



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
LABORATORIO CENTRAL DE EPIDEMIOLOGIA**

“Estandarización de un método específico de trabajo para el análisis de los genes ace, zot, ctxA y ctxB en cepas de *Vibrio cholerae* mediante PCR de punto final”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:

JESSICA MONSERRAT RAMÍREZ VILLANUEVA

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JULIO ELIAS ALVARADO YAAH.

ASESOR INTERNO:

M. EN C. CATALINA MACHUCA RODRIGUEZ.



Ciudad de México 2017.



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO CENTRAL
DE EPIDEMIOLOGIA UBICADO EN CENTRO MEDICO NACIONAL
LA RAZA, IMSS. BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN C. JULIO ELIAS
ALVARADO YAAH.

***No te rindas, aún estás a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.***

***No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje, perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros, y destapar el cielo.***

***No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío quemé, aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda, y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo
porque lo has querido y porque te quiero
porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo.***

***Abrir las puertas, quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.***

***Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar un canto,
bajar la guardia y extender las manos
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos...***

(Mario Benedetti)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el orgullo de pertenecer a ella y aportarme los conocimientos y experiencias que hoy me permiten concluir la carrera de Biología.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a cada uno de los profesores, por compartir sus enseñanzas y prepararme profesionalmente para enfrentarme a los retos que pone la vida.

A la Biología por mostrarme las maravillas de la vida y enseñarme que al amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo de la humanidad.

Al Laboratorio Central De Epidemiología del IMSS por permitirme pertenecer a su equipo de trabajo, y brindarme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo

Al **M. en C. Julio Elias Alvarado Yaah**, por brindarme su apoyo, paciencia, enseñanzas y por su compartir sus experiencias.

A la **M. en C. Catalina Machuca Rodríguez**, por brindarme sus conocimientos y su dedicación que me guiaron a descubrir las maravillas de la Biología Molecular.

A los miembros del jurado.

M en C. Carlos Bautista Reyes

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dr. Hugo López Muñoz

Quienes con sus aportaciones enriquecieron este trabajo.

DEDICATORIA

Agradezco a la vida por estar viva por ser quien soy, de tener lo que me ha tocado, de sentir el amor a mi lado; agradezco poder expresar mi sentir y la oportunidad de sentirme viva.

A mi **madre** por su apoyo incondicional, por sus consejos y cuidados, por ser una gran mujer y enseñarme el valor de las cosas dándome su ejemplo, por hacer de mí una mejor persona, gracias por todo lo que has hecho por mí, ninguna palabra o acción es comparable para decirte lo que significas para mí. Te amo mamá.

A mi **padre** por ser el pilar en mi andar, por tus consejos y mostrarme que los objetivos se cumplen con esfuerzo, por ayudarme a salir adelante ante cualquier circunstancia de la vida, gracias porque sin escatimar esfuerzo alguno has sacrificado gran parte de tu vida en mi formación. Te amo papá.

A mi **hermano** por enseñarme a ser independiente y ser una persona más fuerte al hacerme ver que en esta vida vamos solos. En mí siempre tendrás apoyo.

A mi **abuelo** por ser un ejemplo de vida, por enseñarme a no rendirme y a luchar por mis sueños. Te quiero mucho, gracias por tus consejos.

A toda mi **familia** por creer en mí y por demostrarme que ante cualquier adversidad siempre estarán conmigo apoyándome.

A mis **amigos** gracias por los consejos y por los momentos compartidos en este camino.

Tienes que andar y crear el camino andando; no encontrarás un camino ya hecho. No es barato alcanzar la mayor realización de la verdad. Tendrás que crear el camino andando tu solo; el camino no está ya hecho esperándote. Es justo como el cielo: los pájaros vuelan pero no dejan huellas. No los puedes seguir; no hay huellas detrás.

Osho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS	2
LISTA DE TABLAS	3
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES.....	6
2.1 <i>Vibrio cholerae</i>	6
2.2 Ecología y ciclo biológico de <i>Vibrio cholerae</i>	7
2.3 Patogenicidad.....	8
2.4 Factores de colonización y toxinas de <i>Vibrio cholerae</i>	10
2.5 Toxina colérica	11
2.6 Bacteria con dos cromosomas y estilo de vida diferente	15
2.7 Características y función en la transferencia de los genes de virulencia	17
2.8 Regulación de la expresión de los factores de virulencia.....	19
2.9 Historia de <i>Vibrio cholerae</i>	20
2.10 Epidemiología del cólera.....	22
2.11 Epidemiología molecular del cólera	24
2.12 Algoritmo Diagnóstico del cólera.	25
2.13 Estandarización de métodos específicos de trabajo en el IMSS.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
MATERIAL Y METODO	31
Cepa utilizada.....	32
Descongelación de cepas.....	32
Análisis Bioinformático	32
Extracción y obtención de ADN genómico bacteriano	33
Evaluación de la concentración del ADN.....	33

UNAM-FESZ

PCR punto final.....	33
Estandarización de las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de los genes de toxicidad de <i>Vibrio cholerae</i>	34
Identificación de los genes ace, zot, ctxA y ctxB	35
Concentración de detección mínima de ADN	36
Especificidad y sensibilidad relativa	36
RESULTADOS	37
Análisis bioinformático.....	37
Especificidad de los iniciadores	38
Determinación del gen ace <i>V. cholerae</i>	40
Determinación del gen zot <i>V. cholerae</i>	41
Determinación del gen ctxA <i>V. cholerae</i>	42
Determinación del gen ctxB <i>V. cholerae</i>	43
Extracción ADN genómico <i>V. cholerae</i>	44
Concentración y calidad del ADN	45
PCR punto final.....	45
Concentración mínima de detección de ADN	46
DISCUSION	50
Análisis bioinformático.....	50
Extracción concentración y pureza de ADN genómico	51
Estandarización PCR.....	51
Resultados de concentración mínima	53
Elaboración de método específico de trabajo	54
CONCLUSIONES	56
APENDICES	57
Apéndice 1	58
Apéndice 2	60
Apéndice 3	61
REFERENCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Acción de la toxina colérica.
- Figura 2.** Representación gráfica del fago CTX.
- Figura 3.** Toxina del cólera.
- Figura 4.** Estructura del gangliósido GM1.
- Figura 5.** Distribución mundial de los brotes de casos de cólera en los años 2011-2012.
- Figura 6.** Mapa de casos acumulados de cólera en México por entidad federativa.
- Figura 7.** Casos de cólera acumulados registrados en la Región de las Américas.
- Figura 8.** Algoritmo para el diagnóstico de EDA Bacteriana.
- Figura 9.** Genoma de *V. cholerae* y amplicón genes CTX.
- Figura 10.** Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de punto final del gen ace.
- Figura 11.** Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de punto final del gen de toxicidad zot.
- Figura 12.** Amplicón para la toxina accesoria ace (316 pb).
- Figura 13.** Amplicón para la toxina accesoria zot (1083 pb).
- Figura 14.** Amplicón para la toxina ctxA (494 pb).
- Figura 15.** Amplicón para la toxina ctxB (461 pb).
- Figura 16.** Verificación de tamaño molecular de los productos de PCR de los genes ace (316 pb), zot (1083 pb), ctxA (494 pb) y ctxB (461 pb).
- Figura 17.** Prueba de detección mínima de ADN por PCR para el gen de toxicidad ace de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa.
- Figura 18.** Prueba de detección mínima de ADN por PCR para el gen de toxicidad zot de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa.
- Figura 19.** Prueba de detección mínima de ADN por la PCR para el gen de toxicidad ctxA de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa.
- Figura 20.** Prueba de detección mínima de ADN por la PCR para el gen de toxicidad ctxB de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa.

ABREVIATURAS

ace	Gen que codifica para la enterotoxina accesoria de cólera (por sus siglas en inglés accessory cholera enterotoxin)
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BIH	Infusión de cerebro y corazón
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento básico local (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool)
CT	Toxina colérica
ctxA	Gen que codifica para la subunidad A de la toxina colérica
ctxB	Gen que codifica para la subunidad B de la toxina colérica
CTX ϕ	Bacteriófago filamentoso que en su genoma tiene los genes codificantes para la toxina del cólera
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDA	Enfermedad diarreica aguda
GM ₁	Gangliosido
Kb	Kilobases
KDa	kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacarido
LT	Enterotoxina termolábil
MLA	Marcos de lectura abierta
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés National Center of Biotechnology Information)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reaccion en cadena de la Polimerasa
pb	pares de bases
SSA	Secretaria de Salud
TCBS	Tioglicolato, citrato, bilis sacarosa
TCP	Toxin Corregulated Pilus
TSA	Tripticasa soya agar
zot	Gen que codifica para la toxina zona de unión celular (por sus siglas en inglés zonula occludens toxin)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para la obtención de la región codificante de las toxinas accesorias.

Tabla 2. Mezcla de reactivos utilizados en la técnica de PCR de los genes ace, zot, ctxA y ctx B de *Vibrio cholerae*.

Tabla 3. Condiciones del programa del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR de los genes ace, ctxA y ctxB.

Tabla 4. Condiciones del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR del gen zot.

Tabla 5. Condiciones del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR de la región ace_zot_ctxA_ctxB.

Tabla 6. Iniciadores para la amplificación del amplicón de 2797 pb, ace1 y ctx 7.

Tabla 7. Resultados de la verificación del diseño de los oligonucleótidos.

Tabla 8. Lectura de las concentraciones de ADN en las diluciones.

INTRODUCCION

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en la niñez de todo el mundo, por lo general su etiología se relaciona con la exposición a alimentos o agua contaminada. Actualmente, alrededor de mil millones de personas carecen de acceso a fuentes de agua potable y unos 2500 millones no tienen acceso a instalaciones básicas de saneamiento. La diarrea es un padecimiento infeccioso ocasionado por diversos microorganismos de tipo bacteriano, viral y parásitos.

Una enfermedad que cumple ampliamente con estas características es el cólera, padecimiento que se presenta con una alta incidencia en países pobres con clima tropical, en donde llega a adquirir características endémicas y/o epidémicas (Farfán S. 2002).

El cólera es un problema global de salud y a pesar de que hace más de un siglo se descubrió el microorganismo causante del problema en la actualidad el cólera sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes de las regiones en desarrollo. Las normas internacionales de salud exigen que la Organización Mundial de la Salud notificara inmediatamente cuando surja un brote de cólera en una área previamente libre de la infección y que todos los casos confirmados sospechosos también sean notificados (Pestana, 1993).

El cólera es causado por la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae*, que habita distintos ecosistemas acuáticos en vida libre y en asociación a organismos invertebrados (Fernández-Delgado, 2013). El humano es el único hospedero natural, aunque el organismo puede existir en vida libre en el ambiente (Tovar, 1991). Se ha descrito que de los 200 serogrupos conocidos sólo O1 y O139 toxigénicos han sido responsables de las siete pandemias que han ocurrido desde

UNAM-FESZ

1817; en el medio ambiente, la mayoría de las cepas pertenecen a cualquiera de los 198 serogrupos restantes denominados de manera genérica no-O1 y no-O139 los cuales no portan los genes que codifican para la toxina del cólera (Jorgensen, 2008).

En el Instituto Mexicano del Seguro Social, se llevan a cabo actividades de Vigilancia Epidemiológica por laboratorio de cólera, salmonelosis, shigelosis y otras enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos, mediante el algoritmo diagnóstico de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) el cual se tiene implementado en el Laboratorio Central de Epidemiología del Centro Médico Nacional “La Raza” el cual brinda servicio a toda la población derechohabiente del país.

El presente trabajo se realizó con el propósito principal de estandarizar y homogenizar la metodología de biología molecular para la identificación de los genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB de *Vibrio cholerae* a partir de cepas aisladas de muestras de pacientes.

ANTECEDENTES

Vibrio cholerae es el agente causal del cólera, y fue descrito primeramente por Filippo Pacinni, en 1854 en Italia, en ese mismo año John Snow demostró que el agua era el vehículo de diseminación de la enfermedad (Luna F, 2006). El cólera es una enfermedad que clínicamente se caracteriza por ser una infección intestinal aguda que tiene un periodo de incubación entre uno y cinco días, el cuadro clínico se asocia con la producción por parte de la bacteria de una potente enterotoxina, la cual es responsable de inducir una intensa diarrea acuosa que se caracteriza por evacuaciones inodoras llamadas “agua de arroz” que puede ocasionar deshidratación severa lo que conduce a choque hipovolémico y la muerte del paciente si no es tratado a tiempo.

2.1 *Vibrio cholerae*

En 1965, Véron propuso crear la familia Vibrionaceae para agrupar aquellos géneros cuyas especies fueran oxidasas positivas y móviles por un flagelo polar. La familia está constituida por los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (Blake, 1980).

Vibrio es un género de la familia Vibrionaceae que incluye 78 especies, doce de las cuales son patógenas potenciales para el hombre y dentro de las cuales se encuentra *V. cholerae*.

En cuanto a sus características morfológicas, *V. cholerae* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que mide de 1.5 a 2.5 μm de largo y 0.5 a 0.8 μm de ancho, es catalasa y oxidasa positivo y, aunque crece en medios de cultivo habituales, el medio selectivo empleado para su aislamiento es el agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) donde las colonias crecen lisas de 2 a 4 mm de diámetro, de color amarillo y muy pegajosas (SSA, 2012).

UNAM-FESZ

Su material genético está conformado por dos cromosomas circulares; el cromosoma 1, posee 2 millones 961 mil 146 pares de bases (pb), en este se encuentran los genes que determinan las funciones básicas de la bacteria; mientras que el cromosoma 2 posee 1 millón 072 mil 314 pb, con lo que forma un total de 4 millones 033 mil 466 pb, que en conjunto codifican para 3885 fragmentos de lectura abierta (Heidelberg J. *et al.*, 2000).

V. cholerae se clasifica en serogrupos en función de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) (Farfán, 2002). Se conocen alrededor de 200 serogrupos de *V. cholerae* que se clasifican en función del antígeno O mismo que se encuentra en la superficie de la bacteria, la nomenclatura de los serogrupos se realiza con la letra "O" seguido de un número consecutivo que va del 1 al 200; únicamente dos serogrupos, el O1 y el O139, están implicados en el desarrollo de epidemias y pandemias (Harvez, 2013).

El serogrupo O1 de *V. cholerae* incluye los biotipos "Clásico" y "El Tor", siendo este último el responsable de la séptima pandemia de cólera, estos dos biotipos abarcan, a su vez, los serotipos Inaba, Ogawa e Hikojima (Borroto, 1997).

El biotipo El Tor, aislado inicialmente como cepa no virulenta en 1905, ha evolucionado hacia una virulencia mayor y es el responsable de la pandemia actual (OMS, 2013).

2.2 Ecología y ciclo biológico de *Vibrio cholerae*

Los vibrios son proteobacterias-gama, heterótrofas, cuyo hábitat primario son los ecosistemas acuáticos salobres y marinos, en donde ocupan una gran diversidad de nichos. Están presentes en la columna de agua y en el sedimento, por lo que se les puede encontrar como bacterias de vida libre, comensales, saprobias o parásitas (Bauma, 1977). Las bacterias de este género son bacilos curvos o rectos, Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles por flagelos polares y no esporulados (Chandra, 1992).

UNAM-FESZ

Diversos estudios señalan que los vibrios tienen preferencia por los ecosistemas acuáticos como epibionte, asociado tanto a sustratos vivos como abióticos. Su relación con material suspendido les asegura que en algún momento pueden ser depositados en el sedimento donde encontrarán mayor concentración de nutrimentos. Por otro lado, también se pueden mover hacia niveles superiores a través de la cadena alimentaria iniciando su viaje con organismos bentónicos filtradores y detritívoros (Colwell, 1992).

La adherencia de los vibrios a los sustratos bióticos se considera una interacción de tipo comensal; en este caso las bacterias utilizan compuestos de excreción como las llamadas proteínas de adhesión asociadas a la superficie (Keytani, 1996, Platt, 1995).

V. cholerae puede sobrevivir por periodos de hasta siete días fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos (Alcalá, 2013) y en aguas relativamente libres de contaminación fecal humana (Borroto, 1997), y por semanas si se encuentra contaminada con materia orgánica, por lo que las fuentes de abastecimiento de agua tienen un papel importante (Alcalá, 2013).

2.3 Patogenicidad

La diarrea masiva inducida por *Vibrio cholerae* es causada por la toxina colérica, una proteína termolábil, estructural y funcionalmente parecida a la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (SSA, 2012).

Cuando *V. cholerae* coloniza el intestino delgado se adhiere al epitelio de las vellosidades intestinales y secreta la toxina colérica (CT) provocando diarrea acuosa intensa. Al parecer, la producción de la toxina CT está limitada a la infección en el humano pues no se ha detectado secreción de la misma cuando la bacteria se encuentra en vida libre en el medio ambiente (Thompson, 2004).

UNAM-FESZ

Cada molécula de CT está compuesta de cinco subunidades B y una subunidad A.

La estructura cuaternaria de la toxina depende en gran medida de la interacción electrostática de las subunidades B las cuales forman un homopentámero en forma de anillo el cual esta coronado por la subunidad A.

El mecanismo de toxicidad de *V. cholerae* ocurre mediante la secreción de la toxina CT a través de la membrana externa bacteriana al ambiente extracelular y su captación por parte de las células del epitelio intestinal mediante el receptor de gangliosido monosialo-tetrahexosil (GM1) el cual es capaz de unir de manera estable al pentámero de la subunidad B de la toxina e inducir su transportación mediante endocitosis al citoplasma y aparato de Golgi, sitio donde se realiza la hidrólisis y liberación de la subunidad A de la toxina, la cual a su vez se encuentra constituida por dos dominios estructurales denominados péptido A₁ y A₂, los cuales se separan en el citoplasma de la célula mediante procesamiento proteolítico.

El péptido A₁ es la subunidad que posee una actividad enzimática específica, actúa intracelularmente, incrementando los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), cambiando la función de absorción del intestino delgado por secreción (figura 1) (Castañón-Sánchez, 2012).

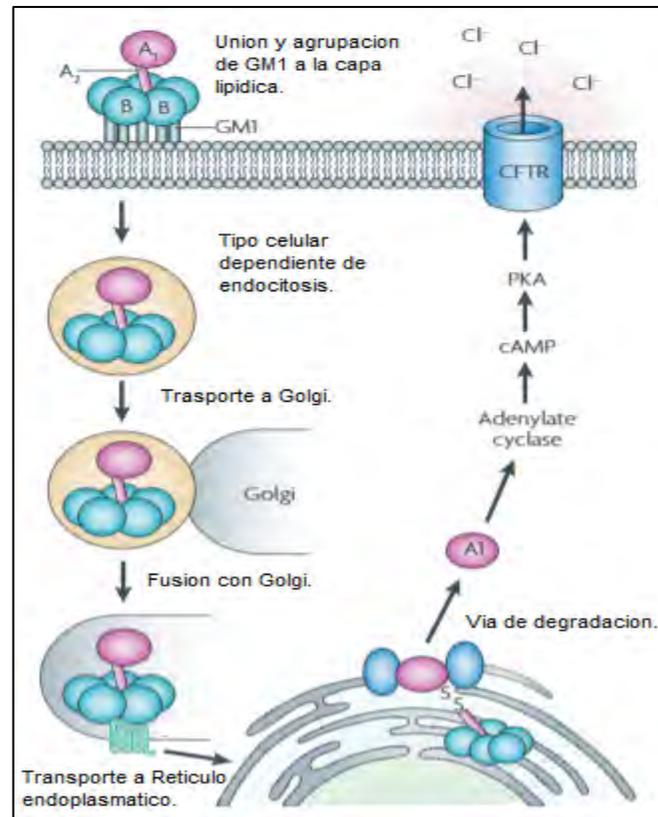


Figura 1. Acción de la toxina colérica. A, B (subunidades de la toxina colérica); GM1 (receptor gangliósido GM1); cAMP (AMP cíclico); PKA (Proteína quinasa a); CFTR (Regulador transmembrana de fibrosis quística). Modificado de Viswanthan V.K., Hodges K., Hech G. 2009. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea.

2.4 Factores de colonización y toxinas de *Vibrio cholerae*

Una vez que la bacteria se instala en el epitelio intestinal empieza a producir la toxina colérica o CT, la cual altera el transporte de iones ocasionando la diarrea de tipo secretor que caracteriza el cuadro clínico del cólera. Los genes que codifican CT (ctxA y ctxB) forman parte de un elemento genético denominado elemento genético CTX, el cual consiste por lo menos de seis genes que integran la región central o del core (ctxA, ctxB, zot, ace, cep y orfU), los cuales están flanqueados por dos o más copias de una secuencia repetitiva (figura 2).

Otras toxinas importantes se han identificado en cepas de *V. cholerae*; una de ellas, llamada Zot (Zonula Ocludens Toxin), tiene actividad sobre las uniones estrechas,

UNAM-FESZ

incrementando la permeabilidad de la mucosa intestinal. Otra más es la toxina Ace (Accessory Cholera Toxin), una potente toxina que ocasiona daño a nivel de membrana en la célula eucariota, originando desequilibrio iónico.

Aunque CT es el principal factor de virulencia, su acción es incrementada por el producto de diferentes genes, entre los que se encuentran los agrupamientos o clusters TCP (Toxin Corregulated Pilus) y ACF (Accessory Colonization Factors), cuyos productos actúan como factores de colonización (Karolis, 1998, Trucksis, 1998).

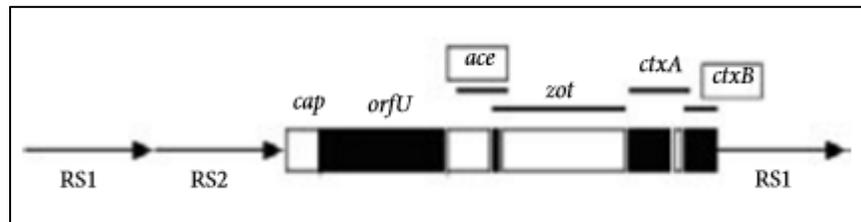


Figura 2. Representación gráfica del fago CTX. Tomada de Eslava A.C., Rosas I., Solano M., Delgado G., Ramírez M., Villaseca J.M., et al. *Vibrio cholerae*: bacteria ambiental con diferentes tipos de vida.

2.5 Toxina colérica

La toxina colérica es una proteína ADP–ribosiladora tipo A-B, la cual tiene una subunidad A con actividad enzimática y 5 subunidades B idénticas, que forman un pentámero, las cuales sirven para unir la toxina a su receptor en el intestino, el gangliósido GM₁ (figura 3). Los pesos moleculares de estas subunidades son 27.2 kDa para la subunidad A y 11.6 kDa para cada una de las subunidades B. Los genes que codifican para la subunidad A (*ctxA*) y para la subunidad B (*ctxB*) forman parte de un mismo operón (Salyers, 1994).

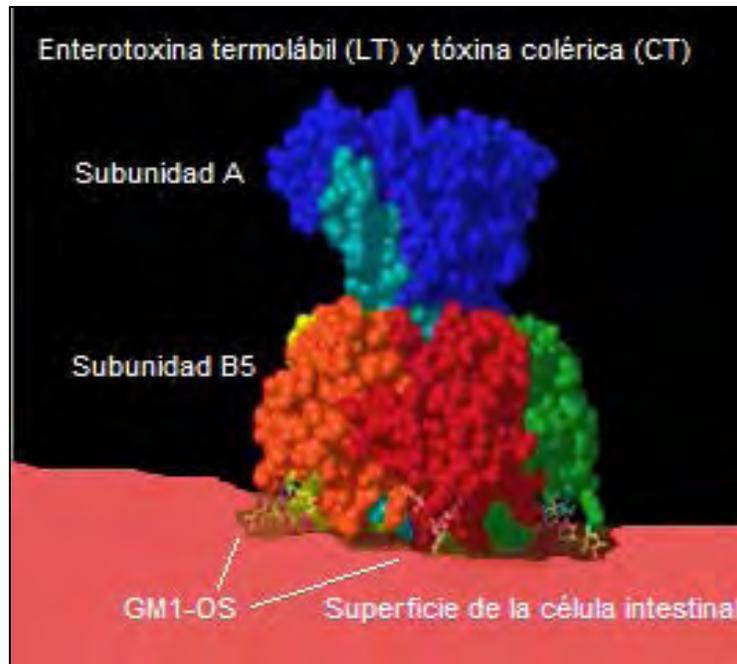


Figura 3. Toxina del cólera. Modificado de Luckham Paul F. 2004. Manipulating forces between surfaces: applications in colloid science and biophysics.

Las subunidades A y B se secretan al periplasma de la bacteria donde se ensambla la CT. La secreción al periplasma esta mediada por una chaperona, la TpcG, la que también está involucrada en el ensamblaje de los pili Tcp (Salyers, 1994).

La activación de la subunidad A se realiza al romperse por proteólisis en dos fragmentos peptídicos A₁ y A₂ los cuales siguen unidos por un puente bisulfuro hasta antes de su internalización a la célula. Este corte proteolítico probablemente sucede después de que la toxina ha sido liberada al fluido extracelular (Salyers, 1994).

La interacción de las subunidades B de la toxina forma un pentámero. Cada uno de los monómeros tiene una α hélice central; al formarse en pentámero se crea un “barril” en su centro, formando un poro. En este poro se asienta la región C- terminal del péptido A₂, el cual se une al pentámero mediante varias interacciones. La región N-terminal del péptido A₂ es una α hélice larga que se extiende fuera del pentámero e interactúa con el péptido A₁.

UNAM-FESZ

La toxina CTX activada se une a su receptor, el gangliósido GM₁, que se encuentra en la superficie de las células de la mucosa intestinal del hospedero. GM₁ es un oligosacárido que contiene ácido siálico unido covalentemente a ceramidas (figura 4). La fracción lipídica del compuesto está embebida en la membrana de la célula del hospedero, mientras que el oligosacárido está expuesto en la superficie, siendo este el que es reconocido como la subunidad B de la toxina de cólera.

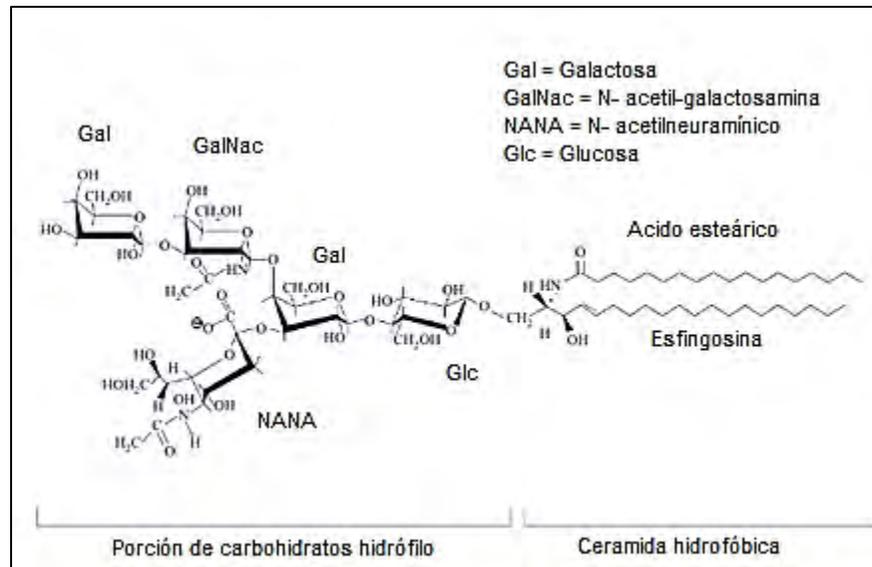


Figura 4. Estructura del gangliósido GM₁. Modificado de Luckham Paul F. 2004. Manipulating forces between surfaces: applications in colloid science and biophysics.

Estudios cristalográficos han determinado que la región inferior por los menos dos subunidades B de la toxina CT, se unen a GM₁, mientras que la subunidad A₁ queda del lado opuesto apuntando hacia afuera de la membrana. Una vez que la CT se une a GM₁, la subunidad A₁ se libera, probablemente por la ruptura del puente bisulfuro y penetra a la célula huésped por translocación.

Existe, sin embargo, una gran especulación sobre este último mecanismo. Una hipótesis propone que el pentámero B se inserta en la membrana de la célula del hospedero formando un poro por el cual pasa la subunidad A₁ (Wachsmuth, 1993, Salyers, 1994).

UNAM-FESZ

Estudios bioquímicos, sin embargo, han mostrado que el pentámero B no se inserta en la bicapa lipídica, sino más bien que se asemeja un iris cuyas subunidades se deslizan formando el poro por donde se introduce la subunidad A₁. Lo que no es claro aún es si la translocación es vía vesículas endocíticas o si la endocitosis no es necesaria para el proceso de internalización (Wachsmuth, 1993, Salyers, 1994).

La subunidad A₁ ribosila el ADP principalmente de las proteínas de membrana G₅. Estas G₅ son un integrante de la familia de las proteínas G que hidrolizan GTP y están compuestas de tres subunidades G α , G β y G γ . La unión y separación de estas subunidades, activa y desactiva a estas proteínas G₅.

G₅ es la proteína que regula la actividad de la adenilato ciclasa de la célula huésped con el consecuente aumento del AMP cíclico intracelular. La forma activa de G₅ incrementa la actividad de la adenilato ciclasa como respuesta normal al estímulo de una hormona y se inactiva después de un corto tiempo. Este control de encendido y apagado asegura la producción de suficiente AMPc para realizar su trabajo en la célula pero no permite su acumulación y por lo tanto la alteración de otras funciones celulares (Wachsmuth, 1993, Salyers, 1994).

La ADP- ribosilación de las proteínas G₅ provoca un “corto circuito” manteniendo a estas proteínas activas, lo cual eleva los niveles de AMPc intracelulares; la alteración más importante como resultado de este proceso es un desequilibrio en la actividad de los transportadores de sodio y cloro a nivel celular (Salyers, 1994).

El incremento de AMPc permite un aumento en la secreción de iones Cl⁻ por las células de las criptas del intestino y un decremento de la absorción de NaCl por las células de las vellosidades intestinales. Esto da como resultado un movimiento neto de electrolitos hacia el lumen intestinal mediado por un gradiente osmótico trans-epitelial. Este flujo masivo de líquido sobrepasa la capacidad de absorción de agua por el intestino, provocando así la presencia de diarrea aguda severa, característica de la enfermedad.

UNAM-FESZ**2.6 Bacteria con dos cromosomas y estilo de vida diferente**

Diversos estudios señalan cómo algunos miembros del género *Vibrio* influyen de manera importante en diferentes ciclos biológicos del ambiente marino. Se ha encontrado que varias especies del mismo género son patógenos importantes para peces, moluscos y mamíferos. Con respecto a *V. cholerae* aún se tiene poca información sobre su ecología, la historia natural de la bacteria, incluyendo su presencia como organismo autóctono en áreas endémicas durante periodos libres de cólera, su existencia en periodos interepidémicos, los factores ambientales que contribuyeron a su reemergencia en América Latina, así como a los componentes ambientales que contribuyen a su permanencia en regiones endémicas de cólera (Wachsmuth, 1993).

En años recientes se encontró que el genoma de *V. cholerae* y otros integrantes del mismo género, presenta 4, 033,460 pares de bases (pb), constituido por dos cromosomas circulares, de 2,961,146 pb (cromosoma 1) y 1,072,314 pb (cromosoma 2). En conjunto ambos codifican para 3,885 marcos de lectura abierta. La mayoría de los genes que son esenciales para las funciones básicas de la bacteria (replicación, transcripción y traducción del ADN y biosíntesis de la pared celular), así como de patogenicidad (toxinas y adhesinas), se localizan en el cromosoma mayor. Por otro lado, el cromosoma pequeño contiene 59% de genes hipotéticos, mientras que en el mayor el 42% de estos no tiene una función conocida. La mayoría de los genes requeridos para el crecimiento y la viabilidad de la bacteria están ubicados en el cromosoma 1 aunque también, y solo presentes en el cromosoma 2, hay genes que pueden ser esenciales para el funcionamiento normal de la célula: *dsdA*, *thrS*, genes que codifican para las proteínas ribosomales L20 y L35 y otros que codifican para diferentes intermediarios de rutas metabólicas (Heidelberg, 2000).

La secuencia del genoma de *V. cholerae* permitió confirmar la presencia de un sistema de captura de genes (isla de integración) localizado en el cromosoma 2

UNAM-FESZ

(125.3 kbp). Entre los genes presentes en esta isla se encuentran tres que codifican para productos involucrados en la resistencia a los antimicrobianos (cloramfenicol acetiltransferasa, proteína para resistencia a la fosfomicina y la glutatión transferasa), varias enzimas del metabolismo del ADN (MutT, transposasa y una integrasa), genes de virulencia (hemaglutininas y lipoproteínas) así como tres genes que codifican para productos similares a las proteínas de adicción del hospedero (higA, higB y doc), utilizados por los plásmidos para la selección y el mantenimiento en las células del hospedero.

El análisis de la secuencia del genoma de *V. cholerae* mostró que la mayoría de los genes presentaban gran similitud con los de *E. coli* 1,454 MLA (marcos de lectura abierta). También se encontró que 499 (12.8%) de los MLA tenían alta similitud con otros genes, lo cual sugiere la existencia de duplicaciones recientes. La mayoría de los MLA duplicados codifican para productos involucrados en funciones de regulación, quimiotaxis, transportes y adherencia, transposición y patogenicidad. De un total de aproximadamente 105 duplicaciones, por lo menos un MLA se encuentra en cada cromosoma, lo que sugiere que se han presentado entrecruzamientos recientes entre ambos. La extensa duplicación de genes involucrados principalmente en mantener la homeostasis de la bacteria, apoya la importancia de los productos de estos genes en la biología de *V. cholerae*, principalmente en relación con su capacidad para habitar diversos ambientes. Es probable que dichos ambientes condujeron la duplicación y divergencia de los genes que son utilizados para funciones específicas. Al respecto se considera que los genes de virulencia están sujetos a presión selectiva, lo cual afecta el número de copias y su localización sobre el cromosoma. La existencia de varios MLA con funciones aparentemente idénticas en ambos cromosomas, sugiere la participación de transferencia lateral de genes y eventos de transposición (Hacker, 1997).

La estructura de dos cromosomas se ha encontrado en otras especies del género *Vibrio*, lo que sugiere que el contenido de genes del megaplásmido confiere a la bacteria una ventaja evolutiva, principalmente dentro del ecosistema acuático en

UNAM-FESZ

donde las diferentes especies de *Vibrio* son los microorganismos dominantes. Aún no resulta claro por qué el cromosoma 2 no se ha integrado en el cromosoma mayor aunque, se sugiere que tiene funciones especializadas importantes para la presión selectiva en la evolución. Una de ellas podría ser el haber acumulado genes que son mejor expresados a un alto o bajo número de copias que los ubicados sobre el cromosoma 1. Otra posibilidad es que en respuesta a alteraciones del ambiente solo uno de los cromosomas se transfiera a las células hijas (segregación aberrante).

Las bacterias en estado de latencia también pueden jugar un papel en la formación de biocapas (biofilms) produciendo quitinasa extracelular, proteasas y otras enzimas degradantes que favorecen la supervivencia de la bacteria en la biocapa (Donlan, 2002).

2.7 Características y función en la transferencia de los genes de virulencia

En 1996 usando la cepa de *V. cholerae* O1 P27459 (modificada genéticamente por un marcador y renombrada SM44) se demostró que el elemento CTX constituye en realidad el genoma de un fago filamentoso (CTXΦ). El fago puede propagarse en cepas receptoras de *V. cholerae*, en las cuales el genoma de CTXΦ puede integrarse al cromosoma en sitios específicos, o bien mantenerse en forma de plásmidos (Waldor, 1996). Este fago filamentoso es de ADN de cadena positiva y está compuesto por una región de 4.5 kb llamada central o core (elemento CTX) la cual está formada por seis genes:

<i>Toxina colérica (CT)</i>	Toxina termolábil que en el hospedero altera el transporte activo de electrolitos a través de la membrana celular impidiendo la adsorción de líquidos y la secreción de ellos por el intestino delgado. Dicha toxina está compuesta por dos subunidades: A y B (en proporción 1A:5B), que son codificadas por los genes <i>ctxA</i> y <i>ctxB</i> respectivamente, que a su vez son parte del operón <i>ctxAB</i> que forma parte del genoma del bacteriófago filamentoso CTXΦ el cual una vez lisogenizado en la bacteria puede integrarse al cromosoma o quedarse en forma de plásmido (Fernández y Alonso, 2009).
------------------------------------	--

UNAM-FESZ

Toxina zonula occludens (zot)	Codificada por el gen <i>zot</i> , aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal rompiendo las uniones estrechas (<i>zona occludens</i>) que mantiene a las células de la mucosa unidas y preservan la integridad de la membrana. Estas uniones actúan como una barrera para que los iones no puedan atravesar directamente por lo que tienen que ser transportados a través de la membrana celular del enterocito mediante bombas específicas. La toxina <i>zot</i> destruye estas uniones y no solo permite la fuga del contenido luminal sino que también altera el equilibrio iónico, ocasionando el cuadro de diarrea (Castañeda, 2009)
Hemaglutinina/proteasa	Codificada por <i>hapA</i> , es una metaloproteasa que actúa sobre las proteínas asociadas a la <i>zona occludens</i> , si bien no es un factor esencial de virulencia, es necesaria para la expresión total de la enterotoxigenicidad (Fernández y Alonso, 2009)
Pili regulado por toxina (TCP)	Es un tipo de pili que está involucrado en la adherencia específica de <i>Vibrio cholerae</i> a la mucosa intestinal además de que se han comprobado que es el receptor del fago CTXΦ. La proteína estructural de este pili se encuentra codificado en el gen <i>tcpA</i> (Karolis <i>et al.</i> , 1999; Silva, 2005).
Citolisinas (hemolisinas)	Codificada por el gen <i>hlyA</i> , como su nombre lo indica tiene capacidad hemolítica, pero además se ha comprobado su capacidad citotóxica y cardiopélica. Por otra parte, esta proteína es biológica, fisicoquímica e inmunológicamente indistinguible en todas las cepas, sugiriendo que contribuye en el desarrollo de la gastroenteritis generada por cepas que carecen de los genes codificantes para la toxina colérica (Castañón, 2005).
Regulón <i>toxR-toxT</i>	Si bien no es un factor de virulencia, es determinante para la expresión de la toxina colérica (TC), TCP y de por lo menos 17 genes más involucrados con el proceso de virulencia de <i>Vibrio cholerae</i> (Eslava, 2008).

La liberación de CTXF, al igual que en otros fagos filamentosos, puede inducirse con luz ultravioleta o con mitomicina C (Boyd, 1999). Una característica observada en este fago es que puede insertarse a una secuencia de 18 pb denominada attRS (sitio de ligamiento), presente en el cromosoma de algunas cepas de *V. cholerae*, o bien no integrarse y comportarse como un plásmido.

La parte central (core) se encuentra flanqueada por una o más copias de la región llamada RS; esta es una secuencia de repetidos que se ha dividido en RS1 y RS2 de 2.7 y 2.4 kb, respectivamente. Esta región codifica para un sistema de integración

UNAM-FESZ

sitio específico, presentando por lo menos 4 MLA. Se ha observado duplicación en tándem del RS y en algunas de todo el elemento CTX. Kimsey y colaboradores (Kimsey, 1998), encontraron que RS1 y RS2 presentan diferencias en sus secuencias, lo que conlleva a diferencias funcionales entre los profagos encontrados en las cepas Clásica y El Tor. En las cepas de *V. cholerae* O1 del biotipo Clásico hay una copia del profago CTX en cada uno de los dos cromosomas, mientras que en las cepas del biotipo El Tor el profago está arreglado en tándem en los dos cromosomas. En las cepas El Tor el genoma del fago a menudo se encuentra flanqueado por una copia adicional de RS1, la cual contiene genes adicionales a RS2 (Boyd, 1999, Kimsey, 1998).

2.8 Regulación de la expresión de los factores de virulencia

El hábitat natural de las cepas toxigénicas de *V. cholerae* comprende diferentes ambientes, uno lo constituye el tracto digestivo del hospedero cuando la bacteria se comporta como patógeno; el otro es el ambiente acuático cuando actúa como microorganismo de vida libre. El microambiente del tracto intestinal induce la expresión de un gran número de factores asociados a virulencia en *V. cholerae*, principalmente de la toxina colérica y del Pili regulado por toxina además de por lo menos otros 17 genes involucrados en el proceso de virulencia los cuales están bajo el control de la cascada regulatoria ToxR-ToxT (DiRita, 1991 y 1992).

Al inducirse la producción y activación de la proteína reguladora ToxR, esta sufre cambios conformacionales que dan como resultado la formación de dímeros que son estabilizados por la proteína ToxS que activa la transcripción de los genes *ctxA* y *ctxB*. ToxR activa además la transcripción del gen *toxT*, gen regulador que se encuentra en la isla de patogenicidad de *Vibrio* (VPI) y que es miembro de la familia AraC. La expresión de CT y TCP, así como de otros factores de virulencia, difieren entre las cepas de *V. cholerae* de los biotipos Clásico y El Tor, lo que ha sugerido la expresión diferencial del regulón ToxR en los dos biotipos debida a un control biotipo específico sobre la expresión de *toxT*. Los diferentes sistemas de regulación en *V.*

UNAM-FESZ

cholerae conducen a una variación en la expresión de los genes de virulencia optimizando su permanencia en diferentes ambientes tales como el intestino humano y el hábitat marino (DiRita, 1996).

2.9 Historia de *Vibrio cholerae*

En los siglos recientes se han documentado 7 pandemias de cólera, cobrando una gran cantidad de vidas, presentándose la última en el año de 1991 y a pesar de que han pasado más de 20 años, existen países como Cuba en los que la enfermedad no cesa (González, 2011).

La primera pandemia tiene su origen en Calcuta (1817-1824), a partir del festival tradicional Kumbh, celebrando en el delta del río Ganges. La enfermedad se propagó a toda la India y se estima que ocasionó cientos de miles de muertes, desde ahí se extendió por Rusia y Europa del Este y para el año 1827 se presentan los primeros casos en Europa Occidental (Lafuente, 2006).

La segunda pandemia fue considerada como la más devastadora. Tuvo lugar entre 1826 y 1837, extendiéndose a prácticamente todo Europa, Asia, África y hace su aparición por primera vez en el continente Americano, afectando gran parte de E.U.A y apareciendo los primeros casos en México en el año 1833 (Lafuente, 2006; Castañeda, 2009).

Para el año 1848 se presenta la tercera pandemia llevando el cólera a Grecia y Turquía, a México llega el 23 de diciembre de 1848, sin embargo la enfermedad se mantuvo endémica en el estado de Sonora, donde se presentaron algunos brotes entre abril de 1849 y finales de 1850, terminando la pandemia en el año de 1862 (Castañeda, 2009). En esta época, en la que John Snow descubre que el agente etiológico de esta enfermedad es un agente hidrottransmisible (Lafuente *et al.*, 2006).

UNAM-FESZ

La cuarta pandemia (1864-1875) comenzó dos años después de que culminara la tercera, tuvo su origen en Bengal y se extendió a través de la India, alcanzando Bombay por la costa oeste y es por medio del tráfico de esclavos que llega a países del medio oriente y el golfo pérsico. Alcanza México, a través de Sudamérica afectando a Brasil en 1867 y Paraguay en 1869, teniendo una duración total de 11 años, concluyendo en 1875 (Hays, 2005; Castañeda, 2009).

Es durante la quinta pandemia (1881-1896) que Pacinni descubre el agente etiológico del cólera al observar un gran número de bacterias curvas en el contenido intestinal de personas con esta patología y Robert Koch lo describe a partir de las heces acuosas de pacientes enfermos de cólera. Esta pandemia afecto de sobremanera Sudamérica, con un gran número de casos registrados en Argentina, Chile y Perú donde cobro muchas vidas (Lafuente *et al.*, 2006; Castañeda, 2009).

La sexta pandemia (1899-1923) se origina en Bengal, afecta Asia, África, el sudeste europeo y Rusia y se mantuvo ausente en los países europeos muy industrializados. En el año 1905 en una estación de cuarentena se aisló una cepa O1 diferente a la causante de las otras cinco pandemias y se le signo con el nombre El Tor y al primero como El Clásico, ambos presentan características antigénicas similares pero se diferencian metabólicamente (Lafuente *et al.*, 2006).

Finalmente y para el año 1962 inicia la séptima pandemia en el sur de Asia, desde donde se disemina a otros continentes, apareciendo en América en el año 1991 cuando las investigaciones epidemiológicas mostraron que el agente causal fue nuevamente *Vibrio cholerae* O1-El Tor, sin embargo en 1962, en el sur de la India aparece una nueva clona epidémica que fue determinada como O139 y se comprobó que esta cepa era portadora del gen codificante para la toxina colérica (Castañeda, 2009).

UNAM-FESZ

2.10 Epidemiología del cólera

Poblaciones de todo el mundo han sido afectadas esporádicamente por brotes de cólera (Valenzuela, 2010). El continente más afectado es África (más del 90% de los casos notificados), seguido de lejos por Asia y América. En Estados Unidos, Europa y Oceanía sólo se notifican casos esporádicos, casi siempre importados (figura 5). (García, 2010).

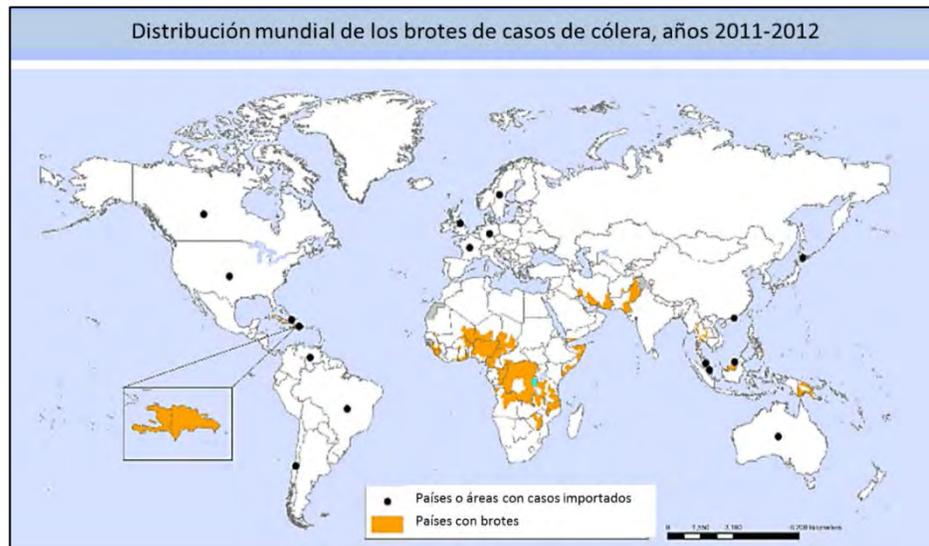


Figura 5. Distribución mundial de los brotes de casos de cólera, años 2011-2012. Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2013.

En México, desde el 9 de Septiembre y hasta el 10 de Octubre de 2013, el Centro Nacional de Enlace para el reglamento sanitario Internacional de México notificó un total de 159 casos confirmados de infección por *Vibrio cholerae* O1 Ogawa toxigénico, incluido un fallecimiento. Del total de casos confirmados, dos (1,3%) son residentes del Distrito Federal, 145 (91,2%) del estado de Hidalgo, 9 (5,7%) del estado de México, uno (0,6%) del estado de San Luis Potosí y dos (1,3%) del estado de Veracruz (figura 6). (OPS, OMS, 2013).



Figura 6. Mapa de casos acumulados de cólera en México por entidad federativa. 12 de octubre de 2013. Modificada de (OPS, OMS, 2013).

Desde la actualización epidemiológica del 12 de octubre del 2013, se han registrado 12 nuevos casos, todos en el estado de Hidalgo. De los casos confirmados, dos (1,2%) son residentes del Distrito Federal, 157 (91,8%) son del Hidalgo, 9 (5,3%) son del estado de México, 1 (0,6%) es de San Luis Potosí y 2 (1,2%) son de Veracruz (OMS, OPS, 2013).



Figura 7. Casos de cólera acumulados registrados en la Región de las Américas, hasta el 18 de octubre 2013. Fuente: Organización Panamericana de la Salud. Tomado de (OMS, OPS, 2013).

UNAM-FESZ

Desde el principio de este brote, en Septiembre de 2013, hasta diciembre de 2014 se notificaron 184 casos confirmados de cólera por *Vibrio cholerae* O1 Ogawa en el país, uno de ellos mortal. De estos 184 casos, 160 se han registrado en el estado de Hidalgo, 11 en el estado de Veracruz, 9 en el estado de México, 2 en el Distrito Federal y 2 en el estado de San Luis Potosí (figura 7) (OMS, 2013).

2.11 Epidemiología molecular del cólera

Incluso con los tratamientos modernos establecidos y medidas preventivas, *V. cholerae* continúa emergiendo como un patógeno peligroso. Las epidemias de cólera tienen comportamiento impredecible aunque han sido bien documentadas durante los últimos dos siglos.

La mayoría de las cepas O1 y O139 causantes de brotes y epidemias de cólera están muy relacionadas desde la perspectiva genómica y tienen una “colección” de genes de virulencia muy similar.

La estructura de integración cromosómica del fago CTX difiere entre las cepas El Clásico y El Tor de la 7ª pandemia y hay algunos cambios de aminoácidos identificados en los marcos de lectura de genes clave.

Durante el reciente brote de Haití en 2010 se aplicaron nuevas herramientas y métodos moleculares para determinar rápidamente el origen y valores predictivos de la cepa causante del brote. Esta representa la primera epidemia de cólera en ser analizada rápidamente con una serie de plataformas de secuenciación (Robins,2014).

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, han aparecido nuevas metodologías que analizan la variabilidad génica mediante secuenciación del ADN. Sobre la base del análisis de las variaciones en las secuencias de genes, se ha sugerido que las últimas dos pandemias de cólera podrían estar causadas por clonas independientes, que emergieron de *V. cholerae* ambientales, no toxigénicos, no O1 (Fernández, 2009).

Como se ha mencionado *V. cholerae* es un problema de salud pública que afecta poblaciones en malas condiciones higiénicas, dando origen a brotes y epidemias.

UNAM-FESZ

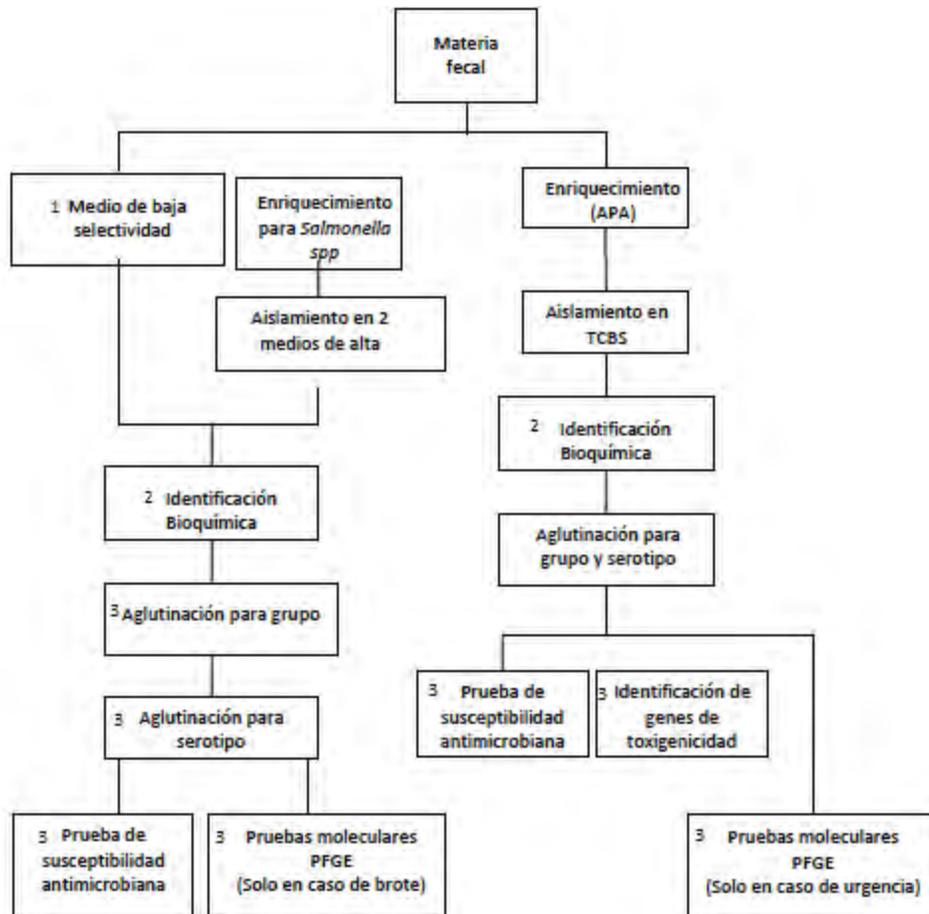
Estas condiciones pueden propiciar que haya recombinación genética entre cepas de *V. cholerae*, dando origen a la aparición de nuevas variantes. Para detectar estas variantes se utilizan métodos y técnicas de análisis de genomas bacterianos, genes, y segmentos específicos de ADN como son: análisis Bioinformático, Reacción en Cadena de la Polimerasa, secuenciación de ácidos nucleicos y análisis filogenético.

2.12 Algoritmo Diagnóstico del cólera.

En México, las acciones de Vigilancia Epidemiológica se apoyan en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), el cual cuenta con el subsistema de laboratorio para llevar a cabo las actividades de vigilancia de manera oportuna y uniforme para el diagnóstico de cólera, salmonelosis, shigelosis y otras enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos y agua contaminada.

Dichas actividades se encuentran normadas bajo los lineamientos de operación para la vigilancia basada en los hallazgos de laboratorio de la enfermedad diarreica aguda bacteriana incluyendo las funciones por niveles; la toma, manejo y envío de muestras; la metodología para el análisis de muestras (métodos tradicionales y métodos moleculares); la evaluación del desempeño así como los estándares de calidad.

El diagnóstico de cólera y otras enterobacterias, se realiza mediante la búsqueda intencionada de *V. cholerae*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* en pacientes que cumplen con la definición operacional de caso de Enfermedad Diarreica Aguda mediante el siguiente algoritmo diagnóstico (figura 8).



- 1 En caso de brote y se sospeche de *Escherichia coli* picar cinco colonias e identificar.
 2 Se pueden emplear métodos automatizados o semi automatizados para la identificación.
 3 Estudios que se realizan en el InDRE.

Figura 8. Algoritmo para el diagnóstico de EDA Bacteriana (*V. cholerae* y otras enterobacterias) implementado en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) de México.

2.13 Estandarización de métodos específicos de trabajo en el IMSS.

El IMSS, es la institución con mayor presencia en la atención a la salud y en la protección social de los mexicanos desde su fundación en 1943, para ello, combina la investigación y la práctica médica, con la administración de los recursos para el retiro de sus asegurados, para brindar tranquilidad y estabilidad a los trabajadores y sus familias, ante cualquiera de los riesgos especificados en la Ley del Seguro

UNAM-FESZ

Social. Actualmente más de la mitad de la población mexicana, tiene algo que ver con el Instituto, hasta ahora, la más grande en su género en América Latina.

La administración de los procesos y procedimientos dentro del IMSS es una actividad que implica homogenizar y estandarizar la elaboración de los documentos internos utilizados en las diferentes áreas del instituto. El Reglamento Interior del Instituto Mexicano del Seguro Social regula a través de la norma que establece las disposiciones para la elaboración, autorización y registro de los documentos internos en el instituto Mexicano del seguro social, las actividades para la elaboración de métodos específicos de trabajo, guías e instrucciones de operación.

Un método específico de trabajo es la adaptación de un procedimiento vigente autorizado y registrado en el catálogo institucional, que describe las actividades específicas que realizan los órganos de operación administrativa desconcentrada y operativos del IMSS en el ámbito de su competencia, utilizando los recursos disponibles (humanos, materiales y financieros) asignados. El contenido y alcances de los métodos específicos de trabajo son de la estricta responsabilidad de los órganos de operación administrativa desconcentrada y los operativos del IMSS emisores de los mismos.

Desde la implementación del diagnóstico molecular de Influenza y Dengue en los laboratorios del IMSS en 2009 y 2011, ha sido su política cumplir con los estándares de calidad establecidos por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) con el objetivo de aportar información certera que apoye en la toma de decisiones en las acciones de protección y promoción de la salud de la población mexicana; actualmente el marco analítico del LCE incluye Influenza, Dengue, Sarampión/Rubéola, Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana (V. cholerae y otras enterobacterias), infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana, Tuberculosis, Leptospirosis, Rickettsiosis, Fiebre zika, Fiebre Chikungunya, Chagas, Diarrea por Rotavirus, Tosferina, Infección Bacteriana Invasiva, determinación de translocaciones en pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica.

UNAM-FESZ

En septiembre de 2010, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) inicio el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica basada en laboratorio, para ello la Dirección de Prestaciones Médicas (DPM) reestructuró la Coordinación de Vigilancia Epidemiológica y Apoyo en Contingencias (CVEAC); actualmente Coordinación de Vigilancia Epidemiológica (CVE), mediante la incorporación de la División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica (DLVIE) a través del acuerdo HCT 290910/299.

Actualmente la DLVIE, está conformada por el Área de Laboratorio Central de Epidemiología (LCE), Área de Control de muestras y Área de Red de Laboratorios, en las que recaen actividades normativas, operativas, de capacitación e investigación en apoyo a la vigilancia epidemiológica basada en laboratorio y tiene como objetivo estandarizar los procedimientos empleados por los laboratorios del Instituto para la vigilancia epidemiológica basada en laboratorio, por esta razón y en seguimientos a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica, con respecto a la operación del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) o InDRE y de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) en el numeral 11, las Áreas de Red de Laboratorios, LCE y Control de Procesos aplican los criterios y recomendaciones emitidos por el InDRE para todos los laboratorios integrantes de la RNLSP.

El IMSS cuenta con una red de laboratorios para el diagnóstico molecular de influenza conformada por el Laboratorio Central de Epidemiología (LCE) y los laboratorios de diagnóstico molecular del Centro de Investigación Biomédica del Occidente (CIBO), Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) y Unidad de Investigación Médica Yucatán (UIMY).

Debido a lo anterior es importante la implementación de métodos específicos de trabajo en los laboratorios que conforman la red y de esta forma garantizar la homogeneidad de las actividades realizadas en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas sujetas a vigilancia epidemiológica por laboratorio.

JUSTIFICACIÓN

En el diagnóstico de cólera es importante la identificación de cepas toxigénicas ya que solo las cepas productoras de toxina causan la enfermedad. La producción de toxina es un marcador importante en la identificación de *Vibrio cholerae*. La toxina colérica (CT) está formada por dos subunidades, los genes que codifican para las subunidades A y B son designados ctxA y ctxB respectivamente y se expresan con una sola unidad transcripcional.

La técnica de PCR se emplea para identificar la subunidad A en cepas de *V. cholerae* O1 toxigénico y es aplicable a la identificación indirecta de la bacteria aislada de materia fecal o de muestra ambientales o bien muestras de alimentos sospechosos de estar involucrados en la transmisión de cólera.

En este trabajo se estandarizará y verificará un método específico de trabajo de PCR de punto final para la detección de genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB de *Vibrio cholerae*, de acuerdo a la normatividad vigente del IMSS.

HIPÓTESIS

El diseño e implementación de un método específico de trabajo de PCR de punto final para la detección de genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB de *Vibrio cholerae* permitirá reducir el tiempo empleado en la identificación de cepas toxigenicas en el Laboratorio Central de Epidemiología del Instituto Mexicano del Seguro Social.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar y verificar un método específico de trabajo de PCR de punto final para la detección de genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB de *Vibrio cholerae*.

OBJETIVOS PARTICULARES

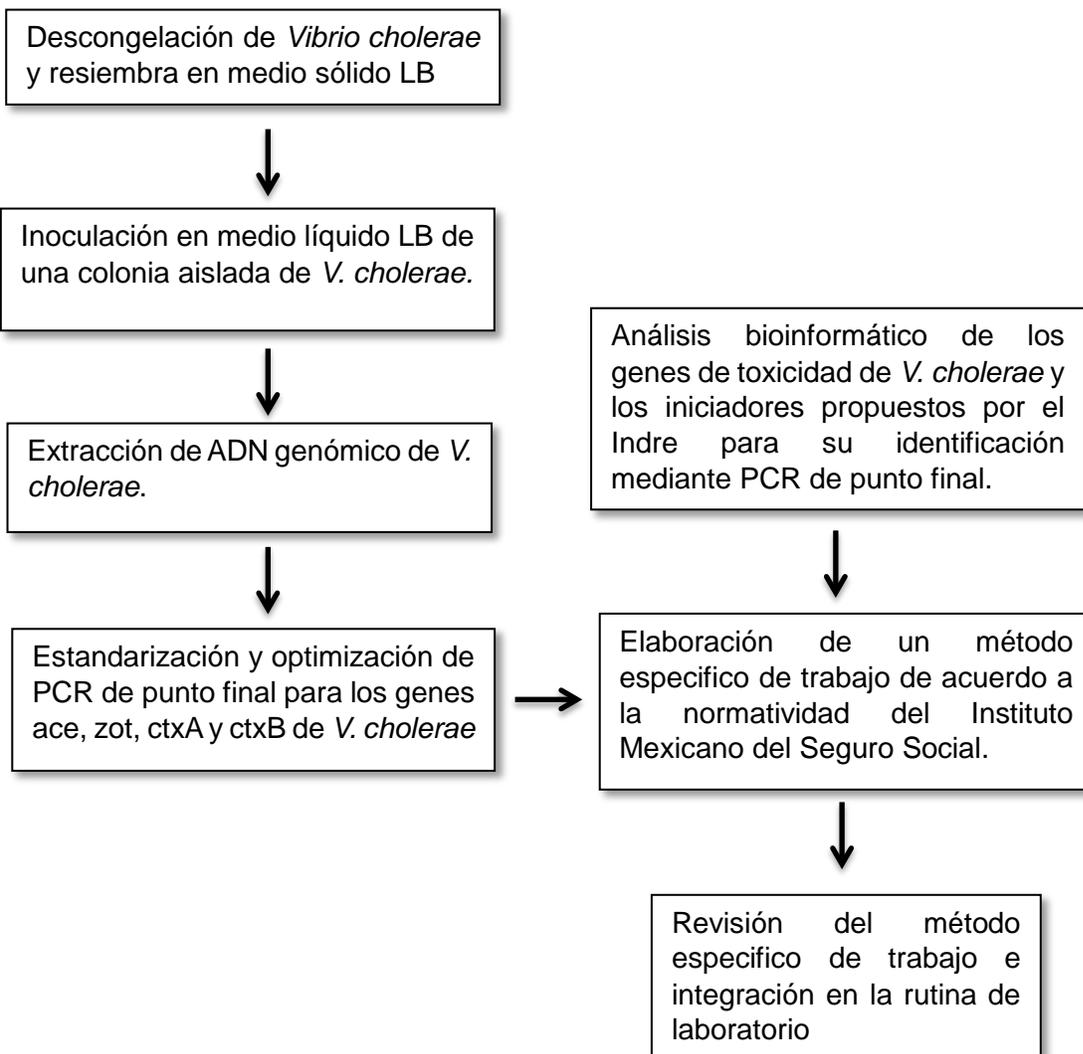
- I. Verificar los iniciadores utilizados en la metodología de PCR referida para la detección de los genes ctx, mediante análisis "*in silico*".
- II. Estandarizar la metodología para la obtención de ADN genómico bacteriano de *Vibrio cholerae*.
- III. Estandarizar las condiciones experimentales de reacciones de PCR de punto final para la amplificación de los genes ace, zot, ctxA y ctxB a partir de ADN genómico de *Vibrio cholerae*.
- IV. Determinar el rango dinámico y límites de detección de ADN genómico necesarios para la amplificación positiva de los genes ace, zot, ctxA y ctxB a partir de ADN genómico de *Vibrio cholerae*.
- V. Elaborar un método específico de trabajo para el análisis de los genes ace, zot, ctxA y ctxB en cepas de *Vibrio cholerae* mediante PCR de punto final y de acuerdo a la normatividad vigente en el IMSS.

UNAM-FESZ

MATERIAL Y METODO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Central de Epidemiología, del Centro Médico Nacional la Raza IMSS.

DIAGRAMA DE TRABAJO



UNAM-FESZ

Cepa utilizada

Para la estandarización de la PCR de punto final de la toxina colérica, se utilizó una cepa de *Vibrio cholerae* O1 serotipo Ogawa, CT+, aislada de una muestra clínica, en el área de bacteriología del Laboratorio central de Epidemiología.

Descongelación de cepas

La cepa de *Vibrio cholerae* se mantuvo congelada a -80° C y su resiembra se realizó en agar LB. Se flameo el asa bacteriológica en el mechero de Bunsen hasta la incandescencia y se introdujo en el criotubo; posteriormente se descargó el inóculo en el agar LB y se sembró por estría cruzada e incubación a 37 °C durante 16 horas.

Análisis Bioinformático

Se hizo una búsqueda en la base de datos de secuencias de nucleótidos “Genbank” del Centro Nacional de Información Biotecnológica “NCBI” (por sus siglas en inglés National Center of Biotechnology Information) para obtener la secuencia de nucleótidos del cromosoma I de *Vibrio cholerae* en el cual se encuentran los genes que codifican para la toxina colérica y toxinas accesorias. Posteriormente se realizó un análisis de las secuencias utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local “BLAST” (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool) del sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Posteriormente se analizaron los oligonucleótidos (Tabla 1) recomendados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica “Indre”, para la identificación de genes de toxicidad de *V. cholerae* mediante PCR de punto final con la aplicación primer-BLAST del sitio <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

UNAM-FESZ

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para la obtención de la región codificante de las toxinas accesorias.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Producto (pb)
ace	5'-TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC CC- 3'	5'-CGT GAT GAA TAA AGA TAC TCA TAG- 3'	316
zot	5'-TGG CTT CGT CTG CTG CCG GCG ATT- 3'	5'-CAC TTC TAC CGA CAG CGC TTG CG- 3'	1083
ctx A	5'-CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G- 3'	5'-CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC- 3'	494
ctx B	5'-GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT- 3'	5'-GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC- 3'	461
Amplicón	5'-TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC CC- 3'	5'-GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC- 3'	2797

Extracción y obtención de ADN genómico bacteriano

Realizada la resiembra de *V. cholerae*, se utilizó una colonia aislada para inocular en 30 mL de medio líquido LB, la cual se incubó a 37° C por 8 horas con agitación constante. Para la obtención de ADN genómico de *Vibrio cholerae* se empleó el sistema Invisorb® Spin Blood Mini Kit (Stratec Molecular– 1031110200), siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante (Apendice 1).

Evaluación de la concentración del ADN

La concentración y pureza del ADN obtenido a partir de las muestras, fue evaluada mediante un espectrofotómetro de micro cuantificación “Nanodrop” (Thermo Scientific®), colocando en el pedestal 2 µL de cada volumen de ADN obtenido en el proceso de extracción y determinando la densidad óptica a 260 y 280 nm.

PCR punto final

Para la verificación de los genes de toxicidad de *Vibrio cholerae*, se realizó una reacción de PCR en punto final para las regiones individuales de ace, zot, ctxA y ctxB, se utilizó una mezcla de reactivos comercial SuperScript™ III RT/ Platinum®

UNAM-FESZ

Taq Mix, (invitrogen No. Cat. 1628353) para la obtención del producto de PCR se siguieron las instrucciones y recomendaciones del fabricante (tabla 2).

Estandarización de las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de los genes de toxicidad de *Vibrio cholerae*.

Tabla 2. Mezcla de reactivos utilizados en la técnica de PCR de los genes ace, zot, ctxA y ctx B de *Vibrio cholerae*.

Reactivos	Volumen de reacción
Platinum® Taq ADN Polymerase	0.5 µl
Buffer 10X	12.5 µl
Iniciador Forward (10 µM)	2.5 µl
Iniciador Reverse (10 µM)	2.5 µl
ADN	5 µl
Agua libre de nucleasas	2 µl
Volumen total	25 µl

Los programas de amplificación se describen en las siguientes tablas:

Tabla 3. Condiciones del programa del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR de los genes ace, ctxA y ctxB.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95° C	5 min	1
Desnaturalización	95° C	15 seg	30
Alineamiento	56° C	30 seg	30
Extensión	68° C	1 min	30
Extensión Final	68° C	2 min	1
Enfriamiento	4° C	∞	1

UNAM-FESZ

Tabla 4. Condiciones del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR del gen zot.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95° C	5 min	1
Desnaturalización	95° C	15 seg	30
Alineamiento	66° C	30 seg	30
Extensión	68° C	1 min 30 seg	30
Extensión Final	68° C	2 min	1
Enfriamiento	4° C	∞	1

Tabla 5. Condiciones del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR de la región ace_zot_ctxA_ctxB.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95° C	5 min	1
Desnaturalización	95° C	15 seg	30
Alineamiento	56° C	30 seg	30
Extensión	68° C	3 min 30 seg	30
Extensión Final	68° C	2 min	1
Enfriamiento	4° C	∞	1

Identificación de los genes ace, zot, ctxA y ctxB

Los productos obtenidos en las reacciones de PCR de punto final fueron analizados, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.90%, 75V utilizando una solución 1X de TRIS-Borato-EDTA TBE como solución amortiguadora de corrida y teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Marca Biotium 10 000 X en agua bidestilada (apéndice 2), con el propósito de visualizar la obtención del producto de PCR y verificar su tamaño.

Concentración de detección mínima de ADN

Para determinar la concentración mínima de ADN detectable en PCR punto final, se emplearon 7 diluciones seriadas con un factor 1:10 a partir de ADN genómico bacteriano en una solución stock de 1000 ng/ μ l hasta una concentración de 1 pg/ μ l, para cada uno de los genes de toxicidad de *Vibrio cholerae*.

Especificidad y sensibilidad relativa

La sensibilidad y la especificidad relativa para PCR de punto final son parámetros que evalúan la capacidad de la técnica para determinar la presencia o ausencia de los genes de toxicidad de *V. cholerae* y su utilidad para el diagnóstico.

Por otra parte el método de PCR puede detectar cantidades extremadamente pequeñas de ADN pero también puede inhibirse por un exceso del mismo, por ello se determinó el rango dinámico de detección, estandarizando la concentración de ADN detectable mediante esta técnica.

UNAM-FESZ

RESULTADOS

Análisis bioinformático

Se utilizó el genoma bacteriano de *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 como secuencia de referencia para analizar la región codificante de los genes ace, zot, ctxA y ctxB y verificar la secuencia de los oligonucleótidos recomendados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos para la identificación de genes de toxicidad de *V. cholerae* mediante PCR de punto final. Se descargó de la base de datos del GENBANK la secuencia en formato FASTA del cromosoma I de *Vibrio cholerae* (3, 007,450 nucleótidos) y se determinaron las posiciones donde alineaban los iniciadores de los genes ace, zot, ctxA y ctxB.

Los genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB se encuentran en tándem en el cromosoma I de *V. cholerae* (figura 9), para ello se realizó un primer BLAST con el iniciador forward de ace y el iniciador reverse de ctxB (tabla 6) para determinar la factibilidad de amplificar toda la región codificante de la toxina colérica y toxinas accesorias utilizando dichos iniciadores.

Tabla 6

ace 1	5'- TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC CC -3'
ctx 7	5'- GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC -3'

Como resultado de este análisis se comprobó que estos iniciadores ace1 y ctx 7 permitirían la amplificación de una región de 2797 pb correspondiente a los genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB. Lo anterior se confirmó experimentalmente al realizar la reacción de PCR de punto final con los oligonucleótidos antes mencionados y con las condiciones experimentales especificadas en la tabla 5.

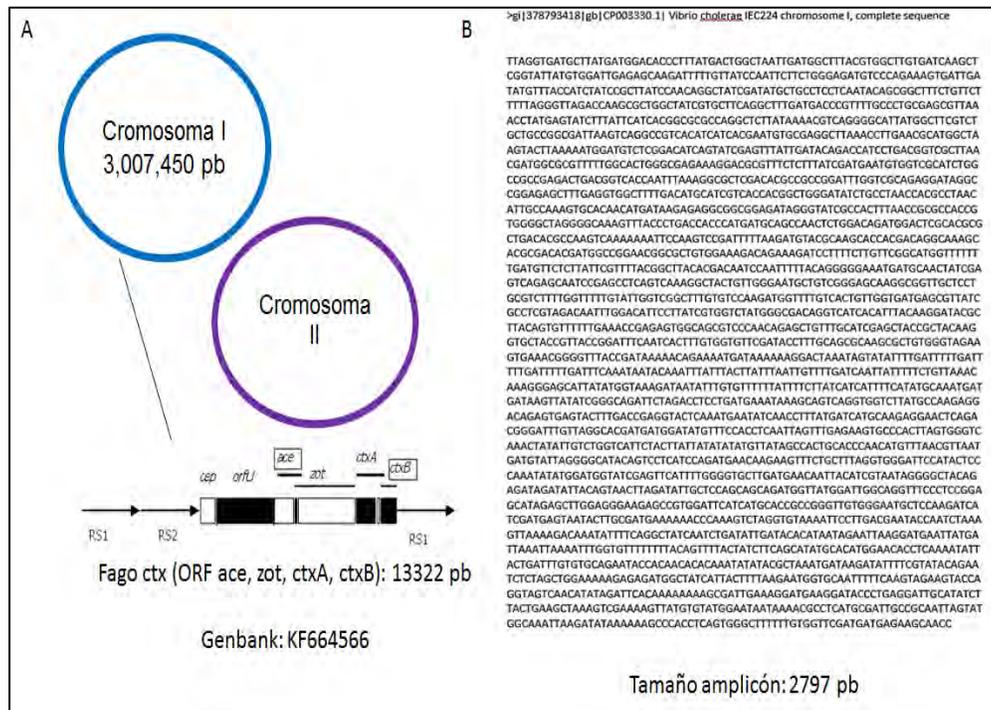


Figura 9. Genoma de *V. cholerae* y amplicón genes CTX. A) Genoma de *V. cholerae*, cromosoma I se encuentran los genes esenciales para funciones básicas y patogenicidad como son las toxinas accesorias (ace y zot) y toxina colérica (ctxA y ctxB). B) Región codificante de la toxina colérica (ctxA y ctxB) y toxinas accesorias (ace zot), 2797 pb.

Especificidad de los iniciadores

Antes de realizar experimentalmente las reacciones de PCR de punto final para la determinación de los genes ace, zot, ctxA y ctxB de *Vibrio cholerae*, se realizó un análisis de los iniciadores mediante la aplicación web Primer-BLAST del NCBI.

Verificando la similitud de las secuencias de los iniciadores con la secuencia de referencia *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 temperatura de alineamiento, longitud del producto de PCR y contenido porcentual de GC (tabla 7). En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la verificación del diseño de los oligonucleótidos:

Tabla 7.

UNAM-FESZ

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Longitud del producto (pb)	Contenido de GC (%)
ace-1	5'-TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC CC-3'	58.4	316	46.1
ace-2	5'-CGT GAT GAA TAA AGA TAC TCA TAG-3'	48.9		33.3
zot-1	5'-TGG CTT CGT CTG CTG CCG GCG ATT-3'	67.3	1083	62.5
zot-2	5'-CAC TTC TAC CGA CAG CGC TTG CG-3'	62.4		60.8
ctx-2	5'-CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G-3'	58.9	494	59.0
ctx-3	5'-CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC-3'	57.9		52.1
ctx-9	5'-GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT-3'	46.0	461	25.0
ctx-7	5'-GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC-3'	58.1		50.0

Los resultados sobre los cambios de base en el diseño de los iniciadores ace-1 y zot-2 se muestran en las figuras 10 y 11.

```

>CP003330.1 Vibrio cholerae IEC224 chromosome I, complete sequence
product length = 316

Forward primer 1      TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC 26
Template      1566735  .T...TGA..... 1566710

Reverse primer 1      CGTGATGAATAAAGATACTCATAG 24
Template      1566420  ..... 1566443

```

Figura 10. Secuencia de oligonucleótidos sentido ace-1, anti sentido ace-2 utilizados para la amplificación por PCR de punto final de una región de 316 pb correspondiente al gen de toxicidad ace.

```

>CP003330.1 Vibrio cholerae IEC224 chromosome I, complete sequence
product length = 1083

Forward primer 1      TGGCTTCGTCTGCTGCCGGCGATT 24
Template      1566384  ..... 1566361

Reverse primer 1      CACTTCTACCGACAGCGCTTGCG 23
Template      1565302  .....C..... 1565324

```

Figura 11. Secuencia de oligonucleótidos sentido zot-1, anti sentido zot-2 utilizados para la amplificación por PCR de punto final de una región de 1083 pb correspondiente al gen de toxicidad zot.

UNAM-FESZ

De igual modo se verifico la especificidad de los oligonucleótidos propuestos realizando un análisis de primer BLAST enfrentando cada uno de los pares de iniciadores contra las secuencias de nucleótidos registradas en la base de datos del GENBANK y excluyendo aquellas secuencias correspondientes a *V. cholerae* y fago ctx. Los resultados obtenidos indican una similitud menor a 20 % con secuencias diferentes a *V. cholerae* y fago ctx, garantizando una alta especificidad hacia las secuencias de los genes ctx (similitud del 100%).

Se utilizó la aplicación web Oligoanalyzer para determinar la factibilidad de formación de estructuras secundarias tipo orquilla, homodimeros y heterodimeros de iniciadores debido a secuencias repetidas, complementarias o palindromicas. Los resultados obtenidos demuestran que es poco probable la formación de estructuras secundarias bajo las condiciones de PCR propuestas (tablas 3, 4 y 5).

Determinación del gen ace *V. cholerae*

Para la amplificación del gen ace se utilizaron los iniciadores reportados por Trucksis 1993.

Se analizó el sitio de hibridación de los iniciadores Ace-1 y Ace-2 dentro de la secuencia de referencia *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 utilizando la metodología de primer-BLAST.

Se encontró que el tamaño de amplificación para el gen ace es de 316 pb (figura 12) el cual es mayor a lo reportado Aidara *et al*, 1998; y el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica quienes refieren que el amplicon para el gen ace es de 314 pb.

UNAM-FESZ

1440661	ATCCGCATGATAGTGCTCGCGATGGCGTACATTCTGGCCGCCATGCTCATTTTGTTAGG
1440661	TAGGCGTACTATCACGAGCGCTACCGCATGTAAGACCGGCGGTACGAGTAAACAAATCC
1440721	TGATGCTTATGATGGACACCC
1440721	TTTATGACTGGCTAATTGATGGCTTTACGTGGCTTGTGA ACTACGAATACTACCTGTGGGAAATACTGACCGATTAAC TACCGAAATGCACCGAACACT
1440781	TCAAGCTCGGTATTATGTGGATTGAGAGCAAGATTTTGT TATCCAATTCTTCTGGGAGA
1440781	AGTTCGAGCCATAATACACCTAACTCTCGTTCTAAAAACAATAGGTTAAGAAGACCTCT
1440841	TGCCCAGAAAGTGATTGATATGTTTACCATCTATCCGCTTATCCAACAGGCTATCGATA
1440841	ACAGGGTCTTTCACTAACTATACAAATGGTAGATAGGCGAATAGGTTGTCCGATAGCTAT
1440901	TGCTGCCTCCTCAATACAGCGGCTTTCTGTTCTTTTTAGGGTTAGACCAAGCGCTGGCTA
1440901	ACGACGGAGGAGTTATGTCGCCGAAAGACAAGAAAAATCCCAATCTGGTTCGCGACCGAT
1440961	TCGTGCTTCAGGCTTTGATGACCCGTTTTGCCTGCGAGCGTTAAACCTATGAGTATCTT
1440961	AGCACGAAGTCCGAAACTACTGGGCAAAACGGGACGCTCGCAATTTGGATACTCATAGAA
1441021	TATTCATCACGGCGCGCCAGGCTCTATAAAACGTCAGGGGCATTATGGCTTCGTCTGCT
1441021	ATAAGTAGTGCGCGGTCGAGAAATATTTGCAGTCCCCTAATACCGAAGCAGACGA

Figura 12. Amplicon para la toxina accesoria ace (316 pb), el color amarillo indica las secuencias de los oligonucleótidos forward ace 1 y reverse ace 2 que amplifican la PCR de punto final, mientras que en color azul se señala el producto teórico de PCR.

Determinación del gen zot *V. cholerae*

Para la amplificación del gen zot se utilizaron los iniciadores reportados por Tamayo, 1997.

Se analizó el sitio de hibridación de los iniciadores zot-1 y zot-2 dentro de la secuencia de referencia *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 utilizando la metodología de primer-BLAST.

Se encontró que el tamaño de amplificación para el gen zot es de 1083 pb (figura 13) el cual es igual a lo reportado por Aidara *et al*, 1998; y el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica quienes refieren que el amplicon para el gen zot es de 1083 pb.

UNAM-FESZ

1441021	TATTCATCACGGCGCCAGGCTCTTATAAAACGTCAGGGGCATTA	TGGCTTCGCTCGCT
1441021	ATAAGTAGTGCCGCGCGTCCGAGAATATTTTGCAGTCCCCGTAATACCGAAGCAGACGA	
1441081	GCCGGCGATT	AAGTCAGGCCGTACATCATACGAATGTGCGAGGCTTAAACCTTGAACG
1441081	CGGCCGCTAATTCAGTCCGGCAGTGTAGTAGTGTACACGCTCCGAATTTGGAACCTTG	
1441141	CATGGCTAAGTACTTAAAAATGGATGTCTCGGACATCAGTATCGAGTTTATTGATACAGA	
1441141	GTACCGATTTCATGAATTTTACCTACAGAGCCTGTAGTCATAGCTCAAATAACTATGTCT	
1441201	CCATCCTGCAGGTCGCTTAACGATGGCGCCTTTTGGGACTGGGCGAGAAAGGACGCGTT	
1441201	GGTAGGACTGCCAGCGAATTGCTACCGCGAAAAACCGTAGCCCGCTCTTCTCGCCAA	
1441261	TCTCTTTATCGATGAATGTGGTCGCATCTGGCCGCCGAGACTGACGGTCACCAATTTAAA	
1441261	AGAGAAATAGTACTTACACCAGCGTAGACCGCGGCTCTGACTGCCAGTGGTTAAATTT	
1441321	GGCGCTCGACACGCCCGGATTGGTCGAGAGGATAGGCCGGAGAGCTTTGAGGTGGC	
1441321	CCGCGAGCTGTGCGCGGCC.TAAACCAGCGTCTCTATCCGGCCTCTCGAACTCCACCG	
1441381	TTTTGACATGCATCGTACCACGGCTGGGATATCTGCCTAACACGCC.TAACATTGCCAA	
1441381	AAAACGTACGTAGCAGTGGTCCGACCCATAGACGGATTGGTGGGATTGTAACCGTT	
1441441	AGTGCACAACATGATAAGAGAGCGCGGGAGATAGGGTATCGCCACTTTAACCGCGCCAC	
1441441	TCACGTGTTGACTATTCTCTCCGCCGCTCTATCCCATAGCGGTGAAATGGCGCGGTG	
1441501	CGTGGGGCTAGGGGCAAGTTTACCCTGACCACCCATGATGCAGCCAACCTGGACAGAT	
1441501	GCACCCGATCCCGTTTCAAATGGGACTGGTGGGTACTACGTTCGTTGAGACCTGTCTA	
1441561	GGACTCGCACGCGCTGACACGCCAAGTCAAAAAAATTC.AAAGTCCGATTTTAAAGATGTA	
1441561	CCTGAGCGTGCAGGACTGTGCGGTTTCAAGTTTAAAGGTT.CAGGCTAAAAATTC.TACAT	
1441621	CGCAAGCACCACGACAGGCAAAAGCACGCGACACGATGGCCGGAACGGCGCTGTGGAAAGA	
1441621	GCGTTCGTGGTGTGTCGCGTTTCTGTCGCTGTGTACCGGCC.TTGC CGCGACACCTTTCT	
1441681	CAGAAGATCCTTTTCTGTTCCGGCATGGTTTTTTTGAATGTTCTCTTATTCGTTTTACGG	
1441681	GTCTTTCTAGGAAAAGAACAAGCCGTACAAAAAACTACAAGAGAATAAGCAAAATGCC	
1441741	CTTACACGACAATCCAATTTTACAGGGGGAAATGATGCAACTATCGAGTCAGAGCAATC	
1441741	GAATGTGCTGTTAGGTTAAAAATGTC.CCCCTTTACTACGTTGATAGCTCAGTCTCGTTAG	
1441801	CGAGCTCAGTCAAAGCTACTGTTGGGAATGCTGTGCGGAGCAAGGCGGTTGCTCCTCGC	
1441801	GCTCGGAGTCAGTTTCCGATGACAACCTTACGACAGCCCTCGTTCCGCCAACGAGGACG	
1441861	GTC.TTTTGGTTTTTGTATTGGTCGGCTTTGTGTC.AAAGATGGTTTTGTCACTGTTGGTGA	
1441861	CAGAAAACCAAAAACATAAACAGCGGAAACACAGGTTCTACCAAAACAGTGACAACCACT	
1441921	TGAGCGTTATCGECTCGTAGACAATTTGGACATTCCTTATCGTGGTCTATGGGCGACAGG	
1441921	ACTCGCAATAGCGGAGCATCTGTTAAACCTGTAAGGAAATAGCACCAGATACCCGCTGTCC	
1441981	TCATCACATTTACAAGGATACGCTTACAGTGT.TTTTGAACCGAGAGTGGCAGCGTCCC	
1441981	AGTAGTGATAAATGTTCTATGCGAATGTC.ACAAAAAAC.TTTGGCTCTACCGTCGCAAGG	
1442041	AACAGAGCTGTTTGCATCGAGCTACCGCTACAAGGTG.TACCGTTACCGGATTTCAATCA	
1442041	TTGCTCGACAACGATAGCTCGATGGCGATGTTCCACGATGGCAATGGCC.TAAAGTTAGT	
1442101	CTTTGTGGTGTTCGATAACCTTTGCA.GCGCAAGCGCTGTGGGTAGAAGTGAACG666GTT	
1442101	GAAACACCACAAGCTATGGAAACGTC	GCGTTCGCGACACCCATCTTCACTTTCGCCCCAAA

Figura 13. Amplificación para la toxina accesoria Zot (1083 pb), el color verde indica las secuencias de los oligonucleótidos forward zot 1 y reverse zot 2 que amplifican la PCR de punto final.

Determinación del gen *ctxA* *V. cholerae*

Para la amplificación del gen *ctxA* se utilizaron los iniciadores reportados por Fields, 1992.

Se analizó el sitio de hibridación de los iniciadores *ctx-2* y *ctx-3* dentro de la secuencia de referencia *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 utilizando la metodología de primer-BLAST.

Se encontró que el tamaño de amplificación para el gen *ctxA* es de 494 pb (figura 14) el cual es menor a lo reportado por Rodríguez, 1994 y el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica quienes refieren que el amplicon para el gen *ace* es de 564 pb.

1442281	TTTTCTGTTAAACAAGGGAGCATTATATGGTAAAGATAATATTGTGTTTTTTATTTTC
1442281	AAAAGACAATTTGTTTCCTCGTAATATACCATTCTATTATAAACACAAAAATAAAG
1442341	TTATCATCATTTTCATATGCAAATGATGATAAGTTATATCGGGCAGATTTCTAGACCTCCT
1442341	AATAGTAGTAAAAGTATACGTTTACTACTATTCAATATAGCCCGCTAAGATCTGGAGGA
1442401	GATGAAATAAAGCAGTCAGGTGGTCTTATGCCAAGAGGACAGAGTGAGTACTTTGACCGA
1442401	CTACTTTATTTTCGTCAGTCCACCAGAAATACGGTTCTCCTGTCTCACTCATGAAACTGGCT
1442461	GGTACTCAAATGAATATCAACCTTTATGATCATGCAAGAGGAACTCAGACGGGATTTGTT
1442461	CCATGAGTTTACTTATAGTTGGAATACTAGTACGTTCTCCTTGAGTCTGCCCTAAACAA
1442521	AGGCACGATGATGGATATGTTCCACCTCAATTAGTTTGAGAAGTGCCCACTTAGTGGGT
1442521	TCCGTGCTACTACCTATACAAAGGTGGAGTTAATCAAACCTTTCACGGGTGAATCACCCA
1442581	CAAACATATATGTCTGGTCATTCTACTTATTATATATATGTTATAGCCACTGCACCCAAC
1442581	GTTTGATATAACAGACCAGTAAGATGAATAATATATATAACAATATCGGTGACGTGGGTTG
1442641	ATGTTTAAACGTTAATGATGTATAGGGGCATACAGTCCATCCAGATGAACAAGAAGTT
1442641	TACAAATTGCAATTACTACATAATCCCCGTATGTGAGGAGTAGGCTACTTGTCTTCAA
1442701	TCTGCTTAGGTGGGATCCCATACCCCAAATATATGGATGGTATCGAGTTCATTTTGGG
1442701	AGACGAAATCCACCCTAAGGTATGAGGGTTATATACCTACCATAGCTCAAGTAAAACCC
1442761	GTGCTTGATGAACAATTACATCGTAATAGGGGCTACAGAGATAGATATTACAGTAACCTTA
1442761	CACGAACTACTTGTTAATGTAGCATTATCCCCGATGCTCTATCTATAATGTCAATTGAAT
1442821	GATATTGCTCCAGCAGCAGATGGTTATGGATTGGCAGGTTCCCTCCGGAGCATAGAGCT
1442821	CTATAACGAGGTCGTCTACCAATACCTAACCGTCAAAGGGAGGCCCTCGTATCTCGA
1442881	TGGAGGGAAGAGCCGTGGATTCATCATGCACCGCCGGTTGTGGGAATGCTCCAAGATCA
1442881	ACCTCCCTTCTCGGCACCTAAGTAGTACGTGGCGGCCAAACCCCTACGAGGTTCTAGT
1442941	TCGATGAGTAATACTTGCATGAAAAACCCAAAGTCTAGGTGTAATAATTCCTTGACGAA
1442941	AGCTACTCATTATGAACGCTACTTTTGGGTTTCAGATCCACATTTAAGGAACGTCTT
1443001	TACCAATCTAAAGTAAAAGACAAATATTTTCAGGCTATCAATCTGATATTGATACACAT
1443001	ATGGTTAGATTTCAATTTCTGTTTATAAAAAGTCCGATAGTTAGACTATAACTATGTGTA
1443061	AATAGAATTAAAGGATGAATTATGATTAATTAATAATTTGGTGTTTTTTTACAGTTTTAC
1443061	TTATCTTAATTCCTACTTAATACTAATTTAATTTTAAACCACAAAAAATGTCAAAATG

Figura 14. Amplicón para la toxina accesoria ctxA (494 pb), el color azul indica las secuencias de los oligonucleótidos forward ctx2 y reverse ctx3 que amplifican la PCR de punto final, mientras que en color morado se señala el producto teórico de la PCR.

Determinación del gen ctxB *V. cholerae*

Para la amplificación del gen ctxB se utilizaron los iniciadores reportados por Olsvik, 1993.

Se analizó el sitio de hibridación de los iniciadores ctx-9 y ctx-7 dentro de la secuencia de referencia *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 utilizando la metodología de primer-BLAST.

Se encontró que el tamaño de amplificación para el gen ace es de 461 pb (figura 15) el cual es mayor a lo reportado por Sarkar A., *et al*, 2002 y el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica quienes refieren que el amplicon para el gen ctxB es de 460 pb.

```

1443001 TACCAATCTAAAGTTAAAAGACAAATATTTTCAGGCTATCAATCTGATATTGATACACAT
1443001 ATGGTTAGATTTCAATTTTCTGTTTATAAAAGTCCGATAGTTAGACTATAACTATGTGTA

1443061 AATAGAATTAAGGATGAATTATGATTAATAAATTTGGTGTTTTTTTACAGTTTAC
1443061 TTATCTTAATCCTACTTAATACTAATTTAATTTAAACCACAAAAAATGTCAAAAATG

1443121 TATCTTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACC
1443121 ATAGAAGTCGTATACGTGTACCTTGTGGAGTTTATAATGACTAAACACACGCTTATGG

1443181 ACAACACACAAATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG
1443181 TGTTGTGTGTTTATATATGCGATTTACTATTCTATAAAAGCATATGCTTAGAGATCGAC

1443241 GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGATGGTCAATTTTTCAAGTAGAAGTAC
1443241 CTTTTCTCTACCGATAGTAATGAAAATCTTACCAGTTAAAAAGTTCATCTTCATG

1443301 CAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCCCTGA
1443301 GTCCATCAGTTGATATCTAAGTGTTTTTTTTCGCTAACTTCTACTTCTATGCGACT

1443361 GGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGC
1443361 CCTAACGTATAGAATGACTTCGATTTTCAGCTTTTCAATACACATACCTTATTATTTGCG

1443421 CTCATGCGATTGCCCAATTAGTATGGCAAATTAAGATATAAAAAAGCCACCTCAGTGG
1443421 GAGTACGCTAACGGCGTTAATCATACCGTTAATCTATATTTTTTCGGGTGGAGTACC

1443481 GCTTTTTGTGGTTCGATGATGAGAAGCAACCGTTTTGCCAAACATGTATTACTGCAAG
1443481 CGAAAAACACCAAGCTACTACTCTCGTTGGCAAAACGGGTTGTACATAATGACGTTG

```

Figura 15. Amplicón para la toxina accesoria ctxB (461 pb), el color rosa indica las secuencias de los oligonucleótidos forward ctx9 y reverse ctx7 que amplifican la PCR de punto final, mientras que en color amarillo se señala el producto teórico de la PCR.

Extracción ADN genómico *V. cholerae*

Se estandarizó un protocolo de extracción de ADN genómico para *Vibrio cholerae* empleando el sistema Invisorb® Spin Blood Mini Kit (Stratec Molecular–1031110200). El procedimiento de extracción/purificación es rápido y no requiere extracción con fenol/cloroformo ni precipitación con etanol permitiendo un manejo seguro de muestras potencialmente infecciosas. Se realizaron al menos 20 repeticiones de la técnica de extracción utilizando diferentes cantidades de material biológico, obteniendo diferentes rendimientos y grados de pureza del ADN genómico.

UNAM-FESZ**Concentración y calidad del ADN**

Con el protocolo de extracción antes mencionado se obtuvieron concentraciones de ADN genómico de *V. cholerae* con valores de 350 a 450 ng/ μ L y con una relación A260/A280 con valor de 1.6 a 2.0 como indicador de la obtención de ADN con bajo contenido de proteínas u otros contaminantes.

PCR punto final

Una vez verificados los amplicones teóricos de cada uno de los blancos de PCR se prepararon las mezclas de reactivos con los iniciadores específicos para la amplificación de los genes *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB*. Utilizando 100 ng de ADN genómico de *V. cholerae* como molde y las condiciones experimentales referidos en las tablas 3, 4 y 5.

Posteriormente se verificaron los tamaños moleculares de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniendo imágenes digitalizadas de los gels con el equipo ChemiDoc XRS+ System, BioRad las cuales se analizaron con el programa de computo Image Lab™ Software, los resultados obtenidos indican una concordancia del 100% de los tamaños teóricos vs. Experimentales (figura 16).

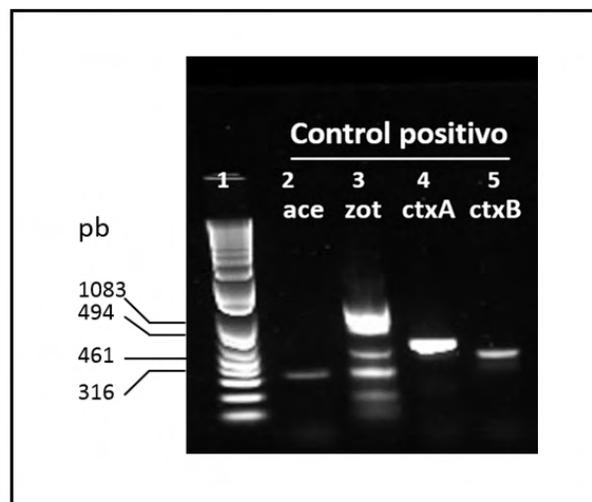


Figura 16. Verificación de tamaño molecular de los productos de PCR de los genes *ace* (316 pb), *zot* (1083 pb), *ctxA* (494 pb) y *ctxB* (461 pb). En la amplificación de gen *zot* se muestran bandas inespecíficas, las cuales fueron depuradas con la estandarización del programa de PCR (tabla 4).

UNAM-FESZ

Para una mejor amplificación del gen zot se modificó el programa de PCR (Aidara *et al*, 1998) ajustando el periodo de extensión final de 5 a 2 min y la temperatura de 72°C a 68° C.

La amplificación de la región fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9% teñido con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Marca Biotium 10 000 X en agua bidestilada.

Una vez estandarizadas las condiciones experimentales para la obtención de los blancos de PCR se procedió a la determinación de las concentraciones mínimas detectables de ADN genómico de *V. cholerae* por la técnica de PCR punto final, así como el rango dinámico de concentración de ADN molde.

Concentración mínima de detección de ADN

En todas las diluciones que se realizaron para la determinación de la concentración mínima detectable de ADN por la técnica de PCR se generaron resultados de amplificación positivos para cada uno de los genes de toxicidad ace (316 pb), zot (1083 pb), ctxA (494 pb) y ctxB (461 pb), como se puede ver en las figuras 15, 16, 17 y 18.

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 a partir una masa inicial de 1000 ng de ADN genómico bacteriano, para ello por cada dilución se tomaron 5 µl de la dilución 10^{-1} los cuales se mezclaron con agua bidestilada estéril cuanto basta para 50 µl de volumen final, repitiendo este paso en las diluciones sucesivas hasta obtener una dilución 10^{-7} con una masa de ADN molde de 0.001 ng (tabla 8).

Lectura de las concentraciones de ADN en las diluciones:

Tabla 8.

Dilución	Masa ADN molde (ng)
Dilución 10^{-1}	1000
Dilución 10^{-2}	100
Dilución 10^{-3}	10
Dilución 10^{-4}	1
Dilución 10^{-5}	0.1
Dilución 10^{-6}	0.01
Dilución 10^{-7}	0.001

Los resultados de amplificación para el gen ace (316 pb) fueron positivos, a partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} como se muestra en la figura 17.

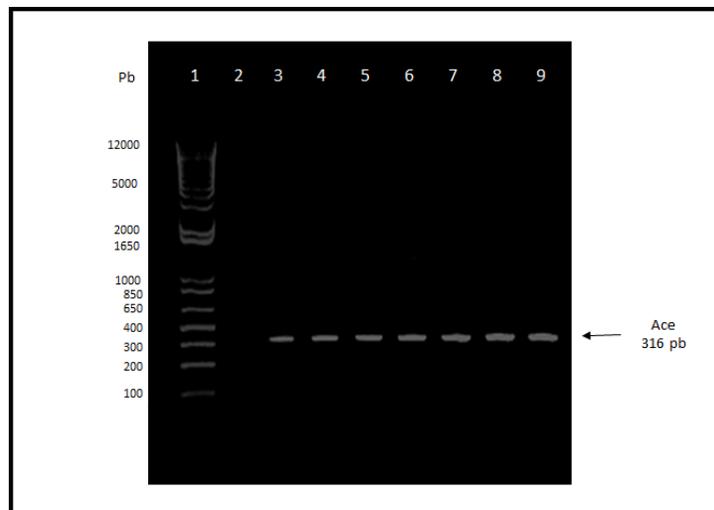


Figura 17. Prueba de detección mínima de ADN por la PCR para el gen de toxicidad ace de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. Pozos: 1) Marcador de peso molecular 1 Kb plus; 2) Blanco; 3) Dilución 10^{-1} ; 4) Dilución 10^{-2} ; 5) Dilución 10^{-3} ; 6) Dilución 10^{-4} ; 7) Dilución 10^{-5} ; 8) Dilución 10^{-6} ; 9) Dilución 10^{-7} .

Los resultados de amplificación para el gen zot (1083 pb) fueron positivos, a partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-6} como se muestra en la figura 18.

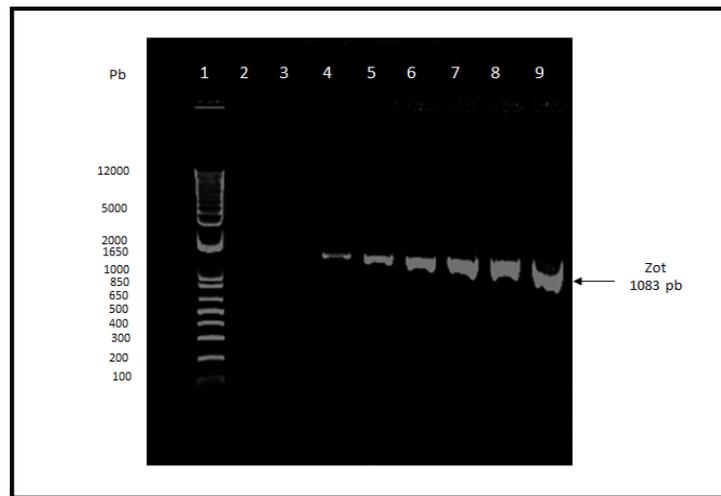


Figura 18. Prueba de detección mínima de ADN por la PCR para el gen de toxicidad zot de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. Pozos: 1) Marcador de peso molecular 1 Kb plus; 2) Blanco; 3) Dilución 10^{-1} ; 4) Dilución 10^{-2} ; 5) Dilución 10^{-3} ; 6) Dilución 10^{-4} ; 7) Dilución 10^{-5} ; 8) Dilución 10^{-6} ; 9) Dilución 10^{-7} .

Los resultados de amplificación para el gen ctxA (494 pb) fueron positivos, a partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} como se muestra en la figura 19.

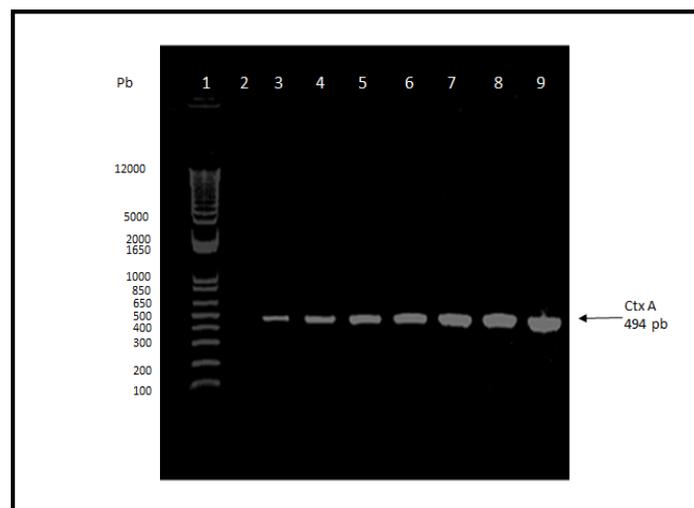


Figura 19. Prueba de detección mínima de ADN por la PCR para el gen de toxicidad ctxA de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. Pozos: 1) Marcador de peso molecular 1 Kb plus; 2) Blanco; 3) Dilución 10^{-1} ; 4) Dilución 10^{-2} ; 5) Dilución 10^{-3} ; 6) Dilución 10^{-4} ; 7) Dilución 10^{-5} ; 8) Dilución 10^{-6} ; 9) Dilución 10^{-7} .

UNAM-FESZ

Los resultados de amplificación para el gen *ctxB* (461 pb) fueron positivos, a partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-6} como se muestra en la figura 20.

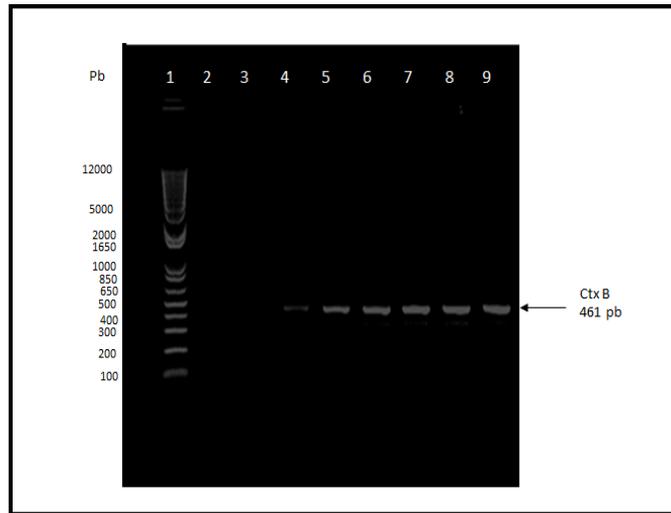


Figura 20. Prueba de detección mínima de ADN por la PCR para el gen de toxicidad *ctxB* de *Vibrio cholerae* por electroforesis en gel de agarosa al 0.9%. Pozos: 1) Marcador de peso molecular 1 Kb plus; 2) Blanco; 3) Dilución 10^{-1} ; 4) Dilución 10^{-2} ; 5) Dilución 10^{-3} ; 6) Dilución 10^{-4} ; 7) Dilución 10^{-5} ; 8) Dilución 10^{-6} ; 9) Dilución 10^{-7} .

UNAM-FESZ

DISCUSION

Análisis bioinformático

La determinación de la producción de la proteína CT es un paso importante en el diagnóstico del cólera, ya que solo las cepas productoras de toxina se asociado con diarrea grave, acuosa y epidemias (Shirai et al, 1991).

Se han descrito varias especies bacterianas que poseen toxinas o proteínas que son inmunológicamente o genéticamente similares con la toxina del cólera (James, 1982) estas proteínas están codificadas en genes que contienen mutaciones puntuales o regiones variables homologas a las subunidades ctxA y ctxB Estos datos son coherentes con el concepto de una familia de genes toxicidad con diversos grados de parentesco (Fields, 1992).

De igual modo se ha utilizado la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento de Restricción para analizar las mutaciones en los genes que codifican para toxina de *Vibrio cholerae* poniendo de manifiesto algunas mutaciones puntuales en los genes ctx (Fields, 1992).

Una ventaja importante de la PCR sobre la ELISA es su rapidez. Durante la investigación de brotes de cólera, la presencia de ctxA se pudo determinar en 4 horas mientras que la ELISA de toxina del cólera requirió al menos 4 días.

En estudios previos se utilizó la secuenciación automatizada del ADN de amplicones generados por PCR para determinar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la subunidad B (ctxB) de una diversa colección de cepas para demostrar la heterogeneidad a nivel de secuencia y cualquier asociación con el origen temporal o geográfico de las cepas, para esto se investigó una colección de 45 cepas toxigénicas de *V. cholerae* O1 aislados de individuos infectados en todo el mundo durante un periodo de 70 años en México se aislaron las cepas 776-83 en 1983 y C7331 en 1991, ambas de serotipo Inaba. El estudio revelo mutaciones puntuales reflejadas con sustituciones de bases específicas en las cepas analizadas, dando como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada; estas diferencias de secuencia dividieron las cepas en tres genotipos de

UNAM-FESZ

ctxB, esto sugiere que las mutaciones aleatorias en este gen no son comunes; sin embargo un estudio más extenso de la epidemiología molecular del cólera en América Latina sugiere que aunque el genotipo de la toxina parece conservarse, otras porciones del genoma de *V. cholerae* son más complejas y variables (Olsvik, 1993).

Para la amplificación de la región codificante de los genes ace, zot, ctxA y ctxB se usaron los iniciadores reportados por Trucksis 1993, Tamayo 1997, Fields 1992 y Olsvik 1993.

Se buscó el sitio de hibridación de los iniciadores dentro de la secuencia de referencia de *Vibrio cholerae* IEC224 GenBank: CP003330.1 y realizando un BLAST se encontró que el tamaño del amplificado es de 2797 pb. Se encontró que la secuencia del iniciador “ace-1” utilizado para la amplificación del gen ace tiene 4 nucleótidos diferentes en relación a la secuencia de referencia, para la toxina zot se encontró 1 nucleótido diferente en el iniciador “zot-2”, mientras que para los iniciadores utilizados en la amplificación de los genes de las toxinas coléricas ctxA y ctxB no se encontraron diferencias en relación a la secuencia de referencia.

En relación al tamaño de los amplicones obtenidos por el BLAST y a pesar de existir diferencias en los nucleótidos antes mencionados se generaron resultados de amplificación positivos.

Extracción concentración y pureza de ADN genómico

La obtención de ADN en cantidad suficiente y de buen grado de pureza es importante en la biología molecular de bacterias, siendo la estandarización de protocolos de extracción de ADN una herramienta indispensable para aumentar la eficiencia de las herramientas de biología molecular.

En el presente estudio se observó que la concentración y pureza del ADN de *V. cholerae* obtenido con el protocolo estandarizado, fue adecuada para su uso en PCR.

Estandarización PCR

El desarrollo de pruebas de PCR constituye una importante alternativa para el

UNAM-FESZ

diagnóstico de muchas enfermedades provocadas por bacterias de crecimiento lento. Se recomienda el uso del kit comercial de extracción de ADN debido a su simplicidad y control de calidad, no utiliza reactivos tóxicos (como el fenol y cloroformo) y por la reproducibilidad de resultados, rendimiento y grado de pureza.

Las condiciones óptimas de la prueba determinadas en este trabajo difieren de las condiciones reportadas previamente para estos oligonucleótidos, esto podría explicarse debido al uso de diferentes reactivos y equipos para la estandarización de esta prueba.

Debido a que la extracción de ADN representa la primera etapa de la mayoría de análisis moleculares, el método de extracción es uno de los factores más importantes. La extracción de ADN mediante Invisorb® Spin Blood Mini Kit (Stratec Molecular) permitió obtener ácido nucleico de buena calidad y sin la presencia de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el método de extracción fue eficiente y de buena calidad.

Diversos estudios han demostrado que la especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentra directamente influenciada por los diversos componentes que integran la técnica: 1. mezcla de reacción, 2. régimen de ciclaje y 3. ADN polimerasa (Guevara, 2013).

Se analizó cada par de iniciadores, verificando que fueran secuencias cortas de 20 a 26 nucleótidos y considerando que cada par tuviera una temperatura de alineamiento (TM) similar.

Los iniciadores se diseñan para ser exactamente complementarios al ADN molde y la concentración a la que suelen emplearse está en el intervalo de 0.1-0.5 μM . Los iniciadores ideales deben carecer en lo posible de secuencias repetidas, palindrómicas o complementarias para evitar la formación de estructuras secundarias. Si existe complementariedad en el extremo 3' se induce a que ambos

UNAM-FESZ

iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores para que la polimerasa los extienda generando así pequeños amplicones referidos como dímeros de *primers*, reduciendo la cantidad de iniciadores disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (Cha RS, 1993).

Nuestros resultados demuestran que estos los iniciadores (tabla 7) son útiles para el análisis de cepas de *V. cholerae*, lo cual indica que esta prueba podría ser útil para el diagnóstico de cólera en el Laboratorio Central de Epidemiología. La aplicación de esta prueba de PCR, previa validación, acortaría el tiempo del diagnóstico para la detección de cólera toxigénico, demostrando ser una alternativa simple y rápida pues tiene el potencial de ser un método específico y sensible para la detección e identificación de *V. cholerae* toxigénico.

Se logró estandarizar las condiciones experimentales óptimas de trabajo para cada uno de los genes de *V. cholerae* y realizando las modificaciones pertinentes a los programas de amplificación en el Veriti Applied Biosystems®; se optimizó la formación de un producto único el cual se verificó en electroforesis donde no se observaron bandas de amplificación inespecíficas.

Resultados de concentración mínima

El nivel mínimo de concentración detectable fue establecido por el laboratorio central de epidemiología en donde se realizó la técnica de PCR para cada uno de los genes de toxicidad tomándose en cuenta diversos factores como son el buen funcionamiento y calibración de los equipos, calidad de los iniciadores, destreza o capacitación del analista e instalaciones adecuadas para llevar a cabo el proceso. Tomando en cuenta estas consideraciones la concentración mínima detectable para los genes codificantes de la toxina accesoria ace y la toxina colérica ctxA fue de 1 pg de ADN genómico bacteriano, mientras que para la toxina accesoria zot y la toxina colérica ctxB fue de 10pg.

UNAM-FESZ

En cuanto al rango dinámico de detección este fue mayor para los genes ace y la toxina colérica ctxA en comparación del rango dinámico para la toxina accesoria zot y la toxina colérica ctxB pues la concentración en masa de ADN genómico utilizado va desde los 1000 ng hasta 1pg para la toxina accesoria ace y la toxina colérica ctxA mientras que para la toxina accesoria zot y la toxina colérica ctxB va de los 1000 ng hasta 10 pg.

El uso de la técnica de PCR como auxiliar en la vigilancia epidemiológica de *V. cholerae*, facilita la identificación de cepas toxigénicas en un tiempo menor a otras metodologías empleadas. Una vez estandarizadas las condiciones experimentales para el desarrollo de la técnica es factible garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos sin importar las variaciones ambientales o rotación de personal, pues todos los analistas deberán estar apegados al procedimiento estandarizado.

Elaboración de método específico de trabajo

La confiabilidad de las pruebas que realiza un laboratorio clínico o de vigilancia epidemiológica por laboratorio radica en el aseguramiento de la calidad de todas y cada una de las actividades requeridas en las fases pre analíticas, analíticas y pos analíticas. Lo anterior implica documentar y estandarizar todos los procedimientos realizados en el laboratorio.

La administración de los procesos y procedimientos dentro del IMSS es una actividad que implica homogenizar y estandarizar la elaboración de los documentos internos utilizados en las diferentes áreas del instituto.

El Reglamento Interior del Instituto Mexicano del Seguro Social regula a través de la norma que establece las disposiciones para la elaboración, autorización y registro de los documentos internos en el instituto Mexicano del seguro social, las actividades para la elaboración de métodos específicos de trabajo, guías e instrucciones de operación. De acuerdo a esta normatividad el contenido y alcances

UNAM-FESZ

de los métodos específicos de trabajo son de la estricta responsabilidad de los órganos de operación administrativa desconcentrados y operativos del IMSS emisores de los mismos, por lo tanto el Laboratorio Central de Epidemiología es libre de elaborar sus procedimientos y guías técnicas de operación.

Los experimentos descritos en este trabajo fueron realizados con el objetivo de evaluar y determinar las condiciones ambientales, uso de equipos, rendimiento, robustez y confiabilidad de los programas de amplificación para cada uno de los genes de toxicidad, verificando que se obtienen resultados válidos y reproducibles.

Finalmente nuestro método específico de trabajo referido en la **“Guía rápida para la determinación de los genes ctx de *V. cholerae* mediante PCR de punto final”** permite que las actividades de diagnóstico se realicen de forma metódica y sistemática para la detección oportuna y confiable de *V. cholerae* toxigénico.

CONCLUSIONES

- I. A pesar de las diferencias encontradas entre las secuencias de referencia y los iniciadores utilizados en la detección de los genes de toxicidad de *V. cholerae*, fue posible optimizar la técnica de PCR y conseguir la amplificación de productos únicos para cada uno de los genes *ctx* y proteínas accesorias.
- II. Se estandarizó la metodología para la obtención de ADN genómico de *Vibrio cholerae* mediante columnas de exclusión y afinidad molecular, obteniendo ácidos nucleicos de alto grado de pureza y concentración aproximada de 350 ng/ μ L.
- III. Se estandarizó las condiciones experimentales de reacciones de PCR de punto final para la amplificación de los genes *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB* a partir de ADN genómico de *Vibrio cholerae*, determinando las condiciones experimentales óptimas para la obtención de los productos de PCR para cada uno de los genes de toxicidad.
- IV. Se determinó el rango dinámico y límites de detección de ADN genómico necesarios para la amplificación positiva de los genes *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB* a partir de ADN genómico de *Vibrio cholerae*, en general la concentración mínima detectable en los reacciones de PCR fue de 0.000001 μ g/ μ L mientras que la concentración máxima antes de la inhibición de PCR fue de 1 μ g/ μ L para *ace* y *ctxA* y 0.1 μ g/ μ L para *zot* y *ctxB*.
- V. Se elaboró un método específico de trabajo para el análisis de los genes *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB* en cepas de *Vibrio cholerae* mediante PCR de punto final y de acuerdo a la normatividad vigente en el IMSS.

APENDICES

Apéndice 1

Extracción de ADN.

1. La cepa estudiada congelada a -80°C se recupera en agar LB.
2. Se siembra la cepa por estría cruzada en agar LB y se incuba a 37°C durante 24 horas.
3. Se toma una colonia aislada y se inocula en 30 mL de medio líquido LB, se incuba en Orbit Environ Shaker Lab-Line a 37°C por 8 horas y con agitación (200 rpm).
4. Se detiene el crecimiento bacteriano
5. Centrifugar la muestra a 4500 rpm por 15 minutos a 25°C
6. Decantar el sobrenadante
7. Resuspender con 200 μL de solución salina, pasar a un tubo de 1.5 mL.
8. Adicionar 200 μL de "Lysis Buffer HL" y resuspender por pipeteo.
9. Incubar la muestra en el termomezclador durante 3 minutos a 56°C .
10. Adicionar 20 μL de "Proteinase K" y mezclar brevemente.
11. Incubar la muestra en el termomezclador durante 5 minutos a 56°C con agitación continua.
12. Adicionar 200 μL de "Binding Buffer HL" y mezclar por inversión.
13. Transferir la muestra al tubo de extracción "RTA Spin Filter Set".
14. Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos.
15. Decantar el filtrado y desechar el "RTA Receiver Tube" y colocar el "RTA Spin Filter Set" en un nuevo tubo colector "RTA Receiver Tube".
16. Adicionar 500 μL de "Pre-Wash Buffer"
17. Centrifugar a 11000 rpm por 1 minuto.
18. Decantar el filtrado y desechar el "RTA Receiver Tube" y colocar el "RTA Spin Filter Set" en un nuevo tubo colector "RTA Receiver Tube".
19. Adicionar 700 μL de "Wash Buffer".
20. Centrifugar a 11000 rpm por 1 minuto.
21. Decantar el filtrado y desechar el "RTA Receiver Tube" y colocar el "RTA Spin Filter Set" en un nuevo tubo colector "RTA Receiver Tube".

UNAM-FESZ

22. Centrifugar a máxima velocidad durante 4 minutos para remover el etanol.
23. Colocar el "RTA Spin Filter" en un nuevo tubo colector de 1.5 mL y adicionar 100 μ L de agua inyectable precalentada a 56°C.
24. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
25. Centrifugar a 11000 rpm por 1 minuto, desechar la columna, rotular el tubo y almacenar a -20°C.

UNAM-FESZ

Apéndice 2

Preparación de geles de agarosa y tinción.

1. En un frasco de 250 mL con tapa rosca se adicionan 100 mL de regulador TRIS-Borato-EDTA TBE 1X, y 0.75 g de agarosa, se calienta la mezcla para disolver la agarosa.
2. Se deja enfriar la mezcla y posteriormente se le adicionan 5 μ L de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000X en agua se agita durante un minuto.
3. Se vierte la agarosa en el molde y se deja polimerizar.
4. Se desmonta el molde de plástico (peine) y los topes del molde, y se coloca en la cámara de electroforesis.
5. Se adiciona el regulador TRIS-Borato-EDTA TBE 1X en un volumen suficiente para cubrir los pozos formados en el gel.
6. En los pozos se deposita una mezcla de 4 μ L del ADN amplificado por PCR y 2 μ L del colorante azul/naranja 6X.
7. Los electrodos se conectan a un transformador de electricidad y se aplica una diferencia de potencial de 75 volts por aproximadamente 50 minutos.

Apéndice 3

Reacción de PCR de punto final para la determinación de los genes ace, zot, ctxA y ctxB de *V. cholerae*.



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Atención Primaria a la Salud
Coordinación de Vigilancia Epidemiológica
División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica
Área de Laboratorio Central de Epidemiología



GUÍA RÁPIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS GENES CTX DE *V. CHOLERA*E MEDIANTE PCR DE PUNTO FINAL

Fundamento del método:

La identificación de cepas toxigénicas en el diagnóstico de cólera es importante ya que solo las cepas productoras de toxina causan la enfermedad. La técnica de PCR de punto final se emplea para la identificación de los genes de toxicidad ace, zot, ctxA y ctxB de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico y puede realizarse con ADN genómico extraído de cultivos puros de *Vibrio cholerae* obtenidos a partir de muestras de materia fecal, muestra ambientales o bien muestras de alimentos o agua contaminados.

Procedimiento:

1. Registrarse en el formato de uso de los equipos a utilizar.
2. Anotar el nombre del operador, la hora, los folios de las muestras para adicionar y el diagnóstico en la bitácora de trabajo y llenar el registro de placas de PCR.
3. Limpiar el área de trabajo y el Gabinete de Seguridad Biológica (GSB).
4. Esterilizar por exposición a luz UV los coolers y contenedores con tapa que se requieran durante 15 min.
5. Apagar la luz UV, encender el flujo de aire del GSB y dejar que se establezca la corriente dentro del gabinete durante 10 min.
6. Descongelar las alícuotas de agua grado biología molecular y el buffer 10x de la enzima ADN polimerasa.
7. Limpiar todo los materiales y gradilla refrigerada con los iniciadores y enzima con etanol al 70% e introducirlos en la campana.
8. Descongelar los juegos de iniciadores de ace, zot, ctxA y ctx B (sacar de la gradilla refrigerante y colocarlos en una gradilla sin refrigerante).
9. Rotular tubos tipo eppendorf de 1.5 mL correspondientes a cada juego de iniciadores de los genes ace, zot, ctxA y ctx B.
10. Determinar el número de reacciones (N) que se realizarán. Preparar un exceso del cóctel de reacción, el equivalente al requerido para dos muestras adicionales.
11. Para cada juego de iniciadores de ace, zot, ctxA y ctx B preparar la mezcla de reacción adicionando los reactivos que se indican en la tabla 1:



Dirección de Prestaciones Médicas
 Unidad de Atención Primaria a la Salud
 Coordinación de Vigilancia Epidemiológica
 División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica
 Área de Laboratorio Central de Epidemiología



Tabla 1. Mezcla de reactivos utilizados en la técnica de PCR de los genes *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB* de *Vibrio cholerae*.

Reactivos	Volumen de reacción
Platinum® Taq ADN Polymerase	0.5 µl
Buffer 10X	12.5 µl
Iniciador Forward (10 µM)	2.5 µl
Iniciador Reverse (10 µM)	2.5 µl
Agua libre de nucleasas	2 µl
Volumen total	20 µl

12. Mezclar mediante pipeteo o vortex, centrifugar 5 s y colocar en una gradilla refrigerante.
13. Rotular microtubos de 0.2 mL para PCR con la clave numérica que identifique las muestras a adicionar y dispensar 20 µL de cada mezcla de reacción en los microtubos.
14. Adicionar 5 µL de ADN bacteriano de acuerdo a la clave asignada por el analista a cada mezcla de reacción de cada juego de iniciadores de *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB*.
15. Iniciar el programa ACE_CTXA_B o ZOT (tablas 2 y 3) en el termociclador Veriti Applied Biosystems® e introducir las muestras a analizar.

Tabla 2. Condiciones del programa ACE_CTXA_B del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR de los genes *ace*, *ctxA* y *ctxB*.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95° C	5 min	1
Deenaturalización	95° C	15 seg	30
Alineamiento	56° C	30 seg	30
Extensión	68° C	1 min	30
Extensión Final	68° C	2 min	1
Enfriamiento	4° C	∞	1



Dirección de Prestaciones Médicas
 Unidad de Atención Primaria a la Salud
 Coordinación de Vigilancia Epidemiológica
 División de Laboratorios de Vigilancia e Investigación Epidemiológica
 Área de Laboratorio Central de Epidemiología



Tabla 3. Condiciones del programa ZOT del termociclador Veriti Applied Biosystems® para PCR del gen zot.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95° C	5 min	1
Desnaturalización	95° C	15 seg	30
Alineamiento	66° C	30 seg	30
Extensión	68° C	1 min 30 seg	30
Extensión Final	68° C	2 min	1
Enfriamiento	4° C	"	1

18. Una vez concluido el programa de PCR, retirar las muestras del termociclador Veriti Applied Biosystems® y analizar los productos mediante electroforesis en agarosa o almacenar de 2 a 8 °C hasta 48 horas antes de su análisis mediante electroforesis.

UNAM-FESZ

REFERENCIAS

Aidara A., Koblavi S., Boye C. S., Raphenon G., Gassama A., Grimont F., Grimont P. A. D. 1998. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from a recent outbreak in Senegal: comparison with isolates from Guinea-Bissau. págs. 163-167.

Alcalá F. C. 2013. *Cólera: mortalidad y propagación en la península de Yucatán, 1833-1834*. Letras Historicas, págs. 115-141.

Bauman, P. y L. Bauman.1977. Biology of the marine enterobacteria: Genera *Beneckia* y *Photobacterium*. Annual Review Microbiology Microbiology 31:39-43.

Blake, P.A., R.E. Weaver y D.G. Hollis. 1980. Diseases of humans caused by vibrios. Annual Review Microbiology 34: 341-350.

Borroto, R. 1997. La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 en ambientes acuáticos. Revista Panamericana de Salud Pública. págs. 3-7.

Boyd, E.F. y M.K. Waldor. 1999. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTXPhi by bacteriophage CP-T1. Infection and Immunity 67: 5898-905.

Castañeda, M. 2009. Caracterización por métodos moleculares de *Vibrio cholerae* aislados en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. 52p.

Castañon, A. 2005. Inducción de apoptosis por la hemolisina vacuolizante HlyA de *Vibrio cholerae*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. Pp.18.

Castañón-Sánchez C. A. 2012. *Toxina VVC de Vibrio cholerae: de la vacuolización a la muerte celular*. Evidencia Médica e Investigación en Salud, págs. 114-119.

Cha RS, Thilly WG. 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. PCR Methods Appl; 3:S18-29.

Chandra, P.S. 1992. Laboratory diagnosis. En: D. Barua y W. B. III Greenough (eds.). Cholera. Plenum Medical Book Company, Nueva York. Pp. 229-251.

Colwell, R.R. y W.N Spira. 1992. The ecology of *Vibrio cholerae*. En: D. Barua y W. B. Greenough (eds.). Cholera. Current Topics in Infections Disease. Plenum Medical Book Co., Nueva York. Pp 107-127.

DiRita, V.J. y J.J. Mekalanos. 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, Tox R and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. Cell 64: (1) 29-37.

UNAM-FESZ

DiRita, V.J., C. Parsot, G. Jander y J.J. Mekalanos. 1991. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. Proceedings of the National Academy of Science 88: 5403-5407.

DiRita, V.J. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. Molecular Microbiology 6: (4) 451-8.

DiRita, V.J., M. Neely, R.K. Taylor, y P.M. Bruss. 1996. Differential expression of ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over ToxT expression. Proceedings of the National Academy of Science 93: 7991-7995.

Donlan, R.M. y J.W. Costerton. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical. Microbiology Review 15: 167193.

Eslava, A., Rosas., Solano, M., Delgado, G., Ramírez, M., Villaseca, J. y A, Cravioto. 2008. *Vibrio cholerae*: bacteria ambiental con diferentes tipos de vida. En: Cravioto, A., Rosas, I. y Ezcurra, E. Microbiología ambiental. Instituto Nacional de Ecología. Pp 43-63.

Espinosa, L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X editores. Ecología molecular. México: INE, CONABIO y UNAM, 2007; p.520-36.

Farfán S. M. Tesis. *Estudio de la estructura genética de poblaciones de Vibrio cholerae*. 2002.

Fernández-Delgado M., Suárez P., Duque Z., García-Amado M. A., y Contreras M. 2013. *Supervivencia y formación de biopelículas de Vibrio cholerae sobre quitina de camarón*. Interciencia, págs. 443-448.

Fernández, S. y G, Alonso. 2009. Cólera y *Vibrio cholerae*. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 40(2):50-69

Fields P. L., Popovic T., Wachsmuth K., Olsvik O.1992. *Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 strains from Latin American cholera epidemic*. Journal of Clinical Microbiology, págs. 2118- 2121.

García-Lázaro M., Almodóvar P.M. C., Rivero A., y Torre-Cisneros J. 2010, *Cólera y otras infecciones del género Vibrio*. Medicine 10, págs. 3489-3496.

Ginebra A.1984. International Vocabulary of Basic and General Terms used in Methods. Organización Internacional de Normalizacion, 26-28.

Guevara P. Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. En: Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. Red de Innovación Tecnológica IDMM editores. Venezuela; 2004; p1-102.

UNAM-FESZ

González, L., Casanova, M. y J, Labrador. 2011. Cólera: historia y actualidad. *Revista de Ciencias Médicas*. 15 (4): 280-2994.

Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer y H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* 23: 1089-1097.

Harvez C. B., Avila V. S. 2013. *La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad*. *Revista Panam Salud Publica*, págs. 40-46.

Hays, J. 2005. Epidemics and Pandemics: Their impacts on Human History. *ABC CLIO*. Pp.267-270.

Heidelberg J.F., Eisen., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L. Gill S., Nelson K.E., Read T.D., Tefelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Drago I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C., Fraser C.M. 2000. DNA Sequence of both chromosomes of the cholerae pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 406:477-484.

Jorgensen R., Purdy A. E., Fieldhouse R. J., Kimber M. S., Bartlett D. H., y Merrill A. R. 2008. *Cholix Toxin, a Novel ADP-ribosylating Factor from Vibrio cholerae* *J. Biol. Chem.*, págs. 10671-10678.

Karolis, D.K., J.A. Johnson, C.C. Bailey, E.C. Boedeker, J.B. Kaper y P.R. Reeves. 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains, *Proceedings of the National Academy of Science* 95: 3134-3139.

Keyhani, N. O. y S. Roseman. 1996. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 33414-33424.

Kimsey, H.H. y M.K. Waldor. 1998. CTXphi immunity: application in the development of cholera vaccines. *Proceedings of the National Academy of Science* 95: 7035-9.

Lafuente, S., Vilella, A., Serrano, B., González, R. y L, Bruni. 2006. El cólera *Enfermedades Emergentes*. 8(1):10-15.

Londoño J. 2004. *Metodología de la Investigación Epidemiológica*. 3ra ed. Ed. Manual Moderno.

Luckham Paul F. 2004. Manipulating forces between surfaces: applications in colloid science and biophysics. *Elsevier*. 111(1-2): 29-47.

Luna Fuentes K.; 2006. "Aislamiento y caracterización serológica de *Vibrio cholerae*, aislado de la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella y de Raíz de Lirio en los

UNAM-FESZ

canales de Xochimilco”. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.

Olsvik O., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth I.K., Fields P. I. (1993) Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 31:22–25.

OPS, OMS. Actualización Epidemiológica Cólera. [En línea] 12 de octubre de 2013. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23319&Itemid=.

OMS, OPS. Actualización Epidemiológica Cólera. [En línea] 19 de octubre de 2013. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23406&Itemid=.

OMS. Cólera en México- Actualización. *Organización Mundial de la Salud*. [En línea] 25 de noviembre de 2013. http://www.who.int/csr/don/2013_11_25/es/.

OMS. Vacunas contra el cólera. [En línea] 18 de noviembre de 2013. http://www.who.int/immunization/cholera_Spanish.pdf.

Pestana de Castro AF, Almeida WF. 1993. Cholerae on the American Continents. International Life Sciences Institute Press. Washington D.C., USA. Pp 137.

Robins W. P., Mekalanos J. J.,. Genomic science in understanding cholera outbreaks and evolution of *Vibrio cholerae* as a human pathogen. [aut. libro] Takeda Y. Nair G. B. *Cholera Outbreaks*. Berlin : Springer, 2014, págs. 211-229.

Rodríguez- Ángeles M. G., Giono-Cerezo S., Moreno-Escobar A., Valdespino-Gómez J. L.,. 1994, *La Técnica de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR) para la identificación de Vibrio cholerae O1 Toxigénico en Ostiones*. *Revista Lat.-Amer. Microbiol.*, págs. 295-306.

Sarkar A., Nandy R. K., Nair G. B. y Ghose A. C., 2002. *Vibrio pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, págs. 4735-4742.

Salyers, A. y D. Whitt. 1994. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. American Society for Microbiology, Washington D.C., EE.UU. Pp 141-156.

Shirai, H., M. Nishibuchi, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, S. C. Pal, and Yoshifumi Takada. 1991. Polymerase chain reaction for detection of cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 29:2517-2521.

UNAM-FESZ

SSA. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología. 2012. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Cólera*.

Tamayo M, Koblavi S, Grimont F, Castañeda E, Grimont PAD. 1997. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Columbia. *J Med Microbiol*; 46: 611-616.

Thompson F. L., Lida T. y Swings J. 2004. *Biodiversity of Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, págs. 403-423.

Torres, A y Baca, B.1995. Reaccion en cadena de la polimerasa. *Elementos, España*. 3:16-21.

Tovar C. S., y González O. 1991. *Cólera*. *Revista Médica Hondurena*, págs. 183-189.

Trucksis, M., J. Michalski, Y.K. Deng y J.B. Kaper. 1998. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science* 95: 14464-14469.

Trucksis M, Galen M, Michalski J, Fasano A, Kaper JB.1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 5267-5271

Valenzuela B. M. T., Salinas P. H. Cárcamo I.M., Cerda L. J., Valdivia C. G., 2010, *Estrategias para el enfrentamiento del cólera. La experiencia chilena desde una perspectiva de salud pública*. *Revista chilena de infectología*, págs. 407- 410.

Viswanthan V.K., Hodges K., Hech G. 2009. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Microbiol*. 7 (2) 110-119.

Wachsmuth K., G. Evins, P. Fields, O. Olsvik, T. Popovic, C. Bopp, J. Wells, C. Carrillo y P. Blake. 1993. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *The Journal of Infectious Diseases* 167:621-626.

Waldor, M.K., J.J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-14.