



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**CUAUTITLAN**

**“Patrón polimórfico del RNA ribosomal  
de *Vibrio cholerae* no 01 procedentes de  
siete Estados de la República Mexicana.”**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de:**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**Presenta:**

**GABRIELA GARCÍA ESQUIVEL**

**ASESORES:**

**M. en C. PAULA FIGUEROA ARREDON**

**M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**Cuautitlán Izcallí, Estado de México**

**2005**

**m. 340524**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA 14  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

ESTAMPADO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La tesis: "Patrón polimórfico del RNA ribosomal de Vibrio cholerae No 01  
procedentes de siete Estados de la República Mexicana".

que presenta la pasante: Gabriela García Esquivel  
con número de cuenta: 8702418-0 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Octubre de 2000.

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Judith Martínez Zamitiz</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	<u>Ana Laura Vázquez Martínez</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	

---

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Agradezco el apoyo del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas para la realización del presente trabajo, en especial atención al Laboratorio de Bacteriología Entérica.**

**A mi directora de Tesis: Paula Figueroa, por la enseñanza técnica, por todo su apoyo y consejos para seguir adelante.**

**A mis compañeros y amigos del INDRE.**

**A La FES : en especial a mis profesores por darme las referencias para ser un profesionista, las bases para trabajar y el orgullo de haber sido su alumna.**

**A mis amigos de la FES por los buenos momentos.**

---

## **DEDICATORIAS.**

### **A Dios por darme la vida.**

A mi padre<sup>†</sup> por su enseñanza y el anhelo de ser lo mejor que podemos.

A mi madre por creer en mi y darme todo lo necesario para lograrlo. Te quiero mucho por se mi madre.

A mi hermana: por su apoyo incondicional y quererme tanto. Gracias por ser mi segunda madre.

A mis hermanos: Raúl y Hugo.

---

## CONTENIDO.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS Y DIAGRAMAS .....	8
RESUMEN .....	9

### I. INTRODUCCION.

I. 1. <i>Vibrio cholerae</i> O1. ....	11
I. 2. <i>Vibrio cholerae</i> O139. ....	19
I. 3. <i>Vibrio cholerae</i> no O1. ....	20
I. 4. Diagnóstico del Laboratorio. ....	24
I. 5. Ribotipificación. ....	27

II. JUSTIFICACION. ....	36
-------------------------	----

III. HIPÓTESIS .....	36
----------------------	----

### IV. OBJETIVOS

IV. 1. Objetivo General .....	37
IV. 2. Objetivos Particulares .....	37

### V. MATERIAL Y EQUIPO

V. 1 Material .....	38
V. 2 Equipo .....	39

---

## VI. METODOLOGIA

VI. 1 Identificación bioquímica y serológica de las cepas de <i>Vibrio cholerae no O1</i> . .....	40
VI. 2 Extracción fenólica del DNA. ....	41
VI. 3 Purificación del DNA. ....	42
VI. 4 Determinación de la concentración del DNA por el método en minigel. ....	42
VI. 5 Digestión del DNA con la enzima de restricción <i>Bgl I</i> .....	44
VI. 6 Hibridación por el método de Southern Blot. ....	44
VI. 7 Obtención de la sonda y marcaje con digoxigenina. ....	48
VI. 8 Sonda de marcadores de peso <i>Ladder 1Kb</i> y <i>Lambda Hind-III</i> , marcados con digoxigenina. ....	50
VII. RESULTADOS .....	51
VIII. DISCUSION. ....	57
IX. CONCLUSIONES. ....	64
X. REFERENCIAS. ....	66
ANEXO. ....	72

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

A	⇒	ácido
BAB	⇒	base de agar sangre.
cAMP	⇒	monofosfato de adenosina cíclico.
CT	⇒	tóxina colérica.
DNA	⇒	ácido desoxiribonucleico.
dNTP's	⇒	mezcla de los cuatro desoxinucleótidos.
dUTP	⇒	desoxiuridintrifosfato
FA	⇒	acumulación de fluidos.
INDRE	⇒	Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas.
K	⇒	alcalino.
LIA	⇒	agar de hierro y lisina.
MIO	⇒	medio para determinar movilidad, descarboxilación de la ornitina y producción de indol.
N	⇒	neutro.
NAG	⇒	vibrio no aglutinante.
PCR	⇒	reacción en cadena de la polimerasa
PF	⇒	factor de permeabilidad.
rDNA	⇒	ácido desoxiribonucleico ribosomal .
RFLP	⇒	fragmentos de estricción de longitud polimórfica.
RIL	⇒	asa ligada de conejo.
RNA	⇒	ácido ribonucleico
rRNA	⇒	ácido ribonucleico ribosomal
SDS	⇒	dodecil sulfato de sodio
SSC	⇒	solución de cloruro de sodio y citrato de sodio.
STE	⇒	solución de tris-ácido clorhídrico, EDTA y cloruro de sodio.
TBE	⇒	solución de Tris base, ácido bórico y EDTA
TCBS	⇒	agar sacarosa, sales biliares-citrato-tiosulfato.
TE	⇒	solución tris-ácido clorhídrico y EDTA.
TSI	⇒	medio de hierro y triple azúcar.
<i>V. cholerae</i>	⇒	<i>Vibrio cholerae</i> .



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Vibrio cholerae</i> .	11
Figura 2.	Mecanismo de acción de la toxina colérica.	17
Figura 3.	Esquema de ribotipos para <i>Vibrio cholerae</i> O1, propuesto por Tanja Popovic (1993).	30
Figura 4.	Amplificación por PCR de los genes 16S y 23S del RNA ribosomal. 1. Ladder 1Kb; 2-5 <i>Vibrio cholerae</i> O1 16S; 6 <i>Escherichia coli</i> 16S; 7 <i>Helicobacter pylori</i> 16S; 8-11 <i>Vibrio cholerae</i> 23S; 12 <i>Escherichia coli</i> 23S; 13 <i>Helicobacter pylori</i> 23S. Foto tomada por el Dr. Berg.	31
Figura 5.	Electroforesis horizontal de minigeles.	43
Figura 6.	Southern blot.	46
Figura 7.	Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Digestión de DNA con <i>Bgl</i> I. A la izquierda marcador de peso DNA lambda <i>Hind</i> III y derecha Ladder 1 Kb.	53
Figura 8.	Productos de amplificación de los genes 16S (carril B) y 23S (carril C) del RNA ribosomal. Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (carril A).	54
Figura 9.	Ribotipos de 14 cepas de <i>V. cholerae</i> no O1 procedentes de siete estados de la República Mexicana y 3 cepas de referencia, con la enzima de restricción <i>Bgl</i> I y la hibridación con los genes específicos 16S y 23S del RNA ribosomal de <i>V. cholerae</i> .	55
Figura 10.	Representación de los ribotipos de 14 cepas de <i>Vibrio cholerae</i> no O1 de siete diferentes estados de la República Mexicana y 3 cepas de referencia de <i>Vibrio cholerae</i> O1. A continuación se indica el carril, número de cepa y procedencia: 1, 33041, Nuevo León; 2, 33044, Nuevo León; 3, 33053, Nuevo León; 4, 42568, Puebla; 5, 52462, Jalisco; 6, 47342, Nuevo León; 7, 48464, Estado de México; 8, 49869, Tamaulipas; 9, 50914, Guerrero; 10, 52452, Colima; 11, 53752, Guerrero; 12, 53762, Guerrero; 13, 47292, Guerrero; 14, 47293, Guerrero; 15, Ribotipo 12, México; 16, Ribotipo 10, Australia; 17, Ribotipo 5, Perú.	56
Figura 11.	Representación de los ribotipos para una cepa de Nuevo León (izquierda) y una de Guerrero (derecha)	60
Figura 12.	Representación de los ribotipos para una cepa de Nuevo León (izquierda) y una de Tamaulipas (derecha)	60
Figura 13.	Representación de 5 ribotipos de las cepas procedentes de Guerrero.	62
Figura 14.	Representación de 4 ribotipos de las cepas procedentes de Nuevo León.	62

---

## ÍNDICE DE TABLAS Y DIAGRAMAS.

Tabla 1.	Características diferenciales de <i>Vibrio spp.</i> , patógenos para el humano.	12
Tabla 2.	Diferenciación de los biotipos de <i>Vibrio cholerae</i> O1. ....	14
Tabla 3.	Factores de virulencia de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	16
Tabla 4.	Diferenciación de <i>Vibrios spp.</i> Comúnmente aislados de TCBS. ....	25
Tabla 5.	Serotipos de <i>Vibrio cholerae</i> serogrupo O1. ....	41
Tabla 6.	Preparación de las muestras de DNA de cada cepa para la digestión con la enzima de restricción <i>Bgl</i> I. ....	44
Tabla 7.	Características fenotípicas y serológicas de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y <i>no</i> O1. ....	52
Diagrama 1.	Características de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	13
Diagrama 2.	Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> a partir de heces. ....	26

---

## RESUMEN.

*Vibrio cholerae* no O1 se aisló de muestras fecales tomadas entre 1991 y 1993 como parte del programa de vigilancia epidemiológica en varios estados de la República Mexicana en que se buscaban los serotipos epidémicos O1 y O139. La distribución de *V. cholerae* no O1 fue indiscriminada y al seleccionar un grupo de estas cepas y determinar su citotoxicidad, observamos efecto citotóxico de redondeo celular y efecto vacuolizante. Por otra parte, las cepas estudiadas no presentaron el gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina colérica, por ensayos de PCR (Figueroa, 1994); considerándose entonces, como cepas toxigenicas de *V. cholerae* no O1, no O139.

En la actualidad se plantea la necesidad de estudiar los patrones fenotípicos y genotípicos de las cepas incluyendo *V. cholerae* no O1 y O139 con el objeto de conocer la relación que existe entre las clonas y su distribución geográfica. Para la genotipificación se utilizan diversas técnicas de Biología Molecular, una de ellas es la ribotipificación, la cual se basa en comparar patrones polimórficos de rRNA que son evolutivamente conservados en los genomas de las especies bacterianas. El caracterizar las cepas por medio de su patrón genotípico permite el estudio de las relaciones entre las cepas de nuevo surgimiento con relación a sus progenitoras y además facilita el rastreo de las cepas epidémicas (Popovic, 1992; Maniatis, 1982).

---

La necesidad de estudiar los patrones fenotípicos y genotípicos de 14 cepas citotóxicas de *V. cholerae* no O1 procedentes de siete estados de la República Mexicana, surgió de la hipótesis de encontrar un probable ribotipo particular con propiedades citotóxicas y los resultados de este trabajo muestran que los ribotipos obtenidos de las 14 cepas fueron diferentes entre si y diferentes a los observados en *V. cholerae* O1, aunque existen ciertas semejanzas. A pesar de que las cepas son citotóxicas, no existe un patrón de bandeo (ribotipo) que se repita, aún entre las cepas procedentes del mismo estado, es decir, cada cepa muestra un ribotipo muy particular. Este resultado muestra la gran diversidad entre este grupo de microorganismos, lo que nos lleva a pensar que se trata de una citotoxina presente en varias clonas involucradas en diarrea causada por *V. cholerae* no O1.

## I. INTRODUCCION.

### ***Vibrio cholerae.***

*Vibrio* y sus más de 20 especies pertenecen a la familia *Vibrionaceae*. El género *Vibrio* comprende bacilos curvos, Gram negativos y con un solo flagelo polar que le permite gran movilidad. *Vibrio* es anaerobio facultativo y posee tanto metabolismo respiratorio como fermentativo; no fijan ni desnitrifican el nitrógeno. Los iones sodio estimulan el desarrollo de todas las especies y son un requerimiento para la mayoría como en el caso de *V. cholerae* el cual está ampliamente distribuido en ambientes acuáticos salobres y su crecimiento se inhibe o crece pobremente en ausencia de sales (Giono, 1993).

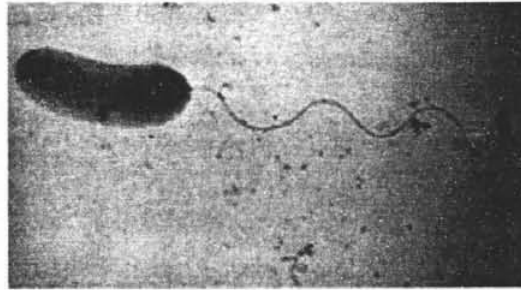


Figura 1. *Vibrio cholerae*

En la tabla 1 se enlistan las especies de *Vibrio*, señalando las patógenas para el humano, así como las pruebas de diferenciación general (Giono, 1994).

### **I.1 *Vibrio cholerae* O1.**

La especie más importante del género *Vibrio* es *Vibrio cholerae* la cual es heterogénea en cuanto a sus características antigénicas y fisiológicas, sin embargo bioquímicamente son muy similares. *V. cholerae* está dividido en más de 138 serogrupos (Diagrama 1) basándose

en aglutinación con antisueros somáticos. Las cepas puras de *V. cholerae* cuando reaccionan con el antisuero somático contra el serogrupo 01 son denominadas *V. cholerae* 01 y el conjunto de cepas de *V. cholerae* que no aglutinan con este antisuero somático son denominados *V. cholerae* no 01 (Sakazaki y Donovan, 1984).

**TABLA 1. Características diferenciales de *Vibrio spp* patógenos para el humano**

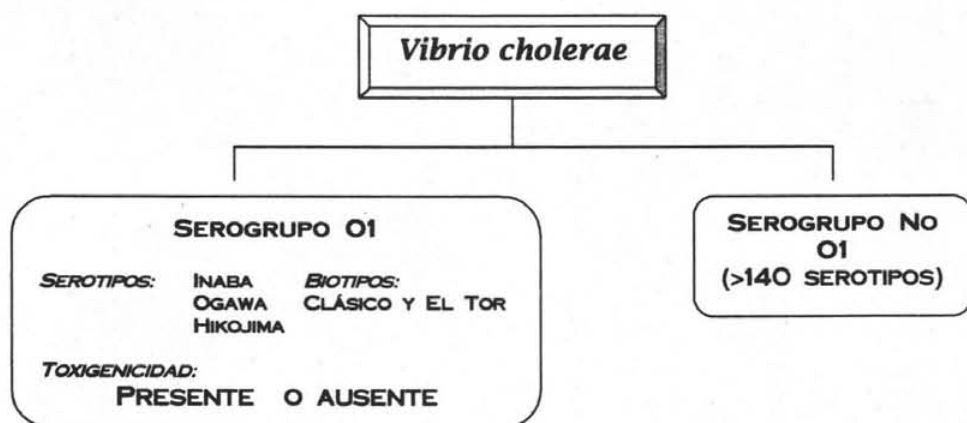
Especie	Crecimiento en NaCl			Voges	Arginina	Indol
	0%	6%	8%	Proskauer	deshidrolasa	
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+/-	-	+/-	-	+
<i>V. alginoliticus</i>	-	+	+	+	-	+/-
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	-	+	-	-
<i>V. damsela</i> *	-	+	-	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+/-	-	+	+/-
<i>V. furnisii</i> **	-	+	+/-	-	+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

\* Ureasa +

\*\* Gas de glucosa  
Giono y col. ,1993

+/- la mayoría de las cepas son positivas

\*\*\* Oxidasa -, nitrito -

Diagrama 1. Características de *Vibrio cholerae*

*V. cholerae* O1 incluye dos serotipos estables principales: el Ogawa y el Inaba y raramente aparece un tercer serotipo, el Hikojima. El segundo nivel de diversidad se refiere a dos clases de biotipos o biovars, el clásico y la variante El Tor, que son variantes fenotípicas diferenciales (Tabla 2) por su comportamiento fisiológico (Giono, 1993).

### Aspectos clínicos

El periodo de incubación del cólera puede ser desde unas cuantas horas hasta cinco días, aunque generalmente es de 2 a 3 días. Suele haber signos premonitorios como anorexia, malestar abdominal y diarrea líquida. Al principio las evacuaciones son de color café con contenido fecal, pero pronto adquieren un color gris pálido con discreto olor a pescado. En los casos graves la frecuente salida de agua y de electrolitos da a las heces una apariencia típica de agua de arroz (Hirschorn, 1971). El cólera también se caracteriza por severos vómitos, deshidratación, calambres musculares y en los casos no tratados se produce la muerte dentro de las 24 horas de su aparición (Giono, 1993).

TABLA 2. Diferenciación de los biotipos de *Vibrio cholerae* O1

PRUEBA	BIOTIPO	
	CLÁSICO	EL TOR
Voges Proskauer	-	+
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Hemólisis de eritrocitos de carnero	-	+
Inhibición con polimixina B (50UI)	+	-
Lisis por bacteriofagos:		
Clásico IV	+	-
FK	+	-
El Tor 5	-	+

Giono, 1993.

**Patogenia.**

Los factores bacterianos que participan en la patogenia del cólera son la movilidad y la adherencia de *V.cholerae* O1, así se produce la colonización intestinal, la producción de enzimas y de diversas enterotoxinas que son factores asociados a la patogenicidad mientras que la toxina colérica (CT, en inglés *cholera toxin*) es la causa principal de la patogenia de la enfermedad (tabla 3) (Giono 1993).

**Toxina colérica.**

La enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* es una proteína que consta de tres polipéptidos, las cadenas polipeptídicas A1, A2 y B. Las cadenas A1 y A2 están unidas covalentemente a través de un puente disulfuro formando un dímero denominado subunidad



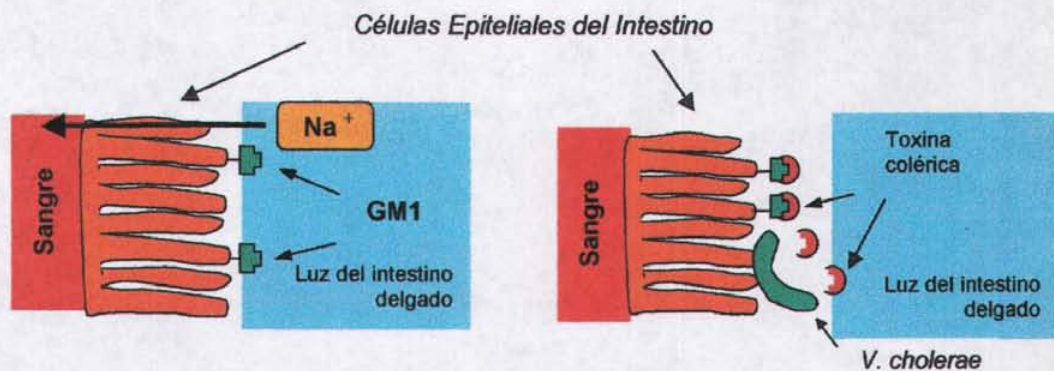
A, que se asocia débilmente con un número variable de cadenas B. La subunidad B contiene el sitio de unión a través del cual la toxina del cólera se combina específicamente con el gangliósido GM1 (un glicolípido complejo) en la membrana citoplasmática epitelial. Pero la subunidad B por sí misma no causa una alteración en la permeabilidad de la membrana. Antes bien, la acción tóxica corresponde a la cadena A1 que activa la enzima celular adenilato-ciclasa, causando la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) a monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). En el mecanismo de acción de la enterotoxina del cólera, el aumento en los niveles de AMP cíclico lleva consigo la secreción activa en la luz del intestino de iones cloruro y bicarbonato procedentes de células de la mucosa intestinal. Este cambio en el equilibrio iónico origina la secreción de grandes cantidades de agua en el lumen del intestino (Figura 2). En la fase aguda del cólera, la intensidad de la pérdida acuosa en el intestino delgado es mayor que la reabsorción de agua por el intestino grueso, y de ahí que se produzca una pérdida masiva de líquidos. Las víctimas del cólera mueren generalmente de deshidratación extrema y el mejor tratamiento para la enfermedad es la administración oral de soluciones de electrolitos que reemplacen los líquidos e iones perdidos (Madigan, 1998).

Los estudios genéticos de la toxina del cólera han demostrado que la enterotoxina colérica está codificada por dos genes *ctxA* *ctxB*. La expresión de *ctxA* y *ctxB* está controlada por un elemento regulador positivo, una proteína codificada por el gen *toxR*. El producto del gen *toxR* es una proteína transmembranal que controla no solo la producción de la toxina del cólera sino también otros factores de virulencia importantes como las proteínas de la membrana externa y los pili que se necesitan para una colonización con éxito de *V. cholerae* en el intestino delgado (Giono, 1993; Madigan, 1998).

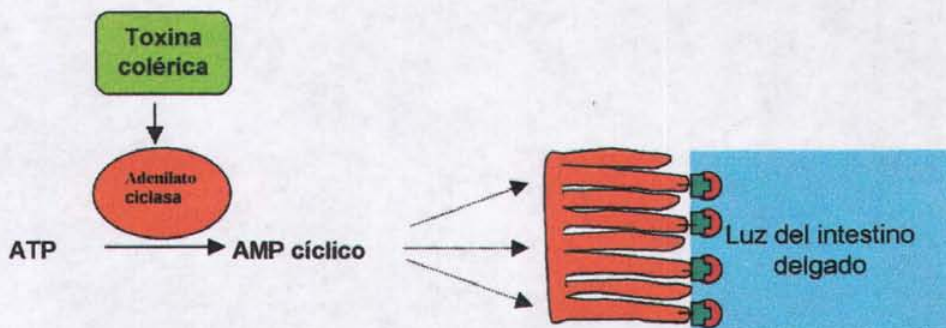
TABLA 3. Factores de virulencia de *Vibrio cholerae*

FACTOR	ENSAYO	ACTIVIDAD in vitro	SITIO BLANCO
<b><i>Vibrio cholerae</i> O1</b>			
Adhesinas	Cultivo celular	Adherencia	Enterocito
Flagelo	Movilidad	Adherencia	
Hemaglutinina	Aglutinación de eritrocitos de pollo	Adherencia	
Proteínas de membrana externa (OMPs)	Electroforesis en gel de poliacrilamida		
Lipopolisacárido	Pirogenicidad en conejos	Endotóxica	
Mucinasa	Enzimático	Degradación de mucina	
Neuraminidasa	Enzimático	Degradación de ác. Neuramínico	
Enterotoxina colérica	Asa ligada, células Y1, RIA, ELISA, sonda génica.	Acumulación de líquidos	Enterocito
Toxina ZOT	Asa ligada	Acumulación de líquidos	
Toxina ACE	Asa ligada	Despolarización	
Citotoxina Shiga	Células HeLa	Muerte celular	
<b><i>Vibrio cholerae</i> no O1</b>			
Toxina LT o ST	Inoculación en ratón lactante	Acumulación de líquidos	Enterocito
Citolisina	Células Y1, CHO	Lisis celular	Héridas, enterocito

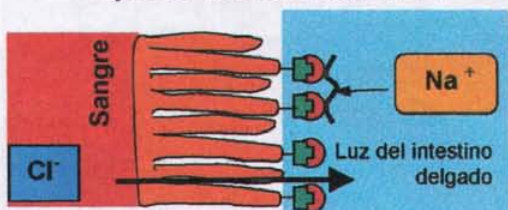
Joseph, 1984.



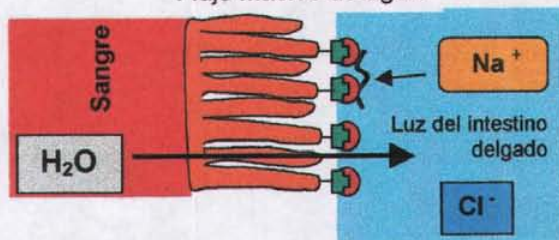
a) Colonización bacteriana del intestino delgado. Producción de toxina colérica y unión en GM1



Bloqueo del flujo de sodio y  
flujo neto de cloro hacia la luz



Flujo masivo de agua



b) Alteración del equilibrio osmótico que origina diarrea

### **Epidemiología**

Se ha visto que el biotipo clásico es el responsable de las primeras seis de las siete grandes pandemias. Sin embargo, en 1962 con el brote de la séptima pandemia, originada en el sureste de Asia, se observaron cepas El Tor. Los serotipos pueden cambiar durante las epidemias pero todos producen enterotoxinas similares y el cuadro clínico es de cólera (Karaolis y col., 1994).

El primer brote de cólera en los Estados Unidos ocurrió en Lousiana en 1978 debido a *V.cholerae* O1 El Tor serotipo Inaba y se dieron pequeños brotes a lo largo de la Costa del Golfo donde se aislaron *V.cholerae* O1 toxigénico hemolítico clonal, diferente de los aislamientos de la séptima pandemia. En 1981 se presentó un brote ocasionado por la misma cepa del Golfo, que involucró a 16 personas en una embarcación en Texas. En los siguientes años se informó de algunos casos asociados a consumo de mariscos crudos provenientes del Golfo de México, que no dieron lugar a brotes epidémicos subsecuentes (Wachsmuth y col., 1994).

En México se presentó el cólera en la Ciudad de Guadalajara en 1833 en donde la enfermedad llegó procedente de Europa pasando a América en el año de 1832. Los últimos casos en México se conocieron en 1883 y fue hasta 1983 cuando se reportó un caso de un turista estadounidense proveniente de Cancún con cólera causado por *V. cholerae* O1 Inaba, toxigénico (Secretaría, 1991).

Sin embargo hasta 1991 se presentó el primer caso de una epidemia de cólera en la República Mexicana que duró hasta 1993. El biotipo El Tor, serotipo Inaba fue el predominante durante el primer año de la epidemia y en 1993 se observó el desplazamiento del serotipo Inaba por el predominio de Ogawa (Gutiérrez, 1994).

---

### **Epidemiología**

Se ha observado que la inmunidad conferida por *V. cholerae* O1 a través de la enfermedad o de una vacuna que no protege contra el serotipo O139, esto confirmó el hecho de que en las zonas donde aparecieron los primeros brotes son endémicas de cólera y, sin embargo, los casos se presentaron con mayor frecuencia en adultos. Hasta la fecha solo *V. cholerae* O1 toxigénico ha sido capaz de causar el cólera epidémico, sin embargo la cepa O139 se comporta en muchos aspectos en forma similar a la cepa epidémica *V. cholerae* O1 biotipo El Tor y se propone que pueda tratarse de un cambio antigénico, ya que la cepa O139 desplazó rápidamente a *V. cholerae* O1 en la propia cuna del cólera clásico (CDC, 1993).

En América se presentó el primer caso importado de una cepa O139 en California, Estados Unidos, reportándose como una cepa productora de toxina colérica y posteriormente aglutinó con el antisuero O139 (MMWR, 1993)

### **I. 3 *Vibrio cholerae* no O1.**

Por muchos años se han asociado enfermedades diarreicas con cepas de *V. cholerae* no O1, pero estos casos ocurren como pequeños brotes localizados o casos esporádicos, sin la tendencia a la epidemia como se observa con *V. cholerae* O1 (Blake y col. 1980; Craig y col. 1994). En Enero de 1991 se reportó un brote de gastroenteritis en Nigeria con un total de 588 muestras procedentes de pacientes con diarrea aguda las cuales fueron estudiadas mostrando que el 20.4% de los casos de gastroenteritis se asoció con *Vibrio* predominando *V. cholerae* O1, sin embargo *V. cholerae* no O1 y *V. parahaemolyticus* están involucrados también (Ndon y col. 1992).

### **Epidemiología**

Se ha observado que la inmunidad conferida por *V. cholerae* O1 a través de la enfermedad o de una vacuna que no protege contra el serotipo O139, esto confirmó el hecho de que en las zonas donde aparecieron los primeros brotes son endémicas de cólera y, sin embargo, los casos se presentaron con mayor frecuencia en adultos. Hasta la fecha solo *V. cholerae* O1 toxigénico ha sido capaz de causar el cólera epidémico, sin embargo la cepa O139 se comporta en muchos aspectos en forma similar a la cepa epidémica *V. cholerae* O1 biotipo El Tor y se propone que pueda tratarse de un cambio antigénico, ya que la cepa O139 desplazó rápidamente a *V. cholerae* O1 en la propia cuna del cólera clásico (CDC, 1993).

En América se presentó el primer caso importado de una cepa O139 en California, Estados Unidos, reportándose como una cepa productora de toxina colérica y posteriormente aglutinó con el antisuero O139 (MMWR, 1993)

### **I. 3 *Vibrio cholerae* no O1.**

Por muchos años se han asociado enfermedades diarreicas con cepas de *V. cholerae* no O1, pero estos casos ocurren como pequeños brotes localizados o casos esporádicos, sin la tendencia a la epidemia como se observa con *V. cholerae* O1 (Blake y col. 1980; Craig y col. 1994). En Enero de 1991 se reportó un brote de gastroenteritis en Nigeria con un total de 588 muestras procedentes de pacientes con diarrea aguda las cuales fueron estudiadas mostrando que el 20.4% de los casos de gastroenteritis se asoció con *Vibrio* predominando *V. cholerae* O1, sin embargo *V. cholerae* no O1 y *V. parahaemolyticus* están involucrados también (Ndon y col. 1992).

### **Aspectos clínicos**

Los rasgos clínicos de la infección causada por *V. cholerae* no O1 que observó Morris y col., en un estudio con voluntarios que recibieron una cepa clínica, fue un período de incubación corto y calambres abdominales frecuentes (Morris, 1990), los cuales fueron muy similares a los descritos en un brote por el consumo de alimentos contaminados reportados en Australia donde la media del período de incubación fue de 11.5 horas (Dakin, 1974). En un brote en Checoslovaquia el período de incubación se estimó entre 20 y 30 horas, el 100% de los pacientes tuvieron diarrea, el 25% vómitos y el 11% fiebre entre 37.4 y 37.7 °C. Ninguno tuvo sangre o moco en heces (Aldová, 1967). Después en un estudio de casos esporádicos de gastroenteritis por *V. cholerae* no O1 reportados al CDC (Centro de Control de Enfermedades en Atlanta), la duración media de la infección fue de 6.4 días y una cuarta parte de los pacientes presentaron diarrea con sangre (Blake y col. 1980).

La bacteremia debida a *V. cholerae* no O1 también se ha descrito con reportes de proporción de mortalidad excedentes al 60%, sin embargo la bacteremia es limitada a personas inmunocomprometidas o a aquellos que padecen enfermedades del hígado.

### **Patogenia**

*Vibrio cholerae* no O1, antes llamado erróneamente vibrio no colérico (NCV) y vibrio no aglutinante (NAG), es muy similar bioquímicamente a *V. cholerae* O1 y se ha asociado ha brotes esporádicos de gastroenteritis (Joseph, 1984). Se ha propuesto que la virulencia de *V. cholerae* no O1 depende de la capacidad de la cepa para colonizar el intestino (Tabla 3) y la producción de una toxina apropiada (Morris, 1990).

Gupta y col. (1956) reportaron que cepas de *V.cholerae* no O1 aisladas de humanos, causan acumulación de fluidos (FA) en ensayos de "asa ligada de conejo" (rabbit ileal loop, RIL). También Zinnaka y Carpenter en 1972 reportaron que el 100% de los aislamientos de pacientes infectados con *V.cholerae* no O1, producen acumulación de fluidos en RIL, pero con un factor de FA mucho menor que el obtenido con cepas El Tor. Además algunas cepas de *V.cholerae* no O1 producen una toxina similar a la colérica y poseen genes similares a los genes de la enterotoxina termolábil de *E. coli*.

Ciznar y col., purificaron parcialmente la toxina de *V.cholerae* no O1 y aislaron una fracción con un factor de permeabilidad (PF) y capacidad hemorrágica, resultando letal para el ratón, pero que no produjo acumulación de fluidos en RIL. (Joseph, 1984). Yamamoto y col. (1983), obtuvieron una enterotoxina colérica de una cepa de *V.cholerae* 0344, E8498 (No O1), que presentó una actividad específica idéntica CT en diferentes sistemas biológicos e inmunológicos e incluso purificaron las subunidades de esta enterotoxina que fueron las mismas subunidades A y B establecidas en CT. Sin embargo, en 1994, Figueroa y col., encontraron cepas de *V.cholerae* no O1 que presentan actividad citotóxica en cultivos de células Vero, pero que no se trata de la toxina colérica, lo que justifica que hayan aparecido aisladas de humanos con diarrea, recibidas en el INDRE. Dado que varios reportes en la literatura implican a *V.cholerae* como productor de toxina colérica, con los estudios que realizaron para la identificación del gen *ctxA* por PCR pudieron descartar que estas cepas produjeran CT y por tanto no pertenecen al serotipo O139 toxigénico que tiene la característica de producirla. Los resultados que obtuvieron, muestran que el efecto citotóxico encontrado no es producido por la toxina colérica, lo que sugiere la existencia de cepas de *V.cholerae* no O1, no O139 con un factor responsable del efecto citotóxico, que no causa el cólera clásico.



### **Epidemiología**

En un estudio de casos esporádicos de diarrea asociado con *V. cholerae* no O1 en Estados Unidos, se ha establecido que los pacientes frecuentemente consumían moluscos, especialmente ostiones crudos. Los ostiones, se establecieron como un vehículo de transmisión epidemiológicamente importantes, porque ellos filtran los alimentos y así pueden concentrar la bacteria.

En Perú, en 1991 se muestrearon 3 lagunas en serie. De estos resultados obtenidos *V. cholerae* no O1 mostró un ciclo estacional donde el pico más alto se observó durante Marzo y Abril y empezó a bajar rápidamente a partir de Julio (Ventura, 1992).

En México, *V. cholerae* no O1 fue aislado de 385 personas con diarrea, en 1966-1967, pero la mayoría de ellos eran viajeros. En 1983 se realizó un estudio epidemiológico en Cancún, en el que no se aisló *V. cholerae* O1, en cambio se reportó una prevalencia alta de *V. cholerae* no O1 en heces de personas con diarrea (González, 1993). Después, debido a la aparición brusca del cólera en Perú, en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (INDRE) se inició desde marzo de 1991 un programa de vigilancia epidemiológica que incluye el estudio de muestras ambientales que pudieran ser vehículo de transmisión de *V. cholerae* O1. De marzo a septiembre del mismo año se procesaron 1655 muestras ambientales y de alimentos, con la colaboración de diversas instituciones. La frecuencia de aislamiento de *V. cholerae* no O1 fue del 46% en aguas negras, 7% en aguas blancas y un 3.5% en alimentos. Sin embargo el aislamiento de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor serotipo Inaba se obtuvo en mucho menor proporción, 5.7% en aguas negras y 0.84% en aguas blancas, no encontrándose *V. cholerae* O1 en alimentos (Bolaños, 1993).

Por otro lado, al iniciar la vigilancia epidemiológica de las cepas de *V. cholerae* no O1 a fin de detectar tempranamente la aparición de *V. cholerae* O139, se observaron algunos casos de *V. cholerae* no O1 aislados de materia fecal, durante la epidemia de cólera que se presentó en México de 1991 a 1993 y por esta razón se estudió la actividad citotóxica de 72 cepas de *V. cholerae* no O1 en células Vero, procedentes de muestras fecales de humanos. Los resultados mostraron que 48 de 72 de cepas (48/72) presentaron actividad citotóxica no relacionada con la toxina colérica. La independencia de la toxina colérica se deduce a partir de que los ensayos de PCR para evidenciar el gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina colérica resultaron negativos. Por tanto estas cepas de *V. cholerae* no O1, relacionadas con cuadros diarreicos, definitivamente no pertenecían al serotipo O139 toxigénico, productor de toxina colérica, descrito para el continente Asiático, lo cual sugiere la posible existencia de cepas *V. cholerae* no O1 productoras de diarrea no pertenecientes al serotipo O139, que se deben vigilar en cuanto a su aparición (Figuroa, 1994).

#### I. 4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico de casos de cólera en México lo hace la Red Nacional de Laboratorios de Cólera, que cuenta con 149 laboratorios en el país y el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas) funge como el centro de referencia. La demostración de la presencia de *V. cholerae* O1 en las heces o el vómito de casos clínicos compatibles con cólera no es requisito indispensable para iniciar el tratamiento, sin embargo es la única manera de corroborar que realmente se trata de un caso de cólera. Además de su hallazgo en casos clínicos, la identificación y genotipificación de la bacteria tienen gran importancia en el análisis epidemiológico de la circulación y el ingreso de diferentes cepas y

en el estudio sobre el impacto de las medidas de vacunación con cepas atenuadas. Lo anterior se logra mediante el aislamiento de la cepa autóctona y la cepa vacunal en los individuos inoculados, en sus contactos y en muestras ambientales complementado con determinaciones serológicas (Giono 1993).

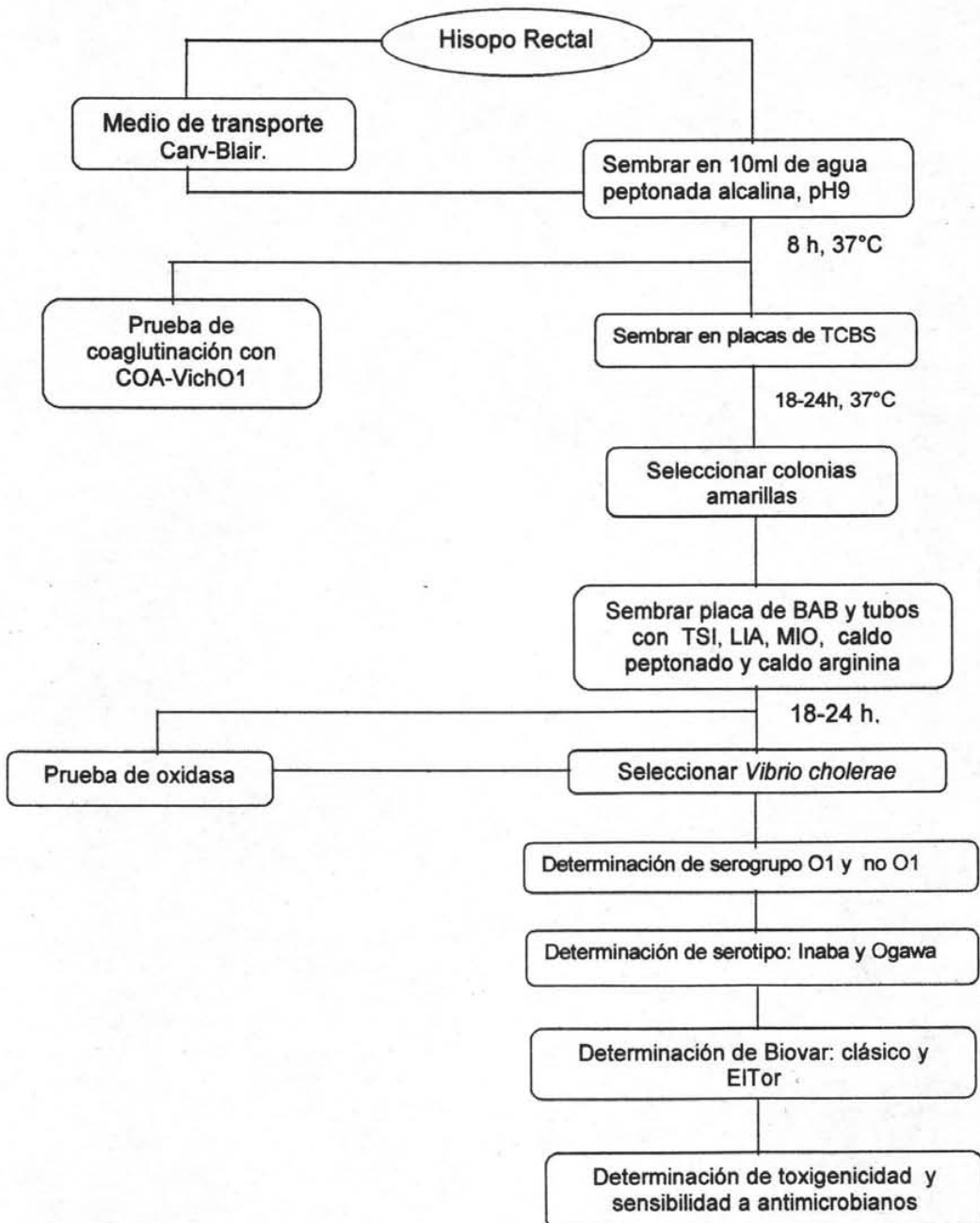
Microbiológicamente, las especies vibriónicas pueden confundirse con enterobacterias y con *Pseudomonas*. Con las primeras, la diferenciación inicial se hace con la prueba de oxidasa y con *Pseudomonas* se hace buscando su incapacidad para fermentar la glucosa. En el diagrama 2 se presenta el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* a partir de heces y la tabla 4 se presentan las pruebas empleadas comúnmente para distinguir los tres vibrios principales que crecen en el medio selectivo TCBS.

**Tabla 4 . Diferenciación de *Vibrio spp.* comúnmente aisladas de TCBS**

PRUEBA	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i> no O1
Fermentación de glucosa	+, no gas	+, no gas	+, no gas
Fermentación de sacarosa	+, raro -	-, raro +	+, raro -
Rojo de metilo, 37°C	+, raro -	+, requiere de NaCl	-, raro+
Reacciones en TSI:			
Superficie	A, raro K	K	K o A
Fondo	A	A	A
Acido sulfhídrico	-	-	-
Crecimiento en caldo nutritivo:			
43°C	-	+	-
Sin NaCl	+	-	+
Con Na Cl 10%	-	+	-

+: positivo; -: negativo; A: ácido; K: alcalino  
Giono, 1993.

DIAGRAMA 2.

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* a partir de heces.

### **I. 5 RIBOTIPIFICACION.**

Los ribosomas están compuestos de una serie de proteínas y de RNAs. Los RNAs ribosómicos juegan un papel crítico durante todas las fases de la síntesis de proteínas, desde la iniciación hasta la terminación, debido a la antigüedad a nivel evolutivo del proceso de la síntesis de proteínas. Recordando la estructura del ribosoma, hay tres moléculas de RNA ribosómico, que en los procariotas tienen una medida de 5S, 16S y 23S. Las moléculas de rRNA bacteriano de gran tamaño, que son 16S y 23S (aproximadamente 1500 y 2900 nucleótidos, respectivamente), contienen varias regiones con secuencias bien conservadas. Estas regiones son útiles para conseguir el alineamiento de secuencias adecuado, pero al mismo tiempo, las moléculas de RNA presentan una variabilidad suficiente de secuencias en otras regiones, que sirven de excelentes cronómetros filogenéticos. El rRNA 5S también se llega a emplear para medidas filogenéticas, pero su tamaño tan pequeño (unos 120 nucleótidos) limitan la información que puede obtenerse de esta molécula (Madigan, 1998).

Los sistemas de tipificación son importantes para la caracterización de las bacterias aisladas de brotes de enfermedades, para determinar el origen y vehículo de transmisión para reforzar medidas de prevención. Los sistemas de tipificación tradicionales están basados solamente en pruebas fenotípicas y tienen limitaciones porque los rasgos fenotípicos son inconsistentes y con frecuencia varía su expresión. El surgimiento de otras técnicas de alta sensibilidad que nos ayudan a la identificación en el ámbito molecular, han favorecido su tipificación (Cheong, 1991).

El RNA ribosomal se ha convertido en una molécula excelente para discernir las relaciones filogenéticas no solo entre las bacterias sino entre los seres vivos. Se trata de moléculas antiguas, funcionalmente constantes, distribuidas universalmente y relativamente bien conservadas a través de un largo trayecto filogenético. Dado que el elevado número de

diferentes secuencias posibles de moléculas de gran tamaño como el RNA ribosómico el parecido entre dos secuencias indica siempre la existencia de algún tipo de relación filogenética, es decir, el grado de semejanza entre las secuencias del RNA ribosómico de dos organismos indica su parentesco evolutivo relativo.

La ribotipificación es hoy por hoy una herramienta de Biología Molecular que permite la identificación de las cepas involucradas en brotes específicos, en áreas donde varios ribotipos están presentes simultáneamente. Esta se basa en el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) de los genes ribosomales, que suele ser característico y genéticamente estable entre las especies (Cheong, 1991; Gustaferrero, 1992). Sin embargo, dependiendo de la enzima de restricción utilizada, la interpretación de los patrones de RFLP puede ser difícil por la multitud de fragmentos cromosomales presentes y la dificultad para observar ligeras diferencias (Popovic, 1992). La transferencia de estos fragmentos a la membrana y la hibridación con una sonda específica reduce bastante el número de fragmentos (Southern, 1975).

Por ejemplo al comparar la hibridación del DNA de tres grupos de bacterias diferentes genéticamente, con sondas de RNA ribosomal de *E. coli*, se observó un sistema con una extensa aplicación, debido a que las secuencias de RNA ribosomal (rRNA) están altamente conservadas y presentes en múltiples copias en el genoma de todas las bacterias. Se ha observado que a pesar de que existen pequeñas variaciones en estos genes, la característica conservada es la estructura secundaria del RNA. Al comparar el RNA ribosomal de especies homologas e incluso al comparar la subunidad mayor del rRNA de todos los organismos eucarióticos conocidos y la subunidad 23S de *E. coli* se observó una similitud de cuatro quintos en la estructura secundaria. Además se definió un core o núcleo

principal conservado de la estructura secundaria donde se localizan todos los sitios funcionales implicados en el proceso de Traducción (Gray, 1990).

Los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S del rRNA bacteriano, marcados convenientemente pueden usarse como sondas para obtener el patrón de hibridación del DNA cromosómico digerido con endonucleasas, que podría ser utilizado para caracterizar las cepas de *Vibrio cholerae* O1 (Popovic, 1992) y de *Vibrio cholerae* No O1 y únicamente estos fragmentos que contienen secuencias únicas complementarias a la sonda son los que se revelan en forma de bandas específicas reproducibles en ensayos similares. El genoma de *E. coli* K12 contiene siete unidades de transcripción para rRNA lo que disminuye el número de bandas esperadas en el patrón de bandeo (Gray, 1990). El número de bandas de hibridación es bastante pequeño (generalmente de 7 a 12 bandas), lo que permite un análisis sencillo y detallado (Cheong, 1991).

Koblavi y col. mostraron que el patrón de RFLP también podía usarse para cepas de *Vibrio cholerae* O1 (Koblavi, 1990) pero fue Tanja Popovic quien propuso un esquema de ribotipos estandarizado (Figura 3), con aplicación epidemiológica para *Vibrio cholerae* O1 de 27 diferentes ribotipos y subtipos de *Vibrio cholerae* O1 basado en la digestión con la endonucleasa *Bgl* I (Popovic, 1993). Este esquema propone perfiles específicos de ribotipos empleando las cepas procedentes de áreas geográficas diversas incluyendo las del Golfo de México y la cepa americana aislada en 1991 de la epidemia que se originó en Perú y que se extendió a toda América.

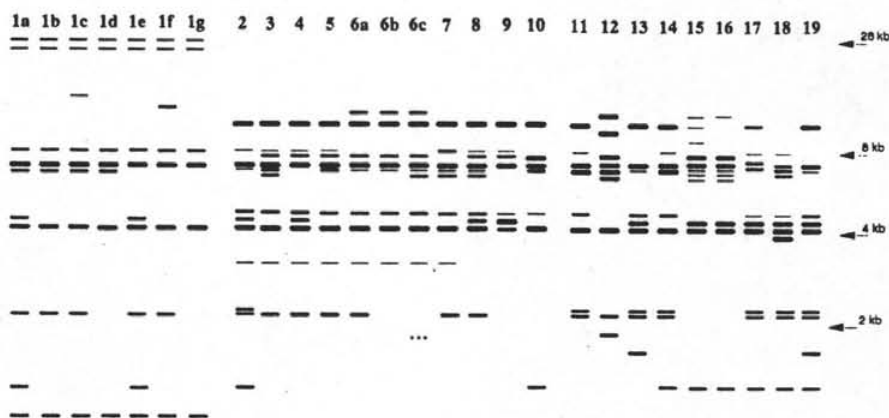


Figura 3. Esquema de ribotipos de *Vibrio cholerae* O1, propuesto por Tanja Popovic. 1993

### **Obtención de la sonda para genes ribosomales.**

Una sonda normalmente es una secuencia de nucleótidos corta, que se puede unir a regiones específicas de una secuencia de nucleótidos blanco. Han sido usadas diferentes sondas para ribotipificación, y estas pueden ser DNA o el mismo rRNA (Wolcott, 1992). La desventaja de las sondas específicas de DNA, es que pueden usarse únicamente para ciertas especies o para ciertas cepas dentro de cada especie. En la ribotipificación este obstáculo ha sido vencido gracias a que es posible usar como sonda el gen que codifica para el rRNA de *E. coli* y se amplía así su uso (Popovic, 1992).

La sonda puede obtenerse por clonación de los genes de la subunidad 16S y 23S del RNA ribosomal de *E. coli* en un plásmido y por transcripción reversa se origina la sonda de DNA complementario (cDNA). Otra forma de obtener la sonda es por manufactura de oligonucleótidos sintéticos, que consisten de un fragmento pequeño de ácidos nucleicos, de



15 a 30 nucleótidos (Barrera, 1993; Popovic, 1992; Wolcott, 1992). Un tercer método para producir la sonda de genes ribosomales, es utilizando oligonucleótidos iniciadores para los genes que codifican para la subunidad 16S y 23S del rRNA y con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtiene el fragmento 16S de aproximadamente 1.5 Kb (figura 4) y el fragmento 23S de 1.8 Kb (Berg, 1994; Gayane, 1995).

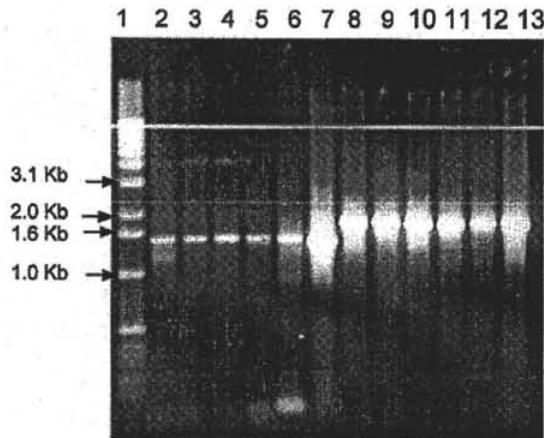


Figura 4. Amplificación por PCR de los genes 16S y 23S del RNA ribosomal. 1. Ladder 1KB, 2-5. *Vibrio cholerae* O1 16S, 6. *Escherichia coli* 16S, 7. *Helicobacter pylori* 16S, 8-11 *Vibrio cholerae* 23S, 12 *Escherichia coli* 23S, 13. *Helicobacter pylori* 23S. Foto tomada por el Dr. Berg.

La sonda es marcada por procedimientos enzimáticos *in vitro*, que involucran la incorporación de los nucleótidos marcados. La marca puede ser radiactiva o no radiactiva (Gustafarro, 1992; Pollard, 1990; Popovic, 1993; Wolcott, 1992).

a) Los métodos radiactivos son los que incorporan radioisotopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{125}\text{I}$ , a la estructura de la molécula.

b) Los métodos no radiactivos, involucran un nucleotido unido covalentemente con una cadena hidrocarbonada que lleve en su extremo la molécula reportera pueden ser:

- Biotina introducida a la sonda como nucleótido biotinado.
- Incorporación de digoxigenina unida al uracilo.

Los procedimientos más conocidos para el marcado de las sondas son:

- a) Marcado por Nick-translation.
- b) Marcado por Random Primers.
- c) Marcado por PCR.

#### **Nick-translation**

El marcado por Nick-translation consiste en una reacción de digestión controlada por la DNAasa I y la reparación de cada corte con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*. Durante el proceso de reparación, la polimerasa va recorriendo la muesca en el DNA en dirección 3' a 5', sacando los nucleótidos de la cadena original y sustituyéndolos por nucleótidos libres en la reacción (Rigby, 1977).

#### **Random Primers.**

El marcado por Random Primers consiste en la síntesis de novo de cadenas marcadas de DNA, por lo que es un procedimiento más eficiente. A la reacción se adicionan hexanucleótidos sintéticos de secuencias totalmente al azar que son los iniciadores de la síntesis de DNA. La síntesis incorpora nucleótidos que están en el medio de reacción, uno de los cuales lleva la molécula reportera. Con este método se obtienen sondas radiactivas y no radiactivas, así también pueden ser marcados los marcadores de peso molecular (Feinberg, 1983).

#### **Marcado por PCR.**

Utilizando los iniciadores para los genes 16S y 23S del rRNA y los desoxinucleótidos que incluye el nucleótido análogo marcado con digoxigenina, los fragmentos de dichos genes pueden ser amplificados y marcados al mismo tiempo por la técnica de PCR para obtener la sonda marcada (Berg, 1994).

### **Reacción en cadena de la polimerasa.**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología ingeniosa que ha resultado de gran valor para la biología molecular y fue descrita por Saiki y col. en 1988. Esta herramienta ha tenido un gran impacto en la investigación, comparable al que en su momento tuvieron el uso de las enzimas de restricción y el Southern blot. La PCR es tan sensible que teóricamente una sola molécula de DNA puede ser amplificada y la copia de un solo gen, puede obtenerse a partir de la mezcla compleja de secuencias genómicas y se observa como una banda, por electroforesis en geles de agarosa (Innis, 1990).

La PCR consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA. Las cadenas individuales de DNA blanco son copiadas por la *Taq* polimerasa en cada ciclo de la reacción, al final cada una de las las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del segmento de DNA sometido al proceso (Barrera, 1993).

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres etapas determinadas por temperaturas y tiempos específicos. En la primera etapa se somete la mezcla a la temperatura de ebullición del agua, a fin de desnaturalizar las cadenas de DNA blanco. La segunda etapa consiste en disminuir la temperatura hasta ajustarla a la temperatura de alineación, donde se da el apareamiento específico entre los oligonucleótidos iniciadores y la cadena blanco. La tercera etapa del ciclo es de polimerización donde la *Taq* polimerasa a una temperatura óptima de 72 °C se une a un iniciador y comienza a adicionar los nucleótidos complementarios al DNA blanco que están presentes en exceso en la solución, sintetizando así al nuevo fragmento (Barrera, 1993; Figueroa 1993; Wolcott, 1992).

La mezcla de reacción requiere de la presencia de cationes como  $Mg^{++}$  o  $Mn^{++}$ , de los cuatro desoxinucleótidos incluyendo el nucleótido unido a la digoxigenina, digoxigenina 11-dUTP, los oligonucleótidos iniciadores específicos para el gen 16S y 23S del rRNA, la *Taq* polimerasa y el DNA molde, todo en una solución amortiguadora adecuada (Berg, 1994).

### **Southern blot.**

El patrón de RFLP de los genes ribosomales se puede verificar por Southern blot, que es un método útil para el análisis genético del DNA genómico. Consiste en digerir el DNA con una enzima de restricción como la *Bgl* I y los fragmentos cromosómicos presentes son transferidos a una membrana donde se hibridan con la sonda específica marcada (Southern, 1975).

La hibridación de la sonda marcada con el DNA que se ha fijado a una membrana de nylon debe llevarse a cabo bajo condiciones de astringencia para obtener una hibridación de secuencia específica. Esta condición de astringencia está dada por la solución de hibridación, la solución contiene componentes muy estables tales como el detergente sarkosyl (N-laurilsarcosina) que evita uniones inespecíficas e intensifica las señales de hibridación. También contiene un reactivo bloqueante que se obtiene de la fraccionación de proteínas de leche el cual ayuda a prevenir uniones inespecíficas a la membrana (Wolcott, 1992; Bohringer, 1989).

La astringencia de la hibridación puede variar utilizando parámetros conocidos, como es la concentración de sal, pH, temperatura y solventes orgánicos. Por tanto se habla de una alta astringencia cuando los parámetros físicos y químicos permiten la hibridación de secuencias complementarias idénticas, es decir con una temperatura elevada y una concentración de sal

baja. Sin embargo cuando existe una hibridación entre secuencias parcialmente complementarias se requiere de una baja astringencia (Meinkoth y Wahl, 1984; Anderson y Young, 1985).

Después de la hibridación se requiere de lavados post-hibridación que son desarrollados para remover alguna sonda no hibridada específicamente a la secuencia complementaria y así la detección de la sonda marcada también sea específica.

La detección de la sonda marcada con digoxigenina mediante un conjugado anticuerpo-enzima (antidigoxigenina-fosfatasa alcalina), es visualizado por una reacción de color o por quimioluminiscencia, al incubar la membrana con el sustrato generador de la señal (Boheringer, 1989). La detección quimioluminiscente tiene una ventaja de detectar pequeñas cantidades de enzima, sobre la reacción de color. En la quimioluminiscencia, la acción de la enzima sobre el sustrato produce luz que se emite y puede ser detectada con un luminómetro o con películas de Rayos X. El sustrato productor de luz es el Luminol o el sistema más reciente y sensible que es un dioxoetano sustituido: 4-metoxi-4-(3 fosfofenil) espiro [1,2 dioxoetano-3,2'adamantano)PPD. La fosfatasa alcalina remueve el grupo fosfato y desestabiliza el compuesto. Como la desfosforilación descompone al dioxoetano este emite una luz que puede ser detectada por un luminómetro o películas de rayos-X (Carlson, 1990).

## II. JUSTIFICACIÓN.

En México se han observado cepas de *Vibrio cholerae* no O1 aisladas de casos esporádicos de diarrea. Después de algunos ensayos en células Vero para detectar su actividad citotóxica, se observó que algunas de estas cepas poseen efecto vacuolizante. Los ensayos de PCR para evidenciar el gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina colérica, fueron negativos, lo que significa que no son coleragénicas y son consideradas como cepas *Vibrio cholerae* no O1, no O139 (Figueroa, 1994).

En la actualidad se plantea la necesidad de estudiar los patrones fenotípicos y genotípicos de las cepas incluyendo *V. cholerae* no O1 O139 con el objeto de conocer la relación que existe entre las cepas, las clonas y su distribución geográfica, para lo cual se utilizan diversas técnicas de Biología Molecular, las pruebas de hibridación de DNA y la ribotipificación que se basa en comparar patrones polimórficos conservados en el genoma bacteriano y permite el estudio de las cepas (Popovic, 1992; Maniatis, 1982). Por tanto surgió la necesidad de estudiar los patrones fenotípicos y genotípicos de las cepas, con el objeto de conocer la relación entre 14 cepas de este grupo de *V.cholerae* no O1 procedentes de siete estados de la República Mexicana.

## III. HIPÓTESIS

Los patrones fenotípicos y genotípicos de las cepas de *V. cholerae* no O1 O139 como agentes productores de diarrea, puede ser muy cercano cuando se trata de agentes involucrados en brotes de diarrea dentro de una región.

## IV. OBJETIVOS.

### IV. 1 OBJETIVO GENERAL.

Establecer un análisis filogenético entre las cepas nativas de *Vibrio cholerae* no 01 aisladas de pacientes con diarrea procedentes de siete estados de la República Mexicana, según los patrones polimórficos de sus genes ribosomales (ribotipos).

### IV. 2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Seleccionar las cepas de *Vibrio cholerae* no 01 que hayan presentado efecto citotóxico, así como las cepas de referencia *Vibrio cholerae* 01.
2. Estudiar el perfil bioquímico de las cepas seleccionadas, característico de *Vibrio cholerae* y confirmar que pertenecen al grupo de *Vibrio cholerae* no 01 por exclusión, mediante el uso del antisuero polivalente contra el serotipo 01.
3. Obtener los ribotipos de las cepas a través de ensayos de hibridación de DNA-DNA, mediante Southern Blot y utilizando sondas correspondientes a los genes ribosomales 16S y 23S marcadas con digoxigenina.
4. Estudiar las posibles relaciones filogenéticas entre las cepas de *Vibrio cholerae* no 01 mediante la comparación de sus patrones polimórficos de ribotipos, agrupándolas según su origen geográfico.

## V. MATERIAL Y EQUIPO.

### V.1 Material.

Tubos eppendorf de 0.5 y 1.5 mL de capacidad nuevos.

Micropipetas de 1.0 mL, 1.0  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 100  $\mu$ L.

Filtros milipore 0.45  $\mu$ m

Bolsas de plástico nuevas para la hibridación

Papel filtro Whatman

Tela esponja .

Refractario

Papel absorbente

Parafilm

Membrana de nylon. Magna Graph MSI

Pipetas graduadas de 2.0, 5.0 y 10 mL

Probetas de 10, 50, 100 y 500 mL

Frascos de vidrio de 200 mL con tapa de rosca.

Matraz erlenmeyer con tapón de rosca de 250 mL

Vasos de precipitado de 50 mL, 250mL, 500 mL y de 2 L.

Medios de cultivo:

Placas de agar Luria.

Medio MIO, TSI, LIA y BAB

Caldo de arginina y caldo nutritivo

Agarosa (BioRad)



**Kits utilizados:**

Kit para Random primers Genius Kit 2 (Boehringer Mannheim)

Kit para marcar con digoxigenina Genius kit 2 (Boehringer Mannheim).

**Enzima de Digestión:**

*Bgl* I . *Bacillus globigil*. 10U/ul (BioLabs)

Buffer 10X: Tris-HCl 6mM; NaCl 150mM; MgCl<sub>2</sub> 6mM; DTT 1mM; pH: 7.9;

Columns Quick Spin T<sup>M</sup> Columns (Boehringer Mannhiem).

Marcador de peso molecular: Ladder 1Kb y Lambda(GIBCO BRL)

**V.2 Equipo:**

Ultracentrifuga

Vortex

Cámara de electroforesis

Cross-linker

Transiluminador Fischer Biotech Ultraviolet Transilluminators

Baño María con agitación.

Termociclador Perkin Elmer

Agitador magnético.

Autoclave

Estufa.

Refrigerador de 20 °C

Bomba de Vacío.

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES. ( Ver anexo).**

---

## VI. METODOLOGIA.

### VI. 1 Selección de las cepas y su identificación bioquímica y serológica.

Un total de 14 cepas de *Vibrio cholerae* no O1 fueron utilizadas en este estudio, cinco cepas fueron procedentes de Guerrero, cuatro de Nuevo León, una del Estado de México, una de Colima, una de Puebla, una de Jalisco y una de Tamaulipas. Todas ellas se aislaron de muestras fecales de pacientes con diarrea y caracterizadas como *V. cholerae* no O1, no O139 por que todas ellas presentaron efecto citotóxico en células Vero, además de resultados negativos en los ensayos de PCR para la determinación del gen *ctx* A (Figuroa, 1994).

Como cepas de referencia se utilizaron tres cepas de *V. cholerae* O1, una cepa procedente de Perú (Ribotipo 5), una cepa de Australia (Ribotipo 10), ambas biotipo El Tor serotipo Inaba y una cepa de México (Ribotipo 12) biotipo El Tor serotipo Ogawa (Popovic, 1993).

Las cepas fueron caracterizadas por las pruebas bioquímicas mínimas necesarias que cubrían el perfil bioquímico característico de *Vibrio cholerae* (diagrama 2) que son: TSI, LIA, MIO, caldo arginina y oxidasa (Giono, 1993) Así también, se estableció que son cepas No O1 por exclusión usando el antisuero polivalente contra el serotipo O1 (Tabla 5).

Tabla 5. Serotipos de *Vibrio cholerae*, serogrupo O1

Serotipo	Antígeno O en el cultivo	Aglutinación con antisueros absorbidos:	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima*	A, B, C	+	+

\*algunos autores no lo reconocen o lo consideran inestable.

Giono, 1993.

## VI. 2 Extracción fenólica de DNA.

Las cepas se sembraron por estría cruzada y se incubaron toda la noche en placas de medio Luria a 37°C, subsecuentemente se comprobó la pureza de las colonias y se resuspendió una asada del crecimiento bacteriano en 800µL de STE 1X contenidos en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL de capacidad. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. a 4°C descartando el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 800µL de TE 10X. Se adicionaron 4µL de lisozima (100 mg/mL) obteniendo una concentración final de 200µg lisozima/mL además de 4µL de RNAasa (100µg/mL). Las muestras fueron incubadas a 37°C por 10 min., después se adicionaron 100µL de dodecil sulfato de sodio al 20% (SDS) obteniendo una concentración final del 1%. Se llevaron las muestras a un baño María donde se incubaron por 15 min. a 65°C posteriormente se adicionaron 4µL de proteinasa K (100 mg/mL) para obtener una concentración final de 200µg/mL y se incubaron a 65°C de 1 a 2 horas.

Sucesivamente a temperatura ambiente se realizaron dos extracciones empleando 100µL de una mezcla de volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una sola extracción final con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Finalmente se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5mL, estéril, y se agregaron 150µl de NaCl 3M para

alcanzar una concentración final de 300mM. El DNA se precipitó agregando 0.6 volúmenes de isopropanol helado, manteniéndose toda la noche a -20°C. EL DNA se obtuvo centrifugando a 12 000 rpm por 15 min. y 4°C. La pastilla colectada se lavó dos veces con un volumen de etanol al 70% y una vez con un volumen de etanol al 95%. El exceso de etanol se descartó y el DNA se dejó secar a 37°C por 45 min. Una vez que el DNA estuvo libre de etanol, se resuspendió en 100µl de agua desionizada, bidestilada y estéril y se conservó a -20°C hasta su uso posterior (Popovic, 1992).

### **VI. 3 Purificación del DNA por Cromatografía de filtración en Sephadex G-25.**

(Procedimiento según el instructivo de Quick spin T<sup>M</sup> columns).

Las columna de Sephadex G-25 preparadas comercialmente, se mezclaron por inversión suave, varias veces para resuspender el soporte. Se removieron las tapas superior e inferior de la columna y está se colocó sobre un tubo colector. La columna se centrifugó a 3000 rpm por 2 min. a 4°C y se descartó el regulador. Luego se equilibró con 100 µL de STE 10X. Conservando la columna en posición vertical, se aplicaron 100µL de DNA en la columna y se colocó en un segundo tubo colector limpio donde se obtendrá el DNA puro. La columna cargada se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. a 4°C y el DNA purificado que se obtiene se conservó a -20°C.

### **VI. 4 Determinación de la concentración de DNA.**

La cantidad de DNA en cada muestra fue determinada por el método en minigel. Por comparación con concentraciones conocidas de DNA.

El minigel se preparó al 0.8% de agarosa para lo cual se pesaron 160 mg de agarosa por cada 20 mL de TBE 1X y se disolvieron llevando a ebullición en TBE 1X hasta que la

solución se observó transparente. En seguida la solución se enfrió a 45°C y se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de Bromuro de etidio (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) homogeneizando y posteriormente la solución se vertió en una cámara de electroforesis horizontal, colocando un peine de ocho pozos se dejó solidificar (Figura 5).

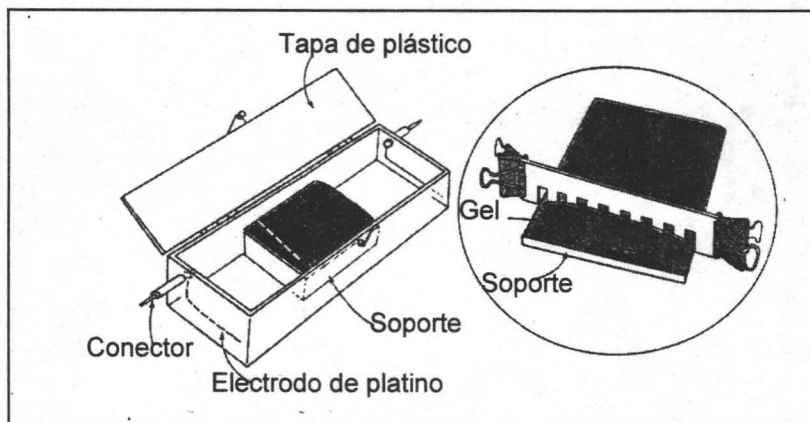


Figura 5. Electroforesis horizontal de minigeles

Por otro lado las muestras se prepararon tomando una alícuota de 5 $\mu\text{L}$  de DNA y se colocaron en un tubo eppendorf de 0.5mL, se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de agua estéril y 10 $\mu\text{L}$  de la solución reguladora de aplicación 10X la mezcla se homogenizó en un vortex y los 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra se depositaron en cada pozo del gel de agarosa. La electroforesis se corrió a 75V por 30 min. La cantidad de DNA fue estimada entre 2.5 y 3  $\mu\text{g}$  con base en la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio (Popovic, 1992), comparada con un patrón de concentración conocida.

## VI. 5 Digestión del DNA con *Bgl* I.

Fueron digeridos de 8.0 a 16.0  $\mu\text{L}$  de DNA de las cepas problema y de las tres cepas de referencia (2.0 $\mu\text{g}$ ) con 1 $\mu\text{L}$  de enzima de restricción *Bgl* I (10 U/ $\mu\text{L}$ ), con volúmenes finales de 20 $\mu\text{L}$ , utilizando la solución reguladora para esta enzima y agua desionizada, bidestilada y estéril (tabla 6). Después de 3 horas de incubación a 37°C, se tomó una alícuota de 2 $\mu\text{L}$  del DNA digerido (200ng) y se corrieron en un minigel de agarosa al 0.8% (pregel) en TBE 1X con bromuro de etidio a 75 V. Se observó el minigel después de haber corrido 30 min. y se determinó el grado de digestión de cada muestra de DNA. Cuando el gel presentaba una banda, la digestión se presentaba parcial y entonces se adicionó 1 $\mu\text{L}$  más de la enzima, incubando toda la noche a 37°C hasta obtener corrimientos homogéneos (Popovic, 1992 modificada ).

**Tabla 6.** Preparación de las muestras de DNA de cada cepa para la digestión con *Bgl* I

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
CEPA	33041	33044	33053	42568	52462	47342	48464	49869	50914	52452	53752	53762	47292	47293	Rib. 12	Rib. 10	Rib. 5	47293
uL DNA	8	8	8	8	8	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Buffer 10X	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Bgl</i> I uL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ddH <sub>2</sub> O uL	9	9	9	9	9	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Vol. Final uL	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Concentración de *Bgl* I = 10 U/uL

## 6. HIBRIDACION POR EL METODO DE SOUTHERN BLOT.

### a) Electroforesis en gel de agarosa para el Southern Blot.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X, sin tefir. En el pozo 1 se colocaron 5 $\mu\text{L}$  (500ng) del marcador de peso Ladder 1Kb y en el último pozo 10 $\mu\text{L}$  (500ng) del marcador de peso Lambda-*Hind* III (fago Lambda cortado con la enzima *Hind* III), el resto de los

pozos fueron ocupados por el volumen de DNA digerido de cada muestra (1.8µg). Se hizo la electroforesis a 30V por 18 horas y después fue teñido con bromuro de etidio (0.5µg/mL) por 30 min. El gel se fotografió con una escala en milímetros colocada del lado izquierdo para medir la distancia recorrida de las bandas que aparezcan en la placa de rayos-X.

#### **b) Preparación del gel para el Southern blot.**

Para depurar el DNA, el gel se sumergió en 200mL de HCl 0.25M por 5 min. o hasta que el Azul de bromofenol viró a color amarillo. Después, el gel se lavó con agua y se sumergió en 200mL de la solución alcalina de desnaturalización (NaOH 0.5M; NaCl 1.5M), por 30 min. Se eliminó esta solución y sin lavar el gel se sumergió el gel en 200mL de la solución de neutralización (Tris-HCl 0.5M; NaCl 1.5M) por 20 min. Para asegurar su orientación se marcó el gel cortando la esquina inferior derecha (Popovic, 1992).

#### **c) Transferencia del DNA a la membrana de Nylon o "Southern blot".**

En un refractario se colocó un soporte de tela esponja de celulosa, ligeramente mayor que el gel impregnándola en abundante SSC 20X (Figura 6). Encima del soporte se colocó un papel filtro del tamaño del gel, evitando que quedaran burbujas atrapadas. Enseguida se colocó el gel con la cara superior hacia abajo y se removieron todas las burbujas. Alrededor del gel se puso una trampa con parafilm para evitar corto circuito. Encima del gel se colocó una membrana de nylon previamente sumergida en agua destilada y luego en SSC 2X, 5 min., hacia la que se llevó a cabo la transferencia del DNA. La membrana se marcó cortando la esquina inferior izquierda, para indicar el lado donde se transfirió el DNA. Encima de la membrana se colocó un papel filtro humedecido en SSC 2X, del tamaño del gel seguido de un bloque de papel secante, de tal forma que quedó como un sandwich y finalmente se le colocó encima un peso de 400 a 1000g. Después de transferir

toda la noche, la membrana se removió y se lavó ligeramente en SSC 6X con la cara que lleva el DNA hacia arriba. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora y entonces el DNA transferido se fijó a la membrana con radiación UV exponiéndola por 2 min. en el Cross-linker y conservándola posteriormente en un folder de papel filtro a temperatura ambiente hasta el momento de prehibridación (Southern, 1975; Popovic, 1992).

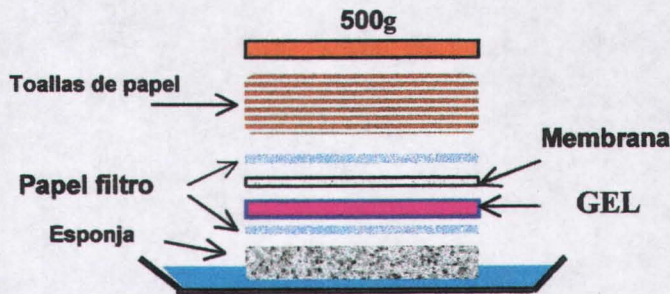


Figura 6. Southern blot

#### d) Prehibridación.

La solución de prehibridación se incubó a 65°C en baño María hasta que el reactivo bloqueante se disolvió, aproximadamente 1 hora. De esta solución se tomaron 40 mL y fueron vertidos en una bolsa conteniendo la membrana, se removieron todas las burbujas y se selló la bolsa. La membrana se incubó 1 hora a 65°C.

#### e) Hibridación con la sonda de los genes 16S y 23S del rRNA

Las sondas de rDNA marcadas con digoxigenina se mezclaron y se llevaron a ebullición por 10 min., en seguida se colocaron en hielo por 5 min. Después esta mezcla se adiciono a 15mL de la solución de prehibridación, obteniendo así la solución de hibridación.



La solución de prehibridación se descartó y se sustituyó por la solución de hibridación. Se removieron todas las burbujas y nuevamente se selló la bolsa incubándola toda la noche a 65°C. Después de la incubación se recuperó toda la solución de hibridación que contenía la sonda marcada y se conservó a -20°C, para reutilizarla posteriormente.

**f) Hibridación con los marcadores de peso molecular.**

Los marcadores de peso molecular marcados con digoxigenina se hirvieron durante 10 min. y rápidamente se enfriaron sobre hielo por 5min. para desnaturalizar las cadenas. Se tomaron 10 µL de estos marcadores y se adicionaron a 15 mL de solución de prehibridación. Luego se agregaron a la bolsa que contenía la membrana y se incubó a 65°C durante 3 horas. La solución de hibridación que contenía los marcadores se recuperó y se conservó a -20°C.

**g) Lavados posthibridación para eliminar la señal de fondo.**

La membrana se introdujo en 100 mL de la solución lavadora 1 se enjuagó rápidamente y se descarto. Se adicionaron 200mL de la solución 1 y se lavó con agitación a temperatura ambiente por 5 min. A continuación se lavó dos veces con 200mL de la solución lavadora No. 2 a 65°C y con agitación por 15 min.

**h) Revelado de los resultados.**

Después de lavar con la solución 2, se enjuagó la membrana con 100mL de solución reguladora A con agitación a temperatura ambiente por 1 min. La membrana se cambió a una bolsa conteniendo 15 mL de solución reguladora A más 5% de leche descremada como solución bloqueadora y se incubó toda la noche a 4°C. Esta solución se descartó y se adicionaron 20mL de buffer A más 5% de leche descremada y 4µL del conjugado (antidigoxigenina-fosfatasa alcalina). La membrana se dejó en contacto con el conjugado

por 30 min. a temperatura ambiente y con agitación. Se recupero la solución de leche con el conjugado y se conservó a 4°C para reutilizarla posteriormente. La membrana se lavó 2 veces con 100mL de solución reguladora A por 15min. a temperatura ambiente y con agitación, después se lavó con 100mL de solución reguladora B y dejando gotear el exceso de solución, la membrana se removió y se colocó en un folder de mica. La membrana se bañó con 2 mL de solución reguladora B más 20µL del sustrato quimioluminiscente (Lumigen PPD); se retiro el exceso de la solución y la membrana se incubó a 37°C por 1 hora. Se expuso a una placa de rayos-X por 30 min. para obtener un primer resultado. Después se conservó a 4°C hasta por 24 horas exponiéndola, nuevamente en caso necesario, a una nueva placa de rayos-X.

#### **VI. 7 Obtención de la Sonda rDNA marcada con Digoxigenina por PCR.**

Para marcar las sondas de los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA), se utilizó la PCR para amplificar dichas secuencias en presencia de un nucleótido marcado con digoxigenina. Se utilizaron los siguientes iniciadores:

a) Oligonucleótido para secuencia del gen 16S

11636 : 5' – TAC GGY TAC CTT GTT GTT ACG ACT

11638 : 5' – GTT TGA TCC TGG CTC AGA GTG AAC

b) Oligonucleótido para secuenciación de 23S

130f : 5' – CCG AAT GGG GVA ACC C            V = A:G:C

2747r : 5' – GYT TAG ATG CYT TC            Y = C:T

Se agregaron 2 $\mu$ L de cada uno de los iniciadores específicos para las secuencias de dichos genes. Los iniciadores 16S y 23S se colocaron por separado, en tubos eppendorf de 0.5mL, adicionando a cada tubo 3 $\mu$ L de la mezcla de los dNTPs-digoxigenina 10X (2.5 mM de cada nucleótido en agua destilada, incluyendo dUTP, nucleótido análogo marcado con digoxigenina) además se adicionaron 2.5 $\mu$ L de la solución reguladora de reacción PCR 10X, 3 $\mu$ L de DNA de *Vibrio cholerae* O139 como DNA blanco, 13.9  $\mu$ L de agua desionizada, bidestilada y estéril. Por último se adiciono 0.6 $\mu$ L de la enzima *Taq* polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L).

En tubos similares se llevaron a cabo reacciones equivalentes en ausencia de digoxigenina en la mezcla de reacción, como controles de amplificación de ambos fragmentos. Todas las mezclas se homogeneizaron suavemente y se sellaron con vaselina estéril, dando previamente, un giro en la centrífuga para llevar el volumen al fondo. Los tubos se sometieron a 15 ciclos en el Termociclador Perkin-Elmer con una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 4 min. Después cada ciclo comprendió una temperatura de desnaturalización de 95°C por 1 min., la temperatura de alineación fue de 50°C por 1 min. y la temperatura de extensión fue de 72°C por 2 min.

La amplificación de la sonda se verificó corriendo 5 $\mu$ L de cada producto de PCR sin marcar (16S y 23S rDNA) como controles de amplificación en minigeles de agarosa al 1.2%, para observar los fragmentos de 1.5 y 1.8 Kb, e implícitamente, se determinó la amplificación de las sondas marcadas con digoxigenina.

**8. Sonda de marcadores de peso Ladder 1Kb y Lambda-Hind III marcados con digoxigenina por Random Primers.**

En un tubo eppendorf estéril se colocaron 1.5µL de el marcador de peso Ladder 1Kb y 3.8µL del marcador Lambda-Hind III más 8.7µL de agua. Se llevaron a ebullición por 10 min. e inmediatamente se enfriaron en baño de hielo por 5 min. Después se adicionaron en frío, los siguientes reactivos: 2µl de los primers 10X (iniciadores al azar), 2µL de dNTP's-digoxigenina y 1µL de la enzima *Klenow*, todos los reactivos pertenecían al kit de Random primers, la muestra fue mezclada e incubada a 37 °C por 1 hora. La reacción se detuvo adicionando 2 µL de EDTA 0.2M (pH 8.0) y el volumen se llevó a 100µL con agua desionizada, bidestilada y estéril. Se purificó por columna y se conservó a -20°C (Popovic, 1992).

## VII. RESULTADOS

### VII. 1 Selección de cepas.

Fueron seleccionadas 72 cepas que en estudios anteriores (Figueroa, 1994) presentaron efecto citotóxico en células Vero y dieron resultados negativos en los ensayos de PCR para identificar el gen *ctxA*. Las 14 cepas seleccionadas presentaron un perfil bioquímico característico de *Vibrio cholerae*, con movilidad positiva y la capacidad para descarboxilar la ornitina pero no la arginina. Las cepas muestran también, la capacidad de producir indol así como citocromo oxidasa, además se observó que pueden desaminar la lisina, aunque pueden o no descarboxilarla. Se observó que las cepas de *Vibrio cholerae* no O1 tienen la capacidad de utilizar la glucosa, sin embargo pueden ser sacarosa y lactosa positivas o negativas, al igual que la del grupo O1.

De las 14 cepas problema ninguna aglutinó con el suero polivalente contra el grupo O1, por tanto fueron *Vibrio cholerae* serotipo no O1 (Tabla 7).

### VII. 2 Digestión del DNA con *Bgl* I

Los productos de la digestión con *Bgl* I del DNA de las cepas problema y de las cepas de referencia, mostraron una digestión total en su corrimiento electroforético en geles de agarosa al 0.8 % y teñidos con bromuro de etidio. Este resultado se observa como un barrido uniforme (Figura 7). Tres de las muestras presentaron baja concentración de DNA pero se consideró aceptable y el resto de las muestras tuvieron una concentración homogénea del producto de la digestión.

**TABLA 7. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y SEROLOGICAS DE LAS CEPAS DE *Vibrio cholerae* O1 Y no O1**

No. DE CEPA	PROCEDENCIA	FECHA DE AISLAMIENTO	SEROTIPO	ARG	INDOL	MOV	ORN	TSI	LIA	OX
33041	Nuevo León	Enero, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
33044	Nuevo León	Enero, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
33053	Nuevo León	Enero, 1993	no O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
42568	Puebla	Julio, 1993	no O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
47292	Guerrero	Agosto, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
47293	Guerrero	Agosto, 1993	no O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
47342	Nuevo León	Agosto, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
48464	Edo. México	Agosto, 1993	no O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
49869	Tamaulipas	Septiembre, 1993	no O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
50914	Guerrero	Octubre, 1993	no O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
52452	Colima	Noviembre, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
52462	Jalisco	Noviembre, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
53752	Guerrero	Diciembre, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
53762	Guerrero	Diciembre, 1993	no O1	-	+	+	+	K/A	K/N	+
Rib. 5	Perú	1991	O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
Rib. 10	Australia	1977	O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+
Rib. 12	México	1983	O1	-	+	+	+	A/A	K/N	+

NOTA: A = ácido. N = neutro. ARG = descarboxilación de la arginina. OX = oxidasa. K = alcalino. MOV = movilidad. ORN = descarboxilación de la ornitina. TSI = agar triple azúcar- fierro. LIA= agar lisina-fierro. Rib. = Ribotipo.

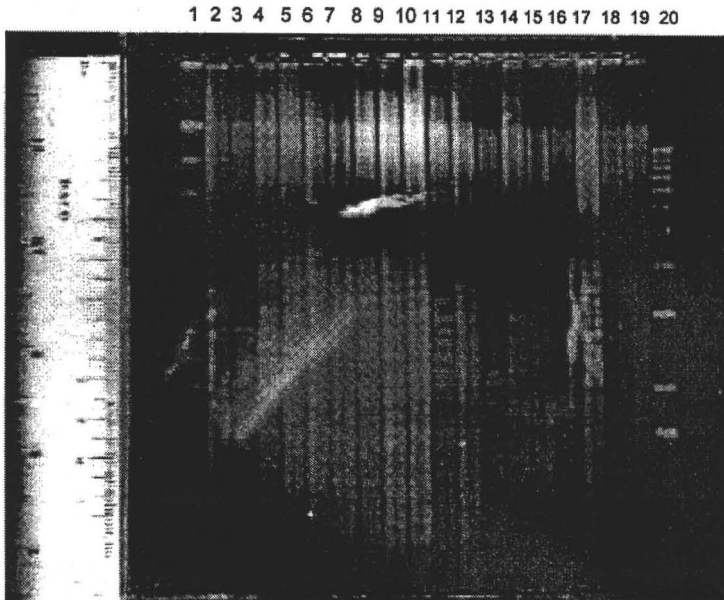


Figura 7. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Digestión de DNA con *Bgl* I. A la izquierda marcador de peso DNA lambda *Hind* III (1) y derecha Ladder 1 Kb (20).

### VII.3 Obtención de la Sonda.

Mediante electroforesis en minigeles de agarosa al 1.2 % de los productos de PCR en ausencia de digoxigenina dUTP, se observó amplificación de los fragmentos cromosómicos que codifican para la subunidad 16S y 23S (Figura 8), además de coincidir con el fragmento de *E. coli* y *Vibrio cholerae* O1 (Figura 4). La sonda 16S mostró una banda de 1.5 Kb y la sonda 23S de 1.8 Kb.

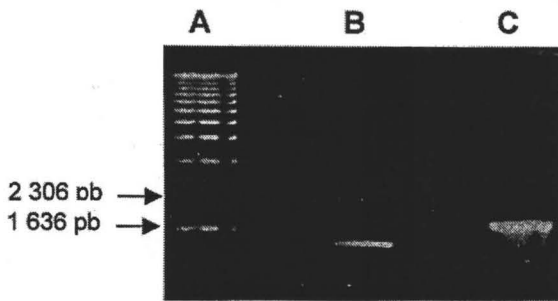


Figura 8. Productos de amplificación de los genes 16S (carril B) y 23S (carril C) del RNA ribosomal. Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (carril A).

#### VII.4 Patrón de ribotipos.

El tamaño de cada banda se obtuvo a partir de la curva patrón de la distancia recorrida (cm) contra el Log pM del marcador de peso molecular Ladder 1 Kb, por tener mayor número de puntos.

Se observó que los RFLP de las cepas problema dieron entre 5 y 11 bandas con un arreglo muy particular dentro de un rango de 0.9 Kb a 11 Kb (Figura 9). Al obtener el tamaño de cada banda se presenta un fragmento común en todas las cepas con un tamaño de 5.86 Kb y uno de 3.97 Kb el cual no se encuentra en dos cepas y ambas bandas se observan en las cepas de referencia.

Al comparar las cepas de *Vibrio cholerae* O1 se observó que el Ribotipo 5 y el Ribotipo 10 poseen un triplete de bandas conservado con tamaños estimados de 5.35, 5.86 y 6.40 Kb. Los *Vibrios cholerae* no O1 mostraron fragmentos relacionados con dicho triplete, pero con arreglos diferentes, dentro de un intervalo de 5.0 a 6.6 Kb. De las 14 cepas hubo 11 que mostraron 3 bandas representativas del triplete conservado; 2 cepas mostraron solo 2 bandas y una sola cepa mostró 4 bandas. Los ribotipos muestran que 10 cepas, contienen un fragmento común de 7.6 Kb, banda que también se exhibe en los Ribotipos 5 y 10. Además se observa la presencia de una banda ligera de 918 pb en 8 de las 14 cepas.



bandas y una sola cepa mostró 4 bandas. Los ribotipos muestran que 10 cepas, contienen un fragmento común de 7.6 Kb, banda que también se exhibe en los Ribotipos 5 y 10. Además se observa la presencia de una banda ligera de 918 pb en 8 de las 14 cepas. Se observó que el patrón de bandeo de los *Vibrio cholerae* no O1, vacuolizantes, a pesar de presentar fragmentos comunes, los 14 RFLP de los genes ribosomales tienen un arreglo muy particular.

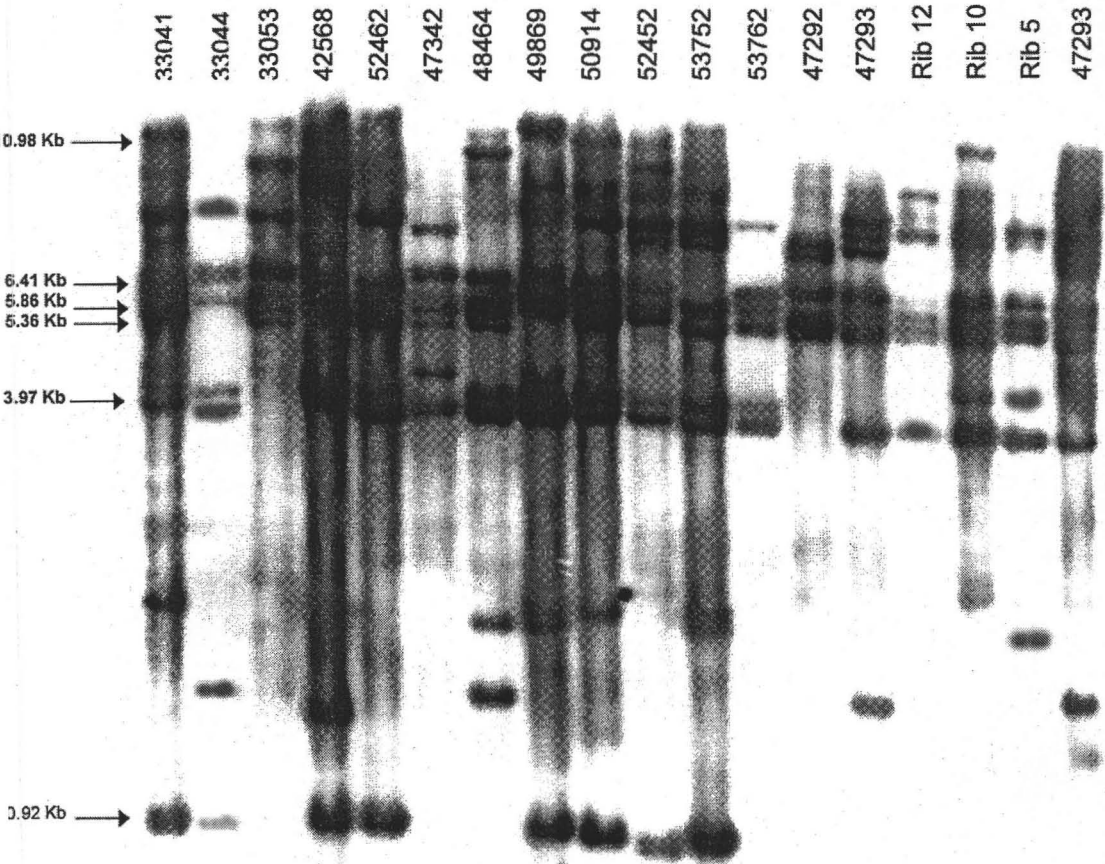
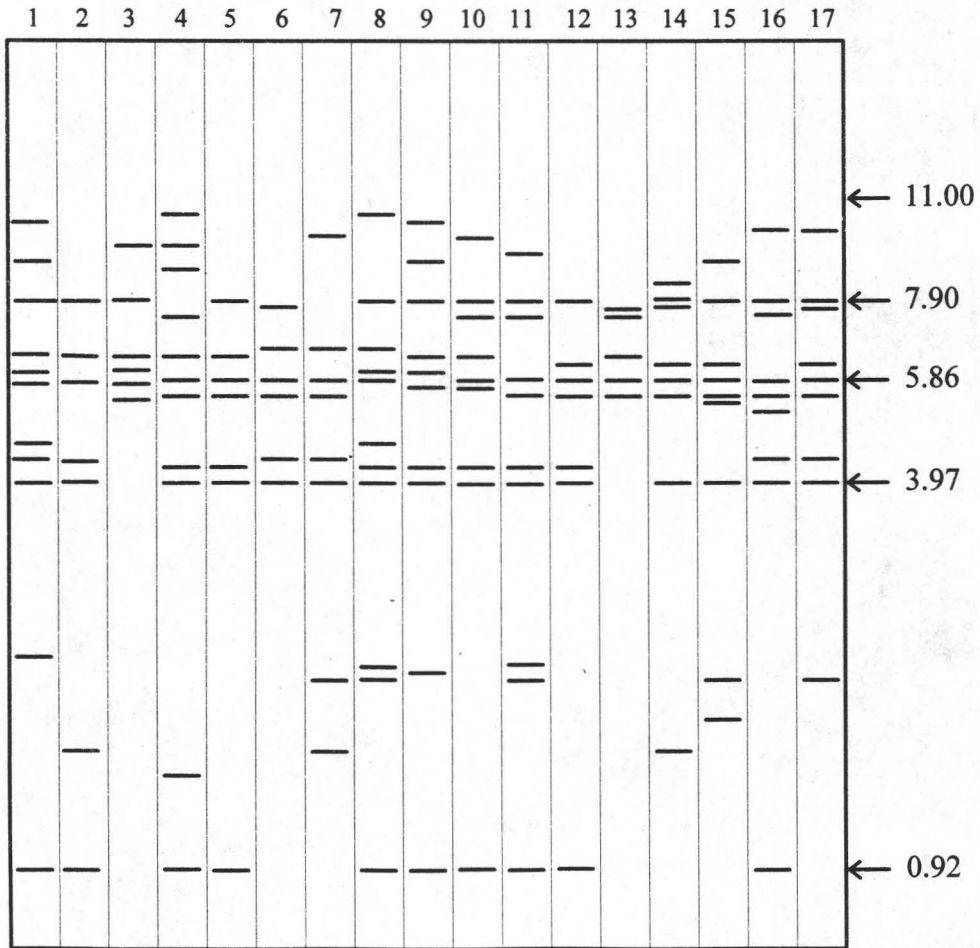


Figura 9. De izquierda a derecha ribotipos de 14 cepas de *V. cholerae* no O1 procedentes de siete estados de la República Mexicana, 3 cepas de referencia de *V. cholerae* O1 y la repetición de una de las cepas de *V. cholerae* no O1. Todos los ribotipos se realizaron cortando el DNA con la enzima de restricción *Bgl* I y la hibridación con los genes específicos 16S y 23S del RNA ribosomal de *V. cholerae* O139.



**FIGURA 10.** Representación de los ribotipos de 14 cepas de *Vibrio cholerae* No O1 de siete diferentes estados de la República Mexicana y 3 cepas de referencia de *Vibrio cholerae* O1. A continuación se indica el carril, número de cepa y procedencia: 1, 33041, Nuevo León; 2, 33044, Nuevo León; 3, 33053, Nuevo León; 4, 42568, Puebla; 5, 52462, Jalisco; 6, 47342, Nuevo León; 7, 48464, Estado de México; 8, 49869, Tamaulipas; 9, 50914, Guerrero; 10, 52452, Colima; 11, 53752, Guerrero; 12, 53762, Guerrero; 13, 47292, Guerrero; 14, 47293, Guerrero; 15, Ribotipo 12, México; 16, Ribotipo 10, Australia; 17, Ribotipo 5, Perú.

## VIII. DISCUSION.

Se estudiaron los patrones fenotípicos y genotípicos de 14 cepas de *Vibrio cholerae* no O1 procedentes de siete estados de la República Mexicana que presentan efecto citotóxico *in vitro* en células Vero en ausencia del gen *ctxA*, con objeto de observar un probable genotipo toxigenico. Este estudio formaba parte del programa de vigilancia epidemiológica en que se buscaba el serotipo O139 a fin de detectar con anticipación un probable surgimiento de esta cepa.

Microbiológicamente las pruebas bioquímicas de las 14 cepas fueron muy similares y no aglutinaron con el suero polivalente para el grupo O1 (Tabla 7), lo que nos confirma que pertenecen al grupo no O1.

El estudio genotípico se basó en la Ribotipificación que se ha utilizado para determinar la relación genética de las clonas dentro de una especie y en este caso de *V.cholerae* no O1. La sonda que se utilizó en este trabajo incluyó a los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S del rRNA y se observó que el uso de esta sonda hace más eficiente el análisis de los ribotipos, comparada con el patrón de bandeo producido solamente al cortar con enzimas de restricción ya que disminuye el número de bandas para el análisis. Grimont y Grimont demostraron que diversas especies pueden diferenciarse con esta sonda (Grimont), tal como se ha reportado para *Shigella* (Hinojosa, 1991), *Helicobacter pylori* (Rautelin, 1994) *V. cholerae* (Popovic, 1993), *Clostridium difficile* (Kristjánsson, 1994) y para muchos otros.

Gracias a que los ácidos nucleicos ribosomales son ubicuos, moléculas altamente conservadas y pueden ser secuenciadas se han determinado iniciadores específicos para la amplificación de los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S (Lane, 1991). Berg amplificó tales genes por PCR a partir de DNA de *E. coli*, *H. pylori* y de *V. cholerae*, mostrando bandas similares a las subunidades 16S (Figura 4) y 23S (Berg, 1994). Así también en este trabajo, al amplificar dichos genes a partir del DNA de *V. cholerae* O139, se observó la similitud con las bandas de tales bacterias (Figura 8) además al utilizarla como sonda marcada con digoxigenina por PCR, los resultados muestran que los ribotipos 5, 10 y 12 utilizados como referencia (Figura 9 y 10) son idénticos a los que reportó Popovic y col. (Popovic, 1993), donde se usó una sonda de rRNA de *E. coli*. Por tanto proponemos que la sonda preparada a partir de los fragmentos conservados de los genes 16S y 23S del rRNA de *V. cholerae* O139 es tan eficiente como la que se obtiene por transcripción inversa del rRNA de *E. coli* (Popovic, 1993), o la sonda obtenida con el fragmento *Bam*HI de 7.5 Kb del plásmido de *E. coli* pK3535 (Krinstantjansson, 1994; Faruque, 1999).

Al analizar los resultados de la hibridación del DNA de las 14 cepas de *V. cholerae* no O1 y de las tres cepas de referencia con la sonda de rDNA, los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) de los genes ribosomales, muestran que 12/14 cepas presentaron dos fragmentos de 3.97 y 5.86 Kb los cuales también están presentes en los ribotipos 5, 10 y 12 e incluso en el resto de los ribotipos de *V. cholerae* O1 (Popovic, 1993), así como también los presentan los ribotipos de *V. cholerae* O139 (Popovic, 1995) y con los propuestos para *V. cholerae* no O1 y O1 por Dalsgaard y col. en 1995 y 1997, respectivamente.

Al analizar *V. cholerae* no O1, 10/14 evidenciaron una banda de 7.9 Kb al igual que *V. cholerae* O1 y en 9/14 cepas se observó una banda que reporta el ribotipo 10 y nueve ribotipos más del esquema de *V. cholerae* O1 cuyo tamaño es de 917 pares de bases (pb). Al comparar las cepas de *V. cholerae* no O1 con las cepas de referencia de *V. cholerae* O1 se observó que 11/14 cepas presentaron tres bandas comunes y cercanas entre 5.1 y 6.6 Kb al igual que los ribotipos 5 y 10. Solamente en 2/14 cepas se presentaron dos bandas dentro de este intervalo y solo una fue capaz de presentar cuatro bandas comunes al ribotipo 12.

Los resultados mostraron que entre las 14 cepas no hay un patrón de bandeo que se repita, todas presentan un ribotipo muy particular y un dato importante es que ninguna de las 14 cepas presentó el patrón 3a o 5a descrito para *V. cholerae* O139, propuesto por Popovic (1995), aunque tampoco se obtuvieron los patrones BI, BII o BIII propuesto por Faruque y col. para *V. cholerae* O139 (1999).

En algunos casos los 14 RFLP de los genes ribosomales se asemejan, pero difieren en el tamaño de las bandas, como en el caso de la cepa 47342 procedente de Nuevo León y la cepa 53762 procedente de Guerrero ( Figura 11), mientras ambas cuentan con seis bandas de arreglo similar, el tamaño de cada banda difieren en por lo menos 200pb .

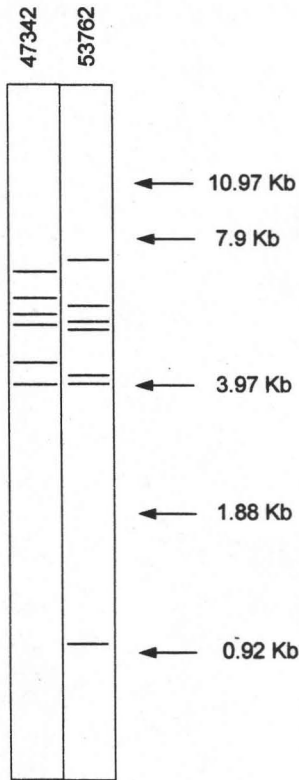


Figura 11. Representación de los ribotipos para una cepa de Nuevo León (izquierda) y una de Guerrero (derecha)

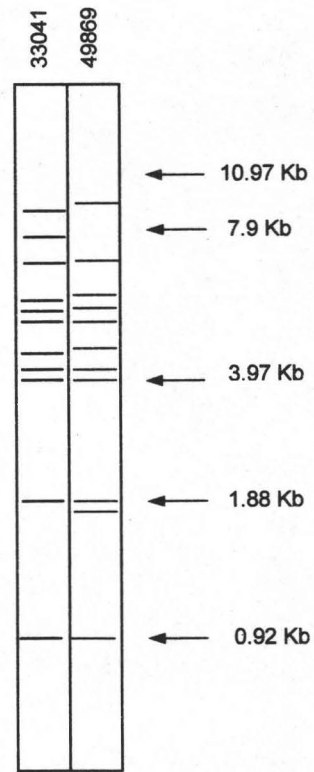


Figura 12. Representación de los ribotipos para una cepa de Nuevo León (izquierda) y una de Tamaulipas (derecha)

Por otro lado la cepa 33041 procedente de Nuevo León y la cepa 49869 procedente de Tamaulipas comparten dos tripletes de bandas (Figura 12), una dentro del rango de 5.0 a 6.6 Kb y el otro en un rango de 3.97 a 4.61 Kb, además de cuatro bandas de tamaño equivalente y solo son diferentes en la presencia de dos bandas, una de 8.91 Kb que se encuentra en la cepa 33041 y la segunda banda distinta es de un tamaño de 1.88 Kb que corresponde a la cepa 49869. Esto mismo sucede entre los ribotipos 3a y 5a de *V. cholerae* O139, que la diferencia entre ellos es solo una banda (Popovic, 1995).

Las cepas procedentes de Guerrero son cinco (Figura 13), de las cuales una de ellas carece del fragmento común de 3.97 Kb, aunque todas tienen la banda de 5.86 Kb común en todos los ribotipos. Además en este grupo se exhibe una banda común para las cinco cepas de un tamaño aproximadamente de 7.9 Kb. No obstante el número de bandas es distinto entre ellas, por tanto el patrón de bandeo no se repite exactamente, aún en cepas procedentes del mismo estado de la República. Del estado de Nuevo León fueron 4 cepas y los patrones de bandeo de cada una es muy particular. Incluso la cepa 33053 no presentó el fragmento de 3.97Kb común en todas las cepas y fue la única cepa que exhibe 4 bandas idénticas al arreglo del Ribotipo 12 con un tamaño dentro del rango de 5.0 a 6.5 Kb (Figura 14).

Los patrones obtenidos fueron polimórficos aun entre cepas del mismo estado de la República, lo que indica que existe una gran diversidad a pesar de que todas las cepas fueron aisladas de materia fecal de individuos que presentaban cuadros diarreicos. Esto nos lleva a concluir que no existe uno o varios genotipos en particular que sean toxigenicos, sino que las cepas mas diversas poseen la capacidad citotoxica observada.

Popovic y col. (1995), reportaron seis ribotipos de 11 cepas de *V. cholerae* no O1, no O139 y ninguno se ha observado en aislamientos no toxigénicos o toxigénicos de *V. cholerae* O1, además reportan 3 patrones diferentes entre *V. cholerae* no O1, no O139 (O141). Así como también, Sharma y col. (1998), reportan 6 ribotipos denominados de R1 a R6 a partir de 13 cepas de *V. cholerae* no O1, no O139 y ninguno coincide con los ribotipos estandarizados para *V. cholerae* O1, o con los *V. cholerae* no O1, propuestos por Popovic y col. en 1993 y 1995 respectivamente. Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los

anteriormente mencionados, se observa una similitud en algunas bandas, pero no en los patrones de ribotipos.

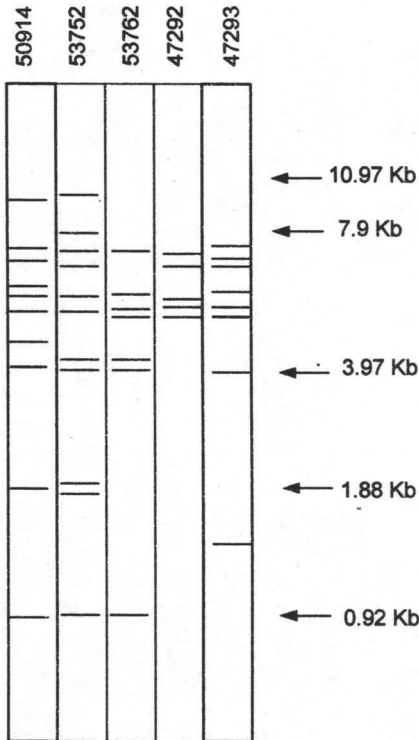


Figura 13. Representación de 5 ribotipos de las cepas procedentes de Guerrero.

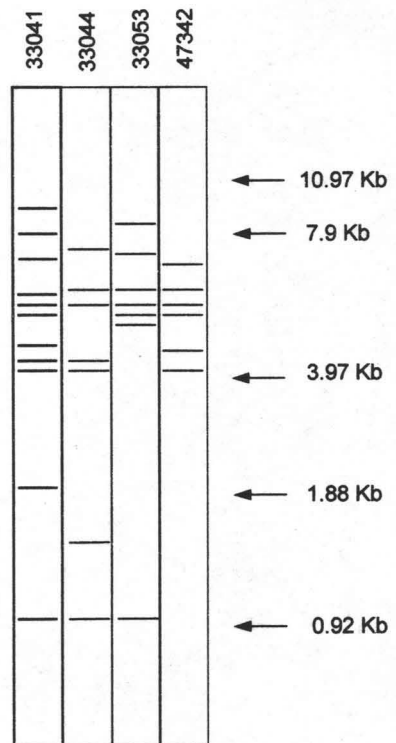


Figura 14. Representación de 4 ribotipos de las cepas procedentes de Nuevo León

Estos resultados muestran una gran diversidad entre las 14 cepas de *V. cholerae* no O1 productores de diarrea, a pesar de compartir fragmentos comunes entre ellas e incluso con los ribotipos de *V. cholerae* O1. Por otra parte, podríamos especular en la posibilidad de que si hiciéramos la búsqueda de patrones ribotípicos entre cepas de origen ambiental encontraríamos la misma variación, aún más se podrían obtener mayores variaciones de



acuerdo al lugar de aislamiento. Lo anterior se ha reportado en estudios con *V. cholerae* O139, donde una cepa aislada en Argentina presentó un ribotipo muy diferente a los 3 ribotipos observados en las cepas procedentes de Bangladesh, Tailandia o India (BI, BII y BIII) (Faruque, 1999). Por lo que el patrón de ribotipos en estas circunstancias nos sirvió para determinar que una muestra mexicana del grupo de *V. cholerae* no O1 es altamente complejo y polimórfico, lo cual se apoya en la misma observación que Karaolis y col. 1994 hicieron empleando serotipificación.

## IX. CONCLUSIONES.

1. Las 14 cepas seleccionadas de siete diferentes estados de la República Mexicana presentaron un perfil bioquímico característico de *Vibrio cholerae*.
2. De las 14 cepas problema ninguna aglutinó con el suero polivalente contra el grupo O1, por tanto fueron *Vibrio cholerae* serotipo no O1.
3. La sonda preparada por PCR, a partir de los fragmentos conservados de los genes 16S y 23S del rRNA de *Vibrio cholerae* O139 es tan eficiente como la que se obtiene de *E. coli*.
4. Los ribotipos obtenidos para estas cepas fueron diferentes de los observados para *Vibrio cholerae* O1 aunque existen ciertas semejanzas. Lo que indica que existe poca relación genética entre *Vibrio cholerae* no O1 y *Vibrio cholerae* O1 ya que ambos conservan solo dos fragmentos en común uno de 3.97 Kb y el otro de 5.86 Kb. Además tanto algunos *Vibrio cholerae* no O1 como algunos *Vibrio cholerae* O1 conservan un fragmento de 918 Kb.
5. No se presentó el patrón 3a o 5a descrito para *Vibrio cholerae* no O1 O139 reportados por Popovic (1995), así como tampoco se observaron patrones correspondientes a los ribotipos BI, BII o BIII propuestos por Faruque para *V. cholerae* O139.

6. No se observaron los patrones correspondientes a los ribotipos 5, 10 y 12 utilizados como cepas de referencia procedentes de *Vibrio cholerae* O1.
  
7. No existe un patrón de bandeo que se repita, cada cepa muestra un ribotipo muy particular aún entre las cepas procedentes del mismo estado. Esto muestra la gran diversidad entre estos microorganismos, como agentes productores de diarrea, lo que nos lleva a pensar que se trata de varias clonas involucradas en los casos de diarrea causada por *Vibrio cholerae* no O1.

---

## X. REFERENCIAS.

- Aldová Eva, K. Laznickova, E. Stepankova and J. Lietava. 1968. Isolation of Nonagglutinable Vibrios from an Enteritis Outbreak in Czechoslovakia. *J. Infect. Dis.* **118**: 25-31
- Barrera S. H.; R. Ortíz; A. Rojas; D. Reséndez. 1993. Reacción en Cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*, enero/febrero: 50-60.
- Berg, Douglas. Comunicación Personal, 1994
- Bhattacharya S., Bose A.K., and Ghosh A.K. 1971. Permeability and Enterotoxic Factors of Nonagglutinable Vibrios *Vibrio alcaligenes* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* **22**: 1159-1161.
- Blake, A. Paul; Robert E. W.; Dannie G. H. 1980. Diseases of Humans (Other Than Cholera) Caused by *Vibrios*. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 341-367.
- Boehringer, Mannheim. 1989. DNA Labeling and Detection Nonradioactive. *Biochemica* p. 62
- Bolaños, M. G.; L. Gutiérrez; S. Giono. 1993. *Vibrio cholerae* No O1 a Partir de Aguas Negras, Papel en la Prevención y Vigilancia del Cólera. *Boletín de cólera INDRE.* **2**: 11-13.
- Carlson, David P., Colleen Superko; Jesse M; Mary E. G.; Pamela H. 1990. Chemiluminescent Detection of Nucleic Acid Hibridization. *Life Technologies. Focus* **12**: 9-12.
- CDC. Letter. 1993. *Vibrio cholerae* Serogroup 0139: a New Serogroup with Epidemic Potential. Julio 1993.
- Ciznar I., Draskovicova A., Hostacka A., and Karolcek J. 1977. Partial Purification and characterization of the NAG vibrio toxin. *Zbl. Bakt. Hyg. I.* **239**: 493-503.
- Craig, P.; K. Yamamoto; T. Yoshifumi. 1991. Production of Cholera-Like Enterotoxin by a *Vibrio cholerae* Non O1 Strain Isolated from the Enviroment. *Infec. Immun.* **59**: 2186-2188.
- Cheong, Y.W.; L. Lung; G. Hon. 1991. Restriction Fragment Length Polimorphism Analysis of *Vibrio cholerae* Strains Associated with a Cholera Outbreak in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1058-1059.

- Dakin W.P.H.; D.J. Howell; Sutton R.G.A.; O'Keefe M. F. and Thomas P. 1974. Gastroenteritis Due to Non-Agglutinable (Non Cholera) *Vibrios*. *Aus.J. Med.* **2**: 487-490.
- Dalsgaard A., Skov M.N., Serichantalergs, Echeverria P., Meza R. and Taylor D.N. 1997. Molecular Evolution of *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolates in Lima, Peru from 1991 to 1995. *J. Clin. Microbiol.* **35**(5): 1151-1156.
- Faruque M.S., Siddique A.K., Saha M.N., Asadulghani., Rahman M.M., Zaman K., Albert J.M., Sack A.D., and Sack B.R. 1999. Molecular Characterization of a New Ribotype of *Vibrio cholerae* O139 Bengal Associated with an Outbreak of Cholera in Bangladesh. *J.Clin. Microbiol.* **37**(5): 1313-1318.
- Faruque S.M., Ahmed K.M., Abdul Alim A.R. M., Qadri Firdausi, Siddique A.K., and Albert M.J. 1997. Emergence of a New Clone of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Displacing *V.cholerae* O139 Bengal in Bangladesh. *J.Clin. Microbiol.* **35**(3): 624-630.
- Feinberg, A. P.; Vogelstein B. 1983. Addendum: a Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.* **137**:266-268.
- Figueroa, A. P.; H. García; K. Chávez. 1994. *Vibrio cholerae* No 01 Toxigenico Involucrado En Brotes De Diarrea. Boletín de cólera INDRE **4**:440-444.
- Figueroa, A. Paula. 1993. Técnicas De Biología Molecular en el Diagnóstico de Diarreas Bacterianas. En: Manual de diagnóstico de laboratorio de diarreas infecciosas por Giono S.; A., Escobar y J. L. Valdespino. IN1DRE, SS. p. 395-409.
- Gayane Martirosian; Saskia K.; Henri V.; Alex V. B. and Felicja M. M. 1995. PCR Ribotyping and Arbitrarily Primed PCR for Typing Strains of *Clostridium difficile* from a Polish Maternity Hospital. *J. Clin. Microbiol.* **8**:2016-2021.
- Giono, C. S. *Vibrio cholerae*.1993 En: Manual de diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales por Giono, C. Silvia; A. Escobar y J.L. Valdespino. . INDRE, S.S. p. 309-350.
- Giono, C. S.; M. G. Rodríguez; L. Gutiérrez y J.L. Valdespino. 1994. Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Vibrio cholerae* O1. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **36**: 243-251.

- 
- González, B. C.; A. Villanueva ; L. Gutiérrez; P. Figueroa; S. Giono. 1993. Cambios en la Epidemiología Mundial del Colera. Difusión de *Vibrio cholerae* No O1, O139. *INDRE Boletín cólera/diarreas infecciosas Año 3 12: 419-423.*
  - Gray, M. W. and Murray N. S. 1990. Evolution Of The Modular Structure Of rRNA. In: The ribosome. Ed. by Walter, E, H. and Albert D. Am. Soc. for Microbiol. Washington D.C. p. 345
  - Grimont, F. and P.A.D. Grimont. 1986. Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Restriction Patterns as Potential Taxonomic Tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol. (Paris) 137B: 165-175.*
  - Gupta N.P., Gupta S.P., Mangalik V.S., Prasad B.G., and Yajnik B.S. 1956. Investigations Into the Nature of the Vibrio Strains Isolated from the Epidemic of Gastroenteritis in Kumb Fair at Allahabad in 1954. *Ind. J. Med. Sci.* 10: 781.
  - Gustafarro, A. C. and D. Persing. 1992. Chemiluminescent Universal Probe for Bacterial Ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1039-1041.
  - Gutiérrez, C. L.; A. Del Río; S. Giono; P. Figueroa; E. Monroy; C. González y J.L. Valdespino. 1994. Variación Serotípica de Cepas de *Vibrio cholerae* O1 Aislados en la República Mexicana. *Boletín cólera/diarreas infecciosas 4:437-448*
  - Hinojosa, Marina A.; B. Swaminathan; S. B. Hunter; D. N. Cameron; Julia A. Kiehlbauch, I. K. Wachsmuth and N. A. Strockbine. 1991. Restriction Fragment Length Polymorphisms in rRNA Operons for Subtyping *Shigella sonnei*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2380-2384.
  - ICDDR, B. 1993. Large Epidemic of Cholera-Like Disease in Bangladesh Caused by *Vibrio cholerae* O139 Synonym Bengal. *Lancet* 342: 387-390.
  - Innis, M. A. and D. H. Gelfand. 1990. Optimization Of Pcrs. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press p. 3-12
  - Joseph S.W., Donta S.T., Maneval D.R., Kaper J.B. Colwell and Spira W.M. 1984. An Assessment of Non-O1 *Vibrio cholerae* virulence in the Y-1 Mouse Adrenal Cell Assay. In: *Vibrios in the Environment*. Ed. Colwell R. Rita.. p. 123-143.
  - Karaolis, D. K.; Lan Ruiting and Peter R. Reeves. 1994. Molecular Evolution of the Seventh-Pandemic Clone of *Vibrio cholerae* and its Relationship to Other Pandemic and Epidemic *V. cholerae* Isolates. *J. Bacteriol.* 176: 6199-6206.
-

- Koblavi, S.; E. Grimont and A. Grimont. 1990. Clonal Diversity of *Vibrio cholerae* O1 Evidenced by rRNA Restriction Patterns. *Res. Microbiol.* **141**: 645-657.
- Kristjansson M., Samore M.H., Gerding N. D., DeGirolami C. P., Bettin M.K., Karchmer W.A., and Arbeit D. R. 1994. Comparison of Restriction Endonuclease Analysis, Ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Differentiation of *Clostridium difficile* Strains. *J.Clin. Microbiol.* **32**(8): 1963-1969.
- Lane, David. J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques* Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley and Sons Ltd.
- M., John Albert; A.K. Siddique; M. S. Islam. Letter. 1993. Large Outbreak of Clinical Cholera due to *Vibrio cholerae* Non O1 in Bangladesh. *Lancet* **341**: 704.
- Madigan M.T., J.M. Martinto and J. Parker. 1998. *Brock Biology of Microorganisms* 8th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.
- Maniatis T.; Fritsh E.F. and Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. p. 383. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
- Meinkoth and Wahl. 1984. *Generation of Hybridization blots*. Life Technologies, Inc. Training Center.
- MMWR. Letter. 1993. Imported Cholera Associated with a Newly Escribed Toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Strain-California . *MMWR* **42**:501-503.
- Morris, G. J.; Tae T.; Ben D.T.; Genevieve A.L.; Sujit K.B.; Bruce D.F.; Bradford A. K. and Mitsuaki N. 1990. Experimental Non-O Group 1 *Vibrio cholerae* Gastroenteritis in Humans. *J. Clin. Invest.* **85**: 697-705.
- NDon, A. J.; M. Udo and B. William. 1992. *Vibrio* Associated Gastroenteritis in the Lower Cross-River Basin of Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2730-2732.
- Pollard, k. D.; Read C. A.; Downes M. J. 1990. Nonradiative Nucleic Acid Detection by Enhanced Chemiluminescence Using Probes Directly Labeled with Horseradish Peroxidase. *Anal.Biochem.* **185** :84-89.
- Popovic, T.; C. Bopp; O. Olsvick; Kichldauch. 1992. Ribotyping in Molecular Epidemiology in Diagnostic Molecular Microbiologic. ASM, Washigton D.C.
- Popovic, T.; C. Bopp; O. Olsvik and K. Wachsmuth. 1993. Epidemiologic Aplication of a Standarized Ribotype Scheme for *Vibrio cholerae* O1. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2474-2482.

- Popovic, T.; P. I. Fields, O. Olsvik; J. G. Wells, G. M. Evins; D.N. Cameron, J.J.Farmer III; C. A. Bopp; K' Wachsmuth; R. B. Sack; M.J.Albert; G. B. Nair; T. Shimada and J.C. Feeley. 1995. Molecular Subtyping of Toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Causing Epidemic Cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. *J. Infect. Dis.* **171**: 122-127
- Rautelin, Ilpi; Tee Wee; Kari Seppala and Timo U. Kosunen.1994. Ribotyping Patterns and Emergence of Metronidazole Resistance in Paired Clinicl Samples of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.***32**: 1079-1082
- Rigby P.; Dieckmann M.; Rhodes; Berg P. 1977. Labeling Deoxirribonucleic Acid to High Specific Activity *in vitro* by Nick-Traslation with DNA Polimerasa I. *J. Mol. Biol.* **112**:237-247.
- Said B., Scotland M.S. and Rowe B. 1994. The Use of Gene Probes, Immunoassays and Tissue Culture for The Detection of Toxin in *Vibrio cholerae* Non-O1. *J. Med. Microbiol.* **40**:31-36.
- Sakazaki R.and Donovan TJ. 1984. Serology and Epidemiology of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Methods Microbiol.* **16**: 271-289.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R.Higuchi, G. Horn, K. Mullis and H. Erlich. 1988. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Secretaria de Salud. 1991.Dirección General de epidemiología. Boletin Sobre Cólera En América. Mayo 7,
- Sharma Ch., Ghosh A., Dalsgaard A., Forslund A., Ghosh R.K., Bhattacharya S.K., and Nair G.B. 1998. Molecular Evidence that a Distinct *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Strain in Calcutta May Have Spread to the African Continent. *J. Clin. Microbiol.* **36**(3): 843-844.
- Sharma Ch., Thungapathra M., Ghosh A., Mukhopadhyay K.A., Basu A., Mitra R., Basu I., Bhattacharya S.K., Shimada T., Ramamurthy T., Takeda T., Yamasaki S., Takeda Y., and Nair B.G. 1998. Molecular Analysis of Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Associated with an Unusual Upsurge in the Incidence of Cholera –Like Disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol* **36**(3): 756-763.
- Southern, E. M. 1975. Detection of Especific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.



- Stull, Terrence L.; J. J. LiPuma and Thomas D. Edlind. 1988. A Broad-Spectrum Probe for Molecular Epidemiology of Bacteria: Ribosomal RNA. *J. Infect. Dis.* **157**: 280-286
- Swerdlow, L. D.; A. Ries. 1993. *Vibrio cholerae* Non O1-the eighth pandemic? Commentary. *Lancet* **342**:382-383.
- Ventura, G.; L. Roberst; R. Gilman. Letter. 1992. *Vibrio cholerae* NON-01 In Sewage Lagoons and Seasonality in Peru Cholera Epidemic. *Lancet*. **339**: 937-938.
- Whasmuth I.K. G.M. Evins, P.I. Fields, O. Olsvik, T. Popovic, C.A. Bopp, J.G. Wells, C. Carrilo and P.A. Blake. 1993. The Molecular Epidemiology of Cholerae in Latin America. *J. Infect. Dis.* **167**: 621-626
- Wolcott, Mark J. 1992. Advances in Nucleic Acid Based Detection Methods. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:370-386.
- Yamamoto K., Takeda Y., Miwatani, and Craig. P. J. 1983. Purification and Some Properties of a Non-O1 *Vibrio cholerae* Enterotoxina That Is Identical to Cholerae Enterotoxin. *Infect. And Immun.* **39**(3): 1128-1135.

## ANEXO.

### PREPARACION DE REACTIVOS.

#### A) SOLUCIONES GENERALES.

##### 1. HCl 1 M.

Se colocaron 16.2 ml de ácido clorhídrico concentrado en una probeta de 200 ml y se diluyeron con agua a 200 ml.

**NOTA: EL AGUA QUE SE UTILIZA PARA TODAS LAS SOLUCIONES DEBE SER DESTILADA, FILTRADA Y ESTERIL.**

##### 2. NaOH 10 N.

Se disolvieron 80 g de ojeles de hidróxido de sodio en 180 ml de agua, se dejó enfriar y después se aforó a 200 ml.

##### 3. NaCl 3M.

Se pesaron 34.8 g de cloruro de sodio y fueron disueltos en 180 ml de agua, ajustando después el volumen a 200 ml con agua.

##### 4. TRIS-HCl 1M.

Fueron disueltos 157.64 g de TRIS-HCl en 800 ml de agua y después se ajustó el pH (7.5, 8.0 ó 9.5 según se requería) y se aforó a 1000 ml.

##### 5. SDS 20%.

Se disolvieron 100 g de dodecilsulfato de sodio en 470 ml de agua y el volumen se ajustó a 500 ml con agua ( esta solución no debe esterilizarse, ni se debe ajustar el pH).

##### 6. MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 1M.

Se pesaron 20.33 g de cloruro de magnesio hexahidratado y fueron disueltos en 80 ml de agua y se ajustó el volumen a 100 ml.

**7. EDTA 0.5 M.**

Se disolvieron 27.9 g de EDTA en 100 ml de agua agregando aproximadamente 3 g de lentejas de hidróxido de sodio y después de que se disolvió completamente se ajustó el volumen a 150 ml con agua.

**8. BROMURO DE ETIDIO 1 mg/ml.**

50 mg de bromuro de etidio fueron disueltos en 50 ml de agua, agitando por varias horas y se filtró con papel Whatman No. 1. Esta solución fue conservada en un recipiente ámbar, a 4°C.

**NOTA:** El bromuro de etidio es mutagénico, se recomienda usar lentes de protección, máscara y guantes cuando se manipule.

**9. TBE 10X.**

Esta solución se preparó al mezclar las siguientes soluciones:

<i>SOLUCION</i>	<i>CONCENTRACION FINAL</i>	<i>CANTIDAD REQUERIDA</i>	<i>CONCENTRACION STOCK</i>
Tris base	0.89 M	54.0g	/
Acido bórico	0.89 M	27.5 g	/
EDTA pH=8.0	0.02 M	20.0 ml	(0.5 M)

Se aforó a 500 ml con agua.

**10. TBE 1X (Tris base 89mM; Acido bórico 89 mM; EDTA 2mM [pH 8.0]):**

De la solución anterior (TBE 10X), se toman 10 ml y se diluyen a 100ml con agua.

**11. TE 10X**

Esta solución se preparó al mezclar las siguientes soluciones:

<i>SOLUCION</i>	<i>CONCENTRACION FINAL</i>	<i>CANTIDAD REQUERIDA</i>	<i>CONCENTRACION STOCK</i>
TrisHCl pH 8.0	10 mM	5 ml	1 M
EDTA	1 mM	1 ml	0.5 M

Aforar a 500 ml con agua

**12. STE 10X**

Esta solución se preparó al mezclar las siguientes soluciones:

<b>SOLUCION</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>	<b>CANTIDAD REQUERIDA</b>	<b>CONCENTRACION STOCK</b>
TrisHCl pH 8.0	100 mM	30 ml	1M
EDTA	10 mM	6 ml	0.5 M
NaCl	1 M	100 ml	3 M

Aforar a 300 ml con agua.

**13. STE 1X (Tris-HCl 10 mM•[pH 8.0]; EDTA 1mM; NaCl 100mM )**

Tomar 10 ml de STE 10X y diluir a 100 ml con agua.

**14. SSC 20X.**

Se pesaron 175.3 g de NaCl y 88.2 g de Citrato de sodio, se disolvieron en 80ml de agua. Se ajusto el pH a 7.0 con NaOH 10N y aforo a 100 ml con agua. Se esterilizo a 121°C y 15 min.

**15. SOLUCION REGULADORA DE APLICACION.**

El regulador de aplicación se preparó de la siguiente forma:

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>	<b>CANTIDAD REQUERIDA</b>
Azul de bromofenol	0.50%	0.025 g
Xilen cianol	0.50%	0.025 g
Glicerol	50.0%	2.5 ml

Se aforó con TBE 1X a 5 ml.

**16. MARCADORES DE PESO MOLECULAR.**

a) Ladder 1Kb 100 ng/μl.

Se tomaron 5 μl del reactivo concentrado comercial, y se ajustó el volumen a 50 μl con agua.

b) DNA Lambda Hind III 100 ng/μl.

Del reactivo concentrado comercial, se tomaron 12.5 μl y se ajustaron a 50 μl con agua.

**B) SOLUCIONES PARA TRATAR EL GEL.****1. SOLUCION DE DEPURACION.**

Se tomaron 50 ml de HCl 1 M y se llevaron a un volumen final de 200 ml con agua.

**2. SOLUCION DE DESNATURALIZACION.**

La solución de desnaturalización se preparó de la siguiente manera:

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN REQUERIDO	CONCENTRACION STOCK
NaOH	0.5 M	10 ml	10 M
NaCl	1.5 M	100 ml	3 M

Se aforó a 200 ml con agua.

**3. SOLUCION DE NEUTRALIZACION.**

La solución de neutralización se preparó de la siguiente manera:

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN REQUERIDO	CONCENTRACION STOCK
Tris-HCl pH=8.0	0.5 M	100 ml	1 M
NaCl	1.5 M	100 ml	3 M

Se aforó a 200 ml con agua.

**C) SOLUCION DE PREHIBRIDACION.**

La solución de prehibridación se preparó de la siguiente manera:

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	CANTIDAD REQUERIDA	CONCENTRACION STOCK
SSC	5 X	25 ml	20X
Reactivo bloqueante	1.0%	1.0 g	/
Sarkosyl	0.1%	1.0 ml	10%
SDS	0.02%	100 $\mu$ l	20%

Se aforó a 100 ml con agua.

**D) SOLUCIONES LAVADORAS POSTHIBRIDACION.****1. SOLUCION 1.**

La solución Lavadora 1 se preparó de la siguiente manera:

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>	<b>VOLUMEN REQUERIDO</b>	<b>CONCENTRACION STOCK</b>
SSC	2X	50.0 ml	20X
SDS	0.1%	2.5 ml	20%

Se aforó a 500 ml con agua.

**2. SOLUCION 2.**

La solución Lavadora 2 se preparó de la siguiente manera:

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>	<b>VOLUMEN REQUERIDO</b>	<b>CONCENTRACION STOCK</b>
SSC	0.2X	5.0 ml	20 X
SDS	0.1%	2.5 ml	20%

Se aforó a 500 ml con agua.

**E) SOLUCIONES PARA REVELAR.****1. SOLUCION REGULADORA A.**

La solución reguladora A se preparó de la siguiente manera:

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>	<b>VOLUMEN REQUERIDO</b>	<b>CONCENTRACION STOCK</b>
Tris-HCl pH 7.5	100 mM	10.0 ml	1 M
NaCl	150 mM	5.0 ml	3 M

Se aforó a 100 ml con agua.

**2. SOLUCION REGULADORA B.**

La solución reguladora B se preparó de la siguiente manera:

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION FINAL</b>	<b>VOLUMEN REQUERIDO</b>	<b>CONCENTRACION STOCK</b>
Tris-HCl pH 9.5	100 mM	10.0 ml	1 M
NaCl	150 mM	3.3 ml	3 M
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	5.0 ml	1 M

Se aforó con agua a 100 ml.

**3. SOLUCION REGULADORA A + 5.0% DE LECHE DESCREMADA.**

La solución se preparó de la siguiente manera:

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD REQUERIDA.</b>
Leche descremada	2.0 g
Solución reguladora A	40.0 ml