1µl/10 ml de tampón nº 2). Mantener en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Lavar la membrana sumergiéndola en tampón de lavado manteniéndola en agitación durante dos periodos de 15 minutos a temperatura ambiente.
- 9.- Equilibrar la membrana sumergiéndola en tampón nº 3(Anexo 2) manteniéndola en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 10.- Unir el substrato del "kit" de detección de Digoxigenina ("DIG Luminescent detection kit, Boehringer Mannheim) añadiendo sobre la membrana una solución conteniendo el substrato a una concentración de 100 µl de substrato/10 ml tampón nº 3. Mantener durante 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- 11.- Eliminar los restos de substrato. Introducir la membrana dentro de una bolsa de hibridación. Cerrar la bolsa sellándola por calor. Incubarla 10 minutos a 37 °C.
- 12.- Introducir la membrana dentro de una cassette de autorradiografía. Exponer una placa de autorradiografía tal como se indica en el apartado de detección de la sonda.

#### **6.10.3.- Detección de la sonda hibridada al ADN en estudio**

- 1.- Coloca las bolsas con las membranas que contienen el ADN hibridado con la sonda, dentro de la cassette de autorradiografía y fijarlas con trozos de cinta adhesiva colocando la cara de la membrana donde se ha unido el ADN mirando hacia arriba.
- 2.- Dentro de una cámara de fotografía con luz infrarroja, colocar la placa de autorradiografía. Cerrar la cassette.
- 3.- La detección de una sonda radiactiva se realiza a (-20) °C, para ello, guardar la cassette cerrada en un refrigerador a esta temperatura, durante el tiempo de exposición. Si la sonda está marcada con digoxigenina, la exposición se realiza a temperatura ambiente.

---

El tiempo de exposición es variable, según la cantidad de ADN fijado a la membrana y la eficacia de la hibridación. Se recomienda utilizar un tiempo mínimo de 3 horas. En caso de no haber suficiente señal se coloca una nueva placa de autorradiografía y se deja en exposición durante 24 horas siendo necesario, en ocasiones, realizar una exposición de varios días.

4.- En el momento de realizar el revelado, éste tendrá lugar igualmente dentro la cámara de fotografía y con luz infrarroja.

5.- Extraer la placa de autorradiografía y sumergirla en la solución reveladora (Anexo 2). Mantenerla en agitación hasta que se visualice señal allí donde se ha hibridado la sonda con el ADN en estudio. El tiempo recomendado es de aproximadamente 5 minutos. Lavar la membrana con agua del grifo.

6.- Extraer la placa y sumergirla en la solución fijadora (Anexo 2). Mantenerla en agitación durante un tiempo aproximado de 5 minutos. Lavar la membrana primero con agua del grifo y después con agua destilada. Dejar secar.

#### **6.11.- Secuenciación automática**

(Perkin Elmer Corporation. Instrucciones del fabricante)

Antes de realizar la secuenciación del ADN en estudio es recomendable purificarlo. Para ello existen diversos sistemas de purificación, diferentes según el tipo de ADN que se pretende purificar. Para Purificar el ADN amplificado por PCR anidada que se pretendía secuenciar se utilizó el "kit" de purificación Spin Bind (FMC), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.- Preparar la mezcla de reacción siguiendo las instrucciones del fabricante. Según estas mismas instrucciones, la cantidad de ADN molde utilizado para realizar la secuenciación fue de dos  $\mu\text{l}$  del ADN purificado (correspondiendo aproximadamente a una concentración de ADN de 3 pmoles/ $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción). Ajustar el volumen final de la mezcla de reacción a 10  $\mu\text{l}$ .

2.- Aplicar las siguientes temperaturas de amplificación durante 25 ciclos: 96 °C, 10 segundos; 50 °C, 5 segundos y 60 °C, 4 minutos. El secuenciador utilizado fue ABI PRISM 377 ADN Sequencer, Perkin Elmer.

3.- Precipitar los productos secuenciados añadiendo al volumen total de reacción (10 µl), 25 µl de etanol al 95% y 1 µl de acetato sódico 3M a pH 4,6. Mantener la solución durante 10 minutos a (- 20) °C.

4.- Centrifugar 16.000xg durante 15 minutos. Eliminar el sobrenadante. Añadir un volumen de 25 µl de etanol al 70%, mantener a temperatura ambiente durante unos segundos. Eliminar y secar la muestra (mediante la utilización de una centrífuga tipo Speedvac SC 100).

5.- Secuenciar .

#### **6.12.- "Western blot"**

Como ya se indicó anteriormente, para la realización de un "Western blot" es necesaria la preparación previa de un gel de poliacrilamida, el protocolo se describe a continuación.

##### **6.12.1.- Preparación de un gel de poliacrilamida**

(Hames y Rickwood, 1981)

El montaje para preparar un gel de poliacrilamida es similar al descrito para los geles de agarosa verticales, con unas ligeras diferencias que se indican a continuación.

1.- Utilizar los mismos vidrios descritos en el apartado para preparación de geles verticales, previamente desengrasados con alcohol.

2.- Preparar el gel de poliacrilamida realizando una mezcla con los reactivos que se describen en la tabla 6.6.

**Tabla 6.6.-** Reactivos utilizados para la preparación de un gel de poliacrilamida

Reactivos <sup>(a)</sup>	Gel separador (12% de poliacrilamida)	Gel compactador (4% de poliacrilamida)
Agua bidestilada	1,658 ml	1,525 ml
<i>Solución B</i> : 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml	-
<i>Solución C</i> : 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,625 ml
<i>Solución D</i> : 10 % SDS	50 µl	25 µl
<i>Solución A</i> : Acrilamida/Bis (30% "stock")	2 ml	0,325 ml
10 % APS (0,05%)	37 µl	27,5 µl
"TEMED" (0,05 %)	2,5 µl	2,5 µl

(a) La preparación de las soluciones A, B, C y D, así como el APS se describe más ampliamente en el Anexo 2. El "TEMED" se suministra comercialmente a la concentración indicada.

En primer lugar se prepara la solución para el gel Separador y se introduce entre los dos vidrios hasta 3-4 mm por debajo de la posición que ocupará el peine. Se deja polimerizar 20-30 minutos a temperatura ambiente.

3.- Preparar a continuación el gel compactador. Aplicarlo sobre el gel separador entre los dos vidrios hasta una altura correspondiente a 2-3 mm por debajo del nivel superior del vidrio pequeño. Colocar el peine. Dejar polimerizar 20-30 minutos a temperatura ambiente. Retirar el peine.

4.- Preparar las muestras en estudio realizando una mezcla de 15 µl de la solución que contiene las proteínas que se pretenden analizar con tampón de carga LSB 2X (Anexo 2), en una relación 1:1(v/v). Incubar las muestras a 100 °C durante 5-7 minutos. Cargar las muestras en el gel con la ayuda de una pipeta tipo Hamilton. Reservar uno de los pocillos para cargar un marcador de pesos moleculares (Low range stained SDS-PAGE standard, Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.- Montar la cubeta tipo Miniprotean siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad).

6.- Llenar la cubeta con tampón de recorrido (Anexo 2) y conectar la corriente. La electroforesis se realiza a un voltaje constante que suele ser de 100 V durante el

tiempo necesario, hasta que se observa que el frente llega a la parte inferior del gel, el tiempo utilizado en los trabajos descritos en el capítulo 1 de esta memoria de tesis fue de 2 horas.

#### **6.12.2.- Electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa**

Posteriormente el gel se electrotransfiere 1 hora a 75 V a una membrana de nitrocelulosa (0,45µm) (Trans-Blot™ Transfer Medium, Bio-Rad). La metodología utilizada ya ha sido descrita en el protocolo de electrotransferencia por “Sandwich”. La única diferencia radica en que el tampón utilizado es el tampón de recorrido en lugar del TBE

Las proteínas electrotransferidas quedan inmediatamente fijadas a la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se realiza la inmunodetección de estas proteínas según se describe en el apartado siguiente.

#### **6.12.3.- Inmunodetección**

- 1.- Bloquear la membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas en estudio, sumergiéndola en una solución de TBS-Tween y 3% de BSA (Suero de albúmina bovina, fracción V) (Anexo 2). Incubar agitando suavemente durante toda la noche a 4 °C.
- 2.- Conjugación con el Anticuerpo primario: Sumergir la membrana en una solución de 10 ml de TBS-Tween 1X (Anexo 2) conteniendo el anticuerpo primario (a una concentración de 2-5 µg de anticuerpo/ml de TBS-Tween). Incubar la membrana en agitación durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3- Lavar la membrana manteniéndola en agitación con 20 ml de TBS-Tween 1X durante tres periodos de 5 minutos a temperatura ambiente .

---

4.- Conjugar con el anticuerpo secundario.(\*). Incubar la membrana directamente a temperatura ambiente, en agitación durante 1 hora y 30 minutos. Repetir los lavados según se describe en el punto 3.

5.- Detección la actividad de la fosfatasa alcalina mediante un método colorimétrico: Añadir 10 ml de Tampón para inmunodetección nº 3 5X (Anexo 2). Añadir 40 µl de NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride) y 35µl de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Fosfato). Incubar la membrana a temperatura ambiente protegido de la luz. El tiempo de incubación es variable dependiendo de la visualización de la señal obtenida. Se recomienda utilizar un tiempo de 15-30 minutos. Una vez visualizada la señal, detener la reacción eliminando los reactivos y realizando un lavado con agua destilada.

### **6.13.- Precipitación de Proteínas**

1.- Mezclar 400 µl de la solución conteniendo las proteínas con acetona, en relación 1:3 (v/v). Agitar por inversión. Guardar en un refrigerador a (-20) °C durante un mínimo de 2 horas. Centrifugar a una velocidad de 216.000xg. Descartar el sobrenadante.

2.- Evaporar los restos de acetona presentes en la muestra manteniendo el tubo abierto durante 15-30 minutos en un incubador a una temperatura de 55 °C (también puede utilizarse una centrífuga tipo Speevac, SC100). Resuspender la muestra en 20µl de agua bidestilada estéril.

(\*) NOTA En los estudios descritos en el capítulo 1 de esta memoria de tesis, se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo de ratón del tipo Ig G, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Immunochemicals). La dilución utilizada fue de 1:1000 (v/v) con TBS-Tween 1X.

## **6.14.- Cultivo celular**

La metodología utilizada para la preparación de monocapas de células animales se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía (Freshney, 1987; Blake, 1993).

### **6.14.1- Mantenimiento de la línea celular**

Se inició el cultivo a partir de una suspensión congelada de las células Vero, con las que se realizó el estudio.

- 1.- Descongelar la suspensión de células a temperatura ambiente. Centrifugar la suspensión a 3.000xg a 4 °C durante 10 minutos.
- 2.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado conteniendo las células con 3 ml de PBS 1X (Anexo 2). Centrifugar la suspensión a 3.000xg 4 °C durante 10 minutos.
- 3.- Resuspender el precipitado en 10 ml de medio MEM suplementado con 10% de suero fetal (Anexo 1). Introducir la suspensión conteniendo las células en un frasco de cultivo de 25 ml.
- 4.- Incubar durante 24 horas en una atmósfera de 0,5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Una vez se ha formado la monocapa de células en la superficie del frasco de cultivo, se elimina el medio anterior y se sustituye por 10 ml de medio MEM suplementado con 5% de suero fetal (Anexo 1) y se mantienen en el incubador con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 0,5% a 37 °C durante 48 horas.

La monocapa de células formada presenta un aspecto homogéneo y cubre la superficie total del frasco de cultivo. En este punto es recomendable preparar un nuevo frasco de cultivo. Para ello se procede tal como se indica a continuación.

#### **6.14.2.- Tripsinización de la monocapa de células y preparación de una nueva monocapa**

- 1.- Eliminar el medio viejo del frasco de cultivo. Proceder a un lavado del cultivo con 5 ml de PBS y eliminar también el PBS.
- 2.- Tripsinizar las células con aproximadamente 3 ml de tripsina (Anexo 1), se deja en contacto durante 5 minutos hasta que las células se separan entre si y de la superficie del frasco de cultivo.
- 3.- Resuspender las células en 10 ml de medio MEM suplementado con 10% de suero fetal.
- 4.- Añadir 3 ml de esta suspensión en un nuevo frasco de cultivo (\*). Añadir 7 ml de medio MEM suplementado con 5% de suero fetal e incubar durante 24-48 horas en una atmósfera de 0,5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Una vez se ha formado la monocapa de células en la superficie del frasco de cultivo, se elimina el medio anterior y se sustituye por 10 ml de medio MEM suplementado con 1% de suero fetal (Anexo 1), manteniéndolo en el incubador con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 0,5% a 37 °C.

Las células se mantuvieron en estas condiciones durante un tiempo máximo de una semana. Transcurrido este tiempo, se tripsinizaron de nuevo las células y se preparó una nueva monocapa de células tal como se ha indicado en este apartado.

#### **6.14.3.- Preparación de los "microtiters"**

Modificación sobre el método de Gentry y col. (1980)

Cuando se quiere preparar un "microtiter", se tripsinizan las células. Para ello se procede como se ha indicado en los puntos 1 y 2 del apartado anterior.

(\*) **NOTA:** Para las células Vero se recomienda inocular una tercera parte del volumen total en que se han resuspendido para preparar una nueva monocapa con la misma superficie.

1.- Resuspender las células en 40 ml de medio MEM suplementado con 5% de suero fetal. Dispensar en dos microtiters de 96 pocillos (\*) inoculando 200µl de la suspensión de células en cada pocillo. Incubar en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 0,5% a 37 °C durante 24-48 horas.

2.- Comprobar que se ha formado una monocapa celular en la superficie de cada pocillo mediante el microscopio invertido.

### **6.15.- Obtención del anticuerpo anti A-Stx 2**

Para el cultivo de los hibridomas se han seguido las instrucciones de la "American Type Culture Collection"(Catalogo de líneas celulares e hibridomas). Para la recuperación del anticuerpo se procedió según las instrucciones descritas por Harlow y Lane (1988).

1.- A partir de un cultivo celular del hibridoma 11E10 ATCC CRL 1907 (Perera y col., 1988).y siguiendo las instrucciones de la "American Type Culture Collection", cultivar las células en medio RPMI-1640 para hibridomas (Anexo 1). Incubar en una atmósfera conteniendo 0,5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

2.- Dejar crecer el cultivo de hibridoma hasta la muerte de las células de hibridoma (6-7 días). Los hibridomas muertos presentan un aspecto negro y opaco fácilmente diferenciable. Los anticuerpos producidos por el hibridoma se mantienen disueltos en el medio de cultivo y de aquí se recuperan (Harlow y Lane, 1988).

3.- Para la recuperación de los anticuerpos, centrifugar la suspensión celular a 3.000xg durante 10 minutos. Recuperar el sobrenadante y esterilizarlo por filtración. Dispensar en alícuotas y mantenerlo a - 20 °C hasta su utilización.

(\*) NOTA: Para las células Vero se recomienda inocular una tercera parte del volumen total en que se han resuspendido para preparar una nueva monocapa. La superficie de un frasco de cultivo de 25 ml es de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>, al realizar el pase se formará una monocapa de una 60 cm<sup>2</sup> de superficie. La superficie que presenta un microtiter de 96 pocillos es de aproximadamente 30 cm<sup>2</sup>, por lo que al realizar el pase se pueden preparar dos microtiters a partir de un frasco de cultivo de 25 ml.

## **6.16.- Enumeración de bacteriófagos por el método de la doble capa de agar**

(Adams. 1959)

1.- Realizar un cultivo de la cepa bacteriana con la que se quiere realizar el recuento de bacteriófagos, con el medio correspondiente (en los estudios realizados se utilizó habitualmente el medio Scholten's modificado o el medio de triptona (Anexo 1). Agitar a 37 °C y controlar el crecimiento mediante la medida de la absorbancia que presenta el cultivo a una DO de 600 nm. Utilizar un tubo de medio sin inocular como blanco.

2.- Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio (*E. coli* CN13 y *E. coli* O157:H7) presentan una absorbancia de 0,2-0,3 (DO<sub>600</sub>) en el punto de crecimiento correspondiente a la mitad de su fase exponencial. En este momento se puede utilizar el cultivo.

3.- Mezclar 0,5 ml del cultivo con 2,5 ml de agar blando (manteniéndolo líquido a una temperatura de 45 °C en un baño termoestático). Añadir 1 ml de la muestra que se desea analizar (\*).

4.- Agitar suavemente, evitando la formación de burbujas.

5.- Verter la mezcla sobre una placa de agar del mismo medio utilizado para realizar el cultivo Repartir la mezcla suavemente sobre la placa de agar hasta que haya cubierto toda la superficie de la placa. Dejar solidificar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos.

6.- Incubar las placas a 37 °C durante (18 ±2) horas.

7.- Proceder al recuento de las calvas de lisis. Los resultados se expresaron en ufp/ml de muestra o en ufp/100 ml de muestra.

(\*) **NOTA:** Las muestras se puede enumerar sin diluir o después de realizar diluciones decimales seriadas, según la contaminación presente en la muestra. Por ejemplo, en muestras de agua residual se recomienda utilizar para la enumeración de los fagos 1 ml de las diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> si se enumeran sobre *Escherichia coli* CN13. Cuando desconocemos la contaminación de la muestra, se recomienda siempre analizar, al menos por triplicado, 1 ml de la muestra directa y 1 ml de las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>.

### **6.17.- Activación del bacteriófago 933W**

(Mühldorfer y col., 1996)

- 1.- Realizar un cultivo de *E. coli* C600(933W) en 10 ml de medio LB (Anexo 1). Incubarlo en agitación a 37 °C hasta que presente una absorbancia de 0,1 (DO<sub>600 nm</sub>).
- 2.- Alicuotar el volumen total del cultivo en dos tubos conteniendo 5 ml del cultivo cada uno. Añadir 15 µl de Mitomicina C (Sigma) a una concentración final de 0,6 µg/ml en uno de los tubos. Incubar ambos tubos en agitación a 37 °C. Realizar medidas de absorbancia cada hora hasta que se detecte un importante descenso de la absorbancia en el tubo con Mitomicina C respecto al tubo control (\*) Normalmente 4-5 horas son suficientes para observar la máxima diferencia.
- 3.- Descontaminar el tubo conteniendo el fago 933 W activado (correspondiente al tubo que contiene el cultivo de *E. coli* C600(933W) con Mitomicina C), añadiendo un 1 ml de cloroformo. Agitar enérgicamente durante 3 minutos y centrifugar a 16.000xg durante 5 minutos.
- 4.- Filtrar el sobrenadante por membranas de 0,22 µm de baja adsorción proteica (Millex™-GV Millipore).

#### **6.17.1.- Observación de las calvas de lisis producidas por el fago 933 W**

A fin de verificar la activación del ciclo lítico del bacteriófagos 933 W, se realizó una enumeración del fago 933 W a fin de observar las calvas de lisis producidas por el fago. Para ello se realizó una variación del método de la doble capa de agar, tal como se describe a continuación,

- 1.- Realizar un cultivo de *E. coli* C600 en medio líquido Luria (LB), suplementado con 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (Anexo 1). Incubar en agitación a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> de 0,3.

(\*)NOTA: El descenso de absorbancia observado es debido a la lisis de las células del cultivo producida por el bacteriófago 933 W después de activar su ciclo lítico con la adición de Mitomicina C.

2.- Con el sobrenadante conteniendo el fago 933 W (descrito en el punto 4 del protocolo anterior), realizar diluciones decimales seriadas con medio líquido Luria Broth (LB), suplementado con 10 mM de CaCl<sub>2</sub>.

3.- Poner a incubar 100µl de cada dilución con 100µl del cultivo de la cepa C600 crecida tal como se indica en el punto 1. Incubar durante 20-30 minutos, en agitación a 37 °C.

4.- Mezclar el volumen total de cada dilución (200 µl) con 2,5 ml de agar blando Luria suplementado con 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, (manteniéndolo líquido a una temperatura de 45 °C en un baño termostático). Mezclar suavemente y verter sobre una placa de Luria Agar, suplementado con 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. Incubar las placas a 37 °C durante toda la noche.

5.- Realizar la observación y si es posible el recuento de las calvas de lisis observadas.

#### **6.18.- Detección y recuento de cepas bacterianas por filtración**

(Standard Methods, 1992)

1.- Homogeneizar la muestra de agua a analizar. Realizar diluciones decimales seriadas de la muestra con peptona salina (Anexo 1). Mezclar 1 ml de cada dilución a 9 ml de ringer 1/4 (Anexo 1) para realizar la filtración.

2.- Colocar, con la ayuda de las pinzas, membranas (de ésteres de celulosa ) de 0,44 µm, sobre el soporte de un sistema de filtración por vacío. Verter en los embudos del sistema de filtración los 10 ml de ringer 1/4 conteniendo 1 ml de la muestra directa o 1 ml de las diluciones decimales de ésta. Conectar la bomba de vacío hasta que toda la muestra se haya filtrado.

3.- Colocar el filtro sobre una placa de agar del medio específico (en los estudios realizados se ha utilizado medio de agar CF (Difco) y medio Fluorocult (Merck), preparados siguiendo las instrucciones del fabricante). Incubar las placas boca abajo a 37 °C durante 24 horas.

4.- Realizar el recuento de las colonias en aquellas placas que contengan entre 30 y 300 colonias (\*). Los resultados se expresaron en ufc por cada 1 o 100 ml de muestra analizada.

#### **6.19.- Observación de bacteriófagos por Microscopía electrónica de Transmisión (MET)**

Para realizar las observaciones de bacteriófagos por MET, descritas en el capítulo 3 de esta memoria de tesis, fue necesario realizar primero un aislamiento y posterior enriquecimiento de los bacteriófagos que se pretenden observar. Este protocolo pretende obtener un "stock" puro de cada bacteriófago con un título suficientemente elevado de partículas víricas. A partir de este "stock" se realizó la preparación de las rejillas de microscopía y visualización de los bacteriófagos aislados por el microscopio electrónico de transmisión.

##### **6.19.1- Aislamiento y enriquecimiento de los fagos aislados a partir de calvas de lisis**

1.- Realizar una enumeración de los bacteriófagos por el método de la doble capa de agar, como se ha indicado en el apartado correspondiente. Los aislamientos de bacteriófagos se realizan a partir de las calvas de lisis obtenidas. Para realizar los aislamientos de bacteriófagos, seleccionar aquellas placas que presentan entre 1 y 20 calvas, escogiéndose las calvas de lisis de una misma placa que estén bien definidas y separadas de las calvas adyacentes.

(\*) **NOTA:** Las colonias que se pretenden estudiar presentan un aspecto diferente según el medio utilizado. En el medio de agar CF, las colonias de coliformes fecales presentan color azul. En el medio Fluorocult, se realiza el recuento de colonias de *E. coli* mediante la exposición de la placa a la luz ultravioleta, y se cuentan sólo aquellas colonias que presentan fluorescencia.

- 
- 2.- Realizar cultivos de 10 ml de un crecimiento de la cepa en estudio hasta el inicio de la fase exponencial (para *E. coli* CN13 y *E. coli* O157:H7 el inicio de la fase exponencial corresponde a una  $DO_{600}$  de 0,1).
  - 3.- Inocular en cada uno de los cultivos los fagos presentes en las calvas de lisis descritas en el punto 1. Para realizar el inóculo, recortar con el asa de siembra el trocito de agar blando donde se sitúa la calva que contiene los fagos que se pretende enriquecer e introducirla dentro del tubo que contiene los 10 ml del cultivo de la cepa huésped. Dejar incubando a 37 °C en agitación durante 5-6 horas (\*).
  - 4.- Transcurridas las 5-6 horas, recoger una alícuota de 700µl del cultivo de enriquecimiento y añadir 300 µl de cloroformo. Agitar enérgicamente y centrifugar 5 minutos a 16.000xg.
  - 5.- A partir de este cultivo de enriquecimiento se recomienda repetir el proceso de forma sucesiva para obtener el título necesario de fagos para su posterior observación en el microscopio electrónico (\*\*). Los siguientes cultivos de enriquecimiento se hacen inoculando 200 µl del sobrenadante obtenido del primer cultivo de enriquecimiento en un nuevo cultivo preparado como se ha descrito en el punto 2 de este protocolo.

El número de repeticiones del proceso de enriquecimiento necesarias para obtener un título óptimo depende del tipo de bacteriófago que se ha aislado ( por ejemplo los *Myoviridae* suelen llegar al título óptimo antes que los *Microviridae*). La experiencia práctica obtenida en estos estudios indica que el título óptimo de bacteriófagos, para su observación al microscopio electrónico, se obtiene después de tres repeticiones del proceso.

(\*)NOTA: El tiempo de incubación se ajustó a lo largo de la práctica experimental de los estudios realizados y es aplicable únicamente para las cepas bacterianas utilizadas (*E. coli* CN13 y *E. coli* O157:H7).

(\*\*)NOTA: El título necesario para la observación de los fagos al microscopio electrónico oscila entre  $10^9$  y  $10^{10}$  fagos/ml.

6.- Repetir el proceso descrito en el punto 4 con el último de los cultivos de enriquecimiento realizados.

7.- Tomar una alícuota del sobrenadante obtenido y proceder a la preparación de las rejillas para la observación de los fagos por microscopía electrónica. Los "stocks" de bacteriófagos, preparados como se ha indicado en este apartado, pueden mantenerse durante un largo periodo de tiempo a 4 °C hasta su observación (\*).

#### **6.19.2.- Tinción negativa de los bacteriófagos para observación al MET**

(Bremer y Horne, 1964)

Para realizar la observación de los bacteriófagos aislados mediante el microscopio electrónico de transmisión es necesario contrastarlos previamente. Para el contraste de los fagos observados por MET en estos estudios, se utilizó el sistema de tinción negativa.

1.- Utilizar rejillas de cobre para microscopía electrónica de 200 nm preparadas con película "Formvar" cubierta de carbón (\*\*). Añadir 8µl de cada cultivo de bacteriófagos, realizado según se ha descrito en el apartado anterior, sobre cada rejilla.

2.- Dejar absorber durante 2 minutos y retirar el exceso con papel de filtro.

3.- A continuación, realizar la tinción añadiendo una gota de Ácido fosfotúngstico 2% KOH, pH 7,2. (Anexo 2) sobre la rejilla. Mantener durante 2,5 minutos y retirar el exceso con papel de filtro.

4.- Dejar secar a temperatura ambiente. Los fagos ya están listos para su observación.

(\*) **NOTA**, exceptuando los "stocks" obtenidos después de la activación del ciclo lítico del fago 933 W, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos del capítulo 1.

(\*\*) **NOTA**: Las rejillas fueron suministradas por el Servicio Técnico de la Universidad de Barcelona, ya preparadas con película "Formvar" cubierta de carbón.

Queremos agradecer a "Serveis Tècnics de la Universitat de Barcelona" su ayuda en la realización de los estudios de microscopía electrónica, tanto por suministrar todas las rejillas necesarias para estos estudios como por sus valiosos consejos y ayuda durante la manipulación del microscopio electrónico de transmisión. Asimismo agradecemos a "Serveis Tècnics de la Universitat de Barcelona" su ayuda en la secuenciación del ADN.

*Bibliografía*

---



---

## 7.- Bibliografía

- Acheson, D.W.K., M. Jacewicz, A.V. Kane, A. Donohue-Rolfe and G.T. Keusch.** 1993. One step high yield affinity purification of Shiga-like toxin II variants and quantitation using enzyme linked immunosorbent assays. *Microb. Pathogen.* **14:** 57-66.
- Acheson, D.W.K., S.A. De Breucker, M. Jacewicz, L.L. Lincicome, A. Donohue-Rolfe, A.V. Kane and G.T. Keusch.** 1995. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. *Infect. Immun.* **63:** 301-308.
- Ackermann, H-W. and T.M. Nguyen.** 1983. Sewage coliphages studied by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **45:** 1049-1059.
- Adams, M. H.** 1959. Bacteriophages. p. 27-30. Interscience Publishers, Inc.
- Albert, M.J., S.M Faruque, A.S. Faruque, P.K. Neogi, M. Ansaruzzaman, N.A. Bhuiyan, K. Alam and M.S. Akbar.** 1995. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* **33:**973-977.
- American Public Health Association.** 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18<sup>th</sup>. ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- American Type Culture Collection.** 1992. Catalogue of bacteria and phages. 18th edition.
- American Type Culture Collection.** 1994. Catalogue of cell lines and hybridomas. 8th edition..
- Bell, R.G.** 1976. The limitation of the ratio of fecal coliforms to total coliphages as a faecal pollution index. *Water Res.* **10:** 743-748.
- Besser-Wiek, J., D. Boxrud, J. Bender, M. Sullivan, L. Carroll and F. Leano.** 1996. Selective media, broth enrichment, immunomagnetic separation and Pcr broth culture assay for detection of *E. coli* O157:H7 in fecal samples abstr. C6364, p. 65. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Betley, M. and J. Mekalanos.** 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science* 229: 185-187.
- Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, S. Aleksic, H.A. Gillespie and T.S. Whittam.** 1997. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *E. coli* strains producing Shiga Toxins in Separate Populations of Cattle and Sheep. *Appl. Env. Microbiol.* 63:2175-2180.
- Bishai, W.R., and J.R. Murphy,** 1988. In *The Bacteriophages Vol 2.* Calendar R.(ed). Plenum Press New York, 683-724.
- Blake, K.** 1993. Cell cultures. *Virology. The LABFAX series.* Harper, D.R., Ed. Bios scientific publishers limited, Oxford, United Kingdom.
- Blanco, J.** 1997. Comentarios sobre *E. coli* O157:H7 y el brote de Fuerteventura. *Boletín de la Sociedad Española de Microbiología.* Junio 1997. 9-11.
- Blanco Alvarez, J., M. Blanco Álvarez y E.A. González García.** 1991. Mecanismos de patogénesis de los *Escherichia coli* enteropatogénicos, enterotoxigénicos, enteroinvasores y enterohemorrágicos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 6:163-176.
- Blanco, J.E., M. Blanco y J. Blanco.** 1995. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. *Microbiología SEM.* 11: 97-110.
- Booth, S.J., R.L. Van Tassell, J.L. Johnson and T.D. Wilkins.** 1979. Bacteriophages of *Bacteroides*. *Rev. Infect. Dis.* 1:325-334.
- Bosch, A., C. Tartera, R. Gajardo, J.M. Diez and J. Jofre.** 1989. Comparative resistance of bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* to inactivation by chlorination or ultraviolet radiation. *Wat. Sci. Technol.* 22:221-226.
- Bradley, D.E.** 1967. The Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocines. *Bacteriol. Rev.* 21: 230-314
- Bremer, S. and R.W. Horne.** 1964. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Selected Papers on Virol.* Prentice Hall. Inc..

- Brown, T.A.** Ed. 1991. Essential molecular biology. A practical approach. Vol. I-II. The practical approach series. Oxford University Press, Oxford.
- Calderwood, S.B., D.W.K. Acheson, G.T. Keusch, T.J. Barret, P.M. Griffin, N.A. Strockbine, B. Swaminathan, J.B. Kaper, M.M. Leveine, B.S. Kaplan, H. Karch, A.D. O'Brien, T.G. Obrig, Y. Takeda, P.L. Tarr. and L.K. Wachsmuth.** 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News (letter). 62:118-119.
- Cantey, J.R. and R.K. Blake.** 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit. A novel mechanism. J. Infect. Dis. 135:454-462.
- Celemin, C., J. Anguita, G. Naharro and S. Suarez.** 1994. Evidence that *Escherichia coli* isolated from the intestine of healthy pigs hybridize with LT-II, ST-Ib and SLT-II DNA Probes. Microb. Pathogen. 16: 77-81.
- Centers for Disease Control.** 1993. Multiestate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburguers --western United States, 1993. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42:258-263.
- Centers for Disease Control.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami --Washington and California, 1994. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 44:157-160.
- Centers for Disease Control.** 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts --Michigan and Virginia, June-July, 1997. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 46:741-744.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 1997. Foodborne diseases active surveillance network, 1996. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 46:258-261.
- Centers for Food Safety and Applied Nutrition.** 1992. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins, 1992. US Food and Drug Administration.
- Clark, D.L., B.B. Milner, M.H. Stewart, R.L. Wolfe and B.H. Olson.** 1991. Comparative study of commercial 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronide preparations with the *Standard Methods* membrane filtration fecal coliform test for the detection of *E. coli* in water samples. Appl. Environ. Microbiol. 57:1528-1534.

- Coia, J.** 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol. Med Microbiol.* **20**:1-9.
- Chang J.C.H., S.F. Ossof and D.C. Lobe.** 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator micro-organisms. *Appl. Env. Microbiol.* **49**: 1361-1365.
- Datz, M., C. Janetzki-Mittmann, S. Franke, F. Gunzer, H. Schmidt and H. Karch.** 1996. Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lamboid phage gene *p* and Shiga-like toxin structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 791-797.
- De Man, J.C.** 1975. The probability of the most probable number. *Em. J. Appl. Microbiol.* **1**; 72-77.
- Dee, S.W. and J.C. Fogleman.** 1992. Rates of inactivation of waterborne coliphages by monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3136-3141.
- Devereux, J.P., P. Haerberli and O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387-395.
- Dylla, B.L., E.A. Vetter, J.G. Hughes and F.R. Cockerill III.** 1995. Evaluation of an immunoassay for direct detection of *E. coli* O157 in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **33**:222-224.
- Echeverria, P., J. Seriwatana, D.N. Taylor, C. Tirapat, W. Chaicumpa and B. Rowe.** 1985. Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic *Escherichia coli* in a longitudinal study of villages in Thailand. *J. Infect. Dis.* **151**:124-130.
- Faith, N.G., J.A. Shere, R. Brosch, K.W. Arnold, S.E. Ansay, M-S. Lee, J.B. Luchansky and C.W. Kaspar.** 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1519-1525.
- Franke, S., D. Harmsen, A. Caprioli, D. Pierard, L.H. Wieler and H. Karch.** 1995. Clonal relatedness of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3174-3178.

- Francki, R.I.B., C.M. Fauquet, D.L. Knudson and F. Brown.** 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology. Supplementum 2. Springer-Verlag. Wien.
- Frestney, R.I.** 1987. Culture of animal cells. A manual of basic techniques. Wiley-liss Inc. New York, EE.UU. 2nd Ed.
- Gannon, V.P.J., C. Teerling, S.A. Masri, and C.L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. J. Gen. Microbiol. 136:1125-1135.
- Gentry, M.K. and J.M. Dalrymple.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. J. Clin. Microbiol. 12: 361-366.
- Goldwater, P.N., and K.A. Bettelheim.** 1995. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O48:H21 in south Australia. Em. Infect. Dis. 1(4): 132-133.
- Grabow, W.O.K., P. Coubrough, E.M. Nupen and B.W. Bateman.** 1984. Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water. Water SA. Vol. 10: 7-14.
- Grant, S.B, C.P. Pendroy, C.L. Mayer, J.K. Bellin and C. J. Palmer.** 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3466-3469.
- Griffin, P.M.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. p. 739-761. In M. J. Blaser, P.D. Smith, J.I. Ravdin, H.B. Greenberg and R.L. Guerrant (ed.), Infections of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, N.Y.
- Griffin, P.M. and R.V. Tauxe.** 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. 13: 60-98.
- Hames, B.D. and D. Rickwood.** 1981. Gel electrophoresis of proteins. A practical

- Harlow, E. and D. Lane.** 1988. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory.
- Havelaar, A.H. and W.H. Hogeboom.** 1983. Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Antoine van Leeuwenhoek* **49**: 387-397.
- Havelaar, A.H., W.H. Hogeboom, W. Koot and R. Pot.** 1987. F-specific bacteriophages as indicators of the disinfection efficiency of secondary effluent with ultraviolet irradiation. *Ozone Sci. Engng.* **9**: 353-368.
- Head, S.C., M. Petric, S. Richardson, M. Roscoe and M.A. Karmali.** 1988. Purification and characterization of verocytotoxin 2. *FEMS Microbiol. Lett.* **51**: 211-216.
- Hofmann, M.A. and D.A. Brian.,** 1991. Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques.* Vol 11, 1.:30-31.
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology.** 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* **25**: 529-545.
- Isaacson, M., P.H. Canter, P. Effler, L. Aentzen, P. Bomans and R. Heenon.** 1993. Haemorrhagic colitis epidemic in Africa. *Lancet.* **341**:961.
- Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda and M. Nishibuchi.** 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from the *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathogen.* **8**: 47-60.
- Jackson, M.P., R.J. Neill, A.D. O'Brien, R.K. Holmes and J.W. Newland.** 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Lett.,* **44**: 109-114.
- Jackson, M.P., J.W. Newland., R.K. Holmes and A.D. O'Brien.** 1987. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophages 933J from *Escherichia coli*. *Microb. Pathogen.* **2**: 147-153

- Jofre, J., E. Oller, F. Ribas, A. Vidal, and F. Lucena. 1995. Potencial usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3227-3231.
- Johnson, W. M., D.R. Polarde, H. Lior, D. Tyler and K.R. Rozee. 1990. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol.* **28**: 2351-2353.
- Johnson, R.P., R.C. Clarke, J.B. Wilson, S.C. Read, K. Rahn, S.A. Renwick, K.A. Sandhu, D. Alves, M.A. Karmali, H. Lior, S.A. McEwen, J.S. Spika and C.L. Gyles. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *E. coli*. *J. Food Prot.* **59**: 1112-1122.
- Karch, H., C. Janetzki-Mittmann, S. Aleksic and M. Datz. 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, Dna-based methods and direct culture. *J. Clin Microbiol.* **34**:516-519.
- Karch, H. and T. Meyer. 1989. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1180-1186.
- Karch, H., T. Meyer, H. Rüssmann and J. Heesemann. 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* **60**:3464-3467.
- Karch, H., H. Rüssmann, H. Schmidt, A. Schwarpkopf and J. Heesemann. 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1602-1605.
- Karmali, M.A., C.A. Lingwood, M.Petric J. Brunton and L. Gyles. 1983. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome and haemorrhagic colitis. *Lancet* **ii**:1299-1300.
- Karmali, M.A. 1989. Infection by verocytotoxic-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**: 15-38.

- Kasatiya, S.** 1987. Phage-Typing scheme for *E. coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 155:806-809.
- Keene, W.E., J.M. McAnulty, F.C. Hoesly, L.P. Williams, K. Hedberg, G.L. Oxman, T.J. Barret, M.A. Pfaler and D.W. Fleming.** 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N.Engl. J. Med.* 331:579-584.
- Kim, S.-H., I.-H. Cha., K.-S. Kim, Y.-H. Kim and Y.-C Lee.** 1997. Cloning and sequence analysis of another Shiga-like toxin IIe variant gene (slt-IIera) from an *Escherichia coli* R107 strain isolated from rabbit. *Microbiol. Immunol.* 41(10):805-808.
- Konowalchuk, J., J.I. Speirs and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infec. Immun.* 18:775-779.
- Kott, Y. and H. Ben Ari.** 1968. Bacteriophages as marine pollution indicators. *Rev. Int. Oceanogr. Med.* ix; 207-217.
- Kott Y., B.A. Hanna and L. Vinokur.** 1978. Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluents. *Prog. Wat. Technol.* 10:337-346.
- Laird, W., and N. Groman.** 1976. Orientation of *tox* gene in the prophage of corynebacteriophage beta. *J. Virol.* 19: 228-231.
- Lasobras, J., M. Muniesa, J. Frias, F. Lucena and J. Jofre.** 1997. Relationship between the morphology of bacteriophages and their resistance in the environment. *Wat. Sci. Tech.* 35:129-132.
- Lee Lang, A., Yu-Ly Tsai, C.L. Mayer, K.C. Patton and C.J. Palmer.** 1994. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and Shiga-like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3145-3149.
- Lindgren, S.W., J.E. Samuel, C.K. Schmitt and A.O'Brien.** 1994. The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect. Immun.* 62:623-631.

- Marques, L.R.M., J.S.M. Peiris, J.S. Cryz and A.D. O'Brien. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett. 44:33-38.II
- Martins, M.T., I.G. Rivera, D.L. Clark, and B.H. Olson. 1992. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal o-nitrophenil- $\beta$ -D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide media. Appl. Environ. Microbiol. 58:3095-3100.
- McDonald, K.L. and M.T. Osterholm. 1993. The emergence of *Escherichia coli* O157:H7 infection in United States. The changing epidemiology of foodborne disease (editorial; comment) JAMA. 269: 2264-2266.
- McGowan, K.L., E. Wickersham and N.A. Strockbine. 1989. *Escherichia coli* O157:H7 from water. Lancet i: 967-968.
- McLeod, D., C.L. Gyles, A. Valdivieso-García and R.C. Clarke. 1991. Physicochemical and biological properties of purified *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. Infect. Immun. 59: 1300-1306.
- McShan, W.M. and J.J. Ferretti. 1997. Genetic diversity in temperate bacteriophages of *Streptococcus pyogenes*: Identification of a second attachment site for phages carrying the erythrogenic toxin A gene. J. Bacteriol. 179: 6509-6511.
- Mel, S. and J.J. Mekalanos. 1996. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by *in vivo* signals. Cell, 87:795-798.
- Meyer, T., H. Karch, J. Hacker, H. Bocklage and J. Heesemann. 1992. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. 276 (2),176-188.
- Morgan, G.M., C. Newman, S.R. Palmer, J.B. Allen, W. Shephard, A.M. Rampling, R.E. Warren, R.J. Gross, S.M. Scotland and H.R. Smith. 1988. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *E. coli* O157:H7 in the UK. Epidemiol. Infect. 101:83-91.

- Mühldorfer, I., J. Hacker, G.T. Keusch, D.W. Acheson, H. Tschäpe, A.V. Kane, A. Ritter, T. Ölschläger and A. Donohue-Rolfe. 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **64**: 495-502.
- Nataro, J.P. and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11(1)**: 142-201.
- Needleman y Wunsch .1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**: 443-453.
- Newland, J.W., N.A. Strockbirne, S.F. Miller, A.D. O'Brien and R.K. Holmes. 1985. Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science.* **230**: 179-181.
- Newland, J.W., and R.J. Neill. 1988. DNA probes for Shiga-like toxin I and II and for toxin converting bacteriophages. *J. Clin. Microbiol.* **26**:1292-1297.
- Niemi, M. 1975. Survival of *Escherichia coli* phage T7 in different water types. *Wat. Res.* **10**: 751-755.
- O'Brien, A.D. and R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* **51**: 206-220.
- O'Brien, A.D., M.A. Karmali and S.M. Scotland. 1994. A proposal for rationalizing the nomenclature of the *Escherichia coli* cytotoxin. p. 147-149. In M. A. Karmali and A.G. Gioglio (ed.), *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Elsevier Science. B.V. Amsterdam
- O'Brien, A.D, T.A. Lively, M.E. Chen, S.W. Rothman and S.B. Formal. 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with hemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Letter, Lancet.* **i**:702.
- O'Brien, A.D., J.W. Newland, S.F. Miller, R.K. Holmes, H.W. Smith and S.B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**: 694-696.

- Ohmura, M., C. Cao, T. Karasawa, J. Okuda, H. Kurazono, V.P.J. Gannon, C.L.Gyles, Y. Takeda. 1993. Purification and some properties of a Vero toxin 2 (Shiga like toxin II) variant (SLT-IIva) of *E. coli* isolated from infantile diarrhea. *Microb. Pathogen.* 15:399-405.
- Omura T., M. Onuma, J. Aizawa, T. Umita and T. Yagi. 1989. Removal efficiencies of indicator micro-organisms in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Technol.* 21: 119-124.
- Ojeda, A., V. Prado, J. Martinez, C. Arellano, A. Borczyk, W. Johnson, H. Lior and M.M. Levine. 1995. Sorbitol negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *J. Clin. Microbiol.* 33:111-115.
- Oku, Y., T. Yutsudo, T. Hirayama, A.D. O'Brien and Y. Takeda. 1989. Purification and some properties of a verotoxin from a human strain of *Escherichia coli* that is immunologically related to Shiga-like toxin II (VT2). *Microb. Pathogen.* 6:113-122.
- Park, C.H., N.M. Vandell and D.L. Hixon. 1996. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34:988-990.
- Paros, M., J. Tarr, H. Kim, T.E. Besser and D.D. Hancock. 1993. A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin length polymorphism profile. *J. Infect. Dis.* 168:1300-1303.
- Paton, A.W. and J.C. Paton. 1996. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34 (2), 463-465.
- Paton, J.C. and A.W. Paton. 1997. Instability of a Shiga toxin type 2 gene in *Enterobacter cloacae*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1917.
- Paton, A.W., J.C. Paton, M.W. Heuzenroeder, P.N. Goldwater and P.A. Manning. 1993. Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microb. Pathog.* 13:225-236(1993).

- Paton, A.W., J.C. Paton and P.A. Manning.** 1993. Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons. *Microb. Pathog.* **15** (1), 77-82.
- Payment, P. and E. Franco.** 1993. Elimination of coliphages, *Clostridium perfringens* and human enteric viruses during drinking water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2418-2424.
- Pedroso, D.M.M and M.T. Martins.** 1995. Ultra-morphology of coliphages isolated from water. *Water. Res.* **29**: 1190-1202.
- Perera, L.P., L.R.M. Marqués, and A.D. O'Brien.** 1988. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 2127-2131.
- Pollard, D.R., W.M. Johnson, H. Lior, S.D. Tyler and K.R. Rozee.** 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol.* **28**: 540-545.
- Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell and R. Gironés.** 1994. Detection of Adenoviruses and Enterovirus en polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2963-2970.
- Raghubeer, E.V., and J.R. Matches.** 1990 Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *Escherichia coli* medium. *J. Clin. Microbiol.* **28**:803-805.
- Rhodes, M.W. and H.I Kator.** 1991. Use of *Salmonella thyphimurium* WG49 to enumerate male-specific coliphages in an estuary and watershed subject to nonpoint pollution. *Water Res.* **25**: 1313-1323.
- Rietra, P.J.G.M., G.A. Willshaw, H.R. Smith, A.M. Field, S.M. Scotland and B. Rowe.** 1989. Comparison of vero-cytotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2307-2318.

- Riley, L.W., R.S Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake and M.L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308 : 681-685.
- Ripp, S. and R.V. Miller. 1995. Effects of suspended particulates on the frequency of transduction among *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1214-1219.
- Rocelle, M., S. Clavero and L.R. Beuchat. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat or freeze-stressed *E. coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3268-3273.
- Rüssmann, H., H. Schmidt, A. Caprioli and H. Karch. 1994. Highly conserved B-subunit genes of Shiga-like toxin II variants found in *Escherichia coli* O157 strains. FEMS Microbiol. Lett. 118: 335-340.
- Rychlik, W. 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. Nucl. Ac. Res. 17, 21: 8543-8551.
- Samadpour, M. 1995. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by Restriction Fragment Length Polymorphism using Shiga-like toxin genes. J. Clin. Microbiol. 33: 2150-2154.
- Samadpour, M., J.E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T.S. Whittam, R. A. Wilson and P.L. Tarr. 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Appl. Environ. Microbiol. 60:1038-1040.
- Samadpour, M., J. Liston, J.E. Ongerth and P.L. Tarr. 1990. Evaluation of DNA probes for detection of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in food and calf fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 56:1212-1215.
- Sambrook, J., E. Fritsch and F. Maniatis. 1989. T. molecular cloning, a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Edition, Chris Nolan Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Saye, D.J., O. Ogunseitan, G.S. Sayler and R.V. Miller.** 1990. Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* during incubation “*in situ*” in a freshwater habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 140-145.
- Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann and H. Karch.** 1993. Shiga-like toxin II- related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* **61**: 534-543.
- Schmitt, C.K., M.L. McKee and A.D. O’Brien.** 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H7 strain E32511. *Infect. Immun.* **59**: 1065-1073.
- Scotland, S.M., N.P. Day and B. Rowe.** 1979. Production by strains of *Escherichia coli* of a cytotoxin (VT) affecting Vero cells. *Society for General Microbiology Quarterly.* **6**:156-157.
- Scotland, S.M., H.R. Smith, and B. Rowe.** 1980. Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of *Escherichia coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroups. *FEMS microbiol. Lett.* **7**:15-17.
- Scotland, S.M., H.R. Smith, G.A. Willshaw and B. Rowe.** 1983. Verocytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* **ii**: 216.
- Sobsey, M.P.** 1989. Inactivation of health-related microorganisms in water disinfection processes. *Wat. Sci. Technol.* **21**: 179-195.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Sowers, E.G., J.G. Well, and A. Strockbine.** 1996. Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1286-1289.
- Stanier, R.Y. and M. Doudoroff.** 1970. *The microbial world.* 3<sup>rd</sup> edition. Prentice-hall inc. Englewood cliffs. New Jersey.

- Strockbine, N.A., L.R. Marques, J.W. Newland, H.W. Smith, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien.** 1986. Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **53**:135-140.
- Swerdlow, D.L., B.A. Woodruff, R.C. Brady, P.M. Griffin, S. Tippen, H.S. Donnell, E. Geldreich, B.J. Payne, A. Meyer and J.G. Wells.** 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* **117**:812-819.
- Swinbanks, D.** 1996. Japan shuns radishes after "posible link" to *Escherichia coli*. *Nature*. vol. **382**: pag. 290.
- Takeda, Y., H. Kurazono and S. Yamasaki.** 1993. Vero toxins (Shiga-Like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (verocytotoxin-producing *Escherichia coli*). *Microbiol. Immunol.* **37**(8): 91-599.
- Tartera, C.** 1986. Estudi del bacteriófags de *Bacteroides fragilis* com a indicadors de la contaminació fecal vírica. Ph.D. Thesis. University of Barcelona, Barcelona, Spain.
- Tartera, C., A. Bosch and J. Jofre.** 1988. The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and UV-irradiation. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 313-316.
- Tartera, C. and J. Jofre.** 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol* **53**: 1632-1637.
- Tartera, C.; F. Lucena and J. Jofre.** 1988. Relationship between numbers of enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environmental samples. *Envir. Technol. Lett.* **9**:407-410.
- Tesh, V.L., J.A. Burris, J.W. Owens, V.M. Gordon, E.A. Wadolokowski, A.D. O'Brien and J.E. Samuel** 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect. Immun.* **61**, 3392-3402.
- Wade, W.G., B.T. Tho and N. Evans.** 1979. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* **ii**:1235-1236.

- Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos.** 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910-1914.
- Wang, G., T. Zhao, and M.P. Doyle.** 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2567-2570.
- Weinstein, D.L., M.P. Jackson, J.E. Samuel, R.K. Holmes and A.D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* **170**: 4223-4230.
- Williams Smith, H., P. Green and Z. Parsell.** 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxin action in laboratory animals, chickens and pigs. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3121-3137.
- Willshaw, G.A., H.R. Smith, S.M. Scotland, A.M. Field and B. Rowe.** 1987. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins: Comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 development of specific gene probes. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1309-1317.
- Yee, A.J., S. De Grandis and C.L. Gyles.** 1993. Mitomycin induced synthesis of a Shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.I.8. *Infect. Immun.* **61**: 4510-5313.
- Yu, H. and J.G. Bruno.** 1996. Immunomagnetic-electroluminescent detection of *E. coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:587-592.
- Zaiss, U.** 1982. Coliphagen und coliforme Bakterien in Fließgewässern unterschiedlicher Güte. *X. Wass. Abwass. Forsch.* **15**: 171-177.
- Zaiss, U. and H.H. Hennies.** 1988. Quantitativen Untersuchungen Über die Elimination von Coliphagen und anderen Fäkalindikatoren bei der Abwasserreinigung. *Zentbl. Bakt. Hyg. B.* **186**: 512-525.