



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

ESTUDIO DE CEPAS DE Vibrio cholerae 01 Y NO 01 PARA DESCARTAR LA POSIBLE PRESENCIA DEL SEROGRUPO 0139

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO PRESENTA: CORAL LOZANO CUENCA

ASESORES: M. en C. MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ ANGELES DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA



MÉXICO, D.F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

LOZANO CUENCA CORAL

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Estudio de cepas de Vibrio cholerae 01 y no 01 para descartar la posible presencia del serogrupo 0139.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	DR RUBEN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL	M en C MA GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES
SECRETARIO	Q E P DORA ALICIA PEREZ GONZALEZ
SUPLENTE	Q F B MA DE LOURDES VEGA NAVARRETE
SUPLENTE	Q F B ALICIA CABRERA AGUILAR

[Handwritten signatures and scribbles over horizontal lines]

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 04 de Febrero de 2002.

[Handwritten signature]
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

c c p Departamento de Control de Egresados
c c p Interesado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología Molecular del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) de la Secretaría de Salud bajo la dirección de la M. en C. María Guadalupe Rodríguez Angeles y la asesoría del Dr. Rubén Marroquín Segura de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme llegar a esta parte importante de mi vida

A mi Madre

Gosos Reina Cuenca Herrera

Con la más profunda admiración y respeto por su esfuerzo, tenacidad y disciplina.
Por ser un ejemplo de lucha y de trabajo de sí misma y para con sus hijos.
Con amor, cariño y gratitud eternas y a quién le dedicó este trabajo y mis metas futuras

A mi Abuelita Alicia†

Que constituye uno de los principales motivos por el que yo haya elegido estudiar esta carrera.

A mis Hermanos

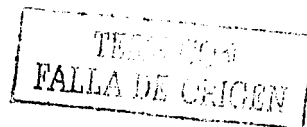
Jair, Nancy y Daniel
que aunque llevamos caminos diferentes somos parte de un mismo principio

A Lupita Rodríguez

Por la oportunidad que me brindó, ya que constituye un paso fundamental en mi vida profesional

A Chucho, Pili, Ili , Ale y todas las personas que conforman el laboratorio de Biología Molecular del InDRE

Por su interés, su paciencia, su gentileza y su tiempo



A mis tíos, primas y primos
que de alguna manera contribuyeron con su apoyo

A mis Sinodales
por su apoyo profesional, en la asesoría de este trabajo

A los Profesores de esta Facultad
que con sus enseñanzas buenas o malas son parte importante de mi formación profesional

A Gloria Gasca, Guille y la Dra. Montaña
por su calidad humana y profesional

A mis Amigos y Compañeros
Lorena A. Mendoza, Edgar Hernández, Guadalupe Rincón, Patricia Palacio, Silvestre
Ramírez., Martha Monroy, Marino Alcántara, etc. por su apoyo.

Gracias

*Cada descubrimiento;
es como una gota más en el Mar del conocimiento
y una gota menos en el gran Océano de la ignorancia.*
J.L.C.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

Indice de figuras	i
Indice de tablas	iii
Abreviaturas	v
Resumen	viii
I. Introducción	1
1. Clasificación antigénica de <i>Vibrio cholerae</i>	3
1.1 Factores de virulencia	6
1.2 Producción de toxina colérica	8
2. Técnicas moleculares para el diagnóstico de bacterias	10
2.1 Técnicas de hibridación	11
2.2 Tipos de hibridación	12
2.2.1 Hibridación <i>in situ</i>	13
II. Fundamento del método	14
Hibridación en fase sólida	14
Hibridación en fase líquida	16
III. Planteamiento del problema	20
IV. Objetivos	21
V. Hipótesis	22
VI. Material y método	23
A. Selección de cepas	28
B. Serología	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C. Reacción de polimerización en cadena (PCR)	30
D. Cultivo celular	31
E. Ribotipificación	34
VII. Resultados	38
VIII. Discusión de resultados	66
IX. Conclusiones	76
X. Anexo	78
XI. Glosario	79
XII. Referencias bibliográficas	82

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fisiología patológica del cólera	2
Figura 2.	Características de <i>Vibrio cholerae</i>	4
Figura 3.	Mecanismo de acción de la enterotoxina del cólera	9
Figura 4.	Mecanismo de la reacción de polimerización en cadena	19
Figura 5.	Diagrama de flujo para el estudio de cepas de <i>Vibrio cholerae</i>	29
Figura 6.	PCR para búsqueda de <i>Vibrio cholerae</i> O139	41
Figura 7.	PCR para la búsqueda del fragmento del gene que codifica para la subunidad A (<i>ctxA</i>) de la toxina colérica en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1	42
Figura 8.	PCR para la búsqueda del fragmento del gene que codifica para la subunidad B (<i>ctxB</i>) de la toxina colérica en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1	43
Figura 9.	PCR para la búsqueda del fragmento de gene que codifica para las toxinas zot y ace en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1	44
Figura 10.	ERIC – PCR de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1	46
Figura 11.	ERIC – PCR en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y no O1	47
Figura 12.	Efecto citopático en células Vero, causado por las toxinas de <i>Vibrio cholerae</i> ; tejido normal (a), efecto citotóxico (b), citotónico (c) y vacuolizante (d)	53

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 13. Ribotipos de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y no O1 de origen humano	59
Figura 14. Ribotipos de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1 de origen ambiental	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Factores de virulencia de <i>Vibrio cholerae</i>	7
Tabla 2.	Condiciones de amplificación de genes de <i>Vibrio cholerae</i> , sometidos a las reacciones de polimerización en cadena	32
Tabla 3.	Programa de amplificación para las reacciones de polimerización en cadena	33
Tabla 4.	Origen, año de aislamiento y serología de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y no O1	39
Tabla 5.	Presencia de genes asociados a serogrupo y toxigenicidad en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1 sometidas a PCR	40
Tabla 6.	Presencia de genes asociados a serogrupo y toxigenicidad en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 sometidas a PCR	45
Tabla 7.	Efecto citopático en células Vero causado por toxinas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1	49
Tabla 8.	Efecto citopático en células Vero causado por toxinas de <i>Vibrio cholerae</i> O1	50
Tabla 9.	Efecto citopático en células CHO causado por toxinas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1	51
Tabla 10.	Efecto citopático en células CHO causado por toxinas de <i>Vibrio cholerae</i> O1	52

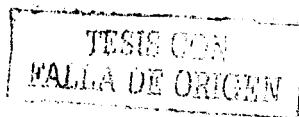
Tabla 11. Pesos moleculares de las bandas de DNA de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y no O1 de origen humano, obtenidos por ribotipificación	57
Tabla 12. Pesos moleculares de las bandas de DNA de <i>Vibrio cholerae</i> O1 de origen humano, obtenidos por ribotipificación	60
Tabla 13. Pesos moleculares de las bandas de DNA de <i>Vibrio cholerae</i> no O1 de origen ambiental obtenidos por ribotipificación	62
Tabla 14. Pesos moleculares de las bandas de DNA de <i>Vibrio cholerae</i> no O1 de origen ambiental obtenidos por ribotipificación	65

Abreviaturas

- *ace*: accessory cholera enterotoxin
- *acf*: factor accesorio de colonización
- ADPribosa: adenosindifosfato ribosa
- AMPc: adenosin monofosfato ciclico
- ATP: adenosintrifosfato
- BAB: agar base sangre
- BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato
- CHO: células de ovario de hamster chino
- Cl⁻: ion cloro
- CO₂: dióxido de carbono
- CT: toxina colérica
- *ctxA*: subunidad A de la toxina colérica
- *ctxB*: subunidad B de la toxina colérica
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- dNTPs: desoxinucleótidos (A, T, G, C)
- ELISA: inmunoensayo enzimático
- ERIC: enterobacterial repetitive intergenic consensus
- GM1: gangliosido de membrana 1
- GTP: guanosintrifosfato
- HeLa: células de carcinoma de cervix
- K⁺: ion potasio

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Kb:** kilobase
- **KDa:** kilodaltones
- **L:** litro
- **LIA:** agar lisina hierro
- **M:** molar
- **min:** minutos
- **MIO:** agar indol motilidad ornitina
- **mJoule:** mili Joule
- **mL:** mililitro
- **mM:** milimol
- **MPM:** marcador de peso molecular
- **Na⁺:** ion sodio
- **NaCl:** cloruro de sodio
- **NAD⁺:** coenzima: nicotinamida adenin-dinucleótido (NAD)
- **NaHCO₃:** bicarbonato de sodio
- **NBT:** nitro azul de tetrazolio
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **pb:** pares de bases
- **pg:** picogramos
- **R:** ribotipo
- **RFLP:** fragmentos de restricción de longitud polimorfica
- **RIA:** radioinmunoanálisis



- ♦ RNA: ácido ribonucleico
- ♦ SDS: dodecil sulfato de sodio
- ♦ seg: segundos
- ♦ SSC: solución salina citratos
- ♦ TCBS: agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa
- ♦ *Tcp pili*: pili corregulador de toxina (toxin coregulated pili)
- ♦ TRIS: tris-hidroximetil amino metano
- ♦ TSI: agar triple azúcar hierro
- ♦ UV: ultravioleta
- ♦ Vero: células de riñón de mono verde africano
- ♦ YI: células de tumor adrenal
- ♦ *zot*: toxina zonula occludens
- ♦ μL : microlitro
- ♦ μm : micrometro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En el diagnóstico de cólera es importante la detección de cepas toxigénicas ya que solo las cepas productoras de toxina causan la enfermedad. La producción de toxina es un marcador importante en la identificación de *Vibrio cholerae*.

Se estudiaron las características fenotípicas por pruebas bioquímicas, serología y cultivo celular y genotípicas por ribotipos y PCR (la presencia de los genes que codifican para la producción de toxina colérica, *ace* y *zot*); de 25 cepas de *Vibrio cholerae* (13 cepas de *V. cholerae* no O1 aisladas de alimentos, aguas negras y de humanos y 12 cepas de *V. cholerae* O1 aisladas de humanos), además se buscó la presencia del serotipo O139 en las cepas estudiadas, ya que se considera como el causante de la octava pandemia de cólera. La toxigenicidad de las cepas se hizo por cultivo celular encontrando que tanto las cepas de *V. cholerae* O1 y no O1 fueron toxigénicas en las dos líneas celulares CHO y Vero, siendo estas últimas más sensibles que la primera.

Sin embargo, se advirtió que las cepas de *V. cholerae* no O1 no contienen los genes que codifican para la toxina colérica, ni las toxinas *zot* y *ace*, lo que las hace diferentes de las *V. cholerae* O1.

No se encontraron los ribotipos 2, 5 y 6a los dos últimos son los más frecuentemente reportados en México. Así mismo las cepas que por serología fueron O139 no presentaron un esquema semejante al de *V. cholerae* O1, ni capacidad toxigénica.

I. INTRODUCCIÓN

El cólera es una infección gastrointestinal aguda grave caracterizada por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación y dolores musculares debido a la pérdida de agua y electrolitos tisulares, además de dolor abdominal y disminución del pulso cardíaco. En condiciones extremas si no se trata oportuna y adecuadamente puede traer consecuencias fatales en menos de 24 horas, debido a que se conoce que rápido afecta al ser humano; a consecuencia de un shock hipovolémico, acidosis metabólica o uremia esta última, resultado de una necrosis tubular aguda como se puede ver en la figura 1. La infección puede durar alrededor de 2 a 7 días, lo cual dependerá principalmente del suministro y recuperación de fluidos y electrolitos ^{1,2,3}.

La cepa epidémica es un bacilo curvo Gram negativo *Vibrio cholerae* que mide de 0.5 a 0.8 μm de diámetro por 1.4 a 2.6 μm de largo, presenta movilidad por medio de un flagelo polar. En cuanto a su identificación por pruebas bioquímicas, son anaerobios facultativos, presentan metabolismo respiratorio y fermentativo, no fijan ni desnitrifican el nitrógeno. Son oxidasa positivo, tienen lisina y ornitina descarboxilasa, dan hidrólisis de gelatina positivo, indol positivo y arginina negativo. Pueden crecer en un medio mineral conteniendo D-glucosa y cloruro de amonio. Algunas cepas requieren del 2-3% de cloruro de sodio o agua de mar como base óptima para su crecimiento. Los vibrios son sensibles a pH bajo, por lo que mueren rápidamente a pH menor a 6, sin embargo son tolerantes a condiciones alcalinas ^{2,3,4}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

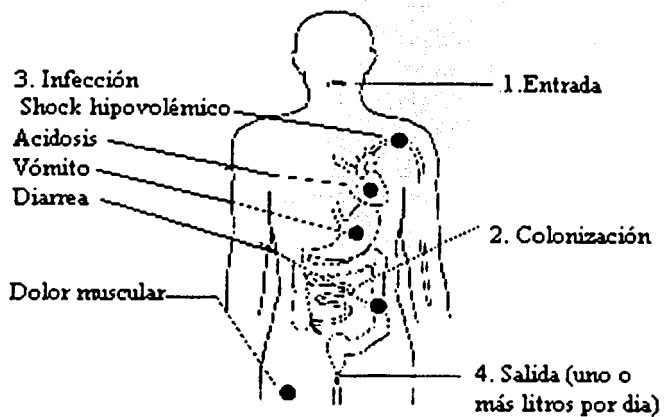


Figura 1. Fisiología patológica del cólera

Modificado de: Finkelstein RA 1999 (2)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La identificación de *V. cholerae* se ha venido realizando mediante su cultivo en el laboratorio de bacteriología, en medios que favorecen su desarrollo como el medio de TCBS, donde las colonias de esta especie son lisas, mucoides, convexas, de borde completo y de una coloración amarilla ⁴.

El cólera se mantiene siguiendo un ciclo de transmisión hombre-medio ambiente, es decir que la transmisión es debida a la ingestión de agua o alimentos contaminados con vómitos o heces del paciente y en menor grado de persona a persona, por contacto directo, las manos sucias o a través de moscas ^{2,4}.

Las personas infectadas pueden liberar un gran número de vibrios durante unos días y aún durante la fase prodrómica, acortándose este periodo una vez que ha recibido tratamiento con antibiótico ⁴.

1. Clasificación antigénica de *Vibrio cholerae*.

La variación antigénica juega un papel importante en la epidemiología y virulencia del cólera. *V. cholerae* en base a su serología se clasifica en el serogrupo O1 y serogrupo no O1; el primero comprende 3 serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (este último se presenta rara vez) y dos biotipos: Clásico y El Tor; mientras que el serogrupo no O1 comprende más de 155 serogrupos entre ellos el serotipo O139 como muestra la figura 2.

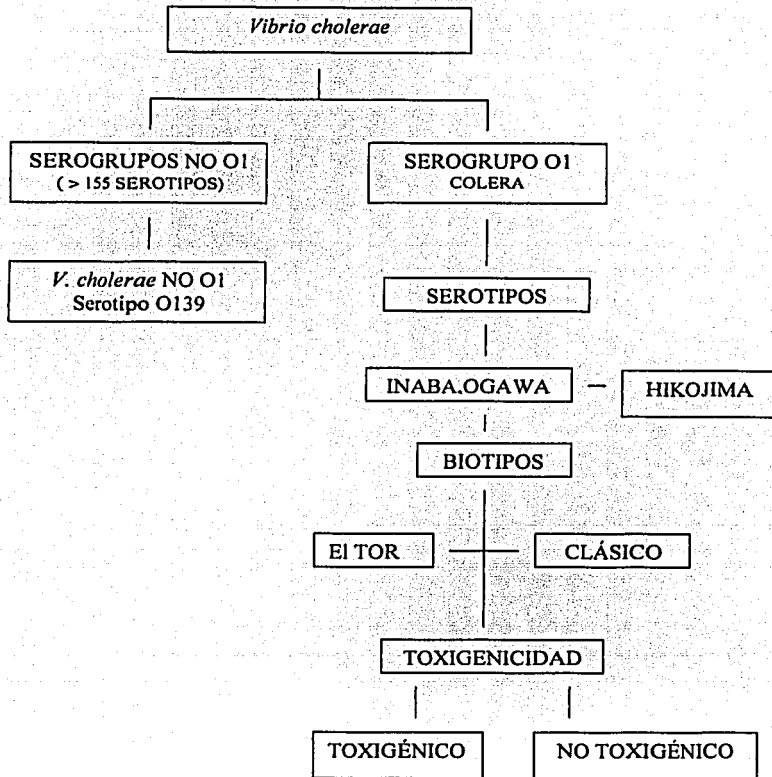


Figura 2. Características de *Vibrio cholerae*

Modificado de: Giono C. S. y col. 1994 (5).

Se considera que el serogrupo O139 surgió durante la última pandemia producida por el biotipo El Tor y que tiene la capacidad de producir una toxina indiferenciable de la toxina del cólera producida por *V. cholerae* O1^{3,4,5,6}.

Hasta 1992, el cólera había sido causado por los dos serotipos, Inaba y Ogawa, y los dos biotipos clásico y El Tor, pero en este año se presentó un nuevo brote con proporciones epidémicas en la India y Bangladesh; encontrándose que esta pandemia era causada por un nuevo serogrupo identificado como O139 ó Bengali.

Los países donde se ha reportado el nuevo serogrupo son: la India, Bangladesh y los Estados Unidos de Norteamérica existiendo la posibilidad de que esta cepa pueda dispersarse por Latinoamérica por medio de casos importados^{7,8}.

Este serovar es identificado por:

1. Su ausencia de aglutinación con el antisuero O1
2. Aglutinación con el antisuero específico O139
3. La presencia de una cápsula.

1.1 Factores de virulencia

Hay distintas características de patogenicidad de *V. cholerae* que son determinantes en los procesos de colonización intestinal como son la movilidad y la adherencia, elaboración de enzimas que incluyen a la neuraminidasa, hemolisinas, enterotoxinas tales como la toxina ZOT (zonula occludens) que altera las uniones entre los enterocitos, incrementando la permeabilidad de la mucosa intestinal por afección en la estructura de las uniones intracelulares, la toxina ACE (accessory cholera enterotoxin) que incrementa bastante la diferencia de potencial en la conductividad del tejido y la quimiotaxis; sin embargo la toxina colérica (cholera toxin) es la principal causa de patogenia en la infección. Si la bacteria es capaz de sobrevivir a la secreción gástrica del estómago el cual es de pH ácido, será apta para sobrevivir en el intestino delgado. La tabla 1 muestra los factores de virulencia de *V. cholerae* y sus características ^{2,4,9}.

V. cholerae es resistente a las sales biliares y pueden penetrar a la mucosa del intestino delgado, posiblemente auxiliada por la secreción de neuraminidasas y proteasas. Es posible que resistan a la motilidad del intestino debido a su habilidad para moverse y la quimiotaxis dirigida a la mucosa intestinal ³.

La adherencia específica de *V. cholerae* en la mucosa intestinal, aunque aún no se conoce acerca de este mecanismo, se cree que probablemente este mediado por fimbrias que forman agregados en los polos de las células. Estas fimbrias han sido denominadas como *pili tcp* (toxin coregulated pili), debido a que la expresión de los genes de este *pili* es coregulada por los genes que regulan la expresión de la toxina colérica ^{2,3}.

Tabla 1. Factores de virulencia de *Vibrio cholerae*

Factor	Ensayo	Actividad <i>in vitro</i>	Sitio blanco
<i>Vibrio cholerae O1</i>			
Adhesinas	Cultivo celular	Adherencia	Enterocito
Flagelo	Movilidad	Movilidad	
Hemaglutinina	Aglutinación de eritrocitos	Adherencia	Eritrocitos
Proteínas de membrana externa (OMPs)	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)		
Lipopolisacárido	Pirogenicidad en conejos	Endotóxica	
Mucinasas	Enzimático	Degradación de mucina	
Neuraminidasa	Enzimática	Degradación de ácido neuramídico	
Enterotoxina colérica (CT)	Asa ligada, células Y1, CHO, RIA, ELISA, sonda de DNA	Acumulación de líquidos Efecto citopático Hibridación	Enterocito
Toxina ZOT	Asa ligada	Acumulación de líquidos	
Toxina ACE	Corriente de corto circuito	Despolarización	Diferencia de potencial
Citotoxina Shiga	Células HeLa	Muerte celular	
<i>Vibrio cholerae no O1</i>			
Toxina ST	Ratón lactante	Acumulación de líquidos	Enterocito
Citolisina	Células Y1, CHO	Lisis celular	Heridas, enterocito

Y1: Células de tumor adrenal.

CHO: Células de ovario de hámster chino.

HeLa: Células de carcinoma de cérvix.

RIA: Radioinmunoanálisis

ELISA: Inmunoensayo enzimático

ST: Toxina termoestable

Modificado de: Giono S.C. 1994 (4).

Otras dos posibles adhesinas de *V. cholerae* son una proteína superficial que aglutina con los glóbulos rojos (hemaglutinación) y un grupo de otras proteínas de membrana, las cuales son productos de los genes *acf* (accessory colonization factor). Se ha observado que los *acf* modificados tienen una reducida habilidad para colonizar el tracto intestinal por lo que se cree que sólo se utilizan para mediar la colonización ³.

1.2 Producción de toxina colérica

En el diagnóstico de cólera es importante la detección de cepas toxigénicas, ya que sólo las cepas productoras de toxina causan el cuadro grave de la enfermedad. La producción de toxina es un marcador importante en la identificación de *V. cholerae*. La toxina colérica (CT) es una proteína oligomérica (84 kDa) constituida por una subunidad A1 (21 kDa), una A2 (7 kDa) la cual estimula la adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPC) hasta 100 veces más que la concentración basal con lo cual se provoca la hipersecreción de sales y agua, dando como consecuencia una diarrea con concentraciones de Cl^- y Na^+ ligeramente inferiores a la del plasma, aproximadamente el doble de NaHCO_3 y de K^+ hasta 3 a 5 veces más concentración en comparación con el plasma, y 5 subunidades B (10 kDa) con las que se fija al gangliósido GM1 ubicado en la membrana celular del epitelio de las células del huésped y que actúa como receptor de la toxina, lo cual se pone de manifiesto al realizar el cultivo celular. La figura 3 muestra el mecanismo de acción de la toxina colérica ^{2,10,11}.

Los genes que codifican para la toxina A y B son designados *ctxA* y *ctxB* respectivamente y se expresan como una sola unidad transcripcional ¹².

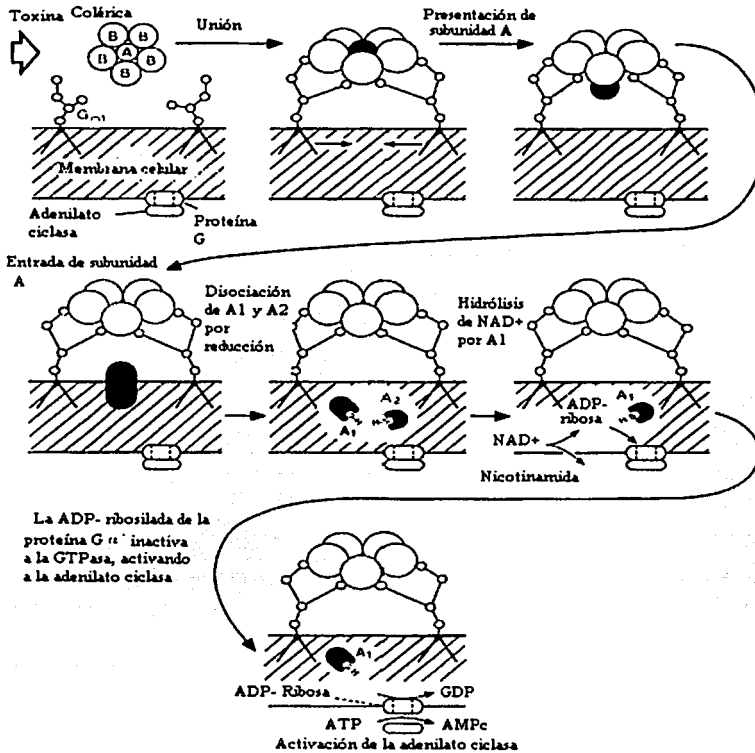


Figura 3. Mecanismo de acción de la enterotoxina del cólera. La toxina colérica se aproxima a la superficie de la célula blanco. La subunidad B se une al oligosacárido del gangliósido GM1. El arreglo conformacional de la holotoxina sucede, permitiendo la presentación de la subunidad A a la superficie celular. La subunidad A entra a la célula. El enlace SH de la subunidad A es reducido por glutatión intracelular, liberando A1 y A2. El NAD⁺ es hidrolizado por A1, produciendo ADP-ribosa y nicotinamida. Una de las proteínas G de la adenilato ciclasa es la ADP-ribosilada, e inhibe la acción de la GTPasa y activa a la adenilato ciclasa.

Modificado de: Finkelstein, 1999 (2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Técnicas moleculares para el diagnóstico de bacterias

Las bacterias implicadas en brotes o casos aislados, han sido identificadas por métodos tradicionales para obtener su género, especie, biotipo, resistencia a los antibióticos, fagotipo o serotipo, estas determinaciones fenotípicas se basan en el análisis de enzimas, toxinas y otros productos de los genes que pueden requerir largo tiempo, pero en ocasiones es preciso una identificación rápida del agente etiológico y su subtipificación con fines epidemiológicos por métodos moleculares, los cuales permiten identificar los genes que codifican para alguna característica en particular que puede ser considerada como marcador y determinar la interrelación de las clonas, así como su origen y cambios a nivel genético por medio de la biología molecular ^{13,14}.

El diagnóstico por biología molecular permite evidenciar la presencia del agente etiológico, aún cuando este ya no es viable o no se ha aislado e identificado por cultivo microbiológico; ya que para ello se requiere de los ácidos nucleicos. Sin embargo, es primordial que al realizar el análisis se cuente con los testigos apropiados, ya que éstos son los únicos que pueden dar validez al diagnóstico ¹⁴.

La biología molecular estudia el gene y cualquier suceso biológico desde el punto de vista de su estructura y función en el contexto molecular. Los genes están constituidos por moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) ¹⁵.

La composición genética de cada microorganismo tienen una secuencia única de nucleótidos en su genoma que los distinguen de otras especies de manera semejante a una huella y que puede usarse para su identificación mediante el uso de técnicas de biología molecular, cuya metodología se basa en la característica de homología y complementaridad que hay entre las cadenas de DNA de los ácidos nucleicos. La molécula de DNA de doble cadena se puede desnaturalizar y separar en cadenas sencillas por calentamiento o por adición de sustancias como el hidróxido de sodio y posteriormente se renaturaliza bajo condiciones adecuadas ^{13,14}.

Las pruebas de biología molecular utilizadas para estudios genéticos se pueden clasificar como: a) estudios de hibridación y b) técnicas que implican la amplificación de secuencias nucleotídicas. Estas pruebas son de gran utilidad para poner de manifiesto a las toxinas producidas por las bacterias, siendo en este caso la de *V. cholerae*.

2.1 Técnicas de hibridación

La hibridación es la unión de dos cadenas individuales complementarias de ácido nucleico de diferente origen en donde una de ellas puede estar adherida a un soporte sólido. Las cadenas se unen para formar una molécula de doble cadena estable y permanecer unidas. Con este fin se pueden unir las secuencias complementarias de cadenas de DNA-DNA, DNA-RNA y de RNA-RNA donde la estabilidad de la hibridación dependerá de la homología entre la secuencia nucleotídica de las cadenas y las condiciones de hibridación

^{16,17}

Para que una reacción de hibridación se desarrolle adecuadamente, debe estar constituida por los siguientes componentes: la sonda, el sitio blanco que está contenido en la muestra, la molécula reportera y el método de hibridación.

Con fines diagnósticos la hibridación se realiza entre el DNA blanco o molde que se encuentra en la muestra y un fragmento de DNA de secuencia conocida la cual es denominada sonda.

Las sondas son piezas de ácido nucleico, marcado, que puede buscar y unirse a largas cadenas de DNA o RNA que tienen secuencias complementarias (las moléculas de adenina (A) son las bases complementarias de las timinas (T) y los residuos de citosina (C) se complementan con la guanina (G). El RNA tiene uracilo (U) y no T por lo tanto en el caso de las sondas de RNA la hibridación se efectuará entre U-A y C-G ¹⁶.

2.2 Tipos de hibridación.

Las reacciones de hibridación pueden efectuarse:

1. En fase sólida como soporte
 - a) Transferencia del DNA de colonias, "colony blot"
 - b) Transferencia del DNA de una gota de cultivo, "dot Blot"
 - c) Transferencia del DNA que ha sido cortado previamente con enzimas de restricción y sometido a electroforesis en gel, "Southern blot"

- d) Transferencia del RNA que ha sido cortado previamente con enzimas de restricción y sometido a electroforesis en gel, "Northern blot"
2. En fase líquida o solución como la reacción de polimerización en cadena (PCR)
3. *In situ* en tejidos

2.2.1 Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* se realiza en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. Esta técnica es útil principalmente en microorganismos patógenos intracelulares como los virus, con la ventaja que se pueden realizar simultáneamente la técnica citológica en el tejido, con la presencia del agente infeccioso que también puede ser detectado con una sonda específica marcada con peroxidasa o fosfatasa alcalina ¹³.

Para el análisis de exotoxinas se cuenta con pruebas *in vivo*. Estos ensayos tienen la ventaja de ser muy sensibles, ya que algunos son capaces de detectar picogramos (pg) de toxina, además se puede estudiar y observar el mecanismo de acción de la toxina y los factores que interactúan en un sistema viviente de forma semejante a lo que se presenta en la naturaleza, pero tienen la desventaja de que se requieren días para ver los resultados, además de contar con los medios necesarios para la crianza y mantenimiento de los animales de experimentación ^{4,18}.

Entre los ensayos *in vivo* se encuentran los siguientes:

- ♦ Asa ligada de conejo adulto
- ♦ Conejo lactante
- ♦ Permeabilidad vascular (conejo)
- ♦ Inoculación intragástrica en ratón lactante
- ♦ Ratón sellado
- ♦ Asa ligada expuesta
- ♦ Perfusión en rata
- ♦ Toxemia en conejo

II. Fundamento del método

Las técnicas de biología molecular tienen aplicación en los estudios de microorganismos, para mejorar y facilitar su caracterización molecular.

Hibridación en fase sólida

La hibridación en fase sólida, se basa en la unión de dos cadenas individuales homólogas y complementarias de ácido nucleico de diferente origen que se unen para formar una molécula de doble cadena estable, que permanecen unidas, sobre una membrana de nylon o nitrocelulosa que sirve como soporte sólido.

La muestra puede ser DNA de una colonia, DNA purificado, una suspensión de microorganismos aislados en cultivo puro o una muestra clínica. El ácido nucleico en la muestra es referido como el DNA o RNA blanco, y la sonda marcada, cuya marca puede ser radioactiva (con un radioisótopo) o no radioactiva (una enzima, digoxigenina, biotina), y es lo que se conoce como molécula reportera ^{13,17}.

Dentro de la hibridación en fase sólida se encuentra la de "Southern blot", en la cual el DNA purificado se rompe con endonucleasas de restricción y los fragmentos son separados por su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa. El DNA del gel de agarosa es transferido a la membrana por vacío en donde queda adherido; fijándose permanentemente al filtro para ser hibridado ¹⁹.

La técnica de "Southern blot" se aplica para la subclasificación de cepas bacterianas como es la ribotipificación.

La ribotipificación es un método molecular que se utiliza para tipificar y analizar directamente el DNA o RNA de los microorganismos involucrados en un brote o para estudiar su relación filogenética, mediante el uso de enzimas de restricción para obtener fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) según su diversidad genética y este patrón se puede verificar con "Southern blot" técnica donde se comprueba la especificidad de algunos fragmentos mediante la hibridación con sondas específicas ^{19,20}.

Los sistemas de tipificación están aumentando en importancia para caracterizar a las bacterias involucradas en brotes y determinar la fuente y vehículo de transmisión.

Hibridación en fase líquida

En este procedimiento tanto el DNA molde y la sonda se encuentran libres y en movimiento aumentando la probabilidad de que las secuencias complementarias se alinien y unan. La hibridación en solución se efectúa de 5 a 10 veces más rápido que en fase sólida

¹⁴.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación o síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un fragmento específico de DNA, que son característicos del organismo a identificar. La metodología muestra tres etapas principales ^{13,21}.

- I. La preparación de la muestra y la obtención del DNA de referencia y problema.
- II. La síntesis que requiere de iniciadores específicos, en este caso se emplean los oligonucleótidos, derivados de los genes que codifican para la producción de toxina.
- III. La electroforesis en gel de agarosa para evidenciar el gen amplificado.

En la PCR, la DNAPolimerasa usa el principio de síntesis de la cadena complementaria de DNA en dirección 5' a 3' usando un DNA molde de cadena sencilla, empezando en una región de doble cadena; por lo que se requiere conocer la secuencia nucleotídica de los sitios que circundan a la región por amplificar y, con base a ella, sintetizar dos pequeños oligonucleótidos de aproximadamente 20 nucleótidos, cada uno complementario a cadenas opuestas de la región de DNA. Los oligonucleótidos se unen a su segmento complementario dentro del DNA molde creando la región de doble cadena necesaria para el inicio de la síntesis del DNA *in vitro*, por lo que se les llama iniciadores ^{21,22}.

Los requerimientos de la reacción son simples: desoxinucleótidos (dNTP) que proveen la energía para la síntesis de DNA, la DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que permite el uso de altas temperaturas para la desnaturalización, el alineamiento y la extensión; los iniciadores; el DNA molde, todo en una solución amortiguadora que contiene cloruro de magnesio ²².

Inicialmente, se desnaturaliza por calentamiento al DNA molde, cuando la temperatura baja, los iniciadores se alinean con su secuencia complementaria en el DNA molde. Inmediatamente después, la DNA polimerasa se ancla al complejo de doble cadena iniciador – DNA molde, y entonces extrae dNTPs libres del medio y hace la extensión a lo largo de la hebra de DNA en el sentido 5' a 3'. En este primer ciclo de síntesis se producen nuevas cadenas de longitud indeterminada que, como las cadenas originales, pueden hibridar con los iniciadores tras la desnaturalización y el alineamiento ^{22,23}.

Con cada ciclo de desnaturalización, alineamiento y extensión, la cantidad de este producto se duplica subsecuentemente, acumulándose exponencialmente así que teóricamente, "n" ciclos resultan en una amplificación de 2^n veces del producto discreto como se puede ver en la figura 4^{22,23}.

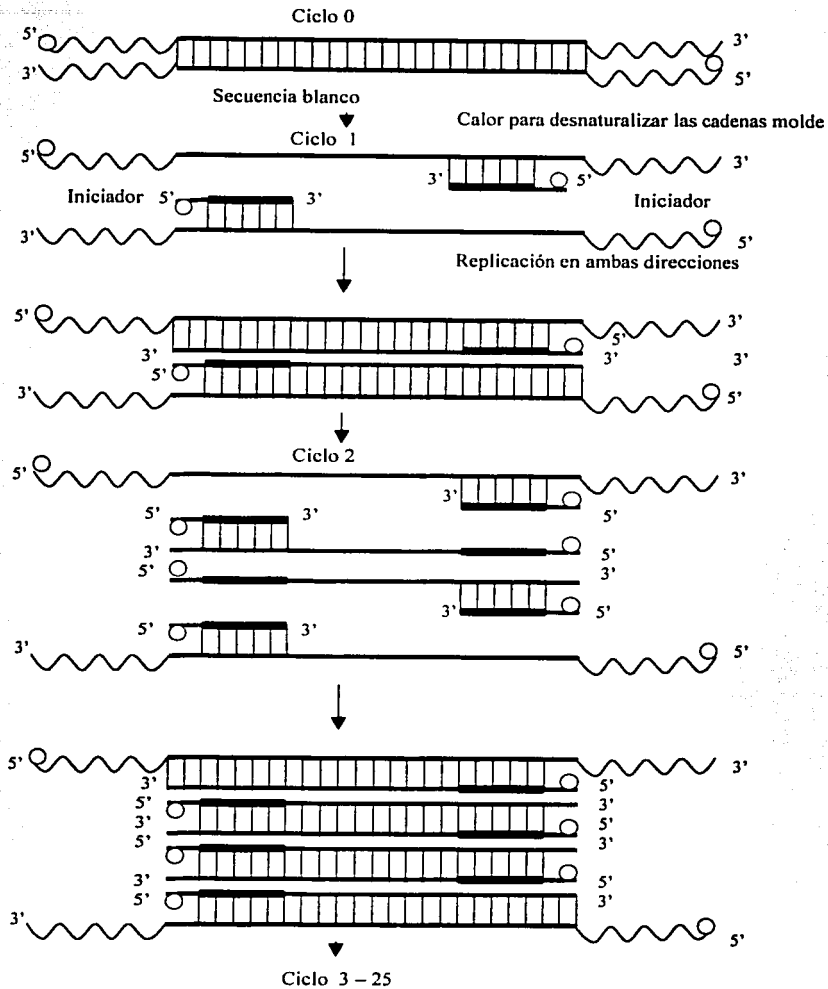


Figura 4. Mecanismo de la reacción de polimerización en cadena. Cada ciclo consta de tres pasos: Separación de la hebra molde, hibridación y extensión de los iniciadores. Modificado de: White T. J. y col. 1992 (24).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de 1991, en México se presentaron infecciones gastrointestinales causadas por *Vibrio cholerae* O1, aumentando el número de casos para 1995 y disminuyendo el número a partir de 1996 hasta el 2000.

Durante la epidemia se presentaron cepas de *V. cholerae* O1 con fenotipo correspondiente a los serotipos Ogawa e Inaba y genotípicamente a los ribotipos 5 y 6a, por lo que es importante determinar actualmente la presencia del serogrupo O139; ya que además se cree que *V. cholerae* se mantiene en un estado de "latencia" ya que permanece en el ambiente, en el esqueleto de los copépodos microscópicos lo que se conoce como *Vibrio* viable no cultivable, por lo que se debe mantener una vigilancia sanitaria y evitar un nuevo brote causado por O1 o bien ahora causado por *Vibrio cholerae* O139 que pudiera llegar a provocar una epidemia que afecte al país, ya que esta cepa puede causar el mismo daño que *V. cholerae* O1.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar y comparar el fenotipo y genotipo de cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no O1 de origen ambiental y humano para descartar la posible presencia del serogrupo O139.

PARTICULARES

- Caracterizar cepas de *V. cholerae* de origen ambiental y humano presuntivamente serotipo O139 mediante técnicas moleculares.
- Buscar mediante la prueba de PCR la presencia de *V. cholerae* O139.
- Determinar la toxicidad de las cepas de *V. cholerae* en cultivo de células Vero y CHO.
- Poner de manifiesto la presencia de genes para la toxina colérica, zot y ace en cepas de *V. cholerae* O1 y no O1.
- Determinar el patrón de ribotipos de las cepas de *V. cholerae*.

V. HIPÓTESIS

Existe relación entre el fenotipo y genotipo toxigénico de *V. cholerae*.

Las cepas de *V. cholerae* O1, O139 y otros vibrios no O1 tienen la misma capacidad toxigénica en células Vero y CHO.

Las cepas O139 presentan un esquema de ribotipificación semejante a las de *Vibrio cholerae* O1.

En México hay circulando cepas de *V. cholerae* O1 que tienen ribotipos diferentes al ribotipo 5 y ribotipo 6a.

VI MATERIAL Y METODO

Material biológico:

- Cepas de referencia:
Vibrio cholerae: no O1, O139, 6706, 2514-88, 299
Escherichia coli: H10407, O157:H7
- Cepas problema de *Vibrio cholerae* no O1 y *V. cholerae* O1

Medios de cultivo

- Placas con TCBS (agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa)
- Tubos con agar base sangre (BAB)
- Placas con agar base sangre (BAB)
- Tubos con caldo Craig
- Tubos con caldo Mueller Hinton
- Tubos con medio: LIA, TSI, MIO, arginina, caldo peptonado

Material

- Asas bacteriológicas
- Mechero Fisher
- Probetas de 10, 25, 50, 250, 500 y 1000 mL
- Micropipetas de 1, 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L
- Pipetas desechables 2, 5 y 10 mL
- Microtubos de 0.2, 0.5 y 1.5 mL
- Puntas de plástico para micropipeta
- Refractario de vidrio rectangular
- Matraz kitasato de 1L

- Papel filtro
- Bolsas de plástico (al tamaño aproximado de la membrana)
- Papel parafilm
- Membrana de Nylon
- Pinzas de disección
- Placas de propileno con 96 pozos
- Hielo

EQUIPO

- Estufa incubadora a 37°C, "Thelco Model 6"
- Baño de agua a 65°C, "Blue M Electric Company"
- Parrilla de agitación y calentamiento, "Corning"
- Balanza analítica digital, "Chyo Balance"
- Horno de luz ultravioleta, "Bio-Rad 6s Gene Linker"
- Horno de microondas "Goldstar"
- Agitador eléctrico de movimiento oscilatorio y temperatura graduable, "Lab-Line Orbit Environ-Shake"
- Equipo de electroforesis con cámara y fuente de poder, "Bio Rad Model 200/2.0"
- Agitador vortex, "Genie 2 VWR"
- Termociclador para PCR, "Gene AMP. System 2400 Perkin Elmer"
- Microcentrífuga, "Hermle 2230 MA"
- Centrifuga, "Hermle Z52 MK"
- Bomba de vacío, "Gast MFG. Corp"
- Posiblot (para transferir DNA por presión al vacío)

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Para serología

- Antiseros polivalentes somáticos "O" (O1 y O139)
- Antisuero específico (Inaba y Ogawa)
- Solución salina

Para PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

- Agua destilada filtrada y esterilizada
- Regulador 10X para la enzima Taq polimerasa
- $MgCl_2$ (25 mM)
- dNTP's : A,G,C,T (1 μ mol)
- Iniciadores de O139, ERIC, CTX A, CTX B, ZOT y ACE
- Enzima Taq polimerasa (5U/ μ L)
- Vaselina

Para electroforesis

- Regulador de corrimiento 10X (anaranjado de metilo o azul de bromofenol)
- Solución de bromuro de etidio de 10 mg/mL
- Marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y fago Fi 174
- Agarosa tipo II

Para extracción de DNA

- Agua destilada, filtrada y estéril para preparar soluciones.

- EDTA di sódico 2H₂O
- Tris 1M-HCl pH8.
- Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH8.
- Regulador TAE 50X (Tris acetato EDTA)
- NaCl 3M.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %.
- STE: Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 10mM pH8, NaCl 150mM.
- TE 10X: Tris-HCl 100mM pH8, EDTA 10mM pH8.
- RNAsa 10 mg/mL en agua.
- Lisozima 100 mg/mL en agua.
- Proteinasa K 10mg/mL en agua.
- Fenol.
- Cloroformo: alcohol isoamflico.
- Etanol al 70%.
- Gel de agarosa 0.7-2.0% en TAE 1X

Para digerir el DNA (Ribotipos)

- Regulador de enzima 10X
- Enzima *Bgl*I (10 U/μL)

Para lavar el gel

- Ácido clorhídrico 1N
- Hidróxido de sodio 10N
- Cloruro de sodio 3M
- SSC 10X

Para hibridación y revelado de la membrana

- Solución de prehibridación
- Sonda de RNA marcada con digoxigenina
- Sonda de marcador de peso molecular
- Solución de lavado A
- Solución de lavado B
- Amortiguador 1
- Amortiguador 2
- Amortiguador 2 + antidigoxigenina (anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina)
- Amortiguador 3
- Amortiguador 3 + nitro azul de tetrazolio (NBT) + 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato (BCIP)

Para sanitizar y desactivar desechos

- Mezcla de etanol-benzal 1:1
- Solución de hipoclorito de sodio al 13 %

Método estadístico

- Mínimos cuadrados. Formulas estadísticas:

$$\log y = a + bx$$

$$\Sigma \log y = n \log a + \Sigma x b$$

$$\Sigma x \log y = \Sigma x \log a + \Sigma x^2 b$$

A. SELECCIÓN DE CEPAS

Se estudiaron 25 cepas de *V. cholerae*: 13 no O1; 10 ambientales aisladas de alimentos y aguas negras, 3 aisladas de humanos y 12 de *V. cholerae* O1 aisladas de humanos.

El diagrama de la figura 5 resume la metodología que se describe más adelante.

- **Criterios de inclusión:** cepas de *V. cholerae* O1 de ribotipos diferentes al 5 y 6 a de humanos y *V. cholerae* no O1 aisladas de casos de diarrea y ambientales que se conozca la información de origen, lugar y año de aislamiento.
- **Criterios de exclusión:** cepas de *V. cholerae* O1 de ribotipos 5 y 6 a.
- **Criterios de eliminación:** cepas de *V. cholerae* sin información sobre el año y lugar de aislamiento.

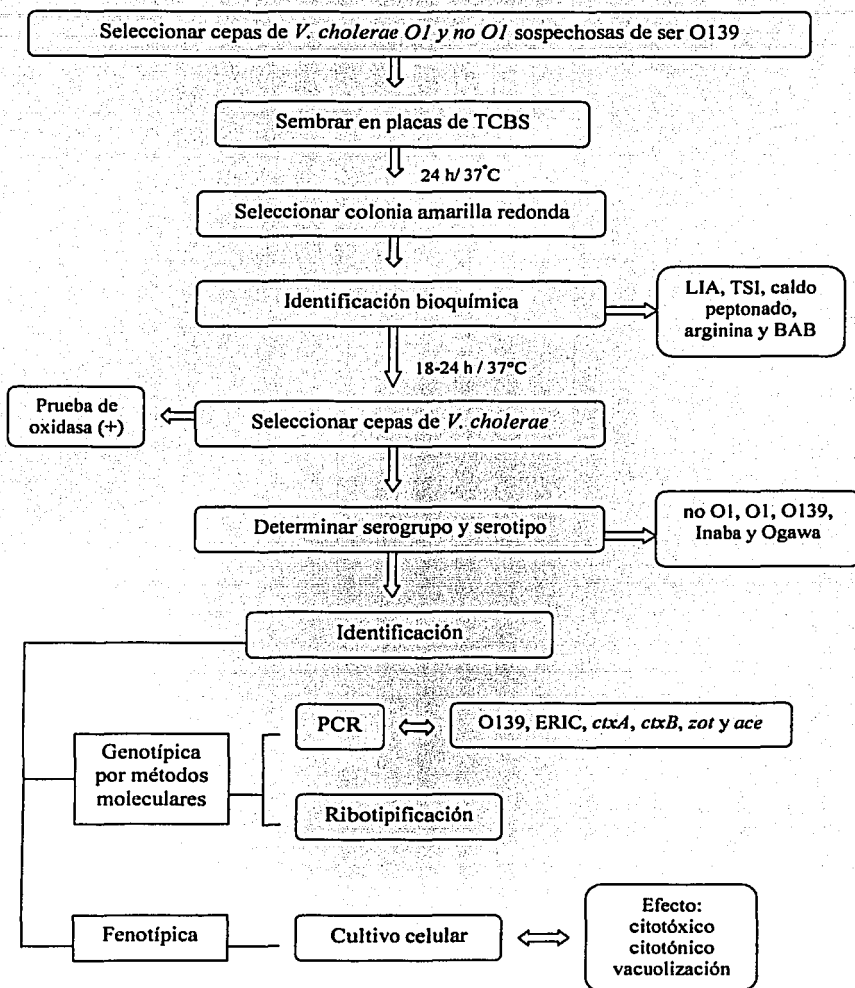


Figura 5. Diagrama de flujo para el estudio de cepas de *Vibrio cholerae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. SEROLOGÍA

Las cepas se sembraron en una placa de agar base sangre. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se prepararon suspensiones densas de cada una de las cepas, utilizando 50 µL de solución salina.

Se hicieron las reacciones de aglutinación colocando en un portaobjetos una gota de los antisueros polivalentes "O"; *V. cholerae* O1, O139 y los antisueros específicos Inaba y Ogawa con una gota de la suspensión de cada cepa. Rotando el portaobjetos por un minuto.

Se observó la presencia o ausencia de grumos (aglutinación).

C. REACCION DE POLIMERIZACIÓN EN CADENA (PCR)

Cada cepa se sembró en placas de medio BAB por estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Se resuspendió en 200µL de agua destilada, filtrada y estéril 1 ó 2 colonias aisladas.

Los tubos se sometieron a ebullición en baño maría por un periodo de 20 ó 30 minutos y después se colocaron en baño de hielo hasta su procesamiento.

Por separado en un microtubo para cada muestra se preparó una mezcla de reacción que contenía: agua, regulador para PCR, MgCl₂, desoxinucleótidos (dNTP's), iniciadores, enzima Taq polimerasa, vaselina estéril y la muestra previamente hervida y enfriada.

Se homogenizó y centrifugó cada uno de los tubos. La tabla 2 indica las condiciones en las que se realizó la PCR.

Los tubos se colocaron en el termociclador con el programa correspondiente como se observa en la tabla 3.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2 % ó al 1.5 % dependiendo del número y tamaño de bandas obtenidas por PCR, ya que para *ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace* y O139 se emplearon geles al 2 % y en ERIC-PCR, los geles fueron al 1.5 %

D. CULTIVO CELULAR

Las cepas se inocularon en 1mL de caldo Craig y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante y se colocaron en baño de hielo.

En forma paralela se observó la confluencia de las células Vero y CHO en la microplaca de 96 pozos.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad. Agregando al pozo 20µL del sobrenadante con la toxina libre de bacterias y 180µL de medio MEM, realizando dilución hasta el sexto pozo.

Se observó la placa inmediatamente después de adicionar la toxina.

Se incubó a 37°C con atmósfera parcial de CO₂.

Se observó el efecto de citotoxicidad luego de 24 horas de incubación.

Tabla No 2. Condiciones de amplificación de genes de *Vibrio cholerae*, sometidos a las reacciones de polimerización en cadena

REACTIVO	GENES AMPLIFICADOS					
	O139 (μ l)	<i>ctxA</i> (μ l)	<i>ctxB</i> (μ l)	<i>zot</i> (μ l)	<i>ace</i> (μ l)	ERIC (μ l)
Agua	10.0	11.0	11.0	2.5	0.5	70.5
Regulador 10X	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	10.0
MgCl ₂ (25 mM)	3.0	4.0	4.0	4.0	10.0	10.0
dNTPs (1 μ M)	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	5.0
Iniciador 1 *	O139 1	<i>ctx</i> 3	<i>ctx</i> 7	<i>zot</i> 1	<i>Ace</i> 1	<i>eric</i> 1
	2.0 (6.25 pg)	1.0 (100 pg)	1.0 (31.25 pg)	4.0 (50 pg)	2.0 (25 pg)	2.0 (50 pg)
Iniciador 2 *	O139 2	<i>ctx</i> 2	<i>ctx</i> 9	<i>zot</i> 2	<i>Ace</i> 2	<i>eric</i> 2
	2.0 (6.25 pg)	1.0 (100pg)	1.0 (31.25 pg)	4.0 (50 pg)	2.0 (25 pg)	2.0 (50 pg)
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5
DNA (10 ⁵ -10 ⁶ bact/mL)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vaselina	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

O139 : serogrupo O139

ctxA : subunidad A de la toxina colérica

ctxB : subunidad B de la toxina colérica

zot : toxina zonula occludens

ace : toxina: accesory cholera enterotoxin

ERIC : enterobacterial repetitive intergenic consensus

* : concentración final del iniciador

TESS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No 3. Programa de amplificación para las reacciones de polimerización en cadena

PCR	O139		ERIC		<i>ctxA, ctxB, ace, zot</i>	
Número de ciclos	30 ciclos*		35 ciclos*		30 ciclos*	
	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura
Preparación	1 min	94 °C	3 min	94 °C	3 min	94 °C
Desnaturalización*	30 seg	94 °C	45 seg	94 °C	30 seg	94 °C
Hibridación*	30 seg	55 °C	1 min	52 °C	30 seg	55 °C
Alargamiento*	1 min	72 °C	10 min	72 °C	1 min	72 °C
Terminación	7 min	72 °C	20 min	72 °C	7 min	72 °C

O139 : serogrupo O139

ERIC : enterobacterial repetitive intergenic consensus

ctxA : subunidad A de la toxina colérica

ctxB : subunidad B de la toxina colérica

zot : toxina zonula occludens

ace : toxina: accessory cholera enterotoxin

* : fases del ciclo

E. RIBOTIPIFICACIÓN

i. Extracción del DNA genómico

Se sembraron masivamente las cepas en placas con agar BAB y se incubó a 37°C por 24 horas.

Todo el crecimiento se transfirió a un microtubo de 1.5 mL con 1mL de solución de STE y se agitó en vortex hasta homogenizar.

Se centrifugó 5 minutos a 10 500 rpm a 4°C. Eliminando el sobrenadante.

El paquete se resuspendió en 500 µL de TE 10X, y se adicionaron 10 µL de lisozima dejando reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente se añadieron 200 µL de SDS al 10%. Se agitó por inversión manual y se incubó a 65°C por 15 minutos.

Se adicionaron 20 µL de RNAsa y se dejó incubando 10 minutos a temperatura ambiente.

Se agregaron 40 µL de Proteinasa K y se incubó a 65°C de 30 minutos a 2 horas.

Se adicionaron 2 volúmenes de fenol y se agitó por inversión 5 minutos.

Se centrifugó a 10 500 rpm por 8 minutos a 4°C.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se repitieron los dos pasos anteriores.

Nuevamente se transfirió la fase acuosa a otro tubo, y se adicionaron dos volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico. Se mezcló por 5 minutos suavemente y por inversión.

Se centrifugó a 10 500 rpm por 8 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.

Se adicionaron 150 µL de NaCl 3M (frío).

El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol frío al 70%, invirtiendo suavemente el tubo hasta que el DNA formó grumos visibles.

Los tubos se centrifugaron a 11 000 rpm por 20 minutos a 4°C.

Se decantó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente por cerca de 2 horas, después se rehidrató con 60 µL de agua destilada, filtrada y estéril.

Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa para verificar la pureza y calidad de cada DNA.

ii. Digestiones

En un tubo para microcentrífuga se colocaron 30 µL de agua destilada, filtrada y estéril; 4µL del regulador de enzima; 2 µL de enzima *Bgl* I (10 U/µL) diluida 1:2 y 4µL de DNA. Se agitó y se centrifugó por 5 segundos y se incubó a 37°C por 16 a 24 horas.

Se realizó electroforesis en gel con TAE al 0.8% para verificar si hubo digestión.

iii. Electroforesis y preparación del gel para la transferencia del DNA de gel a membrana.

Se hizo un gel de agarosa de 18 x 22 cm al 0.8% de TAE con 20 pozos.

En el primer pozo se colocaron 5 µL del MPM (1kb) y 3 µL de amortiguador de corrimiento.

Posteriormente en cada pozo se colocó el digerido de cada muestra más 3 µL de amortiguador de corrimiento.

Se corrió el gel de 16 a 18 horas aproximadamente a 60V.

El gel de agarosa se colocó en un refractario.

Sobre el gel se vertieron 250 mL de HCl 0.25 M y se dejó por 5 minutos.

Se eliminó toda la solución anterior y se lavó 2 veces con agua destilada.

Para desnaturalizar el DNA se añadieron 250 mL de una solución de NaOH 0.5M y NaCl 1.5M, y se dejó por 30 minutos posteriormente se desechó la solución.

El gel se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0.5 M; NaCl 0.5 M por 30 minutos y se eliminó.

iv. "Southern Blot" (transferencia del DNA)

Se preparó una solución 10X de SSC a partir de la solución 20X de SSC [NaCl, citrato de sodio, a pH 7].

En un refractario, se colocó una esponja y se humedeció con la solución 10X de SSC al igual que el papel filtro y la membrana de Nylon previamente cortados.

En el Posiblot primero se colocó una parte del papel filtro húmedo, sobre éste la membrana y sucesivamente la máscara de plástico.

El gel se colocó sobre la máscara de plástico y se sellaron los pozos con agarosa, sobre el gel se colocó una porción de papel filtro seguido de la esponja.

Se realizó la transferencia del DNA por vacío manteniendo una presión de 70 mmHg durante una hora.

La membrana se fijó en una cámara de UV con dos ciclos de 150 mJoule.

v. Hibridación

Después de la fijación, la membrana se colocó en una bolsa de plástico, y se vertieron 25 mL de solución de prehibridación, dejando incubar a 65°C por una hora en baño de agua y se desechó la solución.

Se añadieron 25 mL de líquido de sonda marcada con digoxigenina y se incubó a 65°C toda la noche en baño de agua.

Al día siguiente se retiró la sonda y se guardó para su reuso.

Después se adicionó la sonda del marcador de peso molecular e incubó por 2h a 65°C en baño de agua.

La sonda del MPM se retiró y guardó para su reuso.

Se retiró la membrana de la bolsa y se lavó con solución A, por 5 minutos repitiendo una vez más.

La membrana se lavó con 125mL de solución B, colocando en baño de agua junto con el refractario a 65°C por 15 minutos, se desechó la solución, y se repitió una vez más.

Enseguida se lavó con 50 – 100 mL de amortiguador 1, por un minuto.

Se añadieron 200 mL de amortiguador 2 conteniendo el reactivo bloqueador por 30 minutos.

Se adicionaron 16 µL del anticuerpo (antidigoxigenina) y se incubó a temperatura ambiente y con agitación por otros 30 minutos. Posteriormente se eliminó toda la solución.

La membrana se lavó con 100 mL de amortiguador 1 por 15 minutos con agitación y se eliminó el amortiguador.

Se reveló con amortiguador 3 conteniendo 180 µL de azul de nitrotetrazolio (NBT) y 140 µL de 5 bromo-5 cloro indoil fosfato (BCIP) dejando incubar a temperatura ambiente en la oscuridad hasta aparición de las bandas.

Por último se quitó la solución, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar.

VII. RESULTADOS

Se estudiaron 25 cepas de *Vibrio cholerae* provenientes de 13 estados de la República Mexicana. 13 cepas de *V. cholerae* no O1 de las cuales 6 fueron aisladas de alimentos, 4 de aguas negras, 3 de humanos y 12 cepas de *V. cholerae* O1 aisladas de humanos. De los años de 1991, 1992, 1994 y 1999 por serología 13 fueron Inaba, 4 Ogawa, 6 *V. cholerae* No O1 y 2 *V. cholerae* O139 como lo muestra la tabla 4.

Los resultados de la PCR para la búsqueda de los genes *ctxA* y *ctxB* de la toxina colérica, resultaron negativos en las 13 cepas de *V. cholerae* no O1, dos de ellas positivas en la PCR de O139; lo que indica que estas dos cepas aún siendo O139 no presentan los genes para producir toxina colérica. La tabla 5 y figura 6, 7, 8 y 9 se presentan los resultados obtenidos.

La tabla 6 indica los resultados de la PCR de las cepas de *V. cholerae* O1 en las que 7 fueron positivas a los genes *ctxA* y *ctxB* que codifican para la toxina colérica, así como a los genes *zot* y *ace* y 4 negativas a los 4 genes.

En la ERIC-PCR de la figura 10 y 11 se muestran el número de bandas amplificadas de *V. cholerae* no O1 y O1, en el que se observan un mayor número de ellas en las cepas de *V. cholerae* O1 que en las no O1. En ambos casos se puede observar la presencia de dos bandas con peso molecular de 603 y 310 pb que se mantienen constantes tanto en las cepas toxigénicas y no toxigénicas de *V. cholerae* O1 y las no O1.

Tabla No 4. Origen, año de aislamiento y serología de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no O1

Cepa	Procedencia	Año de recepción	Origen de la muestra	Serología
78	Michoacán	1999	Aguas negras	Inaba
267	Hidalgo	1991	Humano	Ogawa
937	Colima	1999	Aguas negras	Ogawa
1105	Guadalajara	1999	Alimentos	Vc no O1
1110	Guadalajara	1999	Alimentos	Vc no O1
1236	Tamaulipas	1999	Humano	Vc O139
1442	Guadalajara	1999	Alimentos	Ogawa
1501	Guadalajara	1999	Alimentos	Vc no O1
2123	Sinaloa	1999	Aguas negras	Inaba
2124	Sinaloa	1999	Aguas negras	Inaba
2143	Querétaro	1999	Aguas negras	Vc no O1
2868	Campeche	1999	Aguas negras	Vc O139
7915	Zacatecas	1991	Humano	Vc no O1
16893	Veracruz	1992	Humano	Inaba
17176	Veracruz	1992	Humano	Ogawa
17852	Veracruz	1992	Humano	Inaba
17862	Veracruz	1992	Humano	Inaba
17865	Veracruz	1992	Humano	Inaba
18150	Tabasco	1992	Humano	Inaba
21133	Veracruz	1992	Humano	Inaba
23203	Guerrero	1992	Humano	Inaba
50145	Colima	1993	Humano	Vc no O1
52036	Sinaloa	1993	Humano	Inaba
54554	Sinaloa	1994	Humano	Inaba
54708	Guanajuato	1994	Humano	Inaba

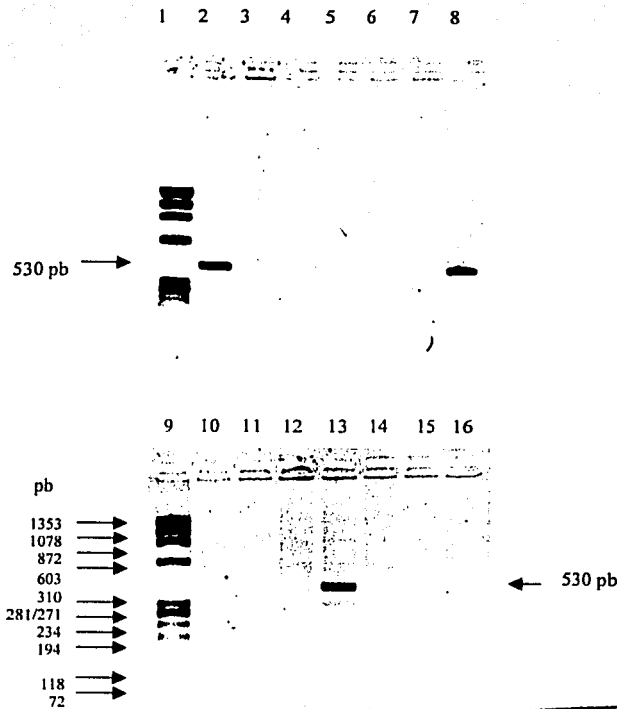
Vc : *Vibrio cholerae*

Tabla 5. Presencia de genes asociados a serogrupo y toxigenicidad en cepas de *Vibrio cholerae* no O1 sometidas a PCR

Cepa	Reacción de Polimerización en Cadena					ERIC
	O139	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>zot</i>	<i>ace</i>	
Vc noO1 *	-	-	-	-	-	3b
O139 *	+	+	+	+	+	7b
6706 (O1) *	-	+	+	+	+	9b
299 (O1) *	-	+	+	+	+	4b
2514-88(O1) *	-	+	+	+	+	7b
78	-	-	-	*	*	2b
937	-	-	-	*	*	3b
1105	-	-	-	*	*	3b
1110	-	-	-	-	-	3b
1236	+	-	-	-	-	3b
1442	-	-	-	*	*	2b
1501	-	-	-	-	-	-
2123	-	-	-	*	*	1b
2124	-	-	-	*	*	3b
2143	-	-	-	*	*	-
2868	+	-	-	-	-	2b
7915	-	-	-	-	-	*
50145	-	-	-	-	-	10b

- = negativo
- + = positivo
- * = no se realizó el estudio
- b = número de bandas
- O139 = serotipo O139
- ctxA* = subunidad A de la toxina colérica
- ctxB* = subunidad B de la toxina colérica
- zot* = toxina zonula occludens
- ace* = accessory cholera enterotoxin
- ERIC = enterobacterial repetitive intergenic consensus
- = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. PCR para búsqueda de *Vibrio cholerae* O139

Carril: 1. Φ 174 *Hae*/III**; 2. *Vibrio cholerae* O139; 3. *Vibrio cholerae* no O1*; 4. 6706*; 5. 1442; 6. 1501; 7. 937; 8. 2868; 9. Φ 174 *Hae*/III**; 10. 2143; 11. 2124; 12. 2123; 13. 1236; 14. 1110; 15. 1105; 16. 78.

** : Marcador de peso molecular, pb: pares de bases * Cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

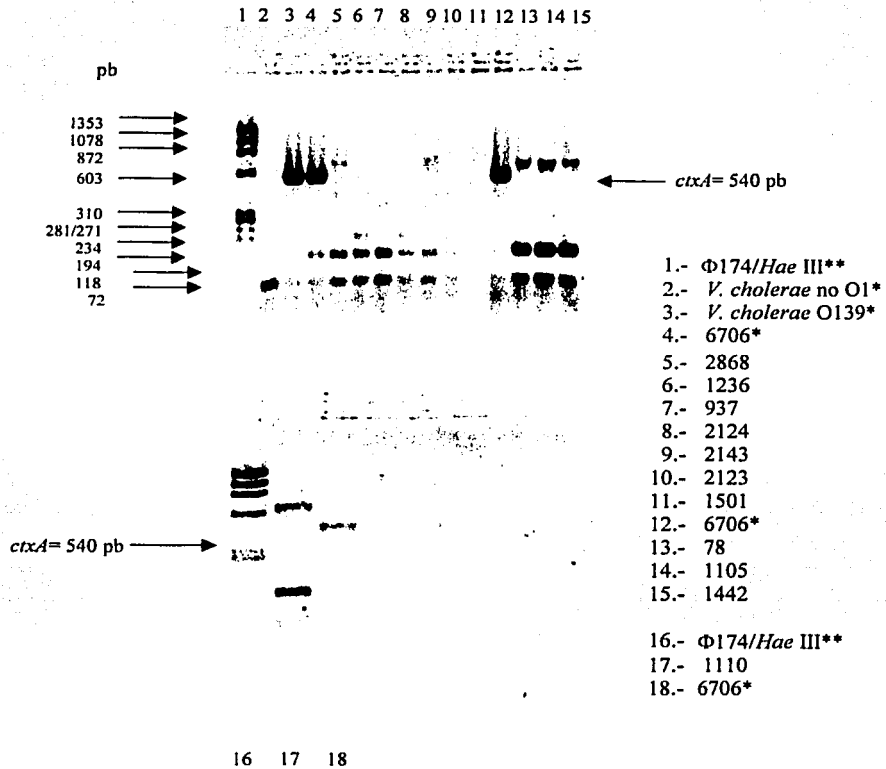
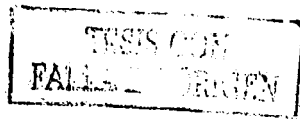


Figura 7. PCR para la búsqueda del fragmento del gene que codifican para la subunidad A (*ctxA*) de la toxina colérica en cepas de *Vibrio cholerae* no O1
 ** Marcador de peso molecular, pb: pares de bases * Cepas de referencia de *Vibrio cholerae*



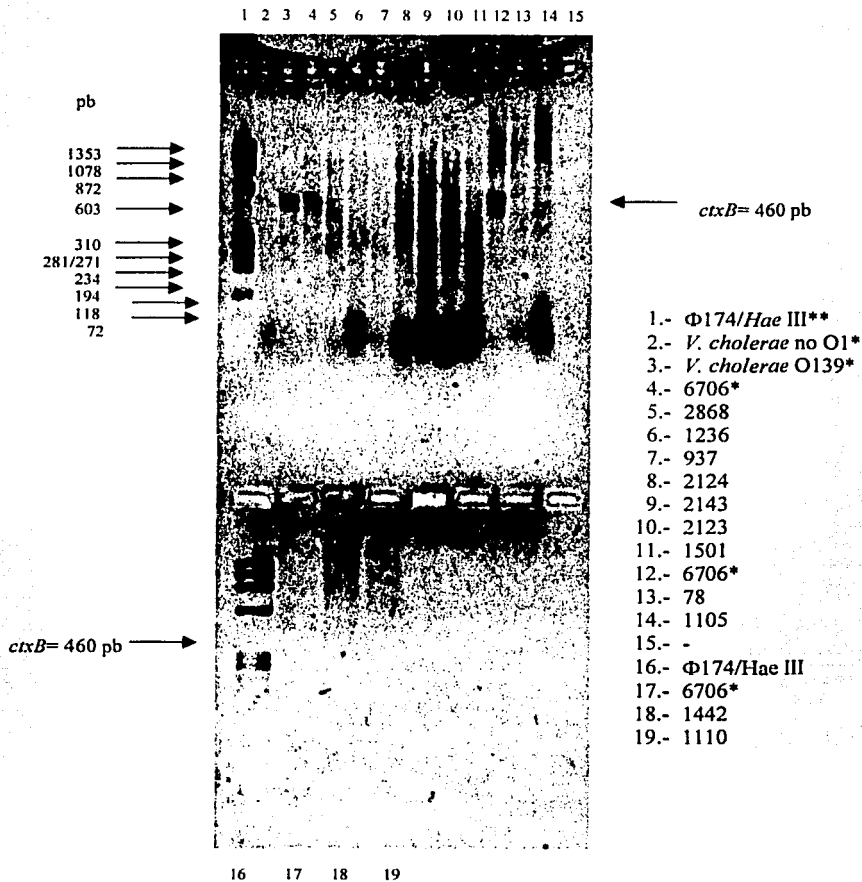


Figura 8. PCR para la búsqueda del fragmento de gene que codifican para la subunidad B (*ctxB*) de la toxina colérica de las cepas de *Vibrio cholerae*

** Marcador de peso molecular, pb: pares de bases * Cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

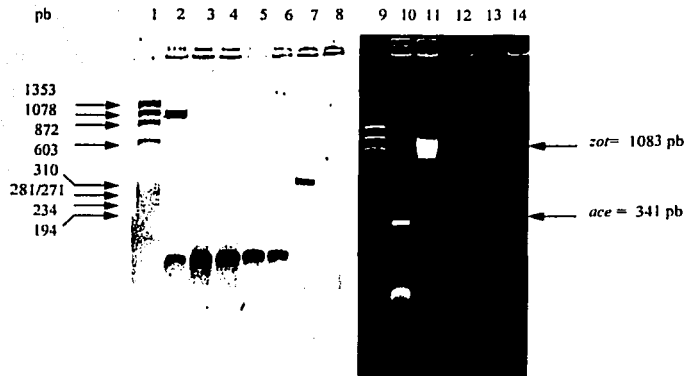


Figura 9. PCR para la búsqueda del fragmento de gene que codifica para las toxinas *zot* y *ace* de las cepas de *Vibrio cholerae* no O1

Carril: 1.- Φ 174 *Hae*/III**, 2.- 6706* (*zot*), 3.- 1110 (*zot*), 4.- 1236 (*zot*), 5.- 1501 (*zot*), 6.- 2868 (*zot*), 7.- 6706* (*ace*), 8.- 1110 (*ace*), 9.- Φ 174 *Hae*/III**, 10.- *ace*⁺, 11.- *zot*⁺, 12.- 1236 (*ace*), 13.- 1501 (*ace*), 14.- 2868 (*ace*).

** Marcador de peso molecular, pb: pares de bases * cepa de referencia de *Vibrio cholerae*, + controles de las toxinas *zot* y *ace*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Presencia de genes asociados a serogrupo y toxigenicidad en cepas de *Vibrio cholerae* O1 sometidas a PCR

Cepa	Reacción de Polimerización en Cadena				ERIC
	<i>ctx A</i>	<i>ctx B</i>	<i>zot</i>	<i>ace</i>	
O139 [♦]	+	+	+	+	7b
6706 (O1) [♦]	+	+	+	+	9b
299 (O1) [♦]	+	+	+	+	4b
2514-88 (O1) [♦]	+	+	+	+	7b
267	+	+	+	+	*
16893	+	+	+	+	*
17176	+	+	+	+	*
17852	-	-	-	-	*
17862	-	-	-	-	8b
18150	+	+	+	+	*
21133	+	+	+	+	3b
23203	+	+	+	+	*
52036	-	-	-	-	*
54554	-	-	-	-	*
54708	+	+	+	+	3b

- = negativo
- + = positivo
- * = no se realizó el estudio
- b = número de bandas
- O139 = serotipo O139
- ctxA* = subunidad A de la toxina colérica
- ctxB* = subunidad B de la toxina colérica
- zot* = toxina zonula occludens
- ace* = accessory cholera enterotoxin
- ERIC = enterobacterial repetitive intergenic consensus
- ♦ = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

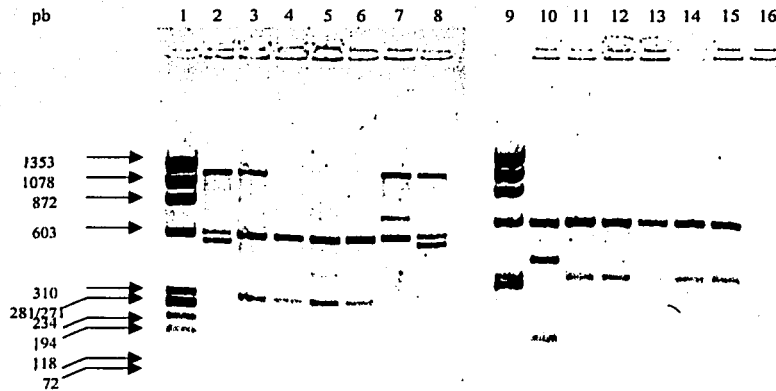


Figura 10. ERIC-PCR de las cepas de *Vibrio cholerae* no O1

Carril: 1. Φ 174 *Hae*III**; 2. *V. cholerae* no O1*; 3. *V. cholerae* O139; 4. 2514-88*; 5. 299*; 6. 1236; 7. 1442; 8. 2123; 9. Φ 174 *Hae*III**; 10. 937; 11. 1105; 12. 78; 13. 1501; 14. 2868; 15. 2124; 16. 1110.

** Marcador de peso molecular, pb: pares de bases * Cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

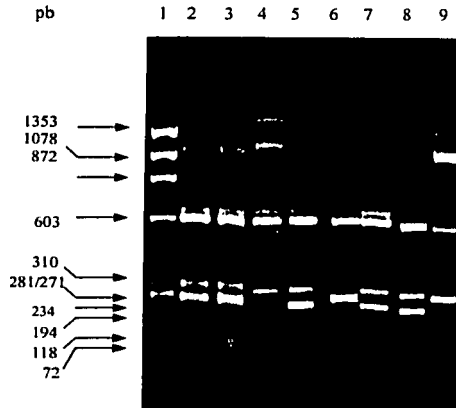


Figura 11. ERIC – PCR en cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no O1

Carril: 1.- Φ 174 *Hae*/III**; 2.- *Vibrio cholerae* O139*; 3.- 6706*; 4.- 2514-88*; 5.- 299*;
6.- 21133; 7.- 17862; 8.- 54708; 9.- 50145

** Marcador de peso molecular, pb: pares de bases * Cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los ensayos en cultivo celular muestran los siguientes resultados:

En células Vero se observó efecto citotóxico en 12/13 cepas de *V. cholerae* no O1 y 1/13 con efecto citotónico en la primera y segunda dilución. En el caso de las cepas de *V. cholerae* O1 3/12 presentaron efecto citotóxico, 4/12 efecto citotónico, 4/12 efecto citotónico y vacuolizante y 1/12 sólo con efecto vacuolizante en la primera y segunda dilución lo cual se indica en las tablas 7 y 8.

En las células CHO se observó efecto citotóxico en 12/13 cepas y 1/13 cepas sin efecto de *V. cholerae* no O1; en cuanto a las cepas de *V. cholerae* O1, se observó efecto citotónico en 8/12 cepas y 4/12 con efecto citotóxico entre la primera y la segunda dilución como se muestra en la tabla 9 y 10.

De lo anterior se puede decir que las células Vero resultaron ser más sensibles a la toxina colérica que las células CHO.

El efecto citotóxico clásico que se observa, consiste de un redondeo de las células seguido de histólisis. El efecto citotónico se presenta como células alargadas. La vacuolización se observa como agujeros o redes en el tejido, como se muestra en la figura 12.

Tabla 7. Efecto citopático en células Vero causado por toxinas de *Vibrio cholerae* no O1

Muestra	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶
Vc no O1 *	ctx	ctx	-	-	-
O139 *	ctx	ctx	ctx	-	-
6706 (O1) *	ctx	ctx	ctn	-	-
78	ctx	-	-	-	-
937	ctx	ctx	ctx	-	-
1105	ctx	ctx	-	-	-
1110	ctx	ctx	ctx	-	-
1236	ctx	ctx	ctx	-	-
1442	ctx	ctx	-	-	-
1501	ctn	-	-	-	-
2123	ctx	ctx	-	-	-
2124	ctx	ctx	ctx	-	-
2143	ctx	ctx	v	-	-
2868	ctx	ctx, v	ctx, v	-	-
7915	ctx	v	-	-	-
50145	ctx	-	-	-	-
0157:H7*	ctx	-	-	-	-
H10407**	ctn	ctn	-	-	-

Vc = *Vibrio cholerae*

ctn = efecto citotónico

ctx = efecto citotóxico

v = Vacuolización

Vero = células de riñón de mono verde africano

♣ = cepa *Escherichia coli* enterotoxigénica de referencia productora de toxina LT y ST

♣♣ = cepa *Escherichia coli* enterohemorrágica de referencia productora de toxina semejante a shiga

♦ = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

Tabla 8. Efecto citopático en células Vero causado por toxinas de *Vibrio cholerae* O1

Muestra	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6
Vc no O1 *	ctx	ctx	-	-	-
6706 (O1) *	ctx	ctn	ctn	-	-
267	ctn	-	-	-	-
16893	ctn	-	-	-	-
17176	ctn	-	-	-	-
17852	ctn	-	-	-	-
17862	ctn, v	ctn, v	-	-	-
17865	ctn	-	-	-	-
18150	ctx	-	-	-	-
21133	ctn, v	-	-	-	-
23203	ctn, v	ctn, v	-	-	-
52036	ctx	-	-	-	-
54554	ctx, v	-	-	-	-
54708	ctn, v	-	-	-	-
0157:H7 [▲]	ctx	-	-	-	-
H10407 ^{◆◆}	ctn	ctn	-	-	-

Vc = *Vibrio cholerae*

ctn = efecto citotónico

ctx = efecto citotóxico

v = vacuolización

Vero = células de riñón de mono verde africano

▲ = cepa *Escherichia coli* enterotoxigénica de referencia productora de toxina LT y ST

◆◆ = cepa *Escherichia coli* enterohemorrágica de referencia productora de toxina semejante a shiga

◆ = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

Tabla 9. Efecto citopático en células CHO causado por toxinas de *Vibrio cholerae* no O1

Muestra	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶
Vc no O1*	ctx	ctx	ctn	-	-
O139*	ctx	ctx	ctn	-	-
6706 (O1)*	ctx	ctx	ctn	-	-
78	ctx	ctx	-	-	-
937	ctx	ctx	-	-	-
1105	ctx	-	-	-	-
1110	ctx	ctx	ctx	-	-
1236	ctx	ctx	ctx	-	-
1442	ctx	-	-	-	-
1501	-	-	-	-	-
2123	ctx	ctx	-	-	-
2124	ctx	ctx	-	-	-
2143	ctx	ctx, v	-	-	-
2868	ctx	ctx	ctx, v	-	-
7915	ctx	ctx	-	-	-
50145	ctx	-	-	-	-
015:7H7*	ctx	ctn	ctn	-	-
H10407**	ctn	ctn	-	-	-

Vc = *Vibrio cholerae*

ctn = efecto citotónico

ctx = efecto citotóxico

v = vacuolización

CHO = células de ovario de hamster chino

♣ = cepa *Escherichia coli* enterotoxigénica de referencia productora de toxina LT y ST

♣♣ = cepa *Escherichia coli* enterohemorrágica de referencia productora de toxina semejante a shiga

◆ = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*

Tabla 10. Efecto citopático en células CHO causado por toxinas de *Vibrio cholerae* O1

Muestra	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶
Vc no O1 *	ctx	ctx	-	-	-
6706 (O1) *	ctx	ctn	ctn	-	-
267	ctn	-	-	-	-
16893	ctn	-	-	-	-
17176	ctn	-	-	-	-
17852	ctn	-	-	-	-
17862	ctn	-	-	-	-
17865	ctn	-	-	-	-
18150	ctx	-	-	-	-
21133	ctx	-	-	-	-
23203	ctn	ctn	-	-	-
52036	ctx	-	-	-	-
54554	ctx	ctx	-	-	-
54708	ctn	-	-	-	-
0157:H7*	ctx	-	-	-	-
H10407**	ctn	ctn	-	-	-

Vc = *Vibrio cholerae*

ctn = efecto citotónico

ctx = efecto citotóxico

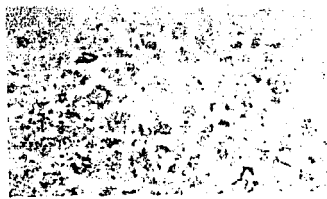
V = vacuolización

CHO = células de ovario de hamster chino

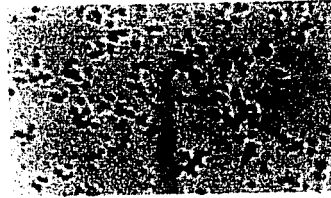
♣ = cepa *Escherichia coli* enterotoxigénica de referencia productora de toxina LT y ST

♣♣ = cepa *Escherichia coli* enterohemorrágica de referencia productora de toxina semejante a shiga

♦ = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*



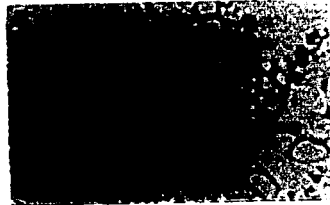
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12. Efecto citopático en células Vero, causado por las toxinas de *Vibrio cholerae*; tejido normal (a), efecto citotóxico (b), citotónico (c) y vacuolizante (d)

Se realizó un estudio estadístico por mínimos cuadrados con el fin de determinar los pesos moleculares aproximados de las bandas de los ribotipos como a continuación se presenta utilizando la siguiente formula y ecuaciones:

$$\log y = a + bx$$

$$\text{ecuación 1} \quad \Sigma \log y = n \log a + \Sigma x b$$

$$\text{ecuación 2} \quad \Sigma x \log y = \Sigma x \log a + \Sigma x^2 b$$

$$\text{donde: } \log a = c \quad \therefore a = 10^c$$

A continuación se da el ejemplo de las columnas con los valores de x (experimentales) y log y para facilitar la sustitución en la forma lineal y proceder a calcular los parámetros a y b de la ecuación, obteniéndose lo siguiente:

No banda	x* (mm)	x ²	Y (MPM)	Log y	x log y
1	-26	676	12216	4.0869	-106.2601
2	-24	576	11198	4.0491	-97.1793
3	-21	441	10180	4.0077	-84.1627
4	-17	289	9162	3.9619	-67.3538
5	-13	169	8144	3.9108	-50.8408
6	-7	49	7126	3.8528	-26.9699
7	0	0	6108	3.7858	0
8	10	100	5090	3.7067	37.0671
9	23	529	4072	3.6098	83.0255
10	41	1681	3054	3.4848	142.8796
11	67	4489	2036	3.3087	221.6881
12	80	6400	1636	3.2137	257.1026
13	106	11236	1018	3.0077	318.8212
n= 13	Σx= 219	Σx ² = 26635	Σy= 81040	Σlog y= 47.987	Σx log y = 627.8175

* distancia entre una banda y otra, medida en milímetros.

Sustituyendo los valores adecuados en las ecuaciones de mínimos cuadrados, el sistema de ecuaciones lineales resultante es:

$$\begin{array}{r} 47.9870 = 13c + 219b \\ -627.8175 = -219c + (-26635)b \\ \hline -579.8305 = -206c - 26416b \end{array}$$

Despejando c nos queda:

$$c = \frac{-579.83 + 26416b}{-206}$$

Sustitución de c en ecuación 2

$$627.8175 = 219 \left[\frac{-579.8305 + 26416b}{-206} \right] + 26535b$$

Despejando b nos queda:

$$b = -7.8698 \times 10^{-3}$$

Sustituyendo b en c:

$$c = 3.8238 \quad \therefore c = \log a; a = 10^c$$

De tal manera que la ecuación empírica ($\log y = a + bx$) adquiere la forma:

$$y = 10^{a+bx}$$

Sustitución de puntos x (-21), (67)

$$y = 10^{3.823 + (-0.00786)(-21)} = 9752.9$$

$$y = 10^{3.823 + (-0.00786)(67)} = 1979.6$$

Con la sustitución de los valores de x en la fórmula se obtienen los pesos moleculares de las bandas en pares de base.

Comparando los fragmentos de los ribotipos de *V. cholerae* O1 y no O1 se puede notar que los primeros presentan una mayor diversidad que los no O1; debido a que algunas bandas de los ribotipos entre una cepa y otra presentan diferentes pesos moleculares en comparación con las de *V. cholerae* no O1 que presentan una homología sólo entre algunos fragmentos de alrededor de 6000 a 8000 pb, como se puede apreciar en las tablas 11, 12, 13 y 14 y las figuras 13 y 14.

No se presenta homología entre los esquemas de las cepas problema con los ribotipos de las cepas control de *V. cholerae* no O1, O139, 6706 (ribotipo 5), 299 (ribotipo 6a) y 2514-88 (ribotipo 2) y sólo presenta semejanza en los fragmentos de 9405, 6666 y 4394 pb.

En el caso de las cepas 1236 y 2868 de *V. cholerae* no O1 que por PCR y serología dieron positivo con el serotipo O139, no presentan el mismo esquema que con el ribotipo control de O139, sólo en los fragmentos con peso molecular entre 6000 y 6400 pb como se puede ver en la tabla 13 y 14.

Para *Vibrio cholerae* O1 las bandas que se encontraron con mayor frecuencia fueron de peso molecular de 7298, 6666 y 4474 pb tabla 11 y de 6926, 6446 pb tabla 12.

En el caso de *Vibrio cholerae* no O1, las bandas que se encontraron más frecuentemente fueron de 6397 pb tabla 13 y 6611 pb tabla 14.

Tabla No 11. Pesos moleculares de las bandas de DNA de *Vibrio cholerae* O1 y no O1 de origen humano, obtenidos por ribotipificación

Peso molecular (pb)	Carril																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
18059					-												
13761						-			-					-			
13271															-		
12799								-									
12343																	-
11274						-											
10677	-																
10297	-						-		-								
10112					-												
9752	-	-															
9577																	
9405		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9236	-												-				
9071	-																
8908								-									
8748																	-
8436	-																
7846												-					
7636								-									
7565	-																
7298		-	-		-				-			-		-		-	
7167														-			
7102				-							-						
7038	-		-		-												-
6912																	-
6666	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6546	-																
6428																	
6370					-												-
6313		-	-														-
6199	-							-									-
6088		-							-								
5714																	
5662													-				
5561	-																
5172																-	
5079		-	-	-	-					-			-				
4810																	-
4724								-					-				
4639						-											-
4556														-			-
4474		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4354								-									

Tabla No 11. Pesos moleculares de las bandas de DNA de *Vibrio cholerae* O1 y no O1 de origen humano, obtenidos por ribotipificación (continuación)

Peso molecular (pb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
3171	-															
2416			-													
2372						-		-								
2330															-	
2309																
2288			-	-	-				-	-	-		-			
2267						-										
2247		-														
1979	-															
1564	-															
1353						-										
1328								-								
1304													-			
976	-															

- | | | |
|------------------------------|-----|-------------------------------------------------|
| 1. MPM 1 Kb | * | = cepas de referencia de <i>Vibrio cholerae</i> |
| 2. <i>V. cholerae</i> no O1* | pb | = pares de base |
| 3. <i>V. cholerae</i> O139* | Vc | = <i>Vibrio cholerae</i> |
| 4. 6706* R5 | MPM | = marcador de peso molecular |
| 5. 299* R6a | R | = ribotipo |
| 6. 2514-88* R2 | ♣ | = <i>V. cholerae</i> no O1 |
| 7. 267 | | |
| 8. 7915♣ | | |
| 9. 16893 | | |
| 10. 17176 | | |
| 11. 17852 | | |
| 12. 17865 | | |
| 13. 18150 | | |
| 14. 21133 | | |
| 15. 23203 | | |
| 16. 50145♣ | | |

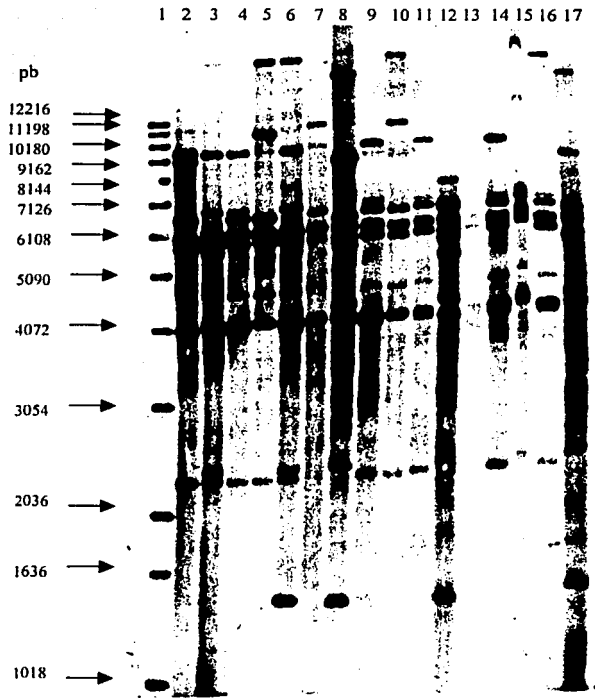


Figura 13. Ribotipos de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no O1 de origen humano

Carril: 1. MPM 1 Kb; 2. *V. cholerae* no O1♣; 3. *V. cholerae* O139*; 4. 6706* (ribotipo 5); 5. 299* (ribotipo 6a); 6. 2514-88* (ribotipo 2); 7. 267; 8. 7915*; 9. 16893; 10. 17176; 11. 17852; 12. 17862; 13. 17865; 14. 18150; 15. 21133; 16. 23203; 17. 50145*.

* Cepas de referencia de *Vibrio cholerae*, MPM: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases. ♣: cepas de *Vibrio cholerae* no O1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No 12. Pesos moleculares de las bandas de DNA de *Vibrio cholerae* O1 de origen humano, obtenidos por ribotipificación

Peso molecular (pb)	Carril									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15836							-			
15554						-				
15276					-					
11458	-									
11254		-								
11053								-		
10759	-									
10663					-					
10286										-
10103	-									
9923		-				-				
9746			-		-		-			
9573		-	-					-		
9487	-									
9402									-	
9235	-									
8441	-									
7715								-		
7443	-									
7310						-				
7180			-				-			
7116		-								
7052	-									
6926			-	-	-	-	-	-	-	-
6446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5999							-			
5892		-						-	-	
5787										
5582								-		
5385										
5289	-									
4922						-				
4835				-						
4748			-		-					
4664		-								
4499	-				-					
4340							-	-	-	
4263	-				-			-		
4187				-	-					
4112	-	-	-							
4039			-							
3759		-				-				
3626					-	-				
3029						-				
2922	-									
2532		-								
2486					-					

Tabla No 12. Pesos moleculares de las bandas de las DNA de *Vibrio cholerae* O1 de origen humano, obtenidos por ribotipificación (continuación)

Peso molecular (pb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2441			-			-				
2398		-								
2355					-					
1933	-									
1586	-									
1644						-				
1068	-									

1. MPM 1 Kb
2. *V. cholerae* no O1*
3. *V. cholerae* O139*
4. 6706* R5
5. 299* R6a
6. 251488* R2
7. 17865
8. 52036
9. 54554
10. 54708

- * = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*
- pb = pares de base
- Vc = *Vibrio cholerae*
- MPM = marcador de peso molecular

Tabla No 13. Pesos moleculares de las bandas de DNA de *Vibrio cholerae* no O1 de origen ambiental obtenidos por ribotipificación

Peso molecular (pb)	Carril											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
16205			-									
15873				-								
15231					-							
14920						-						
14615							-					
13181								-				
11289	-											
11173		-										
10721	-											
10287					-							
10077	-											
9871		-										
9471		-										
9278	-								-		-	
9088					-			-				
8720									-			
8542								-				
8367	-											
8196								-				
7865						-						
7392	-											
7093		-	-			-						
6948		-					-					
6806			-	-					-			
6736								-			-	
6667									-			
6397	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6331						-						
6138		-	-				-		-	-	-	-
6075				-				-				
6012					-							
5951										-	-	
5890			-					-	-	-		
5203	-											
4992								-				
4890												
4790			-	-								
4741						-						
4692					-							
4597										-		
4411							-			-		
4320		-				-					-	
4232	-	-	-				-					
4146					-	-			-			

Tabla No 13. Pesos moleculares de las bandas de DNA de *Vibrio cholerae* no O1 de origen ambiental, obtenidos por ribotipificación (continuación)

Peso molecular (pb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4103				-			-				
4061							-				
3978	-										
2918	-										
2423											
2277		-	-							-	-
2231			-								
2185				-							
2140							-	-			
2097					-						
2054							-				
2012	-										
1852	-										
1603							-				
1331							-				
1304							-				
1277										-	
937	-										

1. MPM 1 Kb
2. *V. cholerae* no O1*
3. *V. cholerae* O139*
4. 6706* R5
5. 299* R6a
6. 2514-88* R2
7. 937
8. 1236
9. 1442
10. 2123
11. 2143

- * = cepas de referencia de *Vibrio cholerae*
- pb = pares de base
- Vc = *Vibrio cholerae*
- MPM = marcador de peso molecular
- R = ribotipo

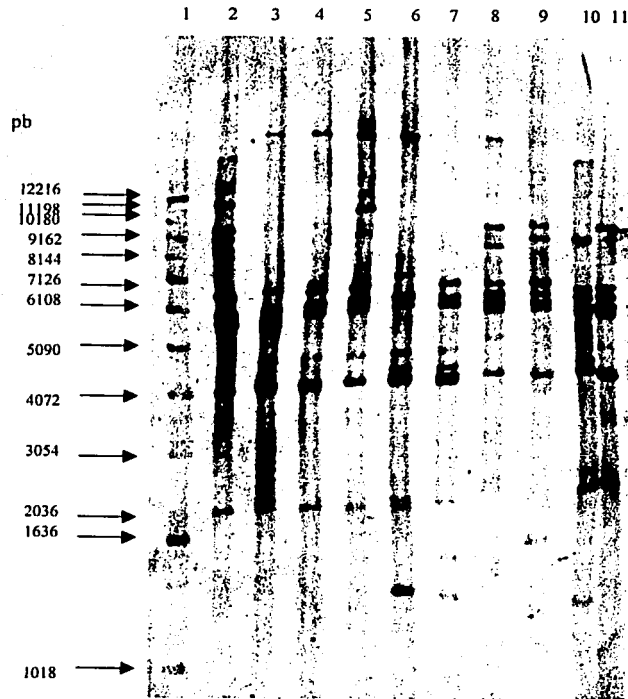


Figura 14. Ribotipos de las cepas de *Vibrio cholerae* no O1 de origen ambiental

Carril: 1. MPM 1 Kb; 2. *Vibrio cholerae* no O1*; 3. *Vibrio cholerae* O139*; 4. 6706* (ribotipo 5); 299* (ribotipo 6*); 2514-88* (ribotipo 2); 7. 937; 8. 1236 (serología O139); 9. 1442; 10. 2123; 11. 2143

* Cepas de referencia de *Vibrio cholerae* MPM: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No 14. Pesos moleculares de las bandas de DNA de *Vibrio cholerae* no O1 de origen ambiental obtenidos por ribotipificación

	Peso molecular (pb)	Carril											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	14256												
*	13997			-	-			-					
=	13743									-	-		
referencia	13494												
de	12091												
<i>Vibrio cholerae</i>	12773												-
pb	10834												
=	10445												
Vc	9887												
=	9708												
<i>Vibrio cholerae</i>	9532												
MPM	9359												
=	9189												
marcador	9022												
de	8859												
peso molecular	8698												
R	8386												
=	8085												
ribotipo	7514												
	7378												
	7113												
	6984												
	6611												
	6491												
1. MPM 1 Kb	6373												
2. <i>V. cholerae</i> no O1*	6315												
3. <i>V. cholerae</i> O139*	6258												
4. 6706* R5	6144												
5. 299* R6a	6033												
6. 2514-88* R2	5923												
7. 78	5505												
8. 1105	5307												
9. 1110	5210												
10. 1501	5024												
11. 2124	4669												
12. 2868	4502												
	4420												
	4340												
	4261												
	4261												
	3065												
	2507												
	2416												
	2373												
	2329												
	2287												
	2205												
	1976												
	1803												
	1557												
	1529												
	1395												
	1004												

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Hoy en día es importante realizar un adecuada identificación del agente etiológico causante de infecciones diarreicas, principalmente durante brotes epidemiológicos; en los cuales existen discrepancia de persona a persona en cuanto a la gravedad de la infección producida en este caso por *Vibrio cholerae*, esto corresponde a las diferencias de susceptibilidad a la infección o enfermedad con este microorganismo, principalmente con aquellas cepas consideradas de simple virulencia como lo es en este caso *V. cholerae* O1, la cual es capaz de causar cuadros de diarrea de diferente grado de gravedad en personas sanas, Yamamoto et al ^{25,26}.

También se debe tomar en cuenta que las personas no presentan inmunidad contra la infección existiendo la probabilidad de una reinfección ocasionada por un nuevo serotipo.

Es importante determinar el potencial toxigénico de cepas de *V. cholerae* no O1 aisladas de pequeños brotes, que han causado gastroenteritis e infecciones extraintestinales, ya que la octava pandemia causada por el nuevo serogrupo O139, sugiere que estas cepas pueden adquirir el potencial epidémico de *V. cholerae* O1. Esto quiere decir que la ausencia de *V. cholerae* O1 y la presencia de *V. cholerae* no O1, como lo indican Mekalanos et al y Nair et al ^{27,28}, no puede ser ignorada.

En este estudio se establece alguna similitud fenotípica y genotípica entre los serogrupos O139, O1 y no O1 de *Vibrio cholerae* pero sobre todo permite observar las diferencias taxonómicas por medio de técnicas de biología molecular como lo es la PCR y ribotipificación, así como por ensayos tradicionales *in vitro* como son: cultivo celular, y serología.

Aunque la mayoría de las cepas con serotipo O139 tienden a hibridar con las pruebas específicas de CT, *zot* y *ace*, en este caso las dos cepas no O1 que por serología aglutinaron con O139 fueron negativas a las pruebas anteriores por PCR, posiblemente debido a que las cepas no poseen los genes que codifican para la síntesis de estas toxinas como lo reportó Nair et al ²⁸.

Sin embargo ambas cepas presentaron efecto citotóxico (*ctx*), lo cual hace suponer que se encuentra presente otro factor de patogenicidad como lo son las hemolisinas, las cuales de acuerdo con Yoshio et al ²⁹ quienes sugieren que la hemolisina es un factor enterotoxico responsable de que *V. cholerae* no O1 produzca gastroenteritis.

En este trabajo no se realizó un estudio de hemolisina, por lo que sería adecuado completar el estudio con esta prueba para fundamentar el efecto citotóxico producido en las células por *V. cholerae* tanto las toxigénicas como las que no lo son.

Otra de las razones por la que cepas con serología O139 no dieran positivo a ninguno de los estudios podría ser debido a que se encuentre un mecanismo que mantiene reprimido al gen que codifica para la toxina, o bien están incompletos o defectuosos y por lo tanto no se presente de acuerdo con Giono³⁰.

Según Versalovic et al.³¹ los iniciadores de ERIC-PCR son altamente específicos y permiten estudios taxonómicos de manera rápida, para distinguir cepas toxigénicas de las no toxigénicas. Por medio de esta técnica Lupski et al.³² sugieren que hay una banda constante, a la que designan como una huella paterna estable y específica de todas las bacterias.

En el caso de *V. cholerae* Rivera et al.³³ reportan tres diferentes fragmentos a los que denominó paternos por que se encuentran en todas las cepas de *V. cholerae* los cuales tienen los pesos moleculares de 1.75, 0.79 y 0.5 Kb. También reporta una banda de peso molecular en común de 126 pb, lo cual difiere con lo obtenido en este trabajo, ya que se obtuvieron dos bandas semejantes a las cepas de *V. cholerae* O1 y no O1 con peso molecular de 603 pb y 281 pb, las cuales también se encuentran en las cepas utilizadas como testigo.

Hulton et al.³⁴ sugieren que las secuencias de ERIC conserva los niveles de secuencia nucleotídica, pero la localización cromosomal difiere entre las especies, lo cual podría ser asignado a los resultados obtenidos, es decir que la información se encuentra en otro sitio y no en los reportados anteriormente por eso se obtienen bandas de diferente peso molecular.

En cultivo celular Vero y CHO el 33% de las cepas de *V. cholerae* O1 presentó efecto citotóxico. El efecto citotónico estuvo presente en un 67%, lo cual fue correlacionado con la técnica de PCR.

Sin embargo, algunas de las cepas de *V. cholerae* O1 que por la PCR fueron positivas a los 4 genes (*ctxA*, *ctxB*, *zot* y *ace*) fueron toxigénicas, presentando diferentes efectos citopáticos lo cual concuerda con Mekalanos et al²⁷. Tal vez debido a que la cantidad de toxina producida puede estar influida por la presencia de proteasas que afectan la estabilidad y calidad de la toxina o que en cierto momento pueden modificar al receptor celular alterando así la sensibilidad del sistema, o afectar los componentes del medio empleado para la producción de toxina colérica como lo prueba Iwanaga et al³⁵.

En el caso de *V. cholerae* no O1 se encontró que 12/13 de las cepas presentó efecto citotóxico tanto en células Vero como en CHO, como lo indica Giono³⁰ para las cepas de *V. cholerae* no O1, en el cual es frecuente observar que *V. cholerae* no O1 presente actividad citotóxica que enmascara la actividad citotónica que en algún momento pudiera presentarse, pero que fue descartada al realizar diluciones de la toxina.

De acuerdo con Said et al.³⁶ el hecho de que las cepas de *V. cholerae* no O1 presentaran efecto citotóxico en las dos líneas celulares no necesariamente indica que se encuentre presente la enterotoxina, esto posiblemente debido a que las cepas no O1 a veces producen sustancias como hemolisinas que causan efecto en las células aún cuando no sean enterotoxigénicas.

Además, Waldor et al.³⁷ sugieren que *V. cholerae* recibe señales del medio ambiente para la producción de toxina, la cual está coordinada mediante un activador transcripcional *toxR* y hay estudios que indican que los *V. cholerae* no O1 tienen la secuencia de *toxR* pero no los genes requeridos para la producción de CT. Y de acuerdo con Gennaro et al.³⁸, pueden tratarse de una hemolisina o de una toxina semejante a CT por lo que sería necesario realizar el estudio con una prueba de ELISA.

Spangler¹⁰ reportó que se requieren nanogramos o picogramos de toxina para que sea positiva la prueba en células CHO y que se formen vacuolas cuando la concentración de toxina es baja; debido a esto se emplearon las células CHO con el fin de confirmar que las cepas de *V. cholerae* que por PCR fueron positivas y que en células Vero resultaron negativas.

Con base en lo anterior a diferencia de lo reportado por Stavric et al.³⁹, que las células Vero son más sensibles a la toxina colérica que las Y1 (células adrenales de ratón) pero menos que las células CHO; en este caso las células Vero resultaron ser más sensibles a la toxina además de que en esta línea celular se observó la presencia de vacuolas. Estos cambios morfológicos en las líneas celulares se deben a la producción de AMPc estimulada por la toxina colérica.

Hanchalay et al.⁴⁰ indican que la probabilidad reportada de que las cepas de *V. cholerae* no O1 resulten positivas a la citotoxina (CT) es de 0 a 25 %, lo cual se puede notar en los resultados de PCR, en los cuales ninguna de las cepas dio positivo a la subunidad A y B de la toxina colérica.

También se encontró una cepa de *V. cholerae* no O1 que no presentó efecto en células CHO y en células Vero sólo presentó efecto citotónico, esto tal vez debido a que las células no fueron sensibles a la toxina o bien que los niveles de toxina producida como ya se mencionó anteriormente fueron tan bajos y no se alcanzaron a detectar o también por que la cepa perdió el fago que codifica para la producción de toxina esto apoyado en Herrera et al.⁴¹

Sin embargo, la presencia del efecto citotóxico de las cepas de *V. cholerae* no O1, pudiera ser responsable del cuadro diarreico no relacionado con cólera de los pacientes de donde proceden algunas de las cepas por lo que sería adecuado correlacionar el resultado de laboratorio con el cuadro clínico del paciente como sugiere Figueroa.⁴²

La cantidad de toxinas esta directamente relacionada con la infección donde también están involucrados varios factores como inmunidad natural o adquirida del huésped, así como cambios de virulencia del microorganismo de ahí que los portadores jueguen un papel importante en la propagación de la infección como indica O' Brien et al.⁴³

Karaolis et al.⁴⁴ sugieren que la ribotipificación puede facilitar la identificación de las cepas involucradas en un brote específico en áreas donde se presentan simultáneamente distintas cepas de *V. cholerae*. Esta es una prueba que pone de manifiesto fragmentos de restricción de longitud polimórfica de genes (de RNAr) de la bacteria y se utilizan para construir esquemas de tipificación molecular.

La técnica de ribotipificación se realizó para determinar la correlación entre las cepas de *V. cholerae* O1 y no O1.

Los resultados de este trabajo difieren de los de Popovic et al.⁴⁵ quien anteriormente realizó un esquema de ribotipificación con 27 patrones diferentes, de cepas originarias de varios países en los que es frecuente que se presenten infecciones por *V. cholerae* O1 incluyendo a México.

Comparando los ribotipos obtenidos con los reportados por Popovic et al.⁴⁵ que sugiere que en México se encuentran circulando cepas con el ribotipo 5 y 6a; las cepas analizadas de *V. cholerae* O1 y no O1 y las dos cepas con serología O139 presentaron esquema de ribotipificación muy variado, que al compararse con el que obtuvo Popovic y con el realizado por Koblavi et al.⁴⁶ con quien tampoco se encontró alguna cepa que concordara, aún utilizando cepas control de *V. cholerae* no O1, 6706 (ribotipo 5), 299 (ribotipo 6a), 2514-88 (ribotipo 2) y O139.

Sólo dos cepas de *V. cholerae* no O1 presentaron un esquema parecido entre sí, sin embargo ninguna de las dos presenta semejanza con las del testigo no O1.

Las bandas de *V. cholerae* O1 que se encontraron más frecuentemente fueron de entre 6446pb y 6666 pb y 4474 pb. En el caso de *V. cholerae* no O1 las bandas más frecuentemente fueron de 6397 y 6611 pb.

Koblavi et al.⁴⁶ reportó 17 diferentes genes de restricción de RNAr, de los cuales dos de ellos considera que se trata de cepas que se encuentran geográficamente limitadas al lugar del brote y temporales, lo cual podría sugerir en este caso, que se traten de cepas transitorias que se encuentran sólo por un periodo de tiempo y en determinados estados del país.

Las cepas toxigénicas de serogrupo O139 es el primero reportado como *V. cholerae* No O1 causante de una nueva epidemia y que puede tener la habilidad de expandirse a nivel mundial por casos importados. Los resultados obtenidos por Karaolis et al.⁴⁴, demuestran que las cepas que el estudio son muy parecidas a las de la séptima pandemia, difiriendo sólo de dos sitios de restricción de 6.8 y 2.1 Kbp con los de El Tor.

Estos resultados son confirmados por Waldor y Mekalanos³⁶ quienes estudiaron a tox R (toxin-coregulated pilus expresión) y sugieren que O139 evolucionó de El Tor y en parte mínima por adquisición de DNA por la interacción bacteria-fago-hospedero, confiriéndole un nuevo antígeno O como lo indican Wachsmuth et al.⁴⁷

En este trabajo no se encontró similitud en las dos cepas que por serología aglutinaron con O139 con la cepa testigo, así mismo tampoco con los ribotipos 5,6a y 2. Lo que sugiere que estas dos cepas no sean O139 sino que se trate de cepas con serotipo O155, las cuales tienden a cruzarse con O139 por serología pero no expresan la toxina colérica.

Pero como amplificaron por PCR para O139 pueden estar indicando que dentro de este serogrupo, hay un esquema de ribotipificación específico y diferente al que Popovic et al.⁴⁵ ha reportado para *Vibrio cholerae* O1, y con el que se puede también diferenciar cepas toxigénicas y no toxigénicas. Lo anterior sugiere que se debe estudiar un grupo más grande de cepas no O1.

La determinación de los genes de restricción de longitud polimórfica (RFLP) son una directa aproximación de la estructura y diversidad clonal de las bacterias. Este método es adecuado para la tipificación de *V. cholerae*.

La aplicación de este estudio sugiere que las cepas de biotipo El Tor son diferentes clonas; una pandemia de cólera no es una simple epidemia mundial debida a una clona ya que pueden presentarse simultáneamente brotes de epidemias pasadas causadas por diferentes clonas involucradas y las epidemias causadas por el biotipo El Tor puede dar lugar a nuevas clonas como lo reportó Koblavi et al ³⁹, por lo que es importante efectuar constantemente un monitoreo a nivel nacional para evitar brotes con efectos epidemiológicos.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, es necesario llevar un monitoreo de vigilancia de *Vibrio cholerae*, ya que esta cepa puede reincidir con nuevos brotes debido a que es capaz de obtener información genética para adquirir la capacidad toxigénica y provocar nuevos casos con facultad epidémica. Por ejemplo el causado por *V. cholerae* O139.

En este estudio se logró encontrar diferencias en el fenotipo y genotipo de las cepas de *V. cholerae* estudiadas, mediante el empleo de métodos tradicionales, *in vitro* y de biología molecular.

Las técnicas de biología molecular empleadas, permitieron advertir cepas de origen clínico y ambiental que no contienen los genes que codifican para la toxina colérica, estas poseen la facultad de presentar otros factores que le confieren un cierto grado de daño hacia el hombre, por lo que se recomienda efectuar una comparación entre los resultados de caracterización de la cepa de *V. cholerae* y el cuadro clínico que presenta el paciente.

Por medio de PCR se encontraron dos cepas de *V. cholerae* O139 que no tienen capacidad toxigénica

Las células Vero resultaron más sensibles a las toxinas de *V. cholerae*, que las células CHO.

Las cepas de *V. cholerae* no O1, no presentaron los genes para CT, *zot* y *ace*, haciéndolos diferentes de los *V. cholerae* O1.

En lo que respecta a los ribotipos, las cepas estudiadas presentaron un esquema diferente y no pertenecieron a los ribotipos 5 y 6a que son los más frecuentemente reportados en México, ni al ribotipo 2 de la zona del Golfo de México que colinda con Estados Unidos.

Las cepas de *V. cholerae* O139 no presentaron un esquema de ribotipificación semejante al de *V. cholerae* O1.

X. ANEXO

Soluciones para ribotipos

1. Solución de prehibridación

SSC 5X

Reactivo bloqueador 1.0%

N-laurilsarcosina 0.1%

SDS 0.02%

2. Solución de lavado A

SSC 2X

SDS 0.1%

3. Solución de lavado B

SSC 0.1%

SDS 0.1%

4. Amortiguador 1

Tris-HCl 100 mM pH 7.5

NaCl 150 mM

5. Amortiguador 2

Amortiguador 1

Leche descremada 5%

6. Amortiguador 3

Tris-HCl pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

XI. GLOSARIO

Ácido nucleico: cada uno de los ácidos orgánicos formados por nucleótidos. Regulan la transmisión de la información hereditaria y controla todo el funcionamiento de la célula, incluida la síntesis de proteína.

Acidosis metabólica: descenso primario de la concentración de bicarbonato en el líquido extracelular, el pH y la capacidad de combinación del CO₂ están reducidos.

Adherencia: unión entre dos superficies u órganos próximos, compuesta por fibrina

Adhesinas: pilis o fimbrias involucradas en la adherencia.

Aglutinación: es la agregación de partículas inicialmente dispersas como resultado de la unión antígeno-anticuerpo.

Biotipo: grupo de individuos que poseen el mismo genotipo.

Cepa: grupo de microorganismos cuya ascendencia es conocida.

Citolisina: sustancia que produce la disgregación de determinados elementos celulares.

Clona: población originada por replicación asexual de una unidad.

Desnaturalizar: separar la doble hélice de DNA ó RNA utilizando medios físicos y químicos como el incremento de la temperatura o adición de hidróxido de sodio.

Desoxinucleótidos: Proveen la energía y nucleosidos para la síntesis de DNA.

Diarrea: evacuación intestinal frecuente, líquida y abundante.

Disentería: enfermedad que produce una diarrea acuosa con moco y sangre.

Electroforesis: un procedimiento de análisis de mezclas de aminoácidos proteínas o ácidos nucleicos que se basa en la observación de su migración bajo la influencia de un campo eléctrico intenso.

Enterocito: célula del intestino.

Enterotoxina: toxinas que producen las bacterias y cuya acción se efectúa en el aparato digestivo.

Exotoxina: toxina que ejerce su acción fuera de la bacteria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Fago: virus que es capaz de infectar a las bacterias y que esta formado por una envoltura proteica que en algunos casos contiene DNA ó RNA.

Fase prodrómica: Etapa de una enfermedad o función fisiológica ó química en un momento dado.

Fenotipo: característica notable en las bacterias conferida por los genes de virulencia.

Fimbria: estructura proteica de 7 mm de diámetro que se encuentra en gran cantidad a lo largo de la bacteria y que interviene en el mecanismo de adherencia.

Flagelo: prolongación celular filiforme móvil que sirve como órgano de locomoción.

Gangliósido: glucolípido formado por ácidos grasos, hexosas, N-acetilneuraminico.

Gene: fragmento de DNA con información específica.

Genotipo: constitución fundamental hereditaria de un organismo que resulta de una combinación particular de genes. Especie tipo de un género.

Glutation: Tripéptido compuesto de cisteína, ácido glutámico y glicina. Pasa fácilmente de modo reversible de la forma oxidada a la reducida con lo cual desempeña un importante papel como transportador de hidrógeno.

Hemaglutinina: proteína que aglutina los eritrocitos.

Hemolisina: enzima que lisa los eritrocitos.

Hibridación: unión de dos cadenas de DNA ó RNA de diferente origen pero que presentan homología.

Lipopolisacárido: azúcar unida a una sustancia lípida.

Lisis: disolución o destrucción de células o bacterias por las lisinas.

Mucínasa: enzima que provoca la coagulación del moco.

Nicotinamida: amida del ácido nicotínico.

Nucleótido: elemento base de las cadenas de ácidos nucleicos.

Oligosacárido: carbohidrato cuya hidrólisis produce más de dos unidades de monosacárido.

Pandemia: Epidemia extendida a varios países, o que ataca a casi todos los individuos del país.

Pili: filamento proteico que se encuentra a lo largo de la superficie bacteriana.

pH: expresa la concentración de iones hidrógeno.

Prehibridación: tratamiento previo que se le da a la superficie sólida en donde esta adherido el DNA o RNA, que se va a diagnosticar, con DNA en solución para evitar uniones inespecíficas durante la hibridación.

Primers o iniciadores: secuencias específicas y conocidas de nucleótidos.

Proteasas: enzima que digiere las proteínas.

Quimiotaxis: es la atracción que ejercen ciertos factores o sustancias químicas en los neutrofilos.

Renaturalizar: formar nuevamente estructuras de doble cadena.

Shock hipovolemico: choque metabólico debido a la disminución del volumen total de sangre, asociado generalmente a circulación periférica disminuida, hipotensión y eliminación de orina reducida.

Sonda: fragmentos de DNA o RNA de secuencia conocida.

Termoestable: que es estable a altas temperaturas.

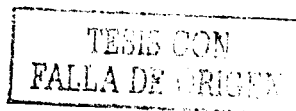
Termolábil: que no es estable a altas temperaturas.

Toxina: sustancia productora de efectos tóxicos.

Uremia: condición tóxica producida por la urea y otros productos de desecho en la sangre.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

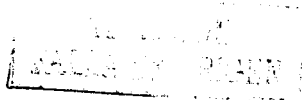
1. Kaper JB, Morris Jr JG and Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:48-52.
2. Finkelstein RA. Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139 and other pathogenic vibrios. Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens. London: Plenum Med B Co, 1999: 85-98.
3. Kenneth T. Bacteriology 330 lecture topics cholera (*Vibrio cholerae*). USA: University of Wisconsin Madison. Department of bacteriology, 1999: 3-15.
4. Giono SC. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: Manual de laboratorio en el diagnóstico de enterobacterias. InDRE, Secretaría de Salud, 1993: 305-350.
5. Giono CS, Rodríguez AG, Gutiérrez CL y Valdespino JL. Caracterización fenotípica y genotípica de *Vibrio cholerae* O1. *Rev Lat Amer Microbiol* 1994; 36:243-251.
6. Nair GB, Albert MJ, Shimada T and Takeda Y. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: the new serogroup causing cholera. *Rev Med Microbiol* 1996; 7:43-51.
7. Valdespino JL, García ML, Hinojosa M, Sarti E y Sepúlveda J. Epidemia de cólera en América. *Ciencia y Desarrollo* 1991; 17:55-64.
8. Figueroa AP, García LH, Gutiérrez CL y Valdespino JL. Efecto citotóxico de *Vibrio cholerae* No O1 en células Vero. *Rev Lat Amer Microbiol* 1994; 36:277-281.
9. Kaper JB and Baldini MM. Genetics. Current topics in infectious disease. Cholera. London: Plenum Med B Co, 1992:69-94.
10. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat labile enterotoxins. *Microbiol Rev* 1992; 56:566-647.
11. Acheson DWK. Enterotoxins in acute infective diarrhoea. *J. Infect* 1992; 24:225-245.
12. Mekalanos JJ. Cholera toxin. Genetic analysis, regulation and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immun* 1985; 118:97-118.



13. Rodríguez AMG. III Curso Teórico Práctico. Estudio y diagnóstico molecular de *Escherichia coli* y otros enteropatógenos. México: InDRE, 2001: 2-28.
14. Tenover FC. Diagnostic desoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:82-101.
15. Lewin B. Genes. 4ª ed. USA: Oxford Cell Press, 1990:60-68
16. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid based detection methods. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:370-382.
17. Edberg SC. Principles of nucleic acid hybridization and comparison with monoclonal antibody technology for the diagnosis of infectious disease. *J Biol Med* 1985; 58:425-442.
18. Giono SC. Mecanismos de patogenicidad de *Escherichia coli*. *Cólera/ Diarreas Infecciosas* 1991; 1(4): 5-13.
19. Souther EM. Detection of species specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503-517.
20. Popovic T, Bopp CA, Olsvick Ø and Wachsmuth K. Ribotyping in molecular epidemiology in diagnostic molecular microbiology. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1992: 2-22.
21. Coen DM. The polymerase chain reaction. Current protocols in molecular biology. USA: John Wiley & Sons Inc, 1994: 15.0.3-15.7.6.
22. Graham RT. PCR basic principles and automation. Great Britain: Oxford University Press, 1991: 1-13.
23. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2ª ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York, 1989:6-25.
24. White TJ, Madej R and Persing DH. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Anal Clin Chem* 1992; 29:161-196.
25. Yamamoto KY, Takeda Y, Miwatani T and Craig JP. Purification and some properties of a Non-O1 *Vibrio cholerae* enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin. *Infect Immun* 1983; 39:1128-1135.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

26. Yamamoto K, Takeda Y, Miwatani T and Craig JP. Evidence that a Non-O1 *Vibrio cholerae* produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. *Infect Immun* 1983; 41:896-901.
27. Mekalanos JJ, Swartz DJ and Pearson GDN. Cholera toxin gene: nucleotide sequence. Deletion analysis and vaccine development. *Nature* 1983; 306:551-557.
28. Nair GB, Shimada T, Kurazono H, Okuda J and Pal A. Characterization of phenotypic, serological and toxigenic traits of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2775-2779.
29. Yoshio I, Yamamoto K, Nakasone N, Tanabe MJ, Takeda T, Miwatani T and Iwanaga M. Enterotoxicity of El Tor like hemolysin of Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1983; 55:1090-1093.
30. Giono CS, Rodríguez MGA, Rodríguez MJ y Valdespino JL. Identificación de enterotoxinas y citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (colony blot). *Rev Lat Amer Microbiol* 1994; 36:231-241.
31. Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and applications to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:6823-6831.
32. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 1992; 174:4525-4529.
33. Rivera JG, Chowdhury MAR, Huq A, Jacobs D, Martins MT and Colwell RR. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and Non O1 strains. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:2898-2904.
34. Hulton JAK, Bernstein D, Huq A, Loomis L, Tamplin ML and Colwell RR. Cholera DFA: improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 120:143-148.
35. Iwanaga M and Yamamoto J. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J Clin Microbiol* 1985; 22:405-408.
36. Said B, Scotland SM and Rowe B. The use of genes probes, immunoassays and tissue culture for detection of toxin in *Vibrio cholerae* non-O1. *J Med Microbiol* 1994; 40:31-36.



37. Waldor MK and Mekalanos JJ. Tox R regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect Immun* 1994; 62:72-77.
38. Gennaro ML, Grenaway PJ and Broadbent DA. The expression of biologically active cholera toxin in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 1982; 10:4883-4890.
39. Stravic S, Spars JI, Konowalchuck and Jeffrey D. Stimulation of cyclic AMP secretion in vero cells by enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1978; 21:514-517.
40. Hanchalay S, Seriwatana J and Echeverría P. Non-O1 *Vibrio cholerae* in Thailand: homology with cloned cholera toxin genes. *J Clin Microbiol* 1985; 21:288-289.
41. Herrera AP. Determinación de enterotoxina termolábil (LT), citotoxinas vero (VT) y semejante a shiga (SLT) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con y sin diarrea. Tesis profesional. ENCB-IPN, 1987: 28-36.
42. Figueroa AP. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de infecciones gastrointestinales. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: InDRE SSA, 1993:369-394.
43. O' Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW and Formal SB. Shiga-like toxin converting phage from *Escherichia coli* strain that cause hemorrhagic colitis on infantiles diarrhea. *Science* 1984; 226:694-696.
44. Karaolis DKR, Lan R and Reeves PR. Molecular evolution of the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* isolates. *J Bacteriol* 1994; 176:6199-6206.
45. Popovic T, Bopp CH, Olsvik Ø and Wachsmuth K. Epidemiologic application of standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2474-2482.
46. Koblavi S, Grimont F and Grimont PAD. Clonal diversity of *Vibrio cholerae* O1 evidenced by rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol* 1990; 141:645-657.
47. Waschmut K, Evins GM, Fields PI, Olsvik Ø, Popovic T, Bopp CHA, Wells JG, Carrillo C and Blake PA. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J Infect Dis* 1993; 167:621-626.