

66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

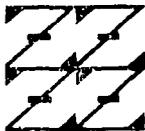
ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE PCR
PARA LA IDENTIFICACION DE LA SUBUNIDAD B
DE LA TOXINA COLERICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :
ROCIO SANCHEZ RONQUILLO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA AFILIACION

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología Molecular del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica bajo la dirección de la M. en C. María Guadalupe Rodríguez Angeles y la asesoría de la Dra. Isabel Soto Cruz en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

DEDICATORIA

A mi madre:

A quien le estaré eternamente agradecida, ya que en los momentos buenos y malos siempre me brindó su cariño y apoyo incondicional, así como su ejemplo de tenacidad y superación.

A mi hermano:

Juan, por su cariño y comprensión.

A Jorge:

Por el apoyo y amor que siempre me ha brindado; por compartir y ser parte de los momentos más importantes de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. María Guadalupe Rodríguez Angeles por su valiosa dedicación y apoyo en la realización de ésta tesis.

A la Dra. Isabel Soto Cruz por su apoyo y provechosos comentarios.

A los miembros del jurado por sus observaciones y comentarios realizados al presente trabajo, que contribuyeron a su mejoramiento: M en C. Ma. Guadalupe Rodríguez Angeles, Dra. Isabel Soto Cruz, Q.F.B. Ma. de Lourdes Vega Navarrete, Dra. Martha Legorreta Herrera, M. en C. Rosalva Rangel Corona.

A los integrantes del laboratorio de Bacteriología molecular del INDRÉ, por otorgarme su ayuda y amistad durante todo el tiempo que compartimos.

Un especial agradecimiento al Q.F.B. Misael Mondragón Barreto por su gran ayuda en la realización de la secuencia.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	
2.1. Antecedentes históricos del <i>Vibrio cholerae</i> O1.....	2
2.2. El <i>Vibrio cholerae</i> O1.....	4
2.2.1. Identificación bioquímica y serológica.....	4
2.3. Factores de transmisión del cólera.....	12
2.4. Toxina colérica.....	14
2.4.1. Estructura.....	15
2.4.2. Mecanismo de acción.....	15
2.5. Otras toxinas producidas por <i>Vibrio cholerae</i>	18
2.5.1. Toxina Zot.....	19
2.5.2. Toxina Ace.....	19
2.5.3. Hemolisina/Citolisina.....	20
2.5.4. Toxina Siga-like.....	20
2.5.5. Toxina ST.....	20
2.6. Pruebas diagnósticas para la toxina colérica.....	21
2.6.1. Asa ligada de conejo adulto.....	21
2.6.2. ELISA.....	21
2.6.3. Aglutinación en látex.....	22
2.6.4. Métodos moleculares.....	22
2.6.4.1. Hibridación.....	22
2.6.4.2. PCR.....	25
2.6.4.3. Electroforesis.....	30
2.7. Secuenciación de DNA.....	31
2.7.1. El método químico (Maxam).....	31

2.7.2. El método del didesoxinucleótido (Sanger)	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. OBJETIVOS	35
5. HIPÓTESIS	36
6. MATERIAL	37
6.1. Material biológico	38
6.2. Material y equipo	38
6.3. Medios de cultivo y reactivos	39
7. MÉTODO	40
7.1. Pruebas de pureza y viabilidad	40
7.2. Estandarización de la técnica de PCR	42
7.2.1. Preparación de los iniciadores	43
7.2.2. Preparación de la mezcla de dNTP's	43
7.2.3. Preparación de la muestra (DNA molde)	44
7.2.4. Prueba para determinar la concentración óptima de los iniciadores	44
7.2.5. Ensayo para establecer la concentración óptima de cloruro de magnesio	46
7.2.6. Prueba para determinar la concentración óptima de la mezcla de dNTP's	48
7.2.7. Ensayo para determinar la concentración óptima de la enzima <i>taq</i> polimerasa	50
7.3. Electroforesis	52
7.4. Secuenciación	52
7.4.1. Purificación de productos de PCR	53
7.4.2. Reacción de secuencias	54
7.4.3. Purificación del producto de reacción de la secuencias	55
8. RESULTADOS	56
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
10. CONCLUSIÓN	87
11. ANEXOS	89
12. BIBLIOGRAFÍA	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características diferenciales de <i>Vibrio</i> y otros géneros afines.....	6
Tabla 2. Diferenciación de <i>Vibrio cholerae</i> y otras bacterias.....	7
Tabla 3. Pruebas diferenciales de vibrios comúnmente aisladas en TCBS.....	8
Tabla 4. Características diferenciales de las especies del género <i>Vibrio</i>	10
Tabla 5. Tipos de transferencia al soporte sólido.....	24
Tabla 6. Diferencias de secuencia en el gen de la subunidad B (<i>ctxB</i>) de la toxina colérica.....	33
Tabla 7. Condiciones para determinar la concentración óptima de los iniciadores.....	45
Tabla 8. Condiciones para determinar la concentración óptima de la solución de MgCl ₂	47
Tabla 9. Condiciones para verificar la concentración óptima de la mezcla de dNTP's.....	49
Tabla 10. Condiciones para obtener la concentración óptima de la enzima <i>Taq</i> polimerasa.....	51
Tabla 11. Condiciones estandarizadas de la técnica de PCR para el gen de <i>ctxB</i> de <i>Vibrio cholerae</i> O1.....	65
Tabla 12. Número de cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 por entidad federativa aisladas entre 1991-1994 que presentaron el gen <i>ctxB</i>	71
Tabla 13. Cepas de <i>V. cholerae</i> O1 que no presentaron el gen <i>ctxB</i>	73
Tabla 14. Cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 a las que se les realizó la secuenciación.....	74
Tabla 15. Diferencias en la secuencia del gen <i>ctxB</i> de la toxina colérica en cepas con genotipo III aisladas en la República Mexicana.....	79
Tabla 16. Diferencias en la secuencia del gen <i>ctxB</i> de la toxina colérica en cepas con genotipo I aisladas en la República Mexicana.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de <i>Vibrio cholerae</i>	11
Figura 2. Estructura y mecanismo de acción de la toxina colérica	16
Figura 3. Amplificación del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
Figura 4. Comportamiento de la serología y año de aislamiento entre las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1	57
Figura 5. Efecto de la concentración de los iniciadores en la PCR para <i>ctxB</i>	59
Figura 6. Efecto de la concentración de MgCl ₂ en la PCR para <i>ctxB</i>	60
Figura 7. Efecto de la concentración de dNTP's en la PCR de <i>ctxB</i>	62
Figura 8. Efecto de la concentración de la enzima <i>Taq</i> polimerasa	63
Figura 9. Productos de amplificación del gen <i>ctxB</i> en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 aisladas de casos de cólera, en gel de agarosa al 2%	66
Figura 10. Distribución y número de cepas de campo de <i>Vibrio cholerae</i> O1 que presentaron el gen <i>ctxB</i> en el año de 1991	67
Figura 11. Distribución y número de cepas de campo de <i>Vibrio cholerae</i> O1 que presentaron el gen <i>ctxB</i> en el año de 1992	68
Figura 12. Distribución y número de cepas de campo de <i>Vibrio cholerae</i> O1 que presentaron el gen <i>ctxB</i> en el año de 1993	69
Figura 13. Distribución y número de cepas de campo de <i>Vibrio cholerae</i> O1 que presentaron el gen <i>ctxB</i> en el año de 1994	70
Figura 14. Gráfica de secuenciación del fragmento del gen <i>ctxB</i> de la cepa de referencia 6706 <i>Vibrio cholerae</i> O1	75
Figura 15. Secuencia de la subunidad B de la toxina colérica en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 que circulan en México	76

RESUMEN

La toxina colérica es producida por *Vibrio cholerae* O1 y es la responsable de la diarrea que caracteriza a la enfermedad. Esta toxina es una proteína compuesta por dos tipos de subunidades, una subunidad A y una subunidad B que consiste de cinco péptidos idénticos.

Los genes que codifican para las subunidades A y B son designados como *ctxA* y *ctxB* respectivamente.

Con base en la secuencia se han identificado 3 genotipos de *ctxB*, el genotipo I que incluye a las cepas del biotipo Clásico y las cepas del biotipo El Tor encontradas en las costas del Golfo en USA, el genotipo II que abarca a las cepas El Tor originarias de Australia y por último el genotipo III que comprende a las cepas El Tor de la séptima pandemia y la reciente epidemia en Latinoamérica.

En la realización de este estudio se llevó a cabo la estandarización de la técnica de PCR para el gen *ctxB*, con el fin de obtener el fragmento *ctxB* de 460 pb y verificar posteriormente la existencia de diversos genotipos en cepas de campo de *V. cholerae* O1 que circularon en la República Mexicana durante 1991 a 1994.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la estandarización de la técnica propuesta, es adecuada para obtener e identificar a *ctxB* de la toxina colérica.

Posterior a la obtención de *ctxB* se realizó su secuenciación, observándose la existencia de dos genotipos de *ctxB* circulando en México, genotipo III y el genotipo I.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa gastrointestinal caracterizada por vómito y diarrea; que es causada por una bacteria denominada *Vibrio cholerae* O1 (*V. cholerae* O1), la cual produce una toxina denominada toxina colérica que actúa sobre la mucosa del intestino delgado y es la responsable de la diarrea característica de la enfermedad.

La toxina colérica esta compuesta de dos tipos de unidades funcionales, una subunidad A y cinco subunidades B. Los genes que codifican para las subunidades A y B son designados como *ctxA* y *ctxB*, respectivamente.

Además de la identificación bioquímica y serológica de *Vibrio cholerae* O1 se han utilizado métodos de biología molecular como: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación, con el fin de tener un mejor estudio de la cepa.

La PCR es un método que consiste en la síntesis enzimática *in vitro*, de millones de copias de un segmento específico de DNA. Al estandarizar la PCR se optimizan las condiciones de reacción, favoreciendo el aumento en la especificidad y sensibilidad de la misma.

A partir del estudio de la secuencia del gen *ctxB* se han identificado tres genotipos, el genotipo I que incluye a las cepas del tipo Clásico y El Tor de las costas del Golfo en Estados Unidos, el genotipo II que abarca a las cepas El Tor de Australia y por último el genotipo III, que comprende a las cepas El Tor de la séptima pandemia y las de la reciente epidemia de Latinoamérica.

Considerando que el principal mecanismo de patogenicidad de *V. cholerae* O1 es la toxina colérica y que el gen *ctxB* proporciona información acerca de la diversidad genética de la bacteria, este estudio tuvo como propósito estandarizar la técnica de PCR para el fragmento del gen *ctxB* con el fin de conocer si existe alguna diversidad, a nivel del genotipo *ctxB*, en las cepas de *V. cholerae* O1 que circulan en México; la aportación de estos conocimientos podrán servir de base para comprender más acerca de la enfermedad del cólera en México a nivel epidemiológico.

MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes históricos del *V. cholerae* O1

La palabra cólera fue usada por Hipócrates hace 24 siglos y significa flujo de bilis. Algunos historiadores prefieren ubicar el origen de la infección en la India, donde permaneció latente hasta el siglo V. En el siglo XVII, Sydenham diferenció la enfermedad *Cholera morbus* del estado colérico, justificando a la enfermedad como un exceso de bilis que irritaba al estómago y a los intestinos, de suerte que se expulsaba como vómito y diarrea¹.

Durante los siglos XIX y XX han ocurrido siete pandemias de cólera. Entre las pandemias que afectaron el Continente Americano se encuentran la segunda, tercera, cuarta y séptima pandemia.

La segunda pandemia del cólera se ubicó entre los años de 1826-1837 y afectó a países de Asia, Europa, América y África, debido a conflictos bélicos que se presentaron entre Rusia y Persia, además de la emigración que se extendió a partir de Europa a América, llegando en 1832 a Canadá, de ahí a Estados Unidos, a Cuba y finalmente a México en 1833¹.

La tercera pandemia comprende los años de 1848-1862 y fue una de las más mortíferas, afectando a países de Asia, Europa, África y América. Específicamente en América la puerta de entrada fue Nueva Orleans, desde ahí se remontó a California y llegó al sureste de México. Durante este periodo John Snow demostró la importancia del agua en la transmisión del padecimiento, siendo así el primero en descubrir las medidas de prevención de la enfermedad a raíz de la epidemia ocurrida en Londres¹.

Entre los años de 1864 - 1875 se presentó la cuarta pandemia perjudicando a países de Asia, Europa, América y África. En África se observó una notoria extensión de la enfermedad debido al intenso tráfico de esclavos¹.

En el año de 1884 Robert Koch descubrió el agente causal de la enfermedad, y lo describe como un bacilo en forma de coma aislado de evacuaciones y tejidos de enfermos de cólera.

La séptima pandemia se inició en Indonesia en 1961 y se extendió al sudeste asiático y al oriente medio, en 1970 invadió África y los países del Mediterráneo.

El primer caso de cólera en Latinoamérica del siglo XX se registró en Perú, el 23 de enero de 1991, extendiéndose por todo el continente y llegando a México en Junio del mismo año. La séptima pandemia se caracteriza por el predominio de *V. cholerae* O1 toxigénico, biotipo El Tor, serotipo Inaba. La presente pandemia no ofrece señales de abatimiento y actualmente en algunos estados de nuestro país tenemos una epidemia controlada¹.

El cólera en México

En México se tienen noticias de la aparición del cólera a partir de la segunda pandemia en el año de 1833. La enfermedad procedente de Europa pasó a América en el año de 1832, transportada por emigrantes infectados. Al parecer el cólera llegó a nuestro país procedente de Nuevo Orleans y Cuba, el cual se diseminó pronto por toda la República Mexicana, causando grandes daños. La ruta principal que siguió fue la de la plata: de Tampico a San Luis Potosí, Guadalajara, Querétaro, Ciudad de México, Puebla y Oaxaca. Fue hasta 1883 en Juchitán, Oaxaca que se registró la enfermedad por última vez^{1, 2, 3}.

Su propagación a gran parte de la República Mexicana estuvo asociada a los movimientos militares de la época y a las condiciones de vida a causa de un periodo de crisis y guerra^{1, 4}.

En lo que va del siglo, el primer caso de cólera en México ocurrió en Junio de 1991 en el Municipio de Sultepec, Estado de México. En pocas semanas se iniciaron otros brotes en diversos puntos del altiplano, para luego extenderse a los estados del sureste y de ahí a otros sitios del país^{1,5,6}.

2.2. El *Vibrio cholerae* O1

El cólera es una enfermedad infecciosa intestinal aguda, grave, caracterizada por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación rápida, acidosis, colapso circulatorio y en los casos no tratados, causa la muerte después de las 24 horas de su aparición⁵.

El aislamiento del agente etiológico del cólera, *V. cholerae* del serogrupo O1, se puede realizar a partir de heces o de vómito del enfermo⁵.

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* a la cual también pertenece los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium*^{5,7}.

2.2.1. Identificación bioquímica y serológica

El *Vibrio* es un bacilo curvo Gram-negativo que mide de 0.5 a 0.8 μm de diámetro por 1.4 a 2.6 μm de largo, las formas involucionadas usualmente se presentan en cultivos viejos o bajo condiciones adversas. En medio líquido son móviles por flagelos polares, no forman endosporas, son anaerobios facultativos y poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo; no fijan ni desnitrifican el nitrógeno, todos son quimiorganotrofos, las especies de *Vibrio* se incluyen en el grupo de fermentadores oxidasa-positivos, fermentan la D-glucosa dando como resultando producción de ácido pero no de gas⁵.

Los iones de sodio estimulan el desarrollo de todas las especies y algunas especies crecen bien en medio conteniendo una base de agua de mar¹.

Las especies vibrionáceas pueden confundirse con enterobacterias y con *Pseudomonas*. Con las primeras, la diferenciación inicial se hace mediante la prueba de oxidasa y con *Pseudomonas* se hace buscando su incapacidad para fermentar la glucosa (tabla 1).

Para hacer la distinción entre las cepas de *V. cholerae*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*, se emplea primeramente la determinación de arginina, además de otras pruebas que se indican en la tabla 2.

El género *Vibrio* incluye 13 especies, que se han aislado de muestras humanas de las cuales se incluyen las siguientes^{1,8}.

- *V. alginolyticus*
- *V. cholerae* O1
- *V. cholerae* No O1
- *V. damsela*
- *V. fluvialis*
- *V. furnissii*
- *V. cincinnatiensis*
- *V. hollisae*
- *V. metschnikovii*
- *V. mimicus*
- *V. parahaemolyticus*
- *V. vulnificus*
- *V. carchariae*

Las reacciones diferenciales en agar tiosulfato, citrato, bilis y sacarosa (TCBS) son útiles para efectuar una identificación presuntiva de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*: después de 18 a 24 horas de incubación las colonias de *V. cholerae* son de color amarillo, lisas de 2 a 4 mm de diámetro con un centro opaco y una periferia transparente. Las colonias de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* no utilizan la sacarosa por lo que las colonias son de color azul-verde⁹.

En la tabla 3 se presentan las pruebas empleadas comúnmente para distinguir las tres especies de vibrios principales que crecen en el medio selectivo TCBS⁹.

Tabla 1. Características diferenciales de *Vibrio* y otros géneros afines.

Características	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacterias
Crecimiento en TCBS	+	-	-	-	-
Crecimiento en aerobiosis	+	+	+	+	+
Crecimiento en anaerobiosis	+	+	+	-	+
Requerimiento de NaCl	+	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	-
Fermentación de D-glucosa	+	+	+	-	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	-	+/-	+/-

+ = positivo

- = negativo

+/- = variable

Tomado de Giono y col⁵.

Tabla 2. Diferenciación de *Vibrio cholerae* y otras bacterias

Características	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterobacterias
Fondo de TSI:				
ácido	+	+	+	+
gas	-	V	-	V
ácido sulfhídrico	-	-	-	V
Lisina				
descarboxilasa	+	V	+	V
Arginina				
	-	+	+	V
Ornitina				
descarboxilasa	+	+	+	V
Hidrólisis de				
gelatina	+	+	-	V
Oxidasa				
	+	+	+	-

+ = positivo

- = negativo

V = Variable

Tomado de Giono y col⁵.

Tabla 3. Pruebas diferenciales de vibrios comúnmente aislados en TCBS

Prueba	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i> No O1
Fermentación de glucosa	+, no gas	+, no produce gas	+, no produce gas
Fermentación de sacarosa	+, (raro -)	-, (raro +)	+, (raro -)
Rojo de metilo 37 °C	+, (raro -)	+, (requiere NaCl)	-, (raro +)
TSI: superficie	A, (raro K)	K	K o A
fondo	A	A	A
H ₂ S	-	-	-
Crecimiento a 43 °C	-	+	-
Caldo nutritivo sin NaCl	crece	no crece	crece
Caldo nutritivo con NaCl 10%	no crece	crece	no crece

+ = positivo

- = negativo

A = ácido

K = alcalino

Tomado de Giono y col⁵

En la tabla 4 se muestran las pruebas de diferenciación de las especies de *Vibrio* patógenas para el humano.

La especie *V. cholerae* presenta algunas diferencias de acuerdo a sus características antigénicas y fisiológicas (figura 1). El primer grado de diversidad de *V. cholerae* toma en cuenta a su antígeno "O" somático, el cual es un polisacárido característico de las bacterias Gram negativas, componente de la superficie de la célula. En la práctica las cepas que aglutinan con el antisuero somático se denomina *V. cholerae* O1 y aquellos que no aglutinan se les designa como *V. cholerae* No O1, antes llamados vibrios no aglutinables (NAG)^{1,5,10}.

Se ha observado que para obtener resultados más satisfactorios para las pruebas de serología, es fundamental elegir colonias a partir de un medio no selectivo como el agar base sangre (BAB)¹¹.

El grupo O1 comprende dos serotipos o serovariedades: Ogawa e Inaba (estables) y la variedad Hikojima, que es inestable (figura 1)⁵. Cabe mencionar, que la séptima pandemia se ha caracterizado por el predominio del serotipo Inaba^{1,12,13}.

El segundo grado de diversidad se refiere a los biotipos o biovars Clásico y El Tor, que son variantes fenotípicas diferenciales por su comportamiento fisiológico. Las pruebas que se utilizan para distinguirlos son la hemólisis de sangre de borrego y pollo, sensibilidad a 50 UI de polimixina en medio Mueller-Hinton y patrón de lisis a los fagos de Mukerjee^{1,14}.

La resistencia a las condiciones del medio ambiente también depende del biotipo de *V. cholerae* O1 de que se trate; se ha observado que el biotipo El Tor es más resistente y sobrevive durante más tiempo en el ambiente, el agua y en los alimentos y por consiguiente puede propagarse más fácilmente que el biotipo Clásico¹.

Tabla 4. Características diferenciales de las especies del género *Vibrio*

Especie	Crecimiento en NaCl			Voges-Proskauer	Arginina	Indol
	0%	6%	8%			
<i>V. cholerae</i>	+	+/-	-	+/-	-	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	+	-	+/-
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	-	+	-	-
<i>V. damsela</i> *	-	+	-	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+/-	-	+	+/-
<i>V. furnissii</i> **	-	+	+/-	-	+	-
<i>V. hollisae</i>	-	+	-	-	-	+
<i>V. metschnikovii</i> ***	+/-	+	+/-	+	+	+/-
<i>V. mimicus</i>	+	+/-	-	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i> *	-	+	+	-	-	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	-	-	-	+

* ureasa +

+ = positivo

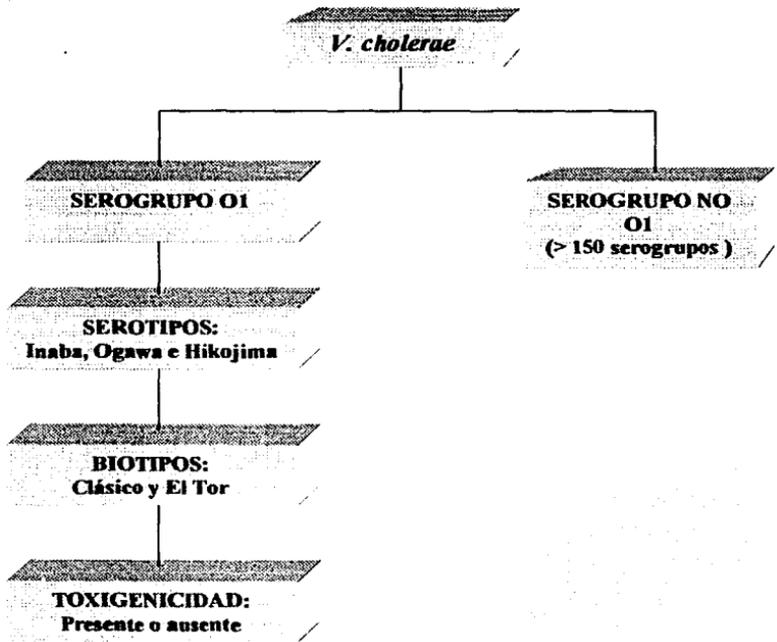
- = negativo

+/- = variable

** gas de glucosa

*** oxidasa -, nitrito -

Tomado de Giono y col⁵.



Modificado de Giono y col⁵.

Figura 1. Características de *Vibrio cholerae*

El *V. cholerae* sobrevive a un pH de 6-9; es susceptible a 1 mg/l de cloro durante 30 minutos; es sensible a un pH menor de 4 y mayor de 11; muere a una temperatura de 60°C durante 10 minutos y a 100 °C en 1 minuto¹.

La capacidad de *V. cholerae* para sobrevivir por largos periodos fuera del organismo, depende de las condiciones y temperatura del medio. En el mar a temperaturas de 5°C a 10°C puede sobrevivir 60 días, cuando la temperatura es mayor (30°C a 32°C) sobrevive de 10 a 13 días. En el agua de una cisterna sobrevive 18 días a bajas temperaturas y hasta 13 días a temperaturas más altas^{1, 2}.

En pescados y mariscos frescos sobrevive entre 7 y 14 días a temperaturas entre 5°C y 10°C y de 2 a 5 días a temperaturas de 30°C a 32°C. En vegetales y frutas frescas sobreviven de 7 a 10 días entre 5 y 10°C y a temperaturas más altas sólo persiste de 1 a 7 días¹.

2.3. Factores de transmisión del cólera

Como se mencionó anteriormente, el cólera es una enfermedad infecciosa aguda caracterizada por diarrea, vómito y deshidratación. El cólera se transmite por ingerir agua o alimentos contaminados con la bacteria; no se transmite por vía respiratoria, por contacto casual o por convivir en áreas de trabajo¹⁰.

Existen diferentes factores que determinan la transmisión del cólera, entre los que se encuentran¹⁰:

1. Factores del huésped.
2. Factores ambientales.
3. Factores del agente (*V. cholerae* O1).

El hombre es el principal reservorio natural del agente causal y la transmisión se realiza en un ciclo hombre → medio ambiente → hombre, pero se desconoce la forma como sobrevive el microorganismo durante los periodos interepidémicos¹.

Se puede considerar que la susceptibilidad del huésped es universal, aunque existen factores humanos individuales que pueden favorecer la infección, como son^{1,10}:

- La acidez gástrica: ya que los vibrios son destruidos a un pH igual o menor de 5, la aclorhidria gástrica aumenta el riesgo de padecer la enfermedad.
- La desnutrición también favorece el que sea más susceptible a adquirir la enfermedad.
- La inmunidad natural de cada persona, ya que en zonas en las que existe la enfermedad de manera endémica, ésta afecta principalmente a niños de entre 2 a 9 años.

Hay elementos que favorecen el desarrollo de la enfermedad del cólera, entre los más importantes se encuentra la cantidad de inóculo, es decir, el número de bacterias y la concentración necesaria para producir enfermedad. Es bien sabido, que se requiere entre un millón y cien millones de organismos de *V. cholerae* O1 para producir la enfermedad^{1,10}.

Otro punto importante es el nivel socioeconómico, ya que la poca disponibilidad y acceso a medidas sanitarias básicas como agua potable y alcantarillado, originan un estado de vulnerabilidad en la población para contraer la enfermedad.

2.4. Toxina colérica

Se sabe que las manifestaciones clínicas del cólera se atribuyen a una enterotoxina elaborada por *V. cholerae* O1, también conocida como toxina colérica (CT)^{11,15}.

Las toxinas son moléculas de muy diferentes orígenes que se reconocen por su capacidad de lesionar tejidos. Las de origen microbiano se clasifican en exotoxinas y endotoxinas. Las exotoxinas son producidas tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, mientras que las endotoxinas se localizan característicamente en las Gram-negativas⁵.

Las exotoxinas que producen las bacterias Gram-negativas enteropatógenas son comúnmente llamadas enterotoxinas⁵.

Los primeros indicios de la existencia de una toxina responsable del cólera fue desarrollada por Robert Koch, quien en 1884 propuso que el agente responsable de la producción del cólera era una "poción especial" que actuaba en el epitelio intestinal^{11,16}.

La hipótesis acerca de la existencia de una toxina fue demostrada en 1959, por dos grupos de investigadores independientes en la India, logrando inducir una considerable pérdida de fluido, mediante la inoculación directa en el intestino de conejo de extractos libres de vibrios^{11,16,17}.

Finkelstein y LoSpalluto, en 1969 lograron purificar la toxina, describiendo por primera vez la toxina y determinando su naturaleza proteica^{11,18}.

2.4.1. Estructura

La toxina del cólera es una proteína con un peso molecular de 84 000 daltons y su estructura está conformada por dos tipos de subunidades, una subunidad A y una subunidad B^{19,20}.

La CT está formada por cinco subunidades B idénticas y una sola subunidad A, (figura 2). Ninguna de las subunidades de forma individual tiene una actividad significativa en animales o sistemas celulares intactos¹¹.

La subunidad B está formada por 103 aminoácidos²¹ tiene un peso molecular de 11.6 kDa, formando un pentámero semejante a una dona gruesa con un poro en su centro, en el cual se aloja la subunidad A^{1,11}; el poro interno mide 11-15 Å de diámetro y aloja específicamente a la región A₂^{11,22}. La subunidad B tiene como función la unión de la toxina con los receptores de los enterocitos¹¹.

La subunidad A tiene un peso molecular de 27.2 kDa y es dividida proteolíticamente en dos cadenas de polipéptidos A₁ (21.8 kDa) y A₂ (5.4 kDa), las cuales se mantienen unidas por enlaces disulfuro^{11,23} (figura 2). El fragmento A₁ tiene una forma triangular y es responsable de la activación del complejo adenilato ciclasa, induciendo una secreción activa de agua y sales que causa una terrible pérdida de fluido asociado con el cólera^{1,24}.

2.4.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la CT inicia, cuando la subunidad B se une a un receptor GM₁ en la superficie de la célula del intestino delgado, lo cual permite que la subunidad A interactúe de cerca con la membrana celular (figura 2).

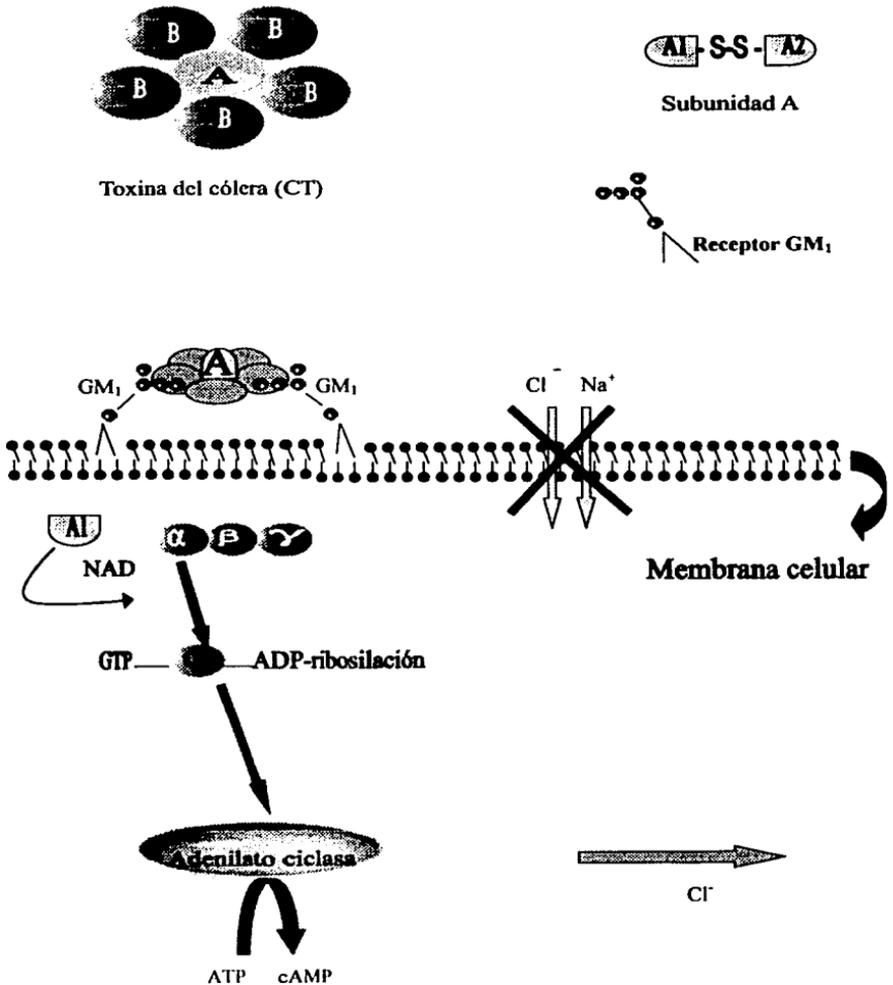


Figura 2. Estructura y mecanismo de acción de la toxina colérica.

Existen controversias de cómo la subunidad A, en particular el fragmento A₁, ingresa a la célula y alcanza a la adenilato ciclasa. Algunos investigadores proponen que la toxina completa (subunidad A y B) ingresa por endocitosis y que una vez dentro de la vesícula endosomal, la subunidad A es liberada al citoplasma^{1,13}.

En un modelo similar se propone que una vez en la vesícula endosomal la subunidad A, aún adherida al endosoma, pero con la región A₁ expuesta hacia el interior de la célula y no al endosoma, se une a la proteína G_{sa} para realizar su ADP-ribosilación^{1,13}.

Otros autores sugieren que al interactuar la CT con la membrana de la célula intestinal, la toxina del cólera sufre un cambio conformacional en su subunidad B lo que conlleva a la penetración de la subunidad A^{1,13}.

Después de que la subunidad B se une al receptor GM₁ de la membrana celular, el objetivo de la CT dentro de la célula, es la adenilato ciclasa, uno de los más importantes reguladores del sistema de las células eucariotas. Esta enzima media la transformación de ATP a AMP cíclico (AMPc), un mensajero crucial intracelular¹¹.

Normalmente la adenilato ciclasa es activada o inactivada en respuesta a una variedad de estímulos. La regulación de la adenilato ciclasa es mediado por una proteína G_s (compuesto activador), que sirve para enlazar muchos receptores en la superficie celular, y un compuesto inhibidor G_i. La proteína G_s esta compuesta de tres subunidades distintas, α β y γ^{11,25} (figura 2).

La toxina colérica cataliza la transferencia de ADP-ribosa (a partir de NAD) a un residuo arginina específico en la proteína G_{sa}¹². La proteína G_{sa} ADP-ribosilada se une a GTP y este complejo es capaz de activar a la enzima adenilato ciclasa dando como resultado un incremento subsecuente en los niveles intracelulares de AMPc^{1,11}.

Al incrementarse la concentración intracelular de AMPc, debido a la activación de la adenilato ciclasa por la toxina colérica, conduce a un incremento de la secreción de Cl⁻ y un decremento en la absorción de Na⁺, provocando un intenso flujo de agua a través de la membrana intestinal hacia la luz del intestino induciendo la diarrea acuosa^{11,26}.

La toxina de *V. cholerae* es codificada por genes ubicados en un fago integrado al cromosoma y su producción está sujeta a la regulación de la transcripción por un efector positivo denominado Tox R¹.

Cada una de las subunidades A y B de la toxina, está codificada por un gen y son designados como *ctxA* y *ctxB*, respectivamente^{18,23,27}.

El gen *ctxA* contiene 777 bp: 636 bp codifican para la subunidad A₁ y 141 bp codifican para la subunidad A₂. Los últimos cuatro nucleótidos de *ctxA* (A TGA), incluyendo el codón de terminación (TGA), son también los primeros nucleótidos del *ctxB* (ATG A)^{23,28}. El gen *ctxB* contiene 375 bp: 63 bp codifica para 21 aminoácidos del péptido líder y las 312 bp restantes codifican para 103 aminoácidos del monómero de la unidad B y el codón terminal^{18,23}.

2.5. Otras toxinas producidas por *V. cholerae* O1

La toxina del cólera no es el único agente agresor característico de la bacteria, se han encontrado algunas cepas de *V. cholerae* O1 que también secretan otras toxinas, entre las que se encuentran la toxinas Zot, Ace, hemolisina, citolisina, SLT y ST; las cuales se describen a continuación.

2.5.1. Toxina Zot

Zot fue descrita por Fasano y colaboradores²⁸ quien reportó que *V. cholerae* producía una toxina que incrementaba la permeabilidad de una pequeña parte de la mucosa intestinal afectando la zónula-occludens del intestino de conejo. Esta toxina afecta la unión de los enterocitos y altera la conductividad eléctrica de la mucosa intestinal del conejo en cámaras de Ussing y se considera que causa la pérdida de fluido a través de la zónula occludens, por lo que se denomina toxina Zot^{1,5}.

El gen *zot* consiste de un marco de lectura abierto de 1.3 kb, el cual puede codificar para un polipéptido de 44.8 kDa. El gen que codifica a la toxina Zot fue clonado y se encontró que la localización es inmediata al operón *ctx*, que codifica para la toxina del cólera^{11,29}.

2.5.2. Toxina Ace

La toxina Ace de *V. cholerae* fue identificada por Trucksis y colaboradores³⁰. Estos investigadores demostraron que el producto de un gen de un marco de lectura abierto que se localizó inmediato al de *zot*, logró incrementar un corto circuito en la corriente en cámaras de Ussing¹¹. A esta toxina se le denominó enterotoxina accesoria del cólera (Ace).

El gen que codifica a la toxina Ace (*ace*) puede codificar a un péptido de 96 residuos con un peso molecular 11.30 kDa^{11,30}.

Similar a la toxina del cólera y en contraste a la toxina Zot, esta toxina incrementa las diferencias de potencial en vez de la conductividad del tejido¹¹.

2.5.3. Hemolisina/ Citolisina

Como se mencionó anteriormente, la hemólisis de eritrocitos de carnero fue tradicionalmente usada para diferenciar a los biotipos de *V. cholerae* El Tor y Clásico. La hemolisina fue inicialmente purificada por Honda y Finkelstein^{11,31} y mostró ser citolítica para una variedad de cultivos en eritrocitos y células de mamíferos y letal para ratones¹¹.

La hemolisina es inicialmente sintetizada como una proteína de 82 kDa y es transformada en dos pasos a una citolisina activa de 65 kDa^{11,32}. Los genes que codifican para esta hemolisina, *hlyA*, se presentan en cepas de *V. cholerae* El Tor, Clásico y no O1^{11,33}; sin embargo las cepas del biotipo Clásico son negativas para la lisis de eritrocitos de carnero.

La hemolisina es capaz de causar una acumulación de fluido con sangre y moco en asa ligada de conejo^{12,34}.

2.5.4. Toxina Shiga-like

La toxina Shiga-like (SLT) fue identificada en *V. cholerae* O1, basándose en la citotoxicidad en células Hela neutralizadas por anticuerpos producidos contra la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae*¹¹. Sin embargo se sabe muy poco acerca de esta toxina, ya que su investigación ha sido muy reducida.

2.5.5. Toxina ST

Hay algunas cepas de *V. cholerae* no O1, que producen una toxina que comparte un 50% de homología en la secuencia de la proteína con ST (toxina estable al calor) de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)^{11,35}.

Morris y col. demostraron que cepas de *V. cholerae* no O1, que producen esta toxina (también llamado NAG-ST) pueden causar diarrea en voluntarios^{11,36}.

Los genes que codifican la enterotoxina ST en *V. cholerae* O1 y no O1, fueron flanqueados por 123 bp de repetición directa, por lo que se sugiere que esta toxina tuvo que ser introducida dentro de *V. cholerae* por medio de un transposon¹¹.

2.6. Pruebas diagnósticas para la toxina colérica

Además de la identificación bioquímica y serológica de *V. cholerae*, existen diversos métodos que se emplean en el diagnóstico y detección de la toxina colérica:

2.6.1. Asa ligada de conejo adulto

Uno de los métodos de laboratorio para determinar CT es la prueba de asa ligada de conejo adulto, en el cual una porción de intestino se liga por los extremos con un hilo y se inyecta el sobrenadante libre de bacterias de un cultivo de *V. cholerae* en el asa formada, al cabo de 10 a 18 horas el animal se sacrifica y se extrae el intestino delgado con el fin de determinar el líquido acumulado debido a la presencia de la toxina⁵.

2.6.2. ELISA

El ensayo inmuno enzimático (ELISA) se utiliza para determinar la toxigenicidad de la cepa de *V. cholerae* O1. Se preparan placas sensibilizadas con el receptor GM1 y se agrega el sobrenadante de un cultivo donde está la toxina. La presencia de interacción receptor-toxina se determina agregando un anticuerpo de conejo antitoxina. La reacción se pone en evidencia al adicionar anticuerpos de cabra contra las inmunoglobulinas de conejo conjugados a una enzima. Al agregar su sustrato específico se desarrolla una reacción colorida que evidencia la presencia de la toxina en el cultivo¹⁰.

2.6.3. Aglutinación en látex

Se utiliza antisuero de conejo anti-toxina colérica para sensibilizar partículas de látex de poliestireno. En presencia de un sobrenadante que contenga la enterotoxina de *V. cholerae*, se produce una reacción de aglutinación. Se deben emplear testigos positivos y negativos conocidos y un testigo adicional preparado con suero de conejo no inmunizado¹⁰.

Se hacen diluciones del sobrenadante filtrado de un cultivo problema y se añade la suspensión del látex sensibilizado. En el caso de que la toxina esté presente se forma una red de aglutinación en el fondo del pozo, en tanto que en su ausencia se observa como un botón¹⁰.

2.6.4. Métodos moleculares

Actualmente se están desarrollando nuevos métodos moleculares que permiten un estudio mas fino para la caracterización de microorganismos patógenos a partir de su DNA; entre los que se encuentran: la hibridación, PCR y secuenciación.

2.6.4.1. Hibridación

La hibridación es el proceso en el cual dos cadenas individuales de ácido nucleico (una de las cuales ha sido marcada previamente) se une *in vitro* para formar una molécula de doble cadena estable.

A la cadena marcada se le llama sonda y a la cadena complementaria se le conoce como DNA blanco o molde, encontrándose en la muestra problema. Las sondas son simplemente secuencias conocidas de DNA o RNA de cadena sencilla, específicas para cada microorganismo⁵.

La reacción de hibridación comienza a partir de la desnaturalización de la doble cadena del DNA blanco con el fin de trabajar con cadenas sencillas. La cadena sencilla es capaz, por su parte, de reasociarse con otra cadena de DNA o con un RNA de secuencia complementaria para formar un híbrido⁵.

Existen tres variantes de la reacción de hibridación:

1. Hibridación sobre una fase sólida como soporte.
2. Hibridación en fase líquida.
3. Hibridación *in situ*.

La hibridación comúnmente utilizada para el diagnóstico de *V. cholerae* es la hibridación en fase sólida como soporte, la cual consta de cuatro pasos⁵:

1. La preparación de la muestra, para exponer el DNA blanco.
2. La aplicación y fijación del DNA blanco al soporte sólido, conocido como transferencia o "blot".
3. La hibridación propiamente dicha empleando una sonda marcada.
4. Detección de la hibridación mediante la señal producida por la sonda.

Este tipo de hibridación emplea como soporte, membranas de nylon o nitrocelulosa y puede identificar tanto DNA como RNA proveniente de una muestra problema. Se emplean diferentes tipos de transferencia para evidenciar la hibridación entre los ácidos nucleicos, la más utilizada para el diagnóstico de *V. cholerae* es la de "colony blot". En la tabla 5 se presentan los tipos de transferencia que se emplean comúnmente para la hibridación.

Tabla 5. Tipos de transferencia al soporte sólido

Metodología	Dot blot y slot blot	Colony blot y macrocolonias	Southern blot	Northern blot
Muestra	Suspensión de microorganismos o DNA total	Colonia de bacterias	Los fragmentos de DNA* se separan por tamaños en EGA	El RNA puro se separa por tamaños en EGAD
Aplicación de la muestra al nylon	Filtración a través de la membrana por vacío	Aplicación directa con una asa bacteriológica.	Se crea un flujo ascendente que acarrea los fragmentos de DNA	Se crea un flujo ascendente que acarrea los fragmentos de RNA
Desnaturalización del DNA	Tratamiento alcalino a la membrana	Tratamiento alcalino a la membrana	Tratamiento alcalino al gel	Tratamiento con formaldehído al gel
Fijación del DNA	80°C/1h o UV 2 min.	80°C/1h o UV 2 min.	80°C/1h o UV 2 min.	80°C/1h o UV 2 min.
Aplicaciones	Diagnóstico clínico, presencia de genes de virulencia	Diagnóstico clínico, presencia de genes de virulencia	Análisis fino de los organismos a nivel genético	Análisis fino de los organismos a nivel transcripcional

*El DNA se trata con endonucleasas para obtener estos fragmentos.

EGA: electroforesis en gels de agarosa

EGAD: electroforesis en gels de agarosa desnaturalizantes

Modificado de Giono y col⁵.

2.6.4.2. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA³⁷.

En general los componentes que se requieren para un PCR son: DNA, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de reacción y DNA polimerasa con $MgCl_2$ como cofactor³⁷.

La reacción consta de tres pasos, los cuales están determinados por temperaturas y tiempos específicos para cada microorganismo³⁷ (figura 3):

- Desnaturalización (92-98°C, 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del DNA blanco.
- Alineamiento (50-60°C, 30-60 segundos), en el que se realiza la unión específica entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado.
- Extensión (70-74°C, 30-90 segundos), en el que la DNA polimerasa aumenta la longitud de la cadena, a partir de los iniciadores unidos al DNA blanco. Al ir polimerizando los desoxinucleótidos (dNTP's) libres, resultan nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

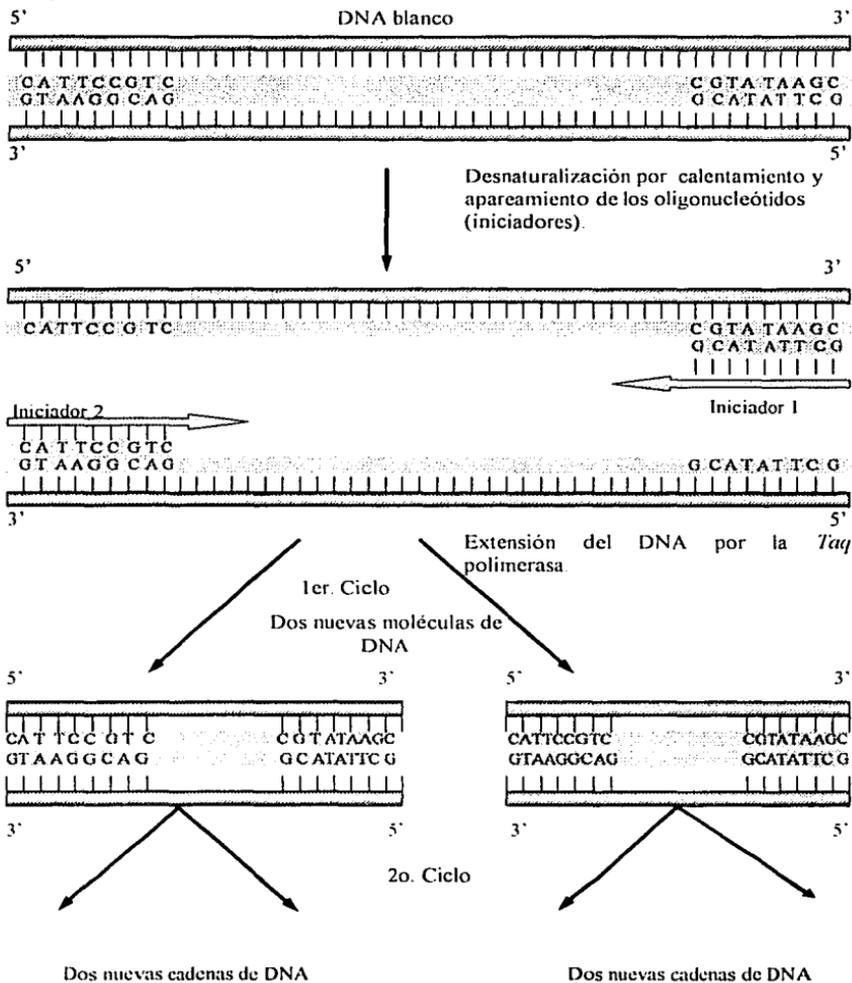


Figura 3. Amplificación del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La estandarización de la PCR tiene como fin establecer las condiciones óptimas para la reacción. Al iniciar la estandarización, es necesario variar los parámetros que se describen a continuación:

Iniciadores: La secuencia de los iniciadores (oligonucleótidos) es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado y para su diseño es indispensable conocer la secuencia específica del DNA blanco, por lo que su elección y diseño debe ser muy cuidadoso.

Los iniciadores deben tener un tamaño que oscile entre 20 y 30 nucleótidos, un contenido de G y C de aproximadamente 50%, una temperatura media de fusión de 55°C, que no sean complementarios entre sí o consigo mismo (para evitar la formación de estructuras secundarias y de dímeros de iniciadores) y que el tamaño del fragmento flanqueado por los iniciadores no exceda la capacidad de la polimerasa para la extensión, idealmente no mayor de 3000 pb^{37,38}.

Idealmente, en cada 100 µl de reacción, la concentración aceptable de iniciadores oscila entre 0.05 y 1.0 µM^{37,38}.

Enzima DNA polimerasa: La DNA polimerasa más utilizada es obtenida de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive en fuentes termales. Esta enzima (llamada *Taq polimerasa*) tiene actividad de DNA polimerasa y exonucleasa de 5' a 3'. Su índice de error de incorporación es de 1 en 4×10^4 bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3000 pb^{37,38,39}.

La mayoría de los protocolos recomiendan el uso de 1 a 2.5 U de la enzima por cada reacción de 100 µl^{37,38}.

Magnesio y dNTP's: La concentración de iones magnesio es determinante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, resultando una gran cantidad de productos indeseables, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos. El ion Mg^{2+} es utilizado como cofactor para la actividad enzimática de la mayoría de las DNA polimerasas^{37, 38, 40}.

Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final de $MgCl_2$ entre 0.5 y 2.5 mM^{37, 38}.

Las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe optimizarse. Concentraciones entre 20 y 200 μM proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's en concentraciones equimolares^{37, 38}.

Número de ciclos: En condiciones óptimas el nivel de amplificación del DNA en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Se registra primero una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se le denomina fase de "meseta", debida al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos DNA blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno^{37, 38}.

Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de reacción o la cantidad de enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice obteniendo los niveles máximos de amplificación. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad inicial^{37, 38}.

Temperatura de alineamiento: Los oligonucleótidos se unen por complementariedad al DNA blanco a la temperatura de alineamiento. El alto grado de complementariedad al DNA entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y el DNA blanco permite utilizar altas temperaturas de alineamiento, lo que favorece la especificidad de la reacción^{37, 38, 41, 42}.

Cuando la temperatura de alineamiento es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del DNA blanco y pueden también ser extendidos. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65°C se reducen considerablemente los sucesos de unión inespecífica^{37, 38, 41, 42}.

Para calcular la temperatura óptima de alineamiento para un par de oligonucleótidos dado, puede utilizarse una fórmula empírica, adicionando 2°C por cada A y T presentes en el oligonucleótido, y 4°C por cada G y C; restando 5°C al resultado^{37, 38}.

Ejemplo:

Oligonucleótido A: ATTGGCCTAACGTACGTGGC = $9 (A+T) \times 2 = 18^\circ\text{C}$

$$11 (G+C) \times 4 = 44^\circ\text{C}$$

$$62^\circ\text{C} - 5^\circ = 57^\circ\text{C}$$

Oligonucleótido B: ATATCCCGATCCGTAGCCTT = $10 (A+T) \times 2 = 20^\circ\text{C}$

$$10 (G+C) \times 4 = 40^\circ\text{C}$$

$$60^\circ\text{C} - 5^\circ = 55^\circ\text{C}$$

Temperatura de alineamiento: $(57^\circ\text{C} + 55^\circ\text{C}) = 56^\circ\text{C}$

2

DNA blanco: La PCR es tan sensible que la amplificación puede hacerse a partir de una sola molécula de DNA. La concentración de DNA blanco en la reacción depende de la fuente utilizada e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de DNA blanco^{37, 38}.

39

2.6.4.3. Electroforesis

Los productos de PCR deben ser un fragmento o fragmentos de un segmento definido de DNA. El paso más simple para evidenciar éste fragmento, es comprobar el peso de la fracción del producto de reacción con un apropiado marcador de peso molecular y colocando una pequeña fracción del producto en un gel de agarosa entre 0.8-4%, conteniendo bromuro de etidio⁴⁰.

El gel de agarosa se corre por electroforesis y el producto puede ser visible bajo un transiluminador de ultravioleta, para verificar el éxito de la amplificación⁴⁰.

La electroforesis es una técnica que se basa en el hecho de que las moléculas se mueven en un campo eléctrico a una velocidad determinada por la relación entre su carga y su masa. Los ácidos nucleicos en solución poseen, en general, una carga negativa debido a que los grupos fosfato están ionizados; por lo tanto, migran hacia el electrodo positivo¹².

El gel que se utiliza en la electroforesis, cuando se solidifica, forma una red de poros interconectados o canales, cuyo tamaño depende de la concentración de la agarosa; el tamaño de los poros en dicho gel limita la velocidad a la que se mueven las moléculas a través de ellos. Los ácidos nucleicos con igual razón carga-masa, se separan en función de su longitud, dado que las moléculas más largas se mueven más lentamente; es decir se mueven a través de un gel a una velocidad inversamente proporcional a la longitud de la cadena¹².

2.7. Secuenciación de DNA

Dada su cualidad como depositario de la información, la propiedad más importante del DNA es su secuencia de nucleótidos.

Fred Sanger desarrolló el método enzimático de terminación de la cadena con el didesoxi-análogo y Walter Gilbert junto con Allan Maxam desarrollaron el método

químico. Estas técnicas se desarrollaron gracias a una mejor comprensión de la química de los nucleótidos y del metabolismo del DNA⁴³.

Tanto el método de Sanger como el de Maxam y Gilbert, el principio general consiste en la reducción del DNA que se quiere secuenciar a cuatro conjuntos de fragmentos marcados. La reacción que da lugar a cada uno de los juegos de fragmentos es específica para cada base, de manera que las longitudes de los fragmentos corresponden a posiciones de la secuencia de DNA en la que se halla presente una determinada base⁴³.

2.7.1. El método químico (Maxam)

Para la secuenciación, en este método se requiere el DNA marcado con ³²P en un sólo extremo y existen reacciones para las cuatro bases (en tubos separados) para modificar selectivamente purinas (con dimetilsulfato) y pirimidinas (con hidracina). Luego de la modificación de las bases, el DNA es sensible a la ruptura selectiva usando piperidina. En condiciones normales de pH neutro se corta en las bases adenina (A) y guanina (G). A pH ácido se logra el corte solo en la base adenina (A). Para corte selectivo en citosina, la reacción con hidracida se hace en NaCl 2M. Los fragmentos marcados en un extremo se resuelven por tamaño en un gel de poliacrilamida-urea 8M. La lectura se hace desde el fragmento más corto (abajo) hacia el más grande (arriba) en el gel, moviéndose entre los carriles de las cuatro reacciones y siguiendo consecutivamente el fragmento que incrementa una base cada vez^{43,44}.

2.7.2. El método del didesoxinucleótido (Sanger)

Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA de la DNA polimerasa. La DNA polimerasa necesita, para expresar su actividad, un iniciador al que se adicionan los nucleótidos y una hebra molde que dirige la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos que han de incorporarse a la secuencia. El grupo hidroxilo en 3' del iniciador reacciona con el desoxinucleótido entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster^{43,44}.

El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) para interrumpir la síntesis del DNA. Cuando el dNTP es reemplazado por el ddNTP se detiene la elongación de la cadena a causa de la ausencia del grupo hidroxilo en 3' necesario para la siguiente reacción. Para la reacción se requiere un iniciador de la síntesis de la cadena complementaria (marcado con ^{32}P en el extremo 5') y la mezcla de los 4 dNTPs más el análogo (ddNTP) correspondiente para cada una de las reacciones en tubos separados. Con esto se produce extremos de la cadena y se generan fragmentos de distintos tamaños que se separan en geles de poliacrilamida^{43,44}.

La secuenciación del DNA se realiza actualmente de modo automático, en base a una variación del método de Sanger en la que el iniciador utilizado en cada reacción está marcado con un tinte fluorescente. La secuenciación del DNA se lee determinando la secuencia de los colores de las bandas según van siendo visualizadas por el lector y la información obtenida se envía directamente a un ordenador⁴⁴.

La secuenciación automatizada fue empleada por Olsvik⁴⁵ para determinar la secuencia de una región de 300 pb del gen que codifica la subunidad B (*ctx B*), a partir de diversas cepas aisladas de todo el mundo entre un periodo de 60 años, identificó tres genotipos basándose en la sustitución de una base en las posiciones 115, 138 y 203. El genotipo I se encontró en cepas del biotipo Clásico y cepas del biotipo El Tor de las costas del Golfo en USA. El genotipo II fue encontrado en cepas del biotipo El Tor originarias de Australia y el genotipo III se localizó en cepas aisladas de la séptima pandemia y la última epidemia de Latinoamérica⁴⁵ (tabla 6).

Tabla 6. Diferencias de secuencia en el gen de la subunidad B (*ctxB*) de la toxina colérica.

Cepas	Posición de la base ^a			Posición del aminoácido ^b			Genotipo
	115	138	203	18	25	47	
Biotipo Clásico							
Biotipo El Tor, de las costas del Golfo en USA.	C	T	C	His	Phe	Thr	I
Biotipo El Tor, de Australia	C	G	C	His	Leu	Thr	II
Biotipo El Tor, de la séptima pandemia							
Biotipo El Tor, de la última epidemia de Latinoamérica	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III

^a Se refiere a la posición de la base en la secuencia de *ctxB* tomando en cuenta el codón de iniciación que concuerda con la secuencia de *ctxA*.

^b Se refiere a la posición del aminoácido en la secuencia de la subunidad B.

Tomado de Olsvick y col⁴⁵.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios anteriores realizados en otros países, se han identificado tres genotipos de *ctxB* a partir de su secuenciación; el genotipo I que incluye a las cepas del biotipo Clásico y El Tor de las costas del Golfo de Estados Unidos, el genotipo II que abarca a las cepas El Tor de Australia y por último el genotipo III que comprende a las cepas El Tor de la séptima pandemia y las de la reciente epidemia de Latinoamérica.

Actualmente, no se tienen conocimientos acerca de la diversidad de genotipos de *ctxB* que están circulando en México.

El presente estudio tuvo como finalidad estandarizar la técnica de PCR para detectar la presencia de *ctxB* en cepas de *V. cholerae* O1 aisladas en la República Mexicana entre los años de 1991 a 1994, ya que en este período se ha detectado un mayor número de casos de forma proporcional.

Empleando como marcador epidemiológico a *ctxB*, en estas cepas de campo, se desea saber a que genotipo corresponden y si existe alguna diferencia entre las cepas que circulan en México, con el propósito de aportar y ampliar más los conocimientos acerca de la epidemiología del cólera en México.

Se debe tomar en cuenta que la estandarización de la técnica para la identificación de la subunidad B que se propone para la diferenciación genotípica a partir de *ctxB* es la única, ya que no existe otro tipo de técnica en donde se obtenga por medio de la PCR el gen *ctxB* de forma individual.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

GENERAL

- Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del gen *ctxB* de la toxina colérica, con el fin de encontrar las diferencias genotípicas, a partir de las cepas de campo de *V. cholerae* O1, aisladas en la República Mexicana comprendida entre los años de 1991 a 1994, que fueron los primeros años de la epidemia en México y en los que se registró el mayor número de casos.

PARTICULARES

- Estandarizar las condiciones adecuadas para la técnica de PCR utilizando cepas de referencia *V. cholerae* O1 toxigénicas que presentan el gen *ctxB*.
- Demostrar la presencia de *ctxB* en las muestras probadas.
- Identificar las diferencias genotípicas de acuerdo al fragmento *ctxB* en las cepas de campo de *V. cholerae* O1.

HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

- La estandarización de la técnica de PCR y la aplicación de la secuenciación del fragmento del gen *ctxB*, correspondientes a la subunidad B de la toxina colérica, permitirá encontrar diferencias entre las cepas de *V. cholerae* O1 que circulan en México.

MATERIAL

6. MATERIAL

En el presente estudio se analizaron cepas de *V. cholerae* O1 aisladas en la República Mexicana entre los años de 1991 a 1994.

Para la realización de un mejor trabajo dentro de las cepas estudiadas, se tomó en cuenta lo siguiente:

1. Criterios de inclusión

- Las cepas estudiadas sólo fueron *V. cholerae* del serogrupo O1.
- Estas cepas *V. cholerae* O1 fueron aisladas exclusivamente de muestras humanas.
- Las cepas que se incluyeron en el trabajo fueron las que presentaron información de su origen geográfico, ya que era fundamental que provinieran únicamente de la República Mexicana.

2. Criterios de exclusión

- Cepas sin información de su origen geográfico.
- Se excluyeron para el estudio, cepas de *V. cholerae* del serogrupo O1 y No O1 que fueran de origen ambiental.

6.1. Material biológico

- Cepa de referencia número 6706 aislada en Perú.
- Cepa de referencia número 2514-88 aislada en EUA en la zona del Golfo.
- Cepas de referencia *V. cholerae* O1 toxigénica número 299 (testigo positivo).
- Cepa *V. cholerae* No O1 número 52093 (testigo negativo).
- Cepas de campo *V. cholerae* O1 aisladas de casos de cólera.

6.2. Material y equipo

- Asas bacteriológicas.
- Cajas Petri desechables.
- Mecheros Fisher.
- Guantes.
- Micropipetas semiautomáticas GILSON de 2, 10, 20, 200 μ l.
- Puntas estériles para micropipetas semiautomáticas.
- Microtubos EPPENDORF de 200, 500, 1500 μ l.
- Gradilla metálica.
- Incubadora THELCO modelo 6.
- Termociclador GENE AMP 2400 de PERKIN ELMER.
- Congelador AMERICAN de -20°C .
- Microcentrifuga CHERMLE Z 230 MA.
- Transiluminador de luz UV.
- Fuente de poder BIO-RAD modelo 200/2.0 POWER SUPPLY.
- Campana de flujo laminar.
- Placa de calentamiento con agitación.
- Horno de microondas.
- STRATAGENE EAGLE EYE II.
- Secuenciador semiautomático SEQ 4X4 de AMERSHAMP PHARMACIA BIOTECH.

6.3. Medios de cultivo y reactivos

- Agar BAB (agar base sangre) en tubo y placa BIOXON.
- Agar sangre BIOXON.
- Agar TCBS (agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa) BIOXON.
- Caldo arginina en tubo BIOXON.
- Agar MIO (medio indol ornitina) en tubo BIOXON.
- Agar TSI (agar hierro y triple azúcar) en tubo BIOXON.
- Agar LIA (agar de hierro lisina) en tubo BIOXON.
- Caldo peptonado DIBICO.
- Reactivo de Kovacs ELSA.
- Vaselina líquida estéril.
- Antisuero polivalente O (somático) y antisueros específicos Ogawa e Inaba.
- Gel de agarosa al 2% SIGMA.
- Regulador de corrimiento.
- Regulador TAE (tris acetato EDTA) 1X.
- Bromuro de etidio BOEHRINGER.
- Marcador de peso molecular Φ 174 cortado con *Hae* III IX -BOEHRINGER.
- *Taq* DNA polimerasa (5U/ μ l) marca GIBCO BRL.
- Regulador de PCR 10X marca GIBCO BRL.
- Mezcla de dNTP's BOEHRINGER.
- Cloruro de magnesio 50mM marca GIBCO BRL.
- Iniciadores ctx 7 y ctx 9 marca BIO-SYNTHESIS.
- Agua destilada y estéril.

MÉTODOS

7. MÉTODO

7.1. PRUEBAS DE PUREZAS Y VIABILIDAD

La metodología se llevó a cabo de la siguiente forma:

Procesamiento inicial

Para recuperar algunas cepas de campo, se tomó una porción de cultivo y se inoculó en un tubo de ensayo con 10 ml de agua peptonada alcalina pH 9 con el fin de obtener una muestra enriquecida que facilitara el aislamiento de *V. cholerae*. Se incubó a 37 °C durante 6 a 8 horas.

Aislamiento y pruebas bioquímicas

A partir de la muestra enriquecida, se tomó con cuidado tres asadas de la superficie de agua peptonada, tratando de no agitar el tubo, ya que en la superficie se encuentran vibrios en mayor cantidad y se sembraron las tres asadas en placas de TCBS incubándose de 18 a 24 horas a 37°C.

Se observaron las colonias aisladas en las placas de TCBS, diferenciando las colonias típicas de *V. cholerae* (fermentadores de glucosa) de otros vibrios. Además, se tomó en cuenta que algunos vibrios también fermentan la glucosa; por lo que se seleccionaron de la placa de TCBS al menos tres colonias amarillas (fermentadoras de glucosa) sospechosas.

En el caso de las cepas que no necesitaron recuperación, éstas solamente se sembraron en placas de BAB. Las colonias de TCBS y BAB se sembraron en las siguientes pruebas bioquímicas:

- Caldo arginina: se tomó una pequeña porción de la colonia y se depositó el inóculo en el medio. Se selló el medio con vaselina líquida o aceite mineral estéril.

- Caldo peptonado: se inoculó con cuidado hasta el fondo
- Medio MIO: se sembró por picadura hasta el fondo.
- Medio TSI: se sembró en picadura hasta el fondo y por estria en la superficie.
- Medio LIA: se sembró en estria con doble picadura hasta el fondo.
- Medio BAB: se sembró por estria y picadura.

Todos estos medios se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

A partir del crecimiento en el medio de BAB o el medio LIA, se realizó la prueba de oxidasa colocando un pequeño inóculo, con un palillo de madera estéril, en una tira de papel filtro impregnado con 2 a 3 gotas del reactivo para oxidasa. La aparición de un color púrpura oscuro sobre el papel se interpretó como una prueba positiva.

En el caldo peptonado, posterior a su incubación, se reveló la producción de indol, agregando aproximadamente 5 gotas del reactivo de Kovacs o Erlich al medio. La aparición de un color rojo en el medio se interpretó como productor de indol.

Se interpretaron los resultados de todas las pruebas bioquímicas y se anotaron los resultados.

Pruebas serológicas

A cada una de las cepas, que de acuerdo a las pruebas bioquímicas, correspondían a *V. cholerae* se les realizó la identificación del serogrupo al que pertenecían con un antisuero polivalente O1. Esto se efectuó haciendo, en un portaobjetos, una suspensión homogénea obtenida a partir de solución salina fisiológica y un cultivo de la cepa desarrollada en el medio BAB.

A esta suspensión se le agregó una gota de antisero polivalente O1, mezclando bien con un aplicador de madera y se observó la presencia de aglutinación. Las cepas que presentaron aglutinación se interpretaron como serogrupo O1.

A las muestras que resultaron positivas al serogrupo O1, se les efectuó una prueba de aglutinación con antiseros específicos Ogawa e Inaba.

En un portaobjetos se prepararon dos suspensiones homogéneas, por separado, con solución salina fisiológica y una porción de crecimiento de la cepa a investigar; a una de las suspensiones se le agregó el antisero Ogawa y a la segunda suspensión su correspondiente antisero Inaba, se mezcló cada una con un aplicador de madera y se observó la presencia de aglutinación.

7.2. Estandarización de la técnica de PCR

Para la estandarización de la técnica de PCR se necesitaron tres áreas de trabajo separadas entre sí, con el fin de evitar contaminación cruzada debido a la alta sensibilidad de la PCR, estas áreas fueron:

- Área de aislamiento y caracterización de las cepas.
- Área de PCR.
- Área de electroforesis.

Además de contar con áreas especiales y restringidas, se previno la presencia de aerosoles, para el montaje de la PCR, trabajando en campanas de flujo laminar. Fue necesario trabajar con guantes, equipo, material y bata que estuvieran aislados y restringidos para el área de PCR.

En el estudio de la estandarización de la técnica de PCR para la identificación de la subunidad B de la toxina colérica, se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Concentración de dNTP's.
- Concentración de iniciadores.
- Concentración de la enzima *taq* polimerasa.
- Concentración de MgCl₂.
- Tiempo y temperatura.

Para realizar la mezcla de reacción de la PCR, fue necesario preparar los iniciadores y dNTP's, como se indica a continuación:

7.2.1. Preparación de los iniciadores

Iniciadores CTX 7 (GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC)⁴⁵

Iniciadores CTX 9 (GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT G)⁴⁵

La concentración original de cada uno: 15 unidades de densidad óptica (U.D.O.)

Para hidratar cada iniciador se adicionaron 5 µl de agua destilada por cada UDO de manera que el volumen final fue de 75 µl. Considerando que 1 UDO equivale a 5 nanomoles, se obtuvo una concentración final de 1 nmol/µl. En la estandarización de la técnica se partió de una concentración inicial de 0.25 nmol/µl.

7.2.2. Preparación de la mezcla de dNTP'S (dCTP, dGTP, dTTP, dATP)

Concentración original: 10 µM

Para la estandarización de la técnica PCR para la subunidad B de la toxina colérica, se utilizó una solución de trabajo a una concentración de 1µM de cada uno de los dNTP's.

7.2.3. Preparación de la muestra (DNA molde)

Cepas de referencia utilizadas

- Cepa de referencia *V. cholerae* O1 toxigénica número 299 (testigo positivo)
- Cepa *V. cholerae* No O1 número 52093 (testigo negativo)

Se sembraron las cepas de referencia por estria cruzada, en placas de agar base sangre (BAB) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas⁴⁶.

De la placa de BAB se seleccionaron 5 colonias aisladas con una asa bacteriológica desechable estéril y se resuspendieron en 200 µl de agua destilada estéril para obtener una concentración de 1×10^5 a 10^6 bacterias por ml, dentro de un microtubo estéril de 0.5 ml previamente etiquetado. Los microtubos se cerraron y sellaron con papel parafilm y por último se colocaron en baño maría. Se dejaron hervir durante 20 minutos⁴⁶ con el fin de obtener el DNA de forma directa.

Después de que la muestra terminó de hervir se colocó rápidamente en hielo.

Para la estandarización de la técnica de PCR se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

7.2.4. Prueba para determinar la concentración óptima de los iniciadores

La mezcla de reacción de PCR se preparó por separado para cada muestra y se colocó en microtubos de 0.2 ml previamente rotulados. En este ensayo se tomaron en cuenta las diferentes concentraciones de los iniciadores ctx 7 (GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC) y ctx 9 (GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT G)^{45,23} como se muestra en la tabla 7:

Tabla 7. Condiciones para determinar la concentración óptima de los iniciadores

REACTIVOS	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
Agua estéril	25.5 μ l	26.5 μ l	27 μ l
Regulador 10X	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Solución de MgCl ₂ 25 mM	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Mezcla de dNTP's 1 μ M	4 μ l	4 μ l	4 μ l
Iniciador ctx 7 0.25 nM/ μ l	1 μ l (0.25 nM)	0.5 μ l (0.125 nM)	0.25 μ l (0.0625 nM)
Iniciador ctx 9 0.25 nM/ μ l	1 μ l (0.25 nM)	0.5 μ l (0.125 nM)	0.25 μ l (0.0625 nM)
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
Vaselina líquida estéril	10 μ l	10 μ l	10 μ l
DNA molde	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Volumen total de reacción	50 μl	50 μl	50 μl

Las muestras ya preparadas se colocaron en un termociclador con el siguiente programa^{45,47}, con el que se obtuvo una banda intensa y específica:

- 1 ciclo de preincubación de 3 minutos a 94 °C.
- 25 ciclos de amplificación cada uno a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto.
- 1 ciclo de incubación final a 72 °C por 7 minutos.

El producto de amplificación de 460 pb⁴⁵ se puso de manifiesto por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio a 100 voltios por 1 hora y se observó en un transiluminador de UV (luz ultravioleta). Este procedimiento se realizó en toda la estandarización así como en el análisis de las cepas de campo.

7.2.5. Ensayo para establecer la concentración óptima de cloruro de magnesio

En este ensayo, la mezcla de reacción se realizó en microtubos de 0.2 ml previamente etiquetados y se probaron varias concentraciones de solución de cloruro de magnesio partiendo de una concentración 25 mM. Las cantidades y reactivos que se utilizaron en esta prueba se muestran en la tabla 8:

Tabla 8. Condiciones para determinar la concentración óptima de solución de MgCl₂

REACTIVOS	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5
Agua estéril	23.5 μ l	25.5 μ l	27.5 μ l	29.5 μ l	31.5 μ l
Regulador 10X	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Solución de MgCl ₂ , 25 mM	10 μ l (5 mM)	8 μ l (4 mM)	6 μ l (3 mM)	4 μ l (2 mM)	2 μ l (1 mM)
Mezcla de dNTP's 1 mM	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l
Iniciador ctx 7 0.03125 nmol/ μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Iniciador ctx 9 0.03125 nmol/ μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
Vaselina líquida estéril	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
DNA molde	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Volumen total de reacción	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

Ya preparadas las muestras se colocaron en el termociclador y se programó bajo las siguientes condiciones en donde se varió también el tiempo de cada ciclo:

- 1 ciclo de preincubación a 94 °C por 1 minuto 30 segundos.
- 25 ciclos de amplificación de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos.
- 1 ciclo de 72 °C por 3 minutos 30 segundos.

7.2.6. Prueba para determinar la concentración óptima de la mezcla de dNTP's

Para realizar este ensayo fue fundamental variar la concentración de la mezcla de dNTP's (dATP, dCATP, dGTP, dTTP) partiendo de una concentración 1 μ M y la mezcla de reacción se preparó mediante el procedimiento que se indica en la tabla 9.

Ya preparada la mezcla de reacción, las muestras se colocaron en el termociclador y se programó bajo las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de preincubación a 94 °C durante 1 minuto y 30 segundos.
- 25 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos.
- 1 ciclo de incubación final a 72 °C por 3 minutos y 30 segundos.

Tabla 9. Condiciones para verificar la concentración óptima de la mezcla de dNTP's

REACTIVOS	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4
Agua estéril	25.5 μ l	26.5 μ l	27.5 μ l	28.5 μ l
Regulador 10X	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Solución de MgCl ₂ 25mM	8 μ l	8 μ l	8 μ l	8 μ l
Mezcla de dNTP's 1 μ M	4 μ l (0.08 μ M)	3 μ l (0.06 μ M)	2 μ l (0.04 μ M)	1 μ l (0.02 μ M)
Iniciador ctx 7 0.03125 nmol/ μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Iniciador ctx 9 0.03125 nmol/ μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
Vaselina líquida estéril	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
DNA molde	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Volumen total de reacción	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

7.2.7. Ensayo para determinar la concentración óptima de la enzima *taq* polimerasa

En esta prueba se varió la concentración de la enzima *taq* polimerasa, realizando diluciones de la enzima, partiendo de una concentración original de 5 U/ μ l. La mezcla de reacción se realizó como se muestra en la tabla 10:

Realizada la mezcla de reacción, las muestras se colocaron en un termociclador programado bajo las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de preincubación a 94 °C por 1 minuto 30 segundos.
- 25 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos.
- 1 ciclo de incubación final a 72 °C por 3 minutos y 30 segundos.

Tabla 10. Condiciones para obtener la concentración óptima de la enzima Taq polimerasa

REACTIVOS	TUBO 1	TUBO 2
Agua estéril	25.5 μ l	26.75 μ l
Regulador 10X	5 μ l	5 μ l
Solución de MgCl ₂ 25 mM	8 μ l	8 μ l
Mezcla de dNTP's 1 μ M	1 μ l	1 μ l
Iniciador ctx 7 0.03125 nmol/ μ l	2 μ l	2 μ l
Iniciador ctx 9 0.03125 nmol/ μ l	2 μ l	2 μ l
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.5 μ l (2.5 U)	0.25 μ l (1.25 U)
Vaselina líquida estéril	10 μ l	10 μ l
DNA molde	3 μ l	3 μ l
Volumen total de reacción	50 μl	50 μl

7.3. Electroforesis

Como se mencionó anteriormente en el texto, con el fin de manifestar el producto de PCR se realizó la electroforesis, ésta se elaboró bajo las siguientes condiciones:

Se preparó un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio (10 mg/ml). En una cámara de corrimiento se colocó regulador TAE 1X y se sumergió el gel en la cámara procurando que el regulador lo cubriera por completo.

Aparte, en un papel parafilm se colocó una gota de 2 μ l de regulador de corrimiento y se homogenizó con 5 μ l del DNA de la muestra, ya homogenizada cada una de las muestras se colocó en un pozo del gel. En el primer pozo del gel se depositaron 5 μ l de marcador de peso molecular (PM) Φ X174/*Hae* III⁴⁸.

Después de que se colocaron las muestras en su correspondiente pozo, se corrió la electroforesis a 100 V de potencia por 1 hora. Posteriormente el gel se expuso en un transiluminador de luz UV para observar la banda de amplificación.

7.4. Secuenciación

Para realizar la secuenciación fue necesario calcular la concentración de DNA de los productos de reacción de PCR que presentaron el gen *ctxB*.

Con el fin de obtener la concentración de DNA amplificado, fue necesario colocar 8 μ l de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 2%, en uno de los pozos se colocaron 4 μ l del marcador de peso molecular Φ X174/*Hae* III a una concentración de 0.025 μ g/ml y se realizó la electroforesis.

Los productos de reacción se colocaron en una lámpara de UV y con el sistema de densitometría del Stratagene Eagle Eye II, se obtuvo la densidad de cada producto de reacción y se calculó la concentración de cada muestra.

7.4.1. Purificación de productos de PCR

Para la purificación se utilizó el kit High Pure™ de Boehringer Mannheim y se adicionaron 500 µl de buffer de enlace a 100 µl de producto de PCR y se mezcló.

Se ensambló un cartucho con filtro en un tubo colector y se agregó la muestra en el cartucho. Se centrifugó por 30 segundos a una velocidad máxima de 13,000 g.

El líquido eluido se descartó y se volvió a ensamblar el cartucho en el mismo tubo colector.

Posteriormente se adicionaron 500 µl de buffer de lavado al cartucho y se centrifugó. Se descartó el líquido eluido y se ensambló el cartucho en el mismo tubo colector.

Se adicionaron 200 µl de buffer de lavado y se centrifugó. Este lavado, con poco volumen de buffer, aseguró una pureza óptima y la remoción completa de residuos del buffer de lavado del filtro. Se descartó el tubo colector y el cartucho se ensambló en un tubo nuevo de 1.5 ml.

Para obtener el DNA puro, se utilizaron 100 µl de buffer de elución, el cual se agregó al cartucho y se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos.

7.4.2. Reacción de secuenciación

Se marcaron con las letras A, G, C y T, 4 microtubos para PCR de 0.2 µl, por secuencia y se colocaron en hielo.

Se depositaron 2 µl del dideoxinucleótido ddATP en el tubo marcado con A, de igual forma se colocaron 2 µl del ddCTP en el tubo C, 2 µl del ddGTP en el G y 2 µl del ddTTP en el T. Los tubos se taparon para prevenir la evaporación. La mezcla maestra o cóctel se preparó de la siguiente forma:

Buffer de reacción	3.5 µl
Iniciador ctx 9 (1 µM)	2 µl
Muestra (50-250 fmol de DNA)	7 µl
Enzima termosecuenciación (10U/ µl)	2 µl
Agua estéril	12.5 µl

A cada tubo de los marcados (A,C,G,T) se les adicionaron 6 µl de la mezcla maestra y se agregó una gota de aceite mineral. Esta mezcla se colocó en un termociclador por 35 ciclos bajo las siguientes condiciones:

94 °C por 2 minutos
95 °C por 10 segundos
40 °C por 30 segundos
72 °C por 1 minuto

Después de la reacción, se centrifugó el tubo brevemente para coleccionar la condensación y se almacenó en congelación.

Cabe mencionar que todos los reactivos que se utilizaron para la secuenciación, excepto el DNA de la muestra, vienen incluidos en el Kit de secuenciación Amersham Pharmacia Biotech.

7.4.3. Purificación del producto de reacción de la secuenasa

Para la purificación del producto de la anterior reacción, se utilizaron 4 columnas AutoseqTMG-50 de Amersham Pharmacia Biotech por reacción, marcadas con A, C, G y T a las cuales se les dio suficiente vortex. Estas columnas se colocaron dentro de un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron por 1 minuto a 1000 rpm. Las columnas se ensamblaron en otro tubo nuevo.

Las muestras a purificar se colocaron en hielo y se adicionó agua destilada a cada muestra hasta completar 20 μ l, se mezcló y agregó al centro de la superficie de la resina compactada de la columna correspondiente. Se centrifugaron 1 minuto a 1000 rpm.

La muestra purificada que quedó en el tubo de 1.5 ml se secó, centrifugando a vacío y posteriormente a cada tubo de muestra se adicionaron 6 μ l de formamida. Se calentó a 70 °C por 3 minutos e inmediatamente se colocó en hielo.

Se preparó un gel de acrilamida al 6 % (Rapel-XL-6%) de Amersham Pharmacia Biotech y se polimerizó en una lámpara de U.V.

Se cargaron 3 μ l de la muestra en cada carril del gel y se prosiguió a la secuenciación a una temperatura de 50 °C en un secuenciador semiautomático acoplado a una computadora que permite mostrar los datos en una gráfica de picos, para leer o guardar la información en forma de gráfica o texto, con el fin de comparar la secuencia obtenida.

RESULTADOS

8. RESULTADOS

Se estudiaron 421 cepas de *V. cholerae* O1 aisladas a partir de muestras humanas en la República Mexicana durante los años de 1991 a 1994: siendo 105 cepas en 1991, 110 cepas en 1992, 110 en 1993 y 96 en 1994.

De las cuales al sembrar en medio TCBS, las colonias de *V. cholerae* O1 se caracterizaron por ser amarillas, de aproximadamente 2 mm de diámetro y de consistencia mucóide. A las colonias se les efectuaron pruebas bioquímicas observándose los siguientes resultados:

- En el caldo arginina: descarboxilación negativa de la arginina
- En el caldo peptonado: producción de indó
- En el medio MIO: producción de indol, movilidad positiva y descarboxilación positiva de la ornitina
- En el medio TSI: el 57% de las cepas manifestaron la característica de presentar un pH ácido en la superficie y el fondo (A/A) debido a la fermentación de la sacarosa y lactosa en la superficie y fermentación de la glucosa en el fondo; mientras un 43% de las cepas presentaron la característica de un pH alcalino en la superficie y ácido en el fondo (K/A), debido a que no fermentaron la sacarosa y lactosa y sólo fermentaron la glucosa en el fondo
- En el medio LIA: desaminación negativa de la lisina en la superficie y descarboxilación positiva en el fondo (K/K)
- Prueba de oxidasa: Positiva

En la figura 4 se presentan los resultados de la serología que se realizó por año a las 421 cepas de *V. cholerae* O1, obteniéndose en total 223 cepas Inaba (53 %) y 198 cepas Ogawa (47%).

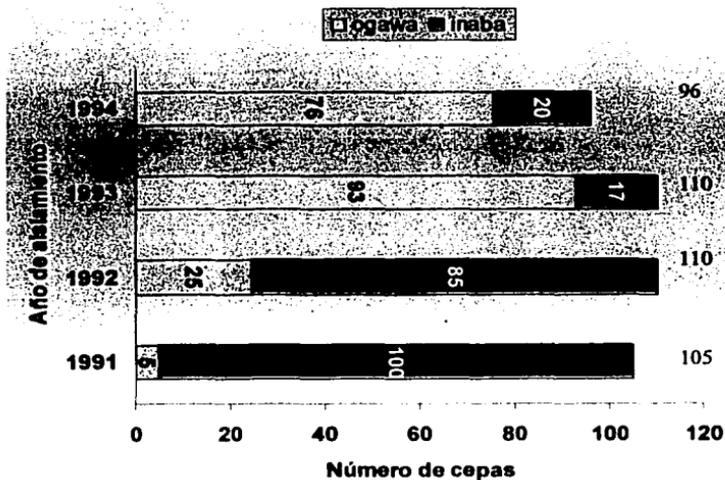


Figura 4. Comportamiento de la serología y año de aislamiento entre las cepas de *Vibrio cholerae* O1

Estandarización de la técnica de PCR para un fragmento del gene *ctxB*

INICIADORES *ctx 7* y *ctx 9*

En lo que respecta a la estandarización de la técnica de PCR, los resultados que se obtuvieron en la determinación de la concentración óptima de los iniciadores *ctx 7* y *ctx 9* se ilustran en la figura 5: en donde los carriles 1 al 3 corresponden a los diferentes volúmenes de iniciadores (1 μl , 0.5 μl y 0.25 μl , respectivamente) derivados de una concentración inicial de 0.25 nM/ μl ; los carriles 4 al 6 corresponden al mismo ensayo debido a que se realizaron por duplicado. Se observó una mayor eficiencia de amplificación en el carril 3 y 6; ya que en estos carriles no se manifestó un exceso de reactivos. La concentración óptima correspondiente, para 50 μl de reacción, fue de 0.25 μl (0.0625 nM) de cada uno de los iniciadores *ctx 7* y *ctx 9*.

Ci = Concentración inicial

Vo = Volumen óptimo

Cf = Concentración final

$$(0.25 \text{ nM}/\mu\text{l}) (0.25 \mu\text{l}) = 0.0625 \text{ nM}$$

Ci Vo Cf

SOLUCIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO

En la prueba de PCR para optimizar la concentración de MgCl_2 , se utilizaron diferentes cantidades decrecientes de una solución de MgCl_2 25 mM: 10 μl , 8 μl , 6 μl , 4 μl y 2 μl .

En la figura 6 se muestra los resultados correspondientes a cada una de las concentraciones de MgCl_2 de forma decreciente entre los carriles 1 al 5. En este caso, la PCR en el carril 1 mostró amplificaciones inespecíficas, mientras que las reacciones en los carriles 3 al 5 presentaron amplificaciones ineficientes. Por lo que se observó que la cantidad óptima para esta reacción es la que se muestra en el carril 2, con 8 μl de una solución 25 mM de MgCl_2 ; obteniéndose una concentración final de 4 mM.

$$(25 \text{ mM}) (8 \mu\text{l}) = 4 \text{ mM}$$

50 μl

$$(Ci)(Vo) = Cf$$

Vr (volumen de reacción)

En este mismo ensayo se logró una amplificación satisfactoria al reducir el tiempo en cada ciclo de reacción, lo cual se observa en la figura 6.

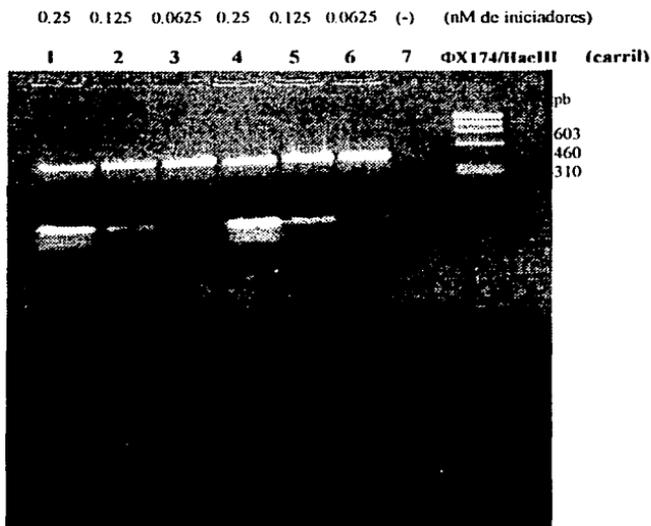


Figura 5. Efecto de la concentración de los iniciadores en la PCR para *ctxB*. Los carriles 1 al 3 muestran diferentes concentraciones de cada uno de los iniciadores. Los carriles del 4 al 6 corresponden al mismo ensayo por duplicado. El carril 7 representa al testigo negativo (*V. cholerae* No O1) y el carril 8 corresponde al marcador de peso molecular Φ X174/Hae III.

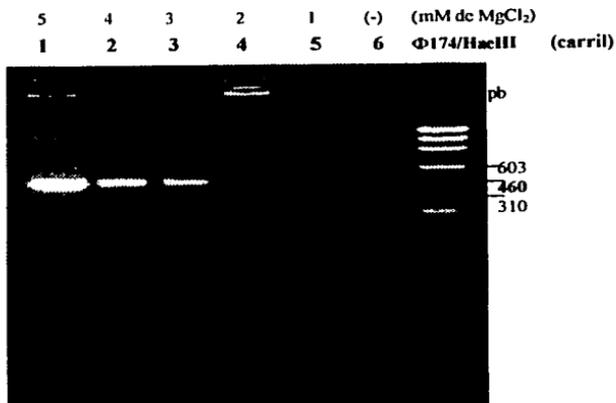


Figura 6. Efecto de la concentración de MgCl₂ en la PCR para *ctxB*. Los carriles del 1 al 5 corresponden a concentraciones decrecientes de MgCl₂. El carril 6 presenta al testigo negativo y el carril 7 muestra al marcador de peso molecular ΦX174/Hae III.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCENTRACIÓN DE LA MEZCLA DE dNTP's

Los resultados para la PCR que se originaron para determinar la concentración óptima de dNTP's se muestran en la figura 7, en donde a partir de una mezcla de dNTP's 1 μM se colocaron diferentes cantidades de esta mezcla: 4 μl , 3 μl , 2 μl , y 1 μl respectivamente.

Como se muestra en la figura 7, la amplificación más eficiente se observó en el carril 5 y corresponde a la concentración más baja (0.02 μM), cabe mencionar que entre los carriles 2, 3 y 4 se detectaron pequeñas amplificaciones inespecíficas.

$$\frac{(1\mu\text{M}) (1\mu\text{l})}{50\mu\text{l}} = 0.02 \mu\text{M}$$

$$\frac{(C_i)(V_o)}{V_r} = C_f$$

CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA Taq POLIMERASA

Se utilizaron las cantidades 0.25 μl y 0.5 μl de la enzima taq polimerasa a partir de una solución concentrada de 5 U/ μl , con el fin de establecer la concentración ideal de la enzima.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 8; en la cual, el carril 4 (0.25 μl) no presentó amplificación, mientras que en el carril 5 (0.5 μl) se observa una amplificación satisfactoria, la cual corresponde a 2.5 U de enzima.

$$\frac{(5\text{U} / 1 \mu\text{l}) (0.5 \mu\text{l})}{V_o} = \frac{2.5 \text{U}}{C_f}$$

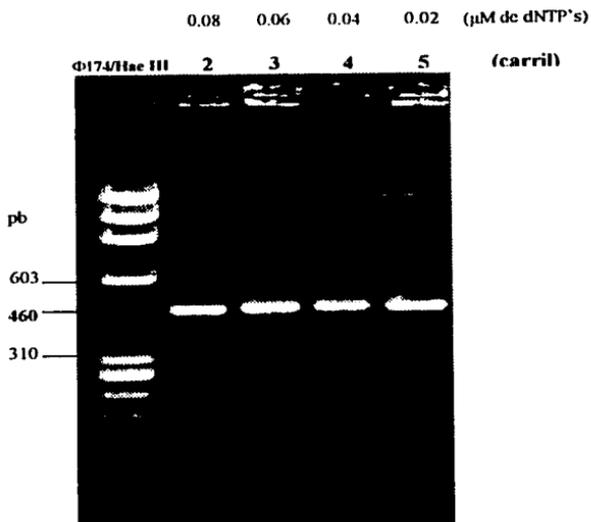


Figura 7. Efecto de la concentración de dNTP's en la PCR de *ctxB*. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular $\Phi 174/Hae III$. Del carril 2 al 5 se muestran los productos de reacción obtenidos con diferentes concentraciones de dNTP's.

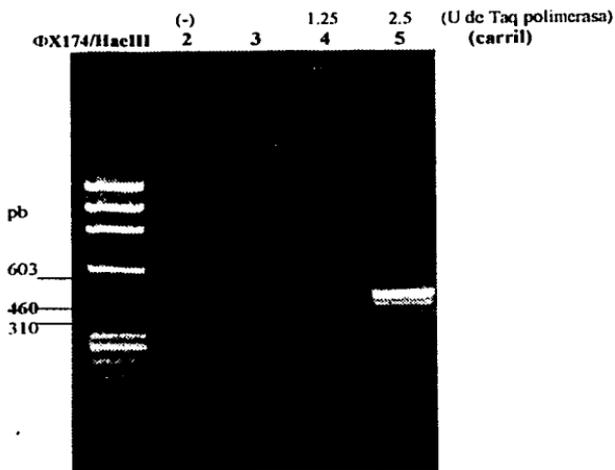


Figura 8. Efecto de la concentración de la enzima Taq polimerasa. En el primer carril se presenta al marcador de peso molecular Φ X174/Hae III. El carril 2 muestra al testigo negativo. El carril 3 esta vacío y del carril 4 al 5 se presentan diferentes concentraciones de la enzima taq polimerasa.

Las cantidades y reactivos que se establecieron finalmente para la estandarización de la técnica de PCR para el gen *ctxB* de *V. cholerae*, se presenta a continuación en la tabla 11.

Las condiciones de reacción que se establecieron en la estandarización para la PCR del gen *ctxB* de *V. cholerae* O1 fueron las siguientes:

- 1 ciclo de preincubación de 94 °C por 1 minuto 30 segundos.
- 25 ciclos de 94 °C (desnaturalización) por 30 segundos, 55 °C (alineamiento) por 30 segundos y 72 °C (extensión) por 30 segundos.
- 1 ciclo de incubación final de 72 °C por 3 minutos 30 segundos.

Al terminar la estandarización para la PCR, estas condiciones se aplicaron para analizar las 421 cepas de campo de *V. cholerae* O1. En la figura 9 se muestra un ejemplo de las amplificaciones obtenidas de las muestras de campo examinadas.

En los años 1991 y 1992 se obtuvo la amplificación del gen *ctxB* en 100 cepas encontradas en cada año respectivamente y cuyo origen se representa en las figuras 10 y 11.

En el año de 1993 se descubrieron 105 cepas que presentaron el gen *ctxB* al realizar la PCR. Los estados en los que se presentó se muestran en la figura 12.

En 1994 se detectaron 93 cepas con *ctxB* y se distribuyó en 19 estados. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 13.

Los estados con mayor número de cepas que presentaron el gen *ctxB* de *V. cholerae* O1 entre los años de 1991 a 1994 fueron: Chiapas (33), Veracruz (31), Puebla (26), Michoacán (25), Hidalgo (25), Estado de México (25) y Distrito Federal (24), abarcando el 47% de los casos en total, como se muestra en la tabla 12.

Tabla 11. Condiciones estandarizadas de la técnica de PCR para el gen *ctxB* de *Vibrio cholerae* O1.

REACTIVOS	VOLUMEN EN μl	CONCENTRACIÓN FINAL EN EL TUBO DE REACCIÓN
Agua estéril	28.5	
Regulador de PCR 10X	5	1X
Solución de MgCl ₂ 25 mM	8	4 mM
Mezcla de dNTP's 1 μ M	1	0.02 μ M
Iniciador <i>ctx 7</i> 0.03125 nmol/ μ l	2	0.0625 nM
Iniciador <i>ctx 9</i> 0.013125 nmol/ μ l	2	0.0625 nM
Enzima taq polimerasa 5 U/ μ l	0.5	2.5 U
Vaselina estéril	10	
DNA molde (10^5 - 10^6 bacterias/ml)	3	
Volumen de reacción	50	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

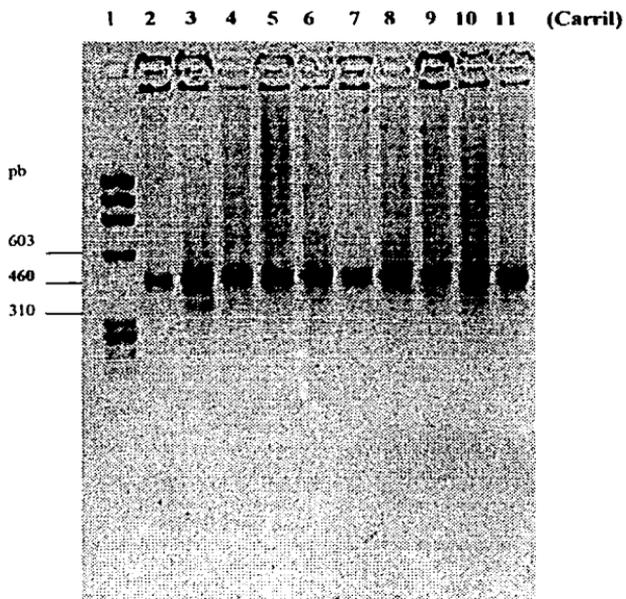


Figura 9. Productos de amplificación del gen *ctxB* en cepas de *Vibrio cholerae* O1, aisladas de casos de cólera, en gel de agarosa al 2%. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Φ X174/*Hae* III. Los carriles del 2 al 11 corresponden a diferentes cepas aisladas de casos de cólera.

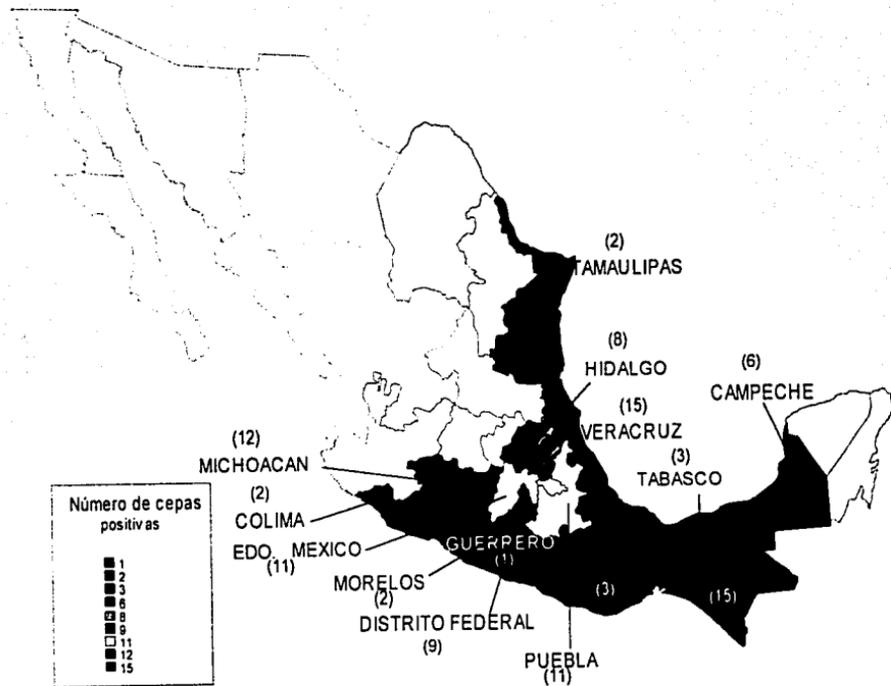


Figura 10. Distribución y número de cepas de campo de *Vibrio cholerae* O1 que presentaron el gen *ctxB* en el año de 1991.

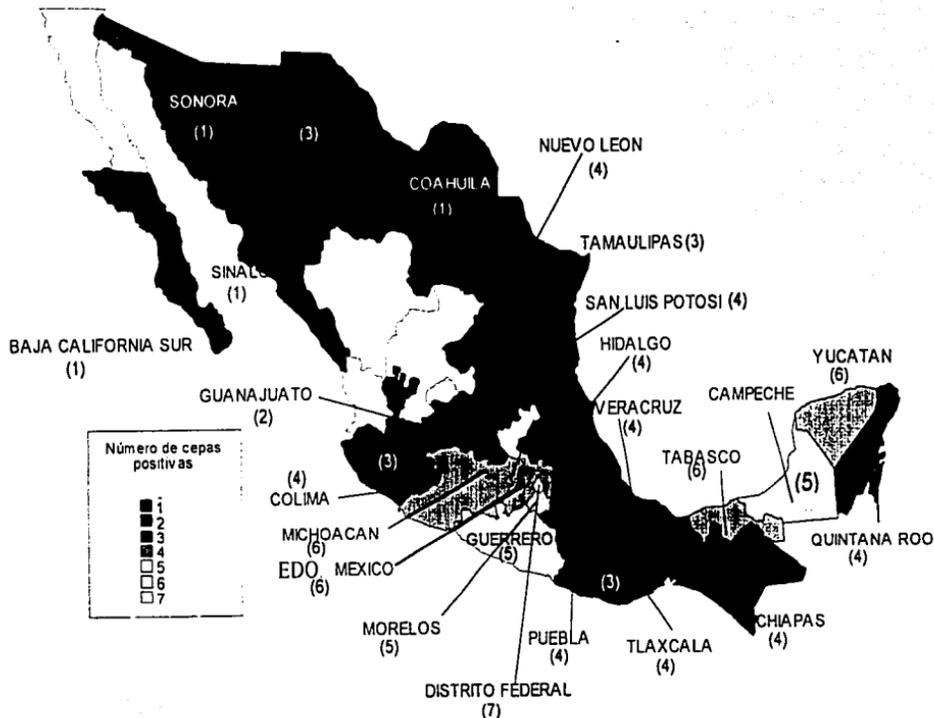


Figura 11. Distribución y número de cepas de campo de *Vibrio cholerae* O1 que presentaron el gen *ctxB* en el año de 1992.

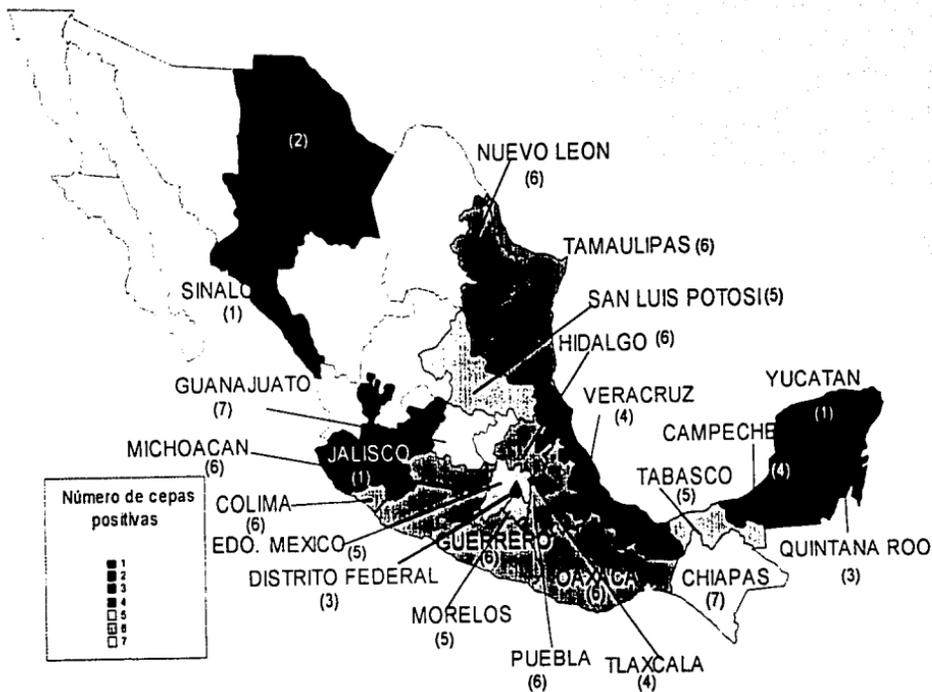


Figura 12. Distribución y número de cepas de campo de *Vibrio cholerae* O1 que presentaron el gen *ctxB* en el año de 1993.

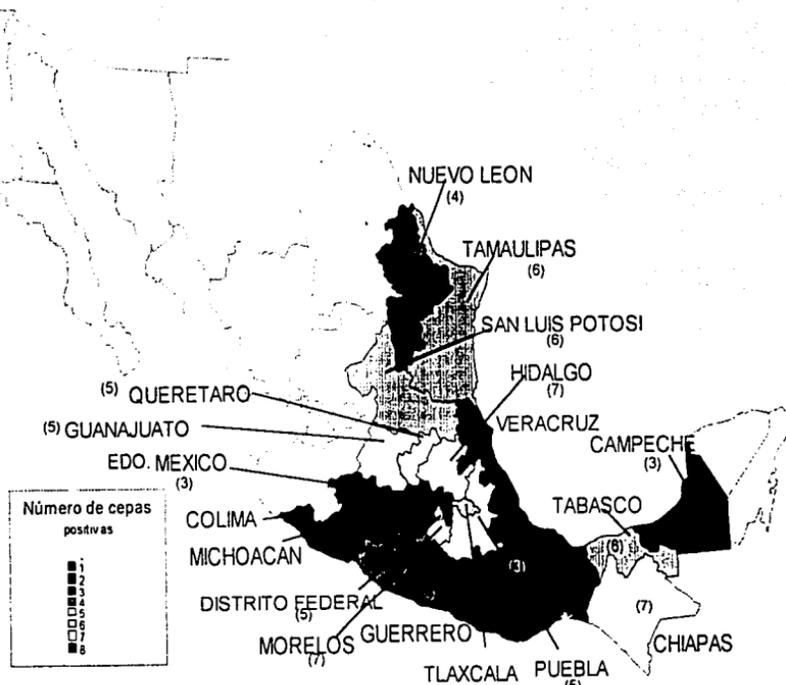


Figura 13. Distribución y número de cepas de campo de *Vibrio cholerae* O1 que presentaron el gen *ctxB* en el año de 1994.

Tabla 12. Número de cepas de *Vibrio cholerae* O1 por entidad federativa aisladas entre 1991-1994 que presentaron el gen *ctxB*.

Estados	Año 1991	Año 1992	Año 1993	Año 1994	Total
Baja California Sur	0	1	0	0	1
Baja California Norte	0	0	0	0	0
Campeche	6	5	4	3	18
Coahuila	0	1	0	0	1
Colima	2	4	6	2	14
Chiapas	15	4	7	7	33
Chihuahua	0	3	2	0	5
Distrito Federal	9	7	3	5	24
Durango	0	0	0	0	0
Guanajuato	0	2	7	5	14
Guerrero	1	5	6	4	16
Hidalgo	8	4	6	7	25
Jalisco	0	3	1	0	4
Edo. de México	11	6	5	3	25
Michoacán	12	6	6	1	25
Morelos	2	5	5	7	19
Nayarit	0	0	0	0	0
Nuevo León	0	4	6	4	14
Oaxaca	3	3	6	3	15
Puebla	11	4	6	5	26
Querétaro	0	0	0	5	5
Quintana Roo	0	4	3	0	7
San Luis Potosí	0	4	5	6	15
Sinaloa	0	1	1	0	2
Sonora	0	1	0	0	1
Tabasco	3	6	5	6	20
Tamaulipas	2	3	6	6	17
Tlaxcala	0	4	4	6	14
Veracruz	15	4	4	8	31
Yucatán	0	6	1	0	7
Zacatecas	0	0	0	0	0
Total	100	100	105	93	398

En la tabla 13 se muestra el año de aislamiento, origen y el resultado de amplificación del fragmento *ctxA* de las cepas que no presentaron el gen *ctxB*.

Secuenciación

Se seleccionaron 14 cepas para la secuenciación, las cuales presentaron además del gen *ctxB*, información adicional obtenida del InDRE a partir de análisis previos que se realizaron a estas cepas (ver tabla 14).

A los productos de amplificación de la PCR de las 14 cepas seleccionadas (3 de referencia y 11 de campo) se les realizó la secuenciación obteniéndose diferentes gráficas, como se presenta en la figura 14.

La secuencia de DNA del fragmento del gen de la subunidad B (*ctxB*) de la toxina colérica, se obtuvo a partir de 300 bases desde la posición 60 a la 360, lo cual se muestra en la figura 15.

Se lograron secuenciar 14 cepas, de las cuales algunas presentaron la sustitución de una base en la posición 115 (C por T) y 203 (T por C); los resultados se muestran en las tablas 15 y 16.

Las diferencias en la secuencia mostraron que cinco cepas: la 32646, 2514-88, 299, 54708 y 25959 presentaron el genotipo I, mientras que las cepas 1, 2, 14570, 25055, 17830, 14140, 23203, 2807 y la cepa de referencia 6706 corresponden al genotipo III (ver tabla 15 y 16).

Tabla 13. Cepas de *Vibrio cholerae* O1 que no presentaron el gen *ctxB*.

CEPAS	<i>ctxB</i>	<i>ctxA</i>	AÑO	ORIGEN
10717	-	-	1991	Edo. de México
13515	-	-	1991	D.F.
10292	-	-	1991	Hidalgo
13541	-	-	1991	Michoacán
12714	-	-	1991	Tamaulipas
14370	-	-	1992	Veracruz
14402	-	+	1992	Veracruz
15720	-	-	1992	Tampico
16268	-	-	1992	Guanajuato
17106	-	-	1992	Guanajuato
19754	-	+	1992	Guanajuato
17271	-	-	1992	Puebla
22290	-	+	1992	Puebla
18131	-	-	1992	San Luis Potosi
19372	-	-	1992	Quintana Roo
35427	-	-	1993	D.F.
35485	-	+	1993	Edo. de México
52036	-	-	1993	Sinaoa
35418	-	-	1993	Tlaxcala
35423	-	-	1993	Tlaxcala
57307	-	-	1994	Tabasco
54554	-	-	1994	Sinaloa
56846	-	-	1994	Edo. de México

23 cepas en total

Tabla 14. Cepas de *Vibrio cholerae* O1 a las que se les realizó la secuenciación.

CEPAS	AMPLIFICAN PARA EL GEN	* EFECTO CITOPÁTICO EN CELULAS VERO	CRITERIO DE INCLUSIÓN PARA LA SECUENCIACIÓN
1	<i>ctxB</i>	Citotónico	Caso correspondiente al año de 1991
2	<i>ctxB, zot *, ace *</i>	Citotónico vacuolizante	Caso correspondiente al año de 1991. Caso índice
25055	<i>ctxB</i>	Vacuolizante	Capacidad vacuolizante
6706	<i>ctxB</i>	Citotónico vacuolizante	Cepa de referencia Inaba aislada en Perú
14140	<i>ctxB</i>	Citotóxico	Cepa hemolítica
14573	<i>ctxB</i>	Citotónico	Caso correspondiente al año de 1992
25959	<i>ctxB</i>	Citotónico vacuolizante	Cepa Ogawa
32646	<i>ctxB</i>	Citotónico	Caso correspondiente al año de 1993
54708	<i>ctxB</i>	Vacuolizante	Caso correspondiente al año de 1994
23203	<i>ctxB</i>	Citotónico vacuolizante	Cepa hemolítica
299	<i>ctxB</i>	Citotónico	Cepa de referencia para PCR
2514-88	<i>ctxB</i>	Citotónico vacuolizante	Cepa de referencia aislada en EUA en la zona del Golfo
17830	<i>ctxB</i>	Citotónico	Multirresistente
2807	<i>ctxB</i>	Citotónico vacuolizante	Hemolítica

*Información obtenida por el Laboratorio de Bacteriología Molecular del InDRE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6706

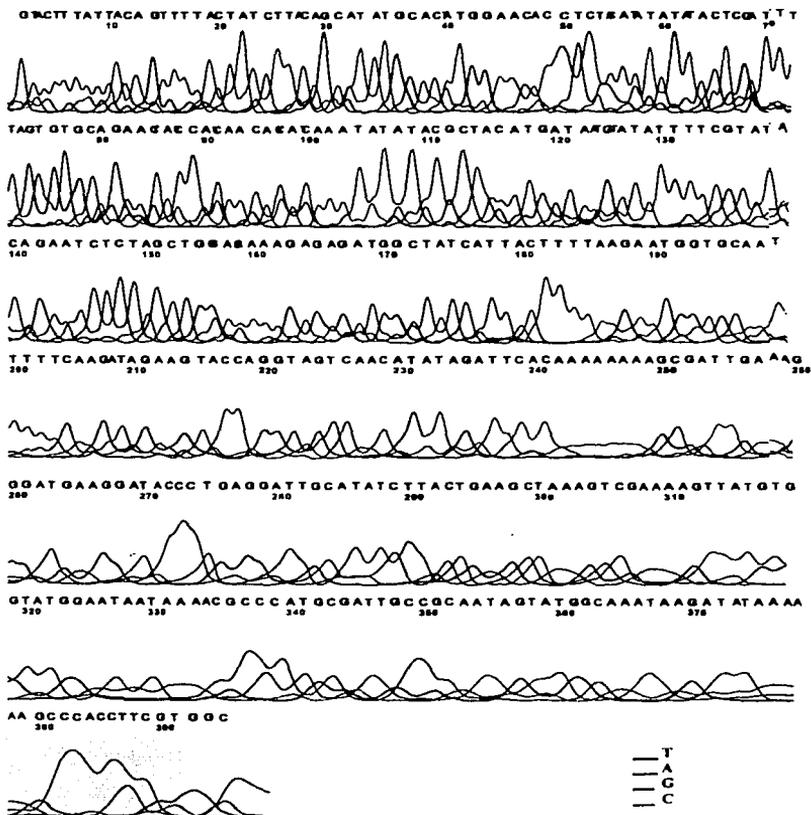


Figura 14. Gráfica de secuenciación del fragmento del gen *ctxB* de la cepa de referencia 6706 *Vibrio cholerae* O1.

Cepas

2	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
2514-88	ATGCACCTGGG	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
14140	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
25055	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
32646	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
6706	GA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
299	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
23203	CATTGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
17830	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
14573	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
1	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
54708	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
25959	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA
28070	ATGCACATGGA	ACA	CCT	CAA	AAT	ATT	ACT	GAT	TTG	TGT	GCA	GAA	TAC	CAC	AAC	ACA

Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn Thr

1

10

90

2	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
2514-88	CAA	ATA	CAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
14140	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
25055	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
32646	CAA	ATA	CAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
6706	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
299	CAA	ATA	CAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
23203	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
17830	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
14573	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
1	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
54708	CAA	ATA	CAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
25959	CAA	ATA	CAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT
28070	CAA	ATA	TAT	ACG	CTA	AAT	GAT	AAG	ATA	TTT	TCG	TAT	ACA	GAA	TCT	CTA	GCT	GGA	AAA	AGA	GAG	ATG	GCT	ATC	ATT

Gln Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile

20

30

40

120

150

180

Figura 15. Secuencia de la subunidad B de la toxina colérica en cepas de *Vibrio cholerae* O1 que circulan en México.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

76

2 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 2514-88 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ACT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 14140 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 25055 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 32646 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ACT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 6706 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 299 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ACT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 23203 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 17830 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 14573 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 1 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 54708 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ACT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 25959 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ACT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT
 28070 ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT

Thr Phe Lys Asn Gly Ala Ile Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile

50

60

210

240

2 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 2514-88 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 14140 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 25055 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 32646 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 6706 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 299 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 23203 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 17830 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 14573 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 1 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 54708 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 25959 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT
 28070 GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT

Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn

70

80

270

300

330

Figura 15. Secuencia de la subunidad B de la toxina colérica en cepas de *Vibrio cholerae* O1 que circulan en México (continuación).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

2	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
2514-88	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
14140	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
25055	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
32646	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
6706	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
299	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
23203	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
17830	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
14573	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
1	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
54708	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
25959	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
28070	AAT	AAA	ACG	CCT	CAT	GCG	ATT	GCC	GCA	ATT	AGT	ATG	GCA	AAT	TAA
	Asn	Lys	Thr	Pro	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Ser	Met	Ala	Asn	Stop
	90										100			103	

360

78

Figura 15. Secuencia de la subunidad B de la toxina colérica en cepas de *Vibrio cholerae* O1 que circulan en México (continuación).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 15. Diferencias en la secuencia del gen *ctxB* de la toxina colérica en cepas con genotipo III aisladas en la República Mexicana.

Muestra	Concentración de DNA (fmol)	Posición de la base ^a			Posición del aminoácido ^b			Genotipo
		115	138	203	18	25	47	
6706 ^c	47.8	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
1	132.8	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
2 ^d	119.3	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
14573	47.9	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
25055	54.9	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
17830	76.3	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
14140	57.2	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
23203	48	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III
2807	71.7	T	T	T	Tyr	Phe	Ile	III

^aSe refiere a la posición de la base en la secuencia tomando en cuenta como inicio al codón de iniciación para *ctxB*.

^bSe refiere a la posición del aminoácido en la secuencia de *ctxB* (a partir de la base 64).

^cCepa de referencia aislada en Perú.

^dCaso índice.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 16. Diferencias en la secuencia del gen *ctxB* de la toxina colérica en cepas con genotipo I aisladas en la República Mexicana.

Muestra	Concentración de DNA (fmol)	Posición de la base ^a			Posición del aminoácido ^b			Genotipo
		115	138	203	18	25	47	
2514-88 ^c	67.8	C	T	C	His	Phe	Thr	I
32646	54.7	C	T	C	His	Phe	Thr	I
299	49.8	C	T	C	His	Phe	Thr	I
54708	79	C	T	C	His	Phe	Thr	I
25959	55	C	T	C	His	Phe	Thr	I

^a Se refiere a la posición de la base en la secuencia tomando en cuenta como inicio al codón de iniciación para *ctxB*.

^b Se refiere a la posición del aminoácido en la secuencia de *ctxB* (a partir de la base 64).

^c Cepa de referencia aislada en EUA en la zona del golfo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El diagnóstico microbiológico del cólera se basó en la detección del agente causal *V. cholerae* O1, a partir de 421 cepas aisladas de muestras humanas entre 1991-1994.

Dentro del diagnóstico microbiológico, de acuerdo a lo expuesto por Giono y col., la característica más común de *V. cholerae* O1 en el medio TSI es el comportamiento ácido en la superficie y ácido en el fondo (A/A), originado por la fermentación de sacarosa y lactosa en la superficie y la fermentación de la glucosa en el fondo. El estado alcalino en la superficie y ácido en el fondo (K/A), ocasionado por la fermentación de la glucosa en el fondo solamente, rara vez se presenta⁵.

Sin embargo, en los resultados obtenidos, se observó que en el medio TSI el 57 % de las cepas presentaron la característica ácido en la superficie y ácido en el fondo (A/A), es decir fermentaron los tres azúcares. Al mismo tiempo el 43 % de las cepas restantes presentaron un comportamiento alcalino en la superficie y ácido en el fondo (K/A) fermentando sólo a la glucosa. Debido a estos resultados cabe señalar que el comportamiento A/A y K/A se presenta de forma ligeramente proporcional en cepas específicamente aisladas en la República Mexicana durante el periodo de 1991 a 1994, contrastando a lo descrito por Giono y colaboradores en donde establece que esta conducta es muy rara.

Según Kumate, Darnell y Janicott, durante la séptima pandemia del cólera se ha observado que la mayoría de las cepas de *V. cholerae* O1 se han caracterizado por ser del serotipo Inaba^{1, 12, 13}.

De acuerdo con los resultados derivados del ensayo, el serotipo Inaba predominó sólo durante el periodo 1991-1992, lo cual concuerda con lo señalado por Kumate, Darnell y Janicott. No obstante se observó un cambio significativo al serotipo Ogawa durante el periodo de 1993-1994. Por lo que cabe señalar que en México durante 1991-1994 no existe, en realidad, un predominio del serotipo Inaba.

El cambio de serotipo de Inaba a Ogawa, que se manifestó durante 1991-1994 en la República Mexicana se puede explicar tomando en cuenta lo señalado por Strocher, quien establece que el cambio de Inaba a Ogawa puede resultar a partir de una variedad de alteraciones a nivel de una simple modificación de bases en el gen *rfbT* el cual crea un prematuro codon de alto en este gen, resultando así cepas Inaba *rfbT* mutantes⁴⁹.

Con relación a la estandarización de la técnica de PCR para el gen *ctxB* de *V. cholerae* O1 se pudo observar lo siguiente:

Al optimizar la concentración de los iniciadores *ctx 9* y *ctx 7*, se observó que al utilizar concentraciones altas de los iniciadores se favorecían las amplificaciones de regiones inespecíficas, por lo que fue necesario disminuir la concentración hasta 0.0625nM para obtener una amplificación óptima en 50 µl de reacción.

Por otra parte, la concentración obtenida en el ensayo no concuerda con lo señalado por Barrera e Innis, ya que establecen que para una reacción de 100 µl la concentración aceptable de cada iniciador oscila entre 0.05 a 1.0 µM (para una reacción de 50 µl se establece una concentración de 0.025 a 0.5 µM)^{37,38}, observándose que la concentración experimental es menor a la teórica. Esto se puede deber a las condiciones de síntesis de los iniciadores y a las especificaciones que da el mismo fabricante.

En la estandarización de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) se pudo comprobar que una concentración alta de iones magnesio conduce a una baja especificidad. También se encontró que disminuir demasiado la concentración de $MgCl_2$ puede conducir a un decaimiento de la enzima al grado de que la amplificación puede ser nula.

Según Barrera e Innis para una reacción de 100 µl se recomienda utilizar una concentración de $MgCl_2$ entre 0.5 a 2.5 mM (por lo que para 50 µl de reacción se requieren entre 0.25 y 1.25 mM)^{37,38}. En la prueba de estandarización de $MgCl_2$, para una mezcla de reacción de 50 µl, se observó que la concentración óptima para la PCR fue de 4 mM de

MgCl₂ la cual no concuerda con los anteriores. Pero si se considera que la cantidad de iniciador usada es menor, esto reduciría el costo de la reacción.

En la estandarización de la enzima *taq* polimerasa, se pudo observar que al disminuir demasiado la concentración de la enzima la amplificación es nula. La concentración que mostró una mejor amplificación fue de 2.5 U para 50 µl de reacción, pero esta concentración es mayor a lo establecido por Barrera e Innis, ya que establecen que por cada 100 µl de reacción se recomienda usar de 1 a 2.5 U de enzima (0.5 a 1.25 U para 50 µl de reacción)^{37,38}. Por lo que es importante considerar el tamaño del producto de amplificación.

Las condiciones de reacción que se llevaron a cabo para la PCR, tanto el número de ciclos como la temperatura de desnaturalización y extensión, si concuerdan con lo indicado por Olsvik, no obstante, la temperatura de alineamiento óptima de 55 °C que se manejo en el ensayo no concuerda con la determinada por Olsvik⁴⁵.

Al obtener la concentración óptima de dNTP'S se pudo observar que a concentraciones bajas puede aumentar la especificidad de la reacción, pero a concentraciones altas tiende a disminuir la especificidad. Barrera e Innis indican que la concentración recomendable de dNTP'S para una reacción de 100 µl tendrá que oscilar entre 20 y 200 µM (10 a 100 µM para 50 µl)^{37,38}. La concentración óptima de dNTP'S que se estableció fue de 0.02 µM por lo que no coincide con lo recomendado por Barrera e Innis.

Después de realizar la PCR a 421 cepas de campo de *V. cholerae* O1, con el fin de detectar el fragmento del gen *ctxB*, se pudo observar que únicamente 398 cepas (el 94% de los casos) mostraron amplificación para el gen, durante el periodo comprendido de 1991 a 1994.

Con respecto a las 23 cepas restantes (16%) que no mostraron amplificación para el gen *ctxB*, se puede deducir que probablemente el mecanismo de patogenicidad de estas cepas no fue la toxina colérica, si no algún otro. A estas cepas se les realizó una PCR para identificar el gen *ctxA* de las cuales solamente 4 cepas amplificaron, es decir, exclusivamente

expresaron el gen *ctxA*; sin embargo, aunque se haya presentado el gen *ctxA*, el mecanismo de la enfermedad probablemente no fue la toxina colérica, de acuerdo a lo establecido por Kaper, ya que menciona que ninguna de las subunidades de forma individual tienen actividad significativa en animales o sistemas celulares intactos¹¹.

Por otra parte se encontró que el número y la distribución de estados de la República Mexicana en los que se presentó el gen *ctxB*, por medio de la PCR, varió constantemente dependiendo del año.

En el mapa correspondiente al año de 1991 se pudo notar que los casos registrados se concentraron en el sur y parte del centro de la República Mexicana, abarcando a 14 estados, y afectando aproximadamente al 45% de los estados de la República en su totalidad.

En el año de 1992 el número de casos que presentaron el gen *ctxB* fue el mismo al de 1991, no obstante, se observó una distribución mayor ya que se afectó a 26 estados (el 84% de los estados de la República Mexicana) abarcando casi todo el sur, centro y norte del país.

En 1993 se presentó el mayor número de casos durante este periodo, además se encontró que la distribución del gen disminuyó en comparación con el año anterior, perjudicando tan sólo a 23 estados (el 74 % de los estados de la República Mexicana) del sur, centro y norte del país.

En el año de 1994 tanto el número de casos como la distribución disminuyó debido, probablemente, a las medidas sanitarias que se llevaron a cabo en ese año, pues solamente el 61% de los estados de la República Mexicana fueron afectados (19 estados en su totalidad) distribuyéndose en el sur, centro y noreste de la República Mexicana.

Con respecto a la secuenciación, se pudo establecer lo siguiente:

Se realizó la secuenciación solamente a 14 cepas de *V. cholerae* O1, que fueron aisladas en la República Mexicana durante el periodo de 1991-1994.

Se pudo lograr una correcta secuenciación para el gen *ctxB*, ya que ésta fue idéntica a la presentada por Lockman y Olsvik^{50, 45}, sin embargo se encontró una diferencia de secuencia con respecto a la establecida por Mekalanos⁵¹ tan sólo en una posición.

De acuerdo con Olsvik⁴⁵, existen tres tipos de genotipos a partir del gen *ctxB* (subunidad B) de la toxina colérica, los cuales se clasifican en genotipo I al que corresponden las cepas del biotipo Clásico y el biotipo El Tor procedentes de las costas del Golfo de USA. El genotipo II encontrado en cepas del biotipo El Tor originarias de Australia y el genotipo III localizadas en cepas provenientes de la séptima pandemia y la última epidemia de Latinoamérica. La clasificación de los genotipos se basó en la sustitución de una base en las posiciones 115, 138 y 203⁴⁵.

En el ensayo se consiguió secuenciar las 14 cepas, lo cual fue benéfico ya que el costo de la secuenciación es muy alto. Se logró detectar la sustitución de una base en las posiciones 115 y 203 (aminoácido 18 y 47 respectivamente) en cinco cepas, revelándose la presencia de dos diferentes genotipos, de acuerdo a lo indicado por Olsvik⁴⁵, el genotipo I y el genotipo III.

Estos dos diferentes genotipos circulan en la República Mexicana, predominando el genotipo III proveniente de la séptima pandemia y la última epidemia en Latinoamérica. El genotipo I se ha encontrado en cepas del biotipo Clásico de todo el mundo y cepas del biotipo El Tor halladas en las costas del Golfo en Estado Unidos.

La aparición del genotipo I en la República Mexicana puede deberse al intercambio comercial que presenta México con Estados Unidos y otros países, siendo, probablemente, el Golfo de México la puerta de entrada.

La técnica de PCR para la identificación del gen *ctxB* de la toxina colérica tiene la ventaja, en comparación con otros métodos, de ser automatizada, rápida, específica y sensible, ya que se puede obtener un gran número de amplificaciones a partir de una pequeña concentración de DNA.

Las desventajas de esta técnica se deben a que se pueden obtener resultados falsos positivos causados por amplificaciones originadas de DNA contaminante. Se requiere de una zona restringida, además de equipo, material, y reactivos exclusivos para esta técnica. Su alto costo la hace poco accesible para algunos laboratorios.

CONCLUSIÓN

10. CONCLUSIÓN

Las cepas de *V. cholerae* O1 presentaron variaciones al crecer en el medio TSI, el 57% de las cepas fermentaron la sacarosa, lactosa y glucosa, observándose la característica Λ/Λ en el medio. El 43% de las cepas no fermentaron la sacarosa y lactosa, sólo fermentaron la glucosa en el fondo del medio, presentando la característica K/A.

Durante el periodo de 1991 a 1994 se observó un cambio importante de serotipo de Inaba a Ogawa, en cepas de *V. cholerae* O1 en la República Mexicana.

La estandarización de la técnica de PCR que se obtuvo en este ensayo permitió obtener e identificar el gen *ctxB* a partir de cepas *V. cholerae* O1.

Las concentraciones óptimas de los reactivos que se obtuvieron para la amplificación del gen *ctxB* de la subunidad B de la toxina colérica (para un volumen total de reacción de 50 μ l) fueron: 0.065 nM de cada uno de los iniciadores *ctx 9* y *ctx 7*, 4 mM de $MgCl_2$, 0.02 μ M de la mezcla de dNTP's, 2.5 U de la enzima taq polimerasa, una concentración de 1X del regulador de PCR y de 1×10^5 a 1×10^6 bacterias/ ml para el DNA molde.

Las condiciones de amplificación fueron de: 25 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos.

En el año de 1992 se presentó la más alta distribución del gen *ctxB*, en la República Mexicana afectando a 26 estados.

El estado que presentó el mayor número de casos durante el periodo de 1991 a 1994 fue Chiapas.

Las principales zonas en las que se localizó el gen *ctxB* durante 1991 a 1994 fueron el centro y sur de México.

La PCR que amplificó e identificó el gen *ctxB* de la subunidad B, sumado con la secuenciación, permitió encontrar diferencias genotípicas en cepas de *V. cholerae* O1 circulantes en México durante el periodo de 1991 a 19994.

Se reveló la existencia de dos genotipos de *ctxB* circulando en la República Mexicana, el genotipo I y el genotipo III.

Se observó que el genotipo III predomina en el país, ya que proviene de la última epidemia en Latinoamérica.

El genotipo I se ha localizado anteriormente en cepas del biotipo Clásico y en cepas procedentes de las costas del Golfo en USA, por lo que la aparición del genotipo I en México, posiblemente se origine a partir del intercambio comercial.

La aparición de estos dos genotipos confirmó la diversidad de cepas de *V. cholerae* O1 que se encuentran presentes en México.

Con este estudio, tomando en cuenta a *ctxB*, se obtuvo una clasificación genética de las cepas que circulan en la República Mexicana.

Al tomar en cuenta esta clasificación genética, posiblemente, se podrá en un futuro examinar si algún caso confirmado de *Vibrio cholerae* O1, es un caso importado o autóctono.

Es probable que al tener una idea del origen de la cepa, se pueda conocer la ruta epidemiológica que sigue la enfermedad y en consecuencia, tomar las medidas necesarias para su control y erradicación.

ANEXOS

ANEXO I

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

EDTA 0.5M pH 8 (ETILENDIAMINO TETRA-ACETATO DE SODIO)

- Se adicionaron 186.1 g de EDTA disódico. 2H₂O en 800 ml de agua.
- Se ajustó a pH 8 con NaOH 1N.
- Se aforó a 100 ml con agua.
- Además se esterilizó y almacenó a temperatura ambiente.

REGULADOR DE TAE 50 X (TRIS ACETATO EDTA)

- 57.1 ml de ácido acético
- 242 g de tris base (hidroximetil) metilamina
- 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.

Se agregó todo en un matraz volumétrico y se adicionó agua hasta 1000 ml. Se almacenó a temperatura ambiente. Toda el agua que se utilizó para preparar las soluciones, fue destilada, filtrada y esterilizada.

REGULADOR TAE 1X

A 20 ml de TAE 50X se le agregó agua aforándose a 1000 ml

BROMURO DE ETIDIO (SOLUCIÓN STOCK 10 mg/ ml)

- Se disolvió 1g de bromuro de etidio en 100 ml de agua.
- Se pasó la solución a un frasco ámbar.
- Este compuesto se manejó solo con guantes.

GEL DE AGAROSA 2% EN TAE 1X

- Se pesaron 0.6 g de agarosa
- La agarosa se disolvió en 30 ml de regulador TAE 1X en un frasco con tapón de rosca. Se aflojó el tapón antes de calentar.
- Se calentó en horno de microondas, 3 ciclos durante 1 min cada uno a 70% de potencia.
- La agarosa se dejó enfriar a 55-60 °C y se le adicionó 1.5 µl de bromuro de etidio, se homogenizó y se depositó al contenedor.
- Se dejó gelificar.

REGULADOR DE CORRIMIENTO 10X

- 0.25 % azul de bromofenol
- 0.25% xilencianol
- 30% de glicerol en agua

Se almacenó a temperatura ambiente.

MEDIO TCBS (AGAR TIOSULFATO, CITRATO, BILIS, SACAROSA)^{52,53}

Extracto de levaduras	5 g
Peptona de caseína	5 g
Peptona de carne	5 g

Citrato de sodio	10 g
Tiosulfato de sodio	10 g
Bilis de buey	5 g
Sacarosa	20 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Azul de timol	0.04 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Este tipo de medio se tuvo que preparar inmediatamente antes de usarse. Todos los ingredientes se disolvieron y se calentó hasta ebullición. Se ajustó el pH a 8.6. Se enfrió a 55 °C y se llenaron las cajas petri estériles. Este medio no se esterilizo en autoclave. Se almacenó solo de 24 -48 horas, en bolsas de plástico y en refrigeración (4-10°C).

CALDO DE TRIPTOFANO O DE PEPTONA⁵³

Peptona	20.0 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Triptofano	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

Se hidrataron los ingredientes con agua destilada y se calentó suavemente hasta su disolución. Se repartió aproximadamente 4 ml en tubos de vidrio de 13 X 100 con tapón de rosca y esterilizó a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos.

Se dejó enfriar antes de su empleo y se conservó en refrigeración (4-10 °C).

MIO (medio indol ornitina)⁵²

Extracto de levadura	3 g
Peptona	10 g
Triptona	10 g
L-ornitina	5 g
Dextrosa	1 g
Agar	2 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	6.5 ± 0.2	

Los ingredientes se hidrataron con agua destilada y se calentó suavemente hasta su disolución. Se distribuyó 4 ml del medio en tubos de 13 X 100 con tapón de rosca y esterilizó a 121 °C, 15 libras de presión y durante 15 min. El medio se dejó enfriar en posición vertical y conservó en refrigeración.

REACTIVOS PARA DEMOSTRAR LA PRESENCIA DE INDOL⁵²

▪ REACTIVO DE EHRLICH

p-dimetilaminobenzaldehido	2 g
Alcohol etílico absoluto	190 ml
HCl concentrado	40 ml

▪ REACTIVO DE KOVACS

p-dimetilaminobenzaldehido	10 g
Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
HCl concentrado	50 ml

Se disolvió el aldehído en el alcohol y se agregó lentamente el ácido a la mezcla aldehído-ácido.

REACTIVO PARA OXIDASA⁵²

N,N,N,N, tetrametil o-fenilendiamina	1 g
Agua destilada	100 ml

AGAR DE HIERRO LISINA (LIA)

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
L-lisina	10 g
Citrato férrico-amónico	0.5 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Tiosulfato de sodio (anhidro)	0.04 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final = 6.7 ± 0.2

Aminoácidos

Se agregaron 10 g (concentración final 1%) de la forma levo del aminoácido (lisina, ornitina o arginina). Se duplicó la concentración cuando se empleó la forma dextro-l, ya que sólo la forma levo es activa.

Se hidrató el medio y se calentó para disolver los ingredientes. Se repartieron aproximadamente 3 ml del medio en tubos de 13 X 100 con tapón de rosca. Se esterilizó a 121°C, 15 libras, 15 min, y se dejó enfriar en posición vertical. Para su conservación se refrigeró.

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZÚCAR (TSI)²²

Peptona de carne*	10 g
Peptona de caseína*	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
Agar	13 g
Rojo de fenol	0.025 g
Sulfato ferroso	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

pH final de 7.3 ± 0.2

*Estas peptonas se pueden sustituir por 2 g de polipeptona.

Se hidrataron y calentaron suavemente los ingredientes hasta su disolución y se agregaron 3 ml en tubos de 13 X 100 y se esterizaron a 121 °C durante 15 min. Se dejó enfriar en posición inclinada (pico de flauta) con una capa basal profunda. Se almacenaron en refrigeración.

CALDO INFUSIÓN DE CEREBRO CORAZÓN (BIII)^{52,53}

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Peptona	10 g
Dextrosa	2g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato disódico	2.5 g
Agua	1000 ml
pH final 7.4 ± 0.2	

Se suspendió el medio en el agua y se calentó para su disolución. Se envasó en tubos de 13 x 100 mm y esterilizó a 121 ° C durante 15 minutos.

SOLUCIÓN SALINA AL 0.85 % (FISIOLÓGICA)⁵³

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua c.b.p.	1000 ml

Se disolvió el cloruro de sodio en 500 ml de agua y se aforó a 1000 ml. Se ajustó el pH a 7.2 ± 0.1 . Se envasó y esterilizó a 121 ° C durante 15 minutos.

ANEXO II

ABREVIATURAS

A	Adenosina
Å	Angstrom
Ace	Toxina accesoria
<i>ace</i>	Gen que codifica a la toxina Ace
ADP	Adenosina 5'-difosfato (adenosina difosfato)
AMP _c	Adenosina 5'-monofosfato ciclico (ácido adenílico)
ATP	Adenosina 5'-trifosfato (adenosina trifosfato)
BAB	Agar base sangre
bp	Pares de bases
C	Citosina
°C	Grado centigrado
CT	Toxina colérica
<i>ctxA</i>	Gen que codifica a la subunidad A
<i>ctxB</i>	Gen que codifica a la subunidad B
ddNTP's	didesoxinucleótidos
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos
EDTA	Etilendiamino tetraacetato de sodio
EGA	Electroforesis en geles de agarosa
EGAD	Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
fmol	Fentomol
g	Gramo
G	Guanina
GM ₁	Gangliósido GM ₁ , receptor para la toxina colérica
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
<i>hlyA</i>	Gen que codifica a la hemolisina
kDa	Kilodaltones

LIA	Agar de hierro y lisina
M	Molar
min	Minuto
MIO	Medio movilidad indol ornitina
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
nmol	Nanomol
³² p	Fósforo 32
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	El grado de acidez o alcalinidad de una solución (-log [H ⁺])
PM	Peso molecular
pmol	Picomol
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
SLT	Toxina Shiga-Like
ST	Toxina estable al calor
T	Timina
TAE	Tris acetato EDTA
TCBS	Agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa
TSI	Agar hierro y triple azúcar
U	Unidad
μl	Microlitro
μM	Micromolar
UV	Ultravioleta
<i>V. cholerae</i> O1	<i>Vibrio cholerae</i> O1
Zot	Toxina que afecta la zónula ocludens
<i>zot</i>	Gen que codifica a la toxina Zot
%	Porcentaje

BIBLIOGRAFÍA

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Kumate J., Sepúlveda A. y Gutiérrez G. El cólera: epidemias, endemias y pandemias. México: Interamericana McGraw-Hill, 1993: 1-84.
2. Valdespino G. J., García G. M., Gutiérrez C. L., Giono C. S., Arminda M. R. y Sepúlveda A. J. Manual sobre cólera para personal de salud: 85 preguntas y respuestas. Publicación técnica del INDRE. 1991; //: 1-48.
3. Florescano E. y Malvido E. Ensayos sobre la historia de las epidemias en México. México: IMSS, 1982; 2: 565-580.
4. Bustamante M. La situación epidemiológica de México en el siglo XIX. México: IMSS, 1982; 2: 425-476.
5. Giono C. S., Escobar G. A. y Valdespino G. J. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: INDRE, 1993: 309-350, 369-388, 395-409.
6. Giono C. S. y Gutiérrez C. L. Caracterización microbiológica del brote de cólera en el municipio de Sultepec Estado de México. Boletín quincenal de cólera / diarreas infecciosas. 1991; /: 4-5.
7. Baumann P., Schubert R. Bergey's manual of systematic bacteriology, Genes I. *Vibrio*. USA: Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
8. Kelly M., Hickman-Brenner F. and Farmer J. Manual of clinical microbiology. 5a ed. Washington, DC: Balows A., 1991: 384-395.
9. Koneman E., Allens D. y Dowel V. Diagnóstico microbiológico. 3ª ed. México: Panamericana, 1998: 318-322.
10. Giono C. S., Gutiérrez C. L. e Hinojosa M. Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. Publicación técnica del INDRE. 1991; /0: 1-54.
11. Kaper J., Morris G. and Levine M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8: 48-86.
12. Darnell J., Jodish H., Baltimore D. y Grinberg Y. Biología celular y molecular. 2ª. Ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1993: 201-239.

13. Janicot M., Fouque F. and Desbuquols B. Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosome. *J. Biol. Chem.* 1991; *266*:12858-12865.
14. Barret T. and Blake P. Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seven pandemic. *J. Clin. Microbiol.* 1981; *13*: 126-129.
15. Ludwig S., Randall K. and Schoolnik K. Chemical and immunochemical studies on the receptor binding domain of cholera toxin B subunit. *J. Biol. Chem.* 1985; *260*: 12528-12534.
16. De S. N. Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature.* 1959; *183*: 1533-1534.
17. Finkelstein R., and LoSpalluto J. Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinoid. *J. Exp. Med.* 1969; *130*: 185-202.
18. Mekalanos J., Swartz J., Pearson N., Harford N., Groyne F. and Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature.* 1983; *306*: 551-557.
19. Lockman H. y Kaper B. Nucleotide sequence analysis of the A₂ and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 1983; *258*: 13722-13726.
20. Yen Lai C. Determination of the primary structure of cholera toxin B subunit. *J. Biol. Chem.* 1977; *252*: 7249-7256.
21. Sixma T., Pronk S., Kalk K., Wartna E., Witholt B., and Hol W. G. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E.coli*. *Nature.* 1991; *351*: 371-377.
22. Heyning S. The subunits of cholera toxin: structure, stoichiometry and function. *J. Infec. Dis.* 1976; *133*: S5-S13.
23. Wachsmuth K., Blake A. and Olsvik Ø. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. USA: Library of congress cataloging in-publication data. 1994: 41-52.
24. Sack R. and Miller E. Progressive changes of *Vibrio* serotypes in germ-free mice infected with *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1969; *99*: 688-695.
25. Hepler J. and Gilman G. G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 1992; *17*: 383-387.

26. Mekalanos J. Cholera toxin: genetic analysis, regulation, and role in pathogenesis. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 1985; *118*: 97-118.
27. Saunders D., Schanbacher J. and Bramucci G. Mapping of gene in *Vibrio cholerae* that determines the antigenic structure of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1982; *38*: 1109-1116.
28. Fasano A., Baudry B., Pumplin W., Wasserman S., Tall D., Ketley J. and Kaper B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which effects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; *88*: 5242-5246.
29. Braudy B., Fasano A., Ketley J., and Kaper B. Cloning of gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1992; *60*: 428-434.
30. Trucksis M., Galem E., Michalski J., Fasano A. and Kaper B. Accessory cholera enterotoxin (*Ace*), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; *90*: 5267-5271.
31. Honda T. and Finkelstein A. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera Vibrios. *Infect. Immun.* 1979; *26*: 1020-1027.
32. Yamamoto k., Ichinose Y., Shinagawa H., Makino K., Nakaca A., Igwanaga M., Honda T., and col. Two-step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. *Infect Immun.* 1990; *58*: 4106-4116.
33. Brown M. and Maning A. Haemolysin genes of *Vibrio cholerae*: presence of homologous DNA in non-haemolytic O1 and haemolytic non-O1 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 1985; *30*: 197-201.
34. Ichinose Y., Yamamoto K., Nakasone N., Tanabe J., Takeda T., Miwatani T., and Iwanaga M. Enterotoxicity of El Tor like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1987; *55*: 1090-1093.
35. Ogawa A., Kato I., Watanabe H. Nair G. and Takeda T. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveler's diarrhea. *Infect. Immun.* 1990; *58*: 3325-3329.

36. Morris J., Takeda T., Fali D., Losonsky A., Bhattacharya K., Forrest D., Kay A., and col. Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. J. Clin. Invest. 1990; 85: 697-705.
37. Barrera S., Ortiz L., Rojas M. y Reséndez P. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y desarrollo. 1993; 18: 50-60.
38. Innis M. and Gelfand D. PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego, USA: Academic Press, Inc., 1990: 3-12.
39. Salki R., Gelfand E., Oste E. and Higuchi R. PCR technology: Principles and applications for DNA amplification. Nueva York, USA: Stockton Press, 1989: 1-38.
40. McPherson M., Hames B. and Taylor G. PCR 2: a practical approach. Nueva York, USA: Iri Press, 1995: 1-15.
41. Thein S. and Wallace R. Human genetic diseases. A practical approach. Virginia, USA: Iri Press. 1986: 33-50.
42. Stryer L. Biochemistry. Nueva York, USA: Freeman and company, 1988: 117-140.
43. Alberts B., Dennis B., and Lewis J. Biología molecular de la célula. Barcelona: Ed. Omega, 1994.
44. Lehninger A., Nelson D., y Cox M. Principios de bioquímica. 2ª ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1993.
45. Olsvik Ø., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth K., and Fields P. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 22-25.
46. Rodríguez Angeles M. G., Giono Cerezo S. y Valdespino Gómez J.L. Efecto citotónico y citotóxico de la toxina colérica en células Vero y su relación con PCR. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 1994; 36: 263-271.
47. Fields P., Popovic T., Wachsmuth K. and Olsvik Ø. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholerae epidemic. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2118-2121.
48. Shirai H., Nishibuchi M., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Pal S., and Takeda Y. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 2517-2521.

49. Stroehler U.H., Karageorgos L.E., Morona R and Manning A. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. Proc. Natl. Acad. Sci. 1992; 89:2566-2570.
50. Lockman H. and Kaper J. Nucleotide sequence analysis of the A2 and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. J. Biol, Chem. 1983; 258: 13722-13726.
51. Mekalanos J., Swart D., Pearson G., Harford N., Groyne F., and Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature. 1983; 306: 551-557.
52. McFadin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Panamericana, 1991.
53. Delaat A. Microbiología. 2ª ed: México: Ed. Interamericana, 1983.