

1.2. Aislamiento de fagos

Diapositiva 1:

En este tema hablaré sobre dónde y cómo se pueden aislar fagos y cómo obtener aislados puros para almacenar.

Diapositiva 2:

Los fagos se pueden encontrar en cualquier ambiente. El agua es un sitio de aislamiento habitual. Altas concentraciones de fagos están presentes en el agua de mar, agua dulce y plantas de tratamiento de residuos. Adicionalmente, se encuentran fagos unidos a las partículas del suelo en muestras de suelo. Además, los animales infectados son una importante fuente de aislamiento. En el proceso de aislamiento se usan aguas residuales de granjas, muestras de intestino, muestras fecales y lechos estables. Una fuente común de fagos para el tratamiento humano es pacientes infectados. Dado que estos pacientes tienen la bacteria diana, también están presentes algunos fagos capaces de infectar estas bacterias. Estos fagos son aislados de muestras de heces, hisopos de piel, saliva e incluso placas dentales. Del mismo modo, los seres humanos sanos pueden ser una rica fuente de fagos para patógenos comensales. Estos fagos pueden aislarse fácilmente de las secreciones nasales. Los fagos también pueden aislarse de ambientes más hostiles, como las aguas termales y los glaciares.

Diapositiva 3:

Los fagos se aíslan cuando la muestra está disponible. En primer lugar, la muestra es pretratada tanto físicamente, por ejemplo por extracción en una solución tampón, por centrifugación o por filtración, como químicamente por cloroformo que mata las bacterias presentes en la muestra. El pretratamiento es seguido por una etapa de enriquecimiento. Esto implica la incubación de la muestra junto con el hospedador deseado en cultivo líquido, a menudo durante la noche dependiendo del hospedador, para amplificar cualquier fago que pueda estar en la muestra. Esto dará lugar a una mayor concentración de los fagos deseados en la muestra, lo que permitiría un aislamiento más fácil. Posteriormente, se realiza un ensayo de doble capa en placa de agar en el que se mezcla una suspensión de bacterias y la muestra en una capa de agar semisólido seguido de una incubación. Si los fagos infectan a la bacteria con suficiente eficacia, se formarán placas de lisis.

Diapositiva 4:

Después del aislamiento de los fagos a partir de la muestra, se obtienen aislados puros mediante purificación en placa. Las placas se forman utilizando el ensayo de la doble capa anteriormente descrito. A continuación, las placas de lisis obtenidas se extraen del medio sólido, se eluyen, después se diluyen antes de ser incubadas con nuevas bacterias para formar nuevas placas de lisis individuales. Este proceso de purificación en placa se repite un mínimo de tres veces para asegurar que la placa final no contiene fagos contaminantes.

Diapositiva 5:

Cuando se dispone de un aislado puro, se almacena un stock de fago que contiene partículas fágicas puras en una concentración elevada. Se aísla una placa de lisis purificada y se incuba junto con el hospedador(es) deseado(s) en cultivo líquido. Después de una noche de incubación, se agrega cloroformo para eliminar las bacterias presentes en el cultivo. Los residuos celulares se eliminan por centrifugación. El sobrenadante que contiene los fagos se separa y se agrega de nuevo cloroformo. Se realiza un ensayo en placa utilizando diluciones seriadas de la solución de fagos y se determina su título (o el número de placas de lisis por ml).

Diapositiva 6:

Los fagos también se pueden aislar a partir de bacterias lisogénicas. Los lisógenos son bacterias en las que el genoma del fago está integrado en el cromosoma bacteriano. El fago está entonces presente como profago. Este profago puede inducirse y liberarse del cromosoma del huésped a través del daño en el ADN ya que esto dará como resultado una respuesta SOS que activa la proteína RecA. Esta proteína inactivará al represor CI que normalmente bloquea los promotores líticos. Al interrumpir este represor, los promotores líticos se expresan y el profago puede salir del cromosoma bacteriano. Los métodos comunes para inducir daño al ADN son, por ejemplo, el tratamiento con UV y la adición de mitomicina C.