

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS MOLECULAR DE CEPAS DE  
*Vibrio cholerae*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

**GABRIELA DELGADO SAPIEN**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO CRAVIOTO

MEXICO, D.F.,

MAYO 2005

m343319



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.

**A Santy y Mary Fer**  
**Con amor.**

**A Luis Fernando**  
**Gracias por compartir mis sueños.**

A mis padres Guillermo y Silvia y a mis suegros Aurora y Eduardo, por todo el apoyo y la ayuda que me han proporcionado.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Dr. Alejandro Cravioto no sólo la ayuda para la realización de este trabajo, sino también la amistad y confianza brindada a lo largo de estos años.

A los integrantes del jurado: Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Irma Rosas, Dra. Silvia Giono y Dra. Rosario Morales, por sus valiosas observaciones, comentarios y el tiempo que ocuparon para mejorar este trabajo.

A la Bióloga Pilar Beltrán por la ayuda que me brindo al enseñarme la técnica de enzimas multilocus.

Al Biólogo José Luis Méndez Sánchez por el gran apoyo técnico brindado en el laboratorio para la realización de este trabajo.

A Gabriel Pérez Soto del Laboratorio de Salud Pública por el apoyo técnico brindado en la edición de los dendogramas.

A la licenciada Guadalupe Sánchez Dorantes por sus enseñanzas en la elaboración de las bases de datos.

Al M. en C. Armando Navarro y a la Biol. Delia Licona por su apoyo en la caracterización serológica de las cepas de *Vibrio cholerae* empleadas en este estudio.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por la ayuda que me brindo en mis primeros pasos en las técnicas de biología molecular.

Al Ing. Javier Calderón Albor, jefe de Redes Telecomunicaciones y al Ing. Gustavo Barradas Culebro jefe de Informática de la Unidad de Informática y Telecomunicaciones de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Este trabajo de investigación fue apoyado por el Consejo de Ciencia y Tecnología proyecto 2397PB y por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM proyecto IN211496.

# Índice

Resumen	i
Introducción	1
Antecedentes	4
1.1. Características de <i>Vibrio cholerae</i>	4
1.2. Historia	6
1.3. Caracterización de <i>Vibrio cholerae</i>	10
1.4. Secuencia completa de los dos cromosomas de <i>Vibrio cholerae</i>	13
1.5. Fisiopatología	16
1.6. Factores de virulencia	17
1.6.1. Toxina colérica (CT)	19
1.6.2. Pili Tcp	22
1.6.3. Toxina Zot y enterotoxina accesoria del cólera (Ace)	22
1.7. Epidemiología	23
1.7.1. Epidemiología molecular	26
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
Material y Métodos	31
Enzimas Multilocus (MLEE)	32
PCR ribotipificación	47
Resultados	55
Discusión y Conclusiones	74
Referencias	82
Apéndice I	89
Apéndice II	101

## Índice de figuras.

Figura 1. Casos de cólera reportados a la OMS, por continente y año, 1990-2000	26
Figura 2. Diagrama de flujo de la técnica de enzimas multilocus (MLEE)	34
Figura 3. Ebullición de la suspensión de almidón para la preparación del gel	35
Figura 4. Degasificación del almidón para evitar la formación de burbujas en el gel	36
Figura 5. Degasificación del almidón	36
Figura 6. Corte para la formación del carril en el gel de almidón	37
Figura 7. Carril en el gel de almidón para colocar las muestras	38
Figura 8. Toma de la muestra con trozos de papel filtro	38
Figura 9. Colocación de las muestras y marcadores en el carril del gel	39
Figura 10. Colocación de las muestras y marcadores en el carril del gel	39
Figura 11. Gel con las muestras listo para el corrimiento electroforético	40
Figura 12. Electroforesis	40
Figura 13. Corte horizontal del gel	44
Figura 14. Cortes horizontales del gel de 1 mm de espesor	44
Figura 15. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima leucina amino peptidasa	45
Figura 16. Corrimiento electroforético y tinción de la Enzima fosfoglucomutasa	45
Figura 17. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima 6 fosfogluconato deshidrogenasa	46
Figura 18. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima transaminasa glutámico	46
Figura 19. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima fenilalanil leucina peptidasa	46
Figura 20. Dendograma que muestra la relación genética de los 279 Ets de <i>Vibrio cholerae</i>	59
Figura 21. Dendograma que muestra la relación genética de las	

cepas de <i>Vibrio cholerae</i> del conglomerado A	60
Figura 22. Dendograma que muestra la relación genética de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> del conglomerado B	61
Figura 23. Dendograma que muestra la relación genética de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> del conglomerado C	62
Figura 24. Operón del RNAr	63
Figura 25: Productos de amplificación del operon RNA ribosomal	64
Figura 26: Perfiles de PCR-ribotipos A, B y C	65
Figura 27: Perfiles de PCR-ribotipos A, B, C y D	66
Figura 28: Perfiles gráficos de la restricción del fragmento 16S-23S RNA ribosomal con la enzima <i>Hind</i> I	67
Figura 29. Dendograma que muestra la relación genética de 20 Ets de <i>Vibrio cholerae</i> que agruparon cepas de diferentes serogrupos y su asociación con los perfiles de PCR- ribotipos	70
Figura 30. Distribución de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> de acuerdo al número de aislamientos en cada PCR-ribotipo	72
Figura 31: Productos de amplificación de los espacios intergénicos (ISR)	73

## Índice de tablas.

Tabla 1. Especies de <i>Vibrio</i> asociadas a enfermedades humanas	4
Tabla 2. Procedencia de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> empleadas en este estudio	32
Tabla 3. Sistemas de amortiguadores para electroforesis de enzimas bacterianas	35
Tabla 4. Enzimas, sistemas de amortiguadores y soluciones para tinción de enzimas	42
Tabla 4. Enzimas, sistemas de amortiguadores y soluciones para tinción de enzimas. Continuación	43
Tabla 5. Cepas de <i>Vibrio cholerae</i> para PCR-Ribotipos	49
Tabla 6. Diversidad genética de <i>Vibrio cholerae</i> por locus basada en los ETs	56
Tabla 7. Perfiles alélicos de enzimas multilocus del conglomerado A	58
Tabla 8: Distribución de los perfiles PCR-Ribotipos y su asociación con ETs, serotipos fecha y fuente de aislamiento, obtenidos en diferentes localidades	71
Tabla 8. Distribución de los perfiles PCR-Ribotipos y su asociación con ET's, serotipos fecha y fuente de aislamiento, obtenidos en diferentes localidades. Continuación	72



## Resumen

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.

La investigación epidemiológica y los avances en la caracterización molecular de *Vibrio cholerae*, han generado nueva información que permite explicar los cambios genéticos y epidemiológicos que ayudan a las autoridades de salud a determinar las vías de transmisión de la enfermedad y establecer las medidas de control más útiles y de mayor corto beneficio para combatir la enfermedad.

El estudio de *Vibrio cholerae* utilizando técnicas de subtipificación molecular ha introducido un cambio considerable en la visión del microorganismo y de la enfermedad, afectando la bacteriología y epidemiología del cólera.

Con objeto de estudiar la relación genética entre cepas de *Vibrio cholerae* pertenecientes a diferentes serotipos aisladas de humanos y del ambiente se realizó un estudio para determinar los genotipos multilocus de 397 cepas de *Vibrio cholerae*. Estas 397 cepas incluían las primeras 143 cepas tipo de un total de 193 que forman el sistema de referencia serológica para *Vibrio cholerae* (5, 6). El resto lo conformaban 10 cepas del serogrupo O1 provenientes de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta Georgia, EUA y 244 cepas de *Vibrio cholerae* aisladas en México y Guatemala. De estas 244 cepas, 230 (58% del total) pertenecían a 59 serogrupos y las 14 cepas restantes no pudieron ser tipificadas con el esquema actual. Las cepas aisladas en México y Guatemala representaron el 30% de la diversidad de serotipos presentes en el estudio.

Se analizaron 17 loci genéticos en cada cepa. Todos los loci fueron polimórficos, y se encontró un total de 279 ETs en las 397 cepas estudiadas, distribuidos en dos divisiones principales (I y II). Estos resultados sugieren que la población estudiada fue muy diversa.

La división I, integrada por la mayoría de las cepas de *Vibrio cholerae* estudiadas estuvo formada por 6 grupos (subdivisiones Ia-If), siendo la subdivisión Ia la que agrupó el 76% de los Ets (214 Ets) pertenecientes a 316 cepas. A pesar de la evidencia encontrada sobre la

frecuente recombinación en esta población, se determinaron líneas clonales que pueden persistir por años y aún hasta por décadas. Además del conglomerado que formaron las clonas pandémicas de los serogrupos O1/O139, este estudio identificó líneas clonales de cepas de *Vibrio cholerae* no O1 distribuidas en diferentes continentes.

También se identificaron cepas con el mismo tipo electroforético (ET) pero pertenecientes a diferentes serogrupos, tal es el caso de las clonas de los serogrupos O37 y O102 aisladas en 1969 en India y en 1988 en China respectivamente, las cuales estuvieron cercanamente relacionadas con las clonas epidémicas O1/O139.

La amplificación del operón RNA ribosomal de *Vibrio cholerae* generó un producto de aproximadamente 4300 pb. Estos productos de amplificación fueron digeridos con *Hinf*.I y se obtuvieron 4 perfiles de restricción o PCR-ribotipos (PCR-ribotipo A, B, C y D) (50).

Dos de los PCR-ribotipo (B y C) se distribuyeron en todo el dendograma, lo cual sugirió que hubo recombinación entre ellos, mientras que el conglomerado donde se localizaron las cepas de *Vibrio cholerae* O1 aisladas durante epidemias y las cepas de los serogrupos O139 y O37 estuvo formado por el PCR-ribotipo C únicamente, lo que sugirió que este perfil tiene estabilidad o poca recombinación del operón RNA ribosomal y su espacio intergénico.

La variación que se encontró en los perfiles de PCR-ribotipos en las cepas estudiadas fue muy baja. El alto grado de conservación de los PCR-ribotipos fue sorprendente considerando la gran diversidad de serogrupos, zonas geográficas, fuentes de aislamiento y años en que se aislaron las cepas de *Vibrio cholerae* utilizadas en el presente estudio.

## Introducción

El cólera representa un problema global de salud que debe ser combatido a través de una acción conjunta. Las normas internacionales de salud exigen que la Organización Mundial de la Salud (OMS) sea notificada inmediatamente cuando surja un brote de cólera en un área previamente libre de la infección y que todos los casos confirmados o sospechosos también sean notificados (1).

A pesar de que hace más de un siglo se descubrió el germen causante del problema, el cólera sigue siendo una de las enfermedades epidémicas más importantes en diversas regiones del mundo en desarrollo.

El cólera es consecuencia de la colonización intestinal por cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae* O1. Existen dos biotipos de este microorganismo, clásico y El Tor. Basado en las diferencias del antígeno somático cada biotipo incluye cepas de tres serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima. Desde 1817, hasta la fecha, se han reportado siete pandemias; la última, que continúa hasta este momento, comenzó en 1961 y es causada por *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor.

La quinta y sexta pandemias fueron causadas por *Vibrio cholerae* O1 biotipo clásico, mientras que la etiología de las primeras cuatro pandemias es imposible de precisar (2). A partir de 1992, un nuevo serotipo de *Vibrio cholerae* el O139 surgió como una amenaza epidémica en el sureste de la India y la bahía de Bengala. Este nuevo serotipo toxigénico produce una enfermedad cuyas características clínicas son indistinguibles del cólera producido por infección con *Vibrio cholerae* O1 clásico o El Tor. A la fecha se han reportado cerca de 200 serotipos de *Vibrio cholerae*, de los cuales únicamente los dos antes mencionados se han asociado con epidemias de cólera (3).

La asociación entre esta enfermedad y el agua fue largamente sostenida por tradiciones populares, pero no fue hasta la década de 1850, cuando que John Snow, estudio un brote de

cólera en Londres y estableció, por primera vez el vínculo epidemiológico entre la enfermedad y el agua para consumo humano (3).

La infección se puede prevenir de manera segura a través de medidas básicas de sanidad y, sobre todo, con el control del abastecimiento de agua potable y drenaje para toda la población. El agua continua siendo el vehículo más importante para la transmisión de la enfermedad; además de ciertos alimentos que pueden también diseminar el cólera (1).

Los portadores asintomáticos de *Vibrio cholerae* O1 en periodos interepidémicos son raros y la bacteria no es capaz de colonizar a otros mamíferos pero sí existen reservorios ambientales, en especial el agua de mar en ciertas regiones del mundo como el Golfo de Bengala o el Golfo de México en el sur de los Estados Unidos (1,2).

La epidemiología del cólera es una interacción entre las propiedades biológicas y ecológicas del *Vibrio cholerae* y los complejos patrones de comportamiento humano en ambientes que, por razones climáticas o de pobreza, permiten la transmisión del germen de un humano a otro.

La investigación epidemiológica y los avances en la caracterización molecular de *Vibrio cholerae* han generado nueva información que permite explicar cambios genéticos y epidemiológicos que pueden ayudar a las autoridades de salud a determinar las vías de transmisión de la enfermedad y establecer las medidas de control más útiles y de mayor costo beneficio para combatir la enfermedad (1, 2).

El estudio de *Vibrio cholerae* utilizando herramientas moleculares ha introducido un cambio considerable en la visión que se tiene sobre la bacteria y enfermedad, con impacto en la bacteriología y epidemiología del cólera. En el presente estudio se utilizó el análisis de la movilidad electroforética de enzimas (electroforesis de enzimas multilocus MLEE), así como ribotipificación a través de la PCR, para investigar la variación alélica, la diversidad y relación genética entre cepas de *Vibrio cholerae*, así como su relación con las clonas

epidémicas O1 y O139. Para tal fin se estudiaron un gran número de cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no- O1 de interés médico y epidemiológico aisladas entre 1932 y 1995 en México y en diferentes partes del mundo.

## Antecedentes

### 1.1. Características de *Vibrio cholerae*

Los miembros de este género son bacilos curvos o rectos, gram negativos, anaerobios facultativos, móviles por flagelos polares y no esporulados. La mayoría son bacterias de vida libre; su hábitat es predominantemente ambientes salinos, tales como estuarios o mares. En 1965, Véron (2, 4) propuso una nueva familia, la *Vibrionaceae*, en un intento de agrupar a aquellos géneros cuyas especies fueran oxidasa positiva y móvil por un flagelo polar. La familia *Vibrionaceae* está integrada por los géneros *Enhydrobacter*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, de los cuales los tres últimos son reconocidos como causantes de infecciones en humanos. Diez miembros del género *Vibrio* se han asociado con enfermedades en humanos (Tabla 1).

**Tabla 1. Especies de *Vibrio* asociadas a enfermedades humanas**

Especies	Enfermedad
<i>V. cholerae</i>	Cólera, o diarrea tipo cólera gastroenteritis, infección tejido blando
<i>V. mimicus</i>	Diarrea tipo cólera
<i>V. parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis, infección tejido blando
<i>V. fluvialis</i>	Diarrea
<i>V. furnissii</i>	Sospecha de diarrea
<i>V. hollisae</i>	Diarrea
<i>V. alginolyticus</i>	Infección tejido blando
<i>V. damsela</i>	Infección tejido blando
<i>V. vulnificus</i>	Septicemia, Infección tejido blando
<i>V. metschnikovii</i>	Posible oportunista

En 1935, Gardner y Venkatraman (2, 4), realizaron la primera clasificación de *Vibrio cholerae* basada en la tipificación de sus antígenos somáticos (O). Las bacterias se clasificaron inicialmente en 6 serogrupos, asignando el serogrupo O1 al vibrio relacionado con el cólera. Además del antígeno somático (O) los vibrios poseen un antígeno flagelar (H) el cual es idéntico para todos los miembros de especie.

Dentro del serogrupo O1 existen tres formas antigénicas o serotipos (basados en las diferencias de los componentes del polisacárido del antígeno somático) designadas como Ogawa, Inaba e Hikojima según su fórmula antigénica AB, AC y ABC, respectivamente. A su vez, *Vibrio cholerae* O1 se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor, que difieren entre sí por pruebas de hemoaglutinación de eritrocitos de pollo, hemólisis de eritrocitos de carnero, sensibilidad a bacteriófagos (Clásico IV y El Tor V), la reacción de Voges–Proskauer (VP) y su susceptibilidad a polimixina B (4).

En años posteriores, Sakazaki *et al.* (4) y Shimada *et al.* (5) extendieron el sistema de clasificación serológica y establecieron un esquema de serotipificación que consistía en 83 serogrupos.

En 1994, Shimada *et al.* (5) ampliaron este esquema hasta el serogrupo O140 y reportaron la existencia de dos serogrupos particularmente importantes, el O139 o tipo “Bengal” causante de una epidemia parecida al cólera en el sureste asiático a finales de 1992 y el serogrupo O140 ó “Hakata”, el cual poseía solamente el factor antigénico C (presente en serotipo Inaba), pero carecía del factor A, el cual era específico para *Vibrio cholerae* O1.

Yamai *et al.*, en 1997 (6) ampliaron nuevamente el esquema de serotipificación a más de 190 serogrupos. Existen únicamente cuatro laboratorios en el mundo en donde se realiza la tipificación completa de antígenos somáticos de *Vibrio cholerae*. Uno de ellos es el de la Facultad de Medicina de la UNAM, en donde se realizó el presente estudio.

## 1.2. Historia

*Vibrio cholerae* O1 es el agente etiológico del cólera; infección gastrointestinal aguda y grave que se caracteriza por la aparición brusca de diarrea acuosa abundante, vómitos y deshidratación rápida que puede causar la muerte en pocas horas (7).

El cólera es una de las enfermedades epidémicas que ha sido parte integral por más de 2000 años de la historia política y social de la humanidad. Existen descripciones de la enfermedad en antiguos escritos griegos, sánscritos y chinos (2).

La historia moderna del cólera comenzó en la India en 1817 de donde partió la primera pandemia (1817-1823). La enfermedad se diseminó de la India a la península arábiga, probablemente por soldados enviados de Bombay a Omán. Posteriormente se extendió al Medio Oriente y a Rusia. La diseminación al Oriente, a través de Birmania, Tailandia y las Indias Orientales llegó, por último, a China y Japón.

La segunda pandemia (1829-1851) comenzó en Rusia y lugares aledaños del Asia central. Se diseminó hacia Europa, incluyendo el Reino Unido. Un segundo foco comenzó en la Península Arábiga, probablemente asociada con la llegada de peregrinos a La Meca, y de ahí se diseminó al norte y este de África y a Europa al regreso de los individuos a sus lugares de origen. En 1832, la pandemia se extendió a Norte América y a Australia.

En México, la enfermedad llegó procedente de Europa en 1832, a través de inmigrantes infectados y se extendió por todo el territorio hasta Juchitán, Chiapas en donde se reportó el último caso en 1883 (7).

La tercera (1852-1859), cuarta (1863-1879) y quinta (1881-1896) pandemias siguieron patrones similares al de la segunda. Epidemiológicamente es difícil determinar si las pandemias fueron el resultado de la diseminación geográfica del microorganismo o bien de brotes independientes causados por la misma bacteria (2).



En 1854, durante la epidemia de cólera; en Florencia, Italia, Pacini (3) describió por primera vez al microorganismo como el *Vibrio* gram negativo en forma de coma (*comma bacillus*) responsable del cólera. Pacini realizó estudios detallados sobre la etiología del cólera, describió la destrucción que sufre la mucosa intestinal durante la enfermedad y asignó este efecto a la bacteria. Estableció claramente que el *Vibrio* era el agente “específico” causante de la enfermedad e insistió que esta era contagiosa, idea que durante esa época estaba bajo disputa. Sus resultados e ideas fueron ignorados por 30 años.

Durante el siglo XIX dos descubrimientos científicos llevaron a un mejor entendimiento del cólera. En 1849, John Snow demostró que el cólera se diseminaba por agua contaminada y en 1883, Robert Koch, durante sus trabajos en la India y Egipto, volvió a demostrar que la enfermedad era causada por un organismo en forma de coma (coma-bacilo), al cual denominó en 1884 vibrio cólera. Ese mismo año, Koch propuso que el agente responsable de la enfermedad producía “un veneno especial” que actuaba sobre el epitelio y que los síntomas del cólera podían deberse “esencialmente a este envenenamiento”. Esta hipótesis fue corroborada 75 años después por dos grupos de investigadores que trabajaban en la India, los cuales describieron una toxina enterotoxigénica producida por cepas de *Vibrio cholerae* O1(8, 9).

Se conoce que la quinta y sexta pandemias fueron causadas por *Vibrio cholerae* O1 biotipo clásico; no así la etiología de las primeras cuatro pandemias que es imposible de precisar (9).

La sexta pandemia (1899-1923), caracterizada por un aumento de casos de cólera en la India, se diseminó inicialmente a Arabia y Medio Oriente. Durante esta epidemia se describió por primera vez en 1904 el *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor, aislado de casos de cólera provenientes de los campamentos en cuarentena en el Sinaí. En Europa y Rusia, la enfermedad se diseminó como parte de las guerras internas y de la primera Guerra Mundial.

De 1926 hasta principios de la séptima pandemia en 1961, continuaron presentándose brotes de cólera en India, Medio Oriente, el sudeste Asiático y China (2).

En 1905 se aislaron las primeras cepas con biotipo El Tor causantes de la séptima pandemia. Estas cepas se obtuvieron de peregrinos que habían fallecido como consecuencia del cólera en un campo de cuarentena denominado “El Tor” cuando regresaban de La Meca.

No fue hasta 1961 en que el biotipo El Tor alcanzó potencial epidémico diseminándose de Indonesia a otros países de Asia, marcando así el inicio de la séptima pandemia la cual continúa hasta la actualidad (9, 10).

En 1959, De (11), trabajando en Calcuta, inyectó filtrados estériles de cultivos de *Vibrio cholerae* O1 a asas ligadas de intestino de conejo, lo cual produjo una gran acumulación de fluido, comprobándose así el efecto enterotóxico del germen. Ese mismo año, Dutta *et al.* en Bombay (11, 12), demostraron que la ingestión de lisados estériles de *Vibrio cholerae* O1 producían diarrea fatal en conejos infantiles. Diez años después, Finkelstein y Lo Spalluto (9) purificaron esta toxina, lo cual permitió que muchos investigadores pudieran estudiar la estructura, el receptor y el modo de acción de esta proteína bacteriana.

Por una década, la séptima pandemia estuvo confinada al Asia y al Medio Oriente, a partir de 1970 se diseminó a África y al sur de Europa. En 1973 se reportó un caso de cólera, (el primero en el Hemisferio Occidental desde 1911), asociado a una cepa del serotipo Inaba El Tor adquirida en Puerto La Vaca, Texas, y en 1978 se reportaron otros casos de la enfermedad en Louisiana asociados con el mismo microorganismo (10). En 1981, se reportó un brote asociado con la cepa de la misma pandemia en 16 personas que habían consumido mariscos crudos provenientes del Golfo de México (10).

Dos años después, en 1983, se reportó un caso de cólera en un turista estadounidense que había visitado Cancún, México, de cuyas heces se aisló *Vibrio cholerae* O1 Inaba Clásico (7). Estudios posteriores no mostraron la presencia de más casos en esa localidad ni en el

resto de México, iniciándose así un sistema activo de búsqueda de la bacteria en diferentes laboratorios del país.

En 1983, Levine *et al.* (9), observaron que la ingestión de 25 µg de toxina colérica purificada, administrada por vía oral a voluntarios humanos era capaz de producir una pérdida de 20 litros de heces con apariencia de agua de arroz y que aún la ingestión de una mínima cantidad de esta toxina (5µg) podía dar como resultado la pérdida de 1 a 6 litros de agua en el intestino. Estos resultados confirmaron el papel de la enterotoxina (“el veneno especial” descrito antes por Koch) producida por *Vibrio cholerae* como el factor determinante de la hipersecreción intestinal descrita como diarrea acuosa severa durante la enfermedad.

La séptima pandemia hizo su aparición en Sudamérica en 1991, cuando se reportaron los primeros casos de cólera en Perú asociados al aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor (9). En enero de ese año se reportaron 480 000 casos de cólera y hubo más de 3000 muertes en ese país. La enfermedad se diseminó por todo el continente a una velocidad de un país por mes, afectando tanto a viajeros como los a habitantes autóctonos de esas zonas (13, 14).

El 12 de junio de 1991 se confirmó el primer caso de cólera en México, en la comunidad de San Miguel Totolmoya, municipio de Sultepec en el estado de México. A partir de esa fecha casi todos los estados de la República Mexicana presentaron casos de cólera confirmados bacteriológicamente (9).

En contraste con todo lo anterior, la importancia médica o epidemiológica de cepas de *Vibrio cholerae* pertenecientes a serotipos distintos del O1 se ha relacionado únicamente con casos esporádicos de diarrea en humanos sin el potencial aparente para producir epidemias. En octubre de 1992 se reportó un brote importante de una enfermedad idéntica al cólera, asociado con el aislamiento de *Vibrio cholerae* de serotipo O139. De India y Bangladesh se diseminó rápidamente a Pakistán, Nepal, Tailandia, Malasia y China,

mostrando un comportamiento epidémico no visto con anterioridad para *Vibrio cholerae* de serotipos no O1. En pocos meses se reportaron miles de casos asociados con esta bacteria con una mortalidad muy similar al cólera producido por infección con *Vibrio cholerae* O1 clásico (15, 16, 17).

Los estudios serológicos mostraron que estas cepas pertenecientes a un serogrupo previamente desconocido, designado O139 o “Bengal” por el lugar donde se habían aislado por primera vez, tenían la capacidad para producir cantidades similares de toxina colérica que las cepas de *Vibrio cholerae* O1; razón por la cual producían una enfermedad indistinguible del cólera (17, 18, 19). En 1994, Cravioto *et al.* (20) reportaron que los genotipos multilocus de cepas epidémicas de *Vibrio cholerae* O139 eran idénticos a los de *Vibrio cholerae* O1 Ogawa biotipo El Tor, aislado en México durante la epidemia de 1991. Estos datos, más toda la evidencia anterior, mostraban que la cepa O139 era, en realidad, un *Vibrio cholerae* O1 con cambios en su lipopolisacárido.

Posterior a este informe se publicaron otros estudios de análisis comparativos entre cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139, los cuales mostraron que las cepas O139 surgieron de una cepa ancestral de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor que adquirió genes externos mediante fagos, plásmidos, transposones o rearrreglos cromosomales (15, 21, 22). Por otro lado, Stroehrer *et al.* (23), sugirieron que ese *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor ancestral permitió una inserción de DNA genómico externo que contenía los genes específicos que codificaban para el antígeno O139; el cual simultáneamente, había sufrido una delección de la mayor parte de sus genes que codificaban para el antígeno O1, dando origen así a esta nueva clona epidémica.

### **1.3. Caracterización de *Vibrio cholerae***

Se han utilizado diferentes métodos para tipificar o caracterizar cepas de *Vibrio cholerae*, incluyendo: serotipificación, biotipificación, tipificación con anticuerpos monoclonales,

sensibilidad a bacteriófagos, tipos de fimbrias, resistencia a antimicrobianos, electroforesis de extractos proteicos, electroforesis de proteínas de membrana externa y varios tipos de perfiles o “huellas digitales” de carbohidratos, lípidos u otras moléculas químicas.

El análisis de perfiles de plásmidos fue una de las primeras herramientas que se utilizaron para subtipificar cepas de *Vibrio cholerae*, cuyos resultados fueron muy limitados en *Vibrio cholerae* O1 aparentemente por la falta de plásmidos en estas cepas (9).

Debido a que estas técnicas son fundamentalmente de tipo fenotípico es difícil, sino imposible, relacionarlas con la variación alélica de genes específicos; por tal motivo su uso no ha permitido que la información que ofrecen sea útil para el análisis de la estructura genética de esta población bacteriana (24).

Una de las primeras técnicas de subtipificación molecular que se utilizó en cepas de *Vibrio cholerae* fue la hibridación con sondas moleculares específicas de DNA por Southern blot de fragmentos largos de restricción (RFLPs) del cromosoma bacteriano, los resultados permitieron detectar diferencias epidemiológicas útiles tanto en el número como en la localización cromosómica de genes (25).

Otros estudios de subtipificación molecular (10, 25) de *Vibrio cholerae* utilizaron RFLPs de vibriofagos localizados en el cromosoma y de los genes del RNA ribosomal (*rrn*).

A diferencia de lo anterior, el uso de técnicas como la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y la ribotipificación (26, 27) durante los últimos 20 años han permitido estudiar la variación clonal en cepas de *Vibrio cholerae* O1.

La técnica de enzimas multilocus (MLEE) permite el análisis de las diferencias en la movilidad electroforética de múltiples enzimas celulares solubles en agua. La velocidad de migración de cada enzima durante la electroforesis está determinada por la carga electrostática neta de la proteína relacionada con la secuencia específica de aminoácidos; la

diferencia en la movilidad de cada enzima esta directamente relacionada con los alelos en el locus estructural de la proteína en el cromosoma bacteriano. Esta metodología ha sido utilizada para estimar la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales de una gran variedad de especies bacterianas en estudios a gran escala (24).

Los operones de RNA ribosomal (*rrn*) en procariontes tienen una anatomía peculiar y muy conservada. Codifican, con algunas excepciones, para tres RNAs ribosomales, en el siguiente orden: 16S-23S-5S. Contienen también genes de RNA de transferencia (tRNAs), así como largas y complejas regiones regulatorias y regiones de espacios intergénicos (ISR), estos ISR son espacios localizados entre los genes de un operon bacteriano que contienen genes para tRNA y algunas secuencias blanco para la Rnasa III y otras señales de reconocimiento requeridas para el proceso de transcripción. Estos operones de RNA ribosomal (*rrn*) normalmente se presentan en múltiples copias a lo largo del genoma bacteriano (aunque también se han encontrado en megaplásmidos) y representa uno de los mejores ejemplos de genes redundantes con una alta expresión durante el crecimiento de los microorganismos (28).

El número de operones *rrn* en bacterias varía entre uno y once. Frecuentemente múltiples operones contienen un mismo espacio intergénico (ISR), los cuales, en general, poseen una estructura secundaria y habitualmente genes de tRNA, pero en algunos casos los ISRs presentan secuencias extensas y variaciones en sus tamaños. Este polimorfismo ha sido descrito entre los diferentes loci del *rrn* del mismo cromosoma y entre diferentes cepas (26, 29, 30).

Los ISRs, especialmente aquellos localizados entre los genes 16S y 23S, presentan mayor variación genética que las regiones que codifican para el RNAr. Este polimorfismo en los ISR los hace útiles como cronómetros moleculares para medir filogenia de corto plazo, así como un buen marcador de los principales linajes de intraespecies. Recientemente, el tamaño y variación en las secuencias de los ISR del 16S-23S del *rrn* han sido utilizados para discriminar entre diferentes géneros y especies de bacterias (26). Estas características

del *rrn* han hecho que se utilice con frecuencia en estudios taxonómicos, epidemiológicos o de evolución, así como para subtipificar microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies.

La ribotipificación es una metodología utilizada para tipificar aislamientos bacterianos para estudios epidemiológicos. Se utiliza el *rrn* como sonda para detectar el polimorfismo de fragmentos largos de restricción del cromosoma (RFLP's). Aunque la ribotipificación es precisa, su utilidad es limitada debido a lo laborioso de la metodología y al tiempo necesario para realizar el Southern blot y su análisis. Debido a estas limitantes, se ha diseñado una nueva metodología, la PCR-ribotipificación, como una alternativa a la ribotipificación típica. En esta técnica se amplifica, a través de PCR, el espacio intergénico que existe entre el 16S-23S del *rrn*, el cual se somete posteriormente a una restricción enzimática (31).

Por otro lado, la electroforesis de campos pulsados (PFGE) probó ser la técnica más discriminatoria en el análisis de los RFLP's del cromosoma bacteriano y, por último el avance más reciente en las técnicas moleculares fue la secuenciación del DNA, técnica que se ha utilizado para secuenciar y comparar secuencias de genes de entre 10 a 100 cepas de *Vibrio cholerae* (9).

#### **1.4. Secuencia completa de los dos cromosomas de *Vibrio cholerae***

Entre cada pandemia *Vibrio cholerae* O1 vive en ecosistemas acuáticos. Todas las características fisicoquímicas (abióticas) y ecológicas (bióticas) de este tipo de sistemas están influidos dramáticamente por el clima. Se ha propuesto que dentro de este ecosistema *Vibrio cholerae* presenta cinco estadios que comprenden su ciclo de vida: 1) la forma independiente de libre movimiento en el agua; 2) la forma simbiótica con el *phytoplankton*; 3) en calidad de comensal del *zooplankton*; 4) en estado viable no cultivable; y 5) formando biocapas asociadas a superficies abióticas o a cúmulos de quitina (32). De este modo, el

repertorio funcional del genoma del *Vibrio cholerae* O1 debe ser inusualmente amplio para poderse adaptar a dos tipos de vida tan distintos: el intestino humano y los habitats acuáticos, los cuales están sujetos al clima determinando y a cambios en su micro-ambiente (32).

La anotación de la secuencia del genoma de *Vibrio cholerae* O1 subraya esta capacidad, en particular la distribución de los genes con función conocida, lo cual provee al microorganismo de indicios sobre como los dos cromosomas puede conferirle ventajas evolutivas en habitats cambiantes (33).

Heidelberg *et al.*, en el 2000 (33) reportaron la secuencia de DNA de los dos cromosomas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor. Los autores determinaron que el genoma consiste de dos cromosomas circulares de 2 961 146 pb (cromosoma 1) y de 1 072 314 pb (cromosoma 2), que juntos codifican para 3 885 marcos de lectura abierta (ORF's). La mayoría de los genes reconocidos para funciones celulares esenciales, tal como la replicación y reparación del DNA, transcripción, traducción, biosíntesis de pared celular, así como los genes relacionados con patogenicidad (*toxR*, *ctx*, *tcp*, LPS, antígenos de superficie, sistema de secreción) se encuentran localizados en el cromosoma grande (chr 1). En contraste, el cromosoma pequeño (chr 2) contiene más de la mitad (59%) de genes con funciones hipotéticas; en comparación con el chr 1 que tiene menos de la mitad (42%). El cromosoma 2 contiene, además, un sistema de integrones (isla de integrones) y genes de "adicción" al huésped que comúnmente se encuentran en plásmidos. Por tal motivo, chr 2 pudo haber sido, en su origen, un megaplásmido que fue capturado por ancestros de especies de *Vibrio*. Si bien muchos de los genes que el microorganismo necesita para su crecimiento y viabilidad están localizados en chr 1, otros genes esenciales para su función normal, (por ejemplo genes que codifican para las proteínas ribosomales L20 y L35), están exclusivamente en chr 2.

Muchos de los intermediarios de vías metabólicas están codificados exclusivamente en este cromosoma 2.



La mayoría de los genes de *Vibrio cholerae* son muy similares a los genes de *E. coli* (1 454 ORF's), pero 499 de los ORF's de *Vibrio cholerae* tienen mayor similitud con genes de otros *Vibrio cholerae*, sugiriendo duplicaciones recientes. La mayoría de los ORF's duplicados codifican para productos involucrados con funciones de regulatorias, quimiotaxis, transporte y unión, transposición, patogenicidad o proteínas putativas. Hay también 105 duplicaciones con por lo menos uno de cada ORF en cada cromosoma, indicando que ha habido entrecruzamientos recientes entre ambos cromosomas. La gran cantidad de duplicaciones de genes involucrados en el comportamiento "carroñero" (quimiotaxis y transporte de solutos) del *Vibrio cholerae* sugiere la importancia de los productos de estos genes en la biología y en la habilidad del *Vibrio cholerae* de vivir en diferentes ambientes. Varios ORF's con funciones aparentemente idénticas existen en ambos cromosomas. Estos ORF's fueron adquiridos probablemente por transferencia horizontal.

Como ya se mencionó, existen evidencias que sugieren que chr 2 fue originalmente un megaplásmido capturado por especies ancestrales de *Vibrio*. Una evidencia a favor de esto es el análisis filogenético de homólogos del gen *parA*, un gen localizado cerca del origen de replicación de los cromosomas 1 y 2. El gen *parA* de chr 1 se agrupa con otros *parAs* cromosomales, mientras el gen *parA* de chr 2 se agrupa con *parAs* de plásmidos, fagos y megaplásmidos. Es posible que el megaplásmido haya adquirido genes de diferentes especies bacterianas antes de pasar a formar parte del material genético del ancestro de *Vibrio*. La adquisición de este megaplásmido ocurrió hace suficiente tiempo para que la composición y porcentaje de G+C entre los dos cromosomas sea similar (32). Aún no es claro, sin embargo, porque el chr 2 no se haya integrado a chr 1. Tal vez, el chr 2 tiene una función especializada importante que proporciona la presión selectiva evolutiva que elimina los eventos de integración cuando estos llegan a presentarse.

Heidelberg *et al.*, (33) han sugerido que la distribución asimétrica de los genes en estos dos cromosomas, da al microorganismo ventajas bajo ciertas condiciones ambientales, ya que pueden sobrevenir diferencias en el número de copias de chr 1 y chr 2, lo que daría un

incremento potencial en el nivel de expresión de genes del cromosoma que se encuentran en mayor número. Esta hipótesis (que actualmente con el advenimiento de la genómica funcional puede ser probada), predice que chr 1, principalmente ayuda al microorganismo a adaptarse al intestino, mientras que chr 2 es esencial para la supervivencia del microorganismo en otros ambientes.

### **1.5. Fisiopatología**

La infección en humanos por *Vibrio cholerae* O1 y O139 es el resultado de la ingestión de estos microorganismos, generalmente a través de agua o comida contaminada.

Dependiendo del tamaño del inóculo (que debe ser relativamente grande en comparación con otros patógenos entéricos) y de la susceptibilidad de la persona que ha sido expuesta, el periodo de incubación del cólera varía entre 12 y 72 horas. El ambiente juega un papel importante, ya que la transmisión hombre-ambiente-hombre es la que prevalece (7, 9).

Una vez ingerida, la bacteria coloniza el epitelio intestinal sin invadir las células epiteliales ni causar alteraciones estructurales en el epitelio. La interacción con las células epiteliales se realiza a través de la producción de una exotoxina, la toxina colérica (CT), la cual actúa sobre las células de la mucosa intestinal provocando un decremento en el influjo de iones sodio y un aumento en la salida de iones cloro y agua hacia el lumen intestinal, dando como resultado una diarrea severa y un desequilibrio electrolítico (34).

Existen síntomas premonitorios asociados al cólera como anorexia, malestar abdominal y diarrea líquida con heces color café. Conforme avanza la enfermedad las heces van adquiriendo poco a poco una consistencia más líquida, perdiendo su color hasta tener la apariencia de “agua de arroz”. Esto se debe a la presencia de poca materia fecal y de moco en una gran cantidad de agua. Generalmente, no hay fiebre ni tenesmo y a menudo, se

acompaña de vómito y de pérdida rápida del 10 al 15% del peso corporal. En la fase aguda de la enfermedad una persona puede perder hasta 20 litros de agua por día.

La pérdida de plasticidad de la piel y los ojos hundidos son evidencias visibles de la pérdida de agua de los tejidos y los calambres en las extremidades se deben a la pérdida de grandes cantidades de potasio. El resultado más serio de la pérdida masiva de agua es el colapso del sistema circulatorio, siendo el choque hipovolémico la causa más común de muerte en las víctimas del cólera (7, 34).

### 1.6. Factores de virulencia

Los factores de virulencia bacterianos, tales como toxinas, frecuentemente están codificados por elementos genéticos accesorios como bacteriófagos, plásmidos, islas cromosomales y transposones. Estos elementos tienen la capacidad de moverse horizontal y verticalmente entre poblaciones bacterianas, confiriéndoles una mejor adaptación evolutiva. En algunos casos, estos elementos se pueden transmitir entre cepas bajo condiciones del laboratorio, pero poco se conoce de su comportamiento en ambientes naturales.

Para ser virulento, *Vibrio cholerae* requiere de dos factores regulados coordinadamente, la toxina colérica (CT) y los pili co-regulados con la toxina (TCP) para colonizar el epitelio intestinal (35). En 1996, Waldor y Mekalanos (36) reportaron que los genes estructurales de la toxina producida por *Vibrio cholerae* O1 estaban codificados por un bacteriófago filamentoso (designado  $\phi$ CTX), el cual era similar en estructura al bacteriófago M13. Este  $\phi$ CTX utilizaba para infectar a *Vibrio cholerae* como su receptor a los pili TCP. El  $\phi$ CTX se integraba, al cromosoma bacteriano o bien se podía replicar como un plásmido. Este elemento genético CTX, era un segmento de DNA de 7 a 9.7 kb presente frecuentemente en múltiples copias arregladas una tras otra en las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae* O1. El CTX presentaba la estructura de un transposon con un núcleo (core) central de 4.5 kb, flanqueado por una o más copias de secuencias repetidas (RS) de 2.7 kb. Este núcleo

contenía, por lo menos, seis genes, incluyendo *ctxA* y *ctxB*, los cuales codifican para la producción de las subunidades A y subunidad B de la toxina CT. Contiene, además, genes que codifican para Zot, Cep, Ace y orfU, genes que codifican para la producción de proteínas accesorias a la CT, excepto por orfU, cuya función se desconoce aún.

Sobre la base de los resultados de la investigación de Waldor y Mekalanos, se sugirió que los productos de los genes *zot* y *orfU* eran probablemente necesarios para la replicación y la morfogénesis del fago CTX, mientras que *cep* codificaba para un polipéptido de 47 aminoácidos cuya secuencia era muy parecida a la proteína de la cápside del virion M13 (36) y, por lo tanto, de la del virion CTX también.

Por otro lado, la producción de TCP está codificada por genes presentes en una isla de patogenicidad llamada VPI (isla de patogenicidad de *Vibrio cholerae*). Como se mencionó con anterioridad los TCP están relacionados con los procesos de colonización y son el receptor del  $\phi$ CTX. En 1999, Karaolis *et al.* (37), publicaron que VPI es el genoma de otro bacteriófago filamentoso que denominaron  $\phi$ VPI que codifica para un pili tipo IV y que la subunidad TcpA era, de hecho, la proteína capsular del fago. Estos resultados fueron la primera descripción de un fago que codifica para un receptor necesario para otro fago y de una interacción fago-fago necesaria para la expresión de patogenicidad de una bacteria.

Sin embargo, en 2003, Faruque y Mekalanos (38) estudiaron cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139 de diferentes orígenes y con diferentes variantes genéticas de la isla TCP para la producción del  $\phi$ VPI y del  $\phi$ CTX. Sus resultados mostraron que todas las cepas toxigénicas producían  $\phi$ CTX, pero ninguna de ellas eran positivas para la producción del  $\phi$ VPI. Sus resultados contradecían lo reportado previamente por Karaolis *et al.* (37). En un estudio reciente, O'Shea y Boyd (39) demostraron que VPI se podía transferir por transducción generalizada del fago CP-T1 a un *Vibrio cholerae* receptor, aunque esta transferencia se realizaba a baja frecuencia ( $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  UFF).

VPI tiene características similares a otras islas de patogenicidad bacterianas (PAIs). Su tamaño es de aproximadamente 40 kb, y muestra la presencia de genes asociados a virulencia, regulación y movilidad y un solo sitio de inserción al cromosoma (*att*). Su contenido de G+C es diferente al del cromosoma bacteriano (37).

### 1.6.1. Toxina colérica (CT)

El interés en la elaboración de una vacuna efectiva contra el cólera se ha enfocado hacia los factores de virulencia de *Vibrio cholerae*. Este microorganismo produce una gama de productos extracelulares que interaccionan con las células eucariontes. La diarrea masiva inducida por esta bacteria esta causada por la toxina colérica (CT), aunque cepas de *Vibrio cholerae* a las que se les han removido los genes que codifican para la producción de esta proteína pueden causar diarrea leve o moderada aún en muchos individuos. Investigaciones sobre este punto han dado como resultado el descubrimiento de toxinas adicionales producidas por esta especie. Como resultado, *Vibrio cholerae* ha demostrado ser un excelente modelo para el estudio de la colonización de la mucosa intestinal y los efectos de una enterotoxina sobre células del hospedero. Estudios recientes han mostrado que esta interacción es mucho más compleja de lo que se había asumido con anterioridad (9, 34).

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 GM<sub>1</sub> (34). 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 (34). Los genes que codifican para la subunidad A (*ctxA*) y para la subunidad B (*ctxB*) forman parte de un mismo operón (34). Las subunidades A y B se secretan al periplasma de la bacteria donde se ensambla la CT (34). La secreción al periplasma esta mediada por una chaperona, la TcpG, la que también esta involucrada en el ensamblaje de los pili Tcp (34).

La activación de la subunidad A se realiza al romperse por proteólisis en dos fragmentos peptídicos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, los cuales siguen unidos por un puente bisulfuro hasta antes de su internalización a la célula (34). Este corte proteolítico probablemente sucede después de que la toxina ha sido liberada al fluido extracelular (34). Las estructuras cristalográficas de CT muestran características esencialmente idénticas a la toxina LT de *Escherichia coli* enterotoxigénica, la cual ya fue extensamente caracterizada (34).

La interacción de las subunidades B de la toxina forma un pentámero. Cada uno de los monómeros tiene una  $\alpha$  hélice central; al formarse el pentámero se crea un "barril" en su centro, formado un poro. En este poro se asienta la región C-terminal del péptido A<sub>2</sub>, el cual se une al pentámero mediante varias interacciones. La región N-terminal del péptido A<sub>2</sub> es una  $\alpha$  hélice larga que se extiende fuera del pentámero e interactúa con el péptido A<sub>1</sub> (34).

La toxina CTX activada se une a su receptor, el gangliósido GM<sub>1</sub>, que se encuentran en la superficie de las células de la mucosa intestinal del hospedero (34). El GM<sub>1</sub> es un oligosacárido que contiene ácido siálico unido covalentemente a ceramidas (34). La fracción lipídica del compuesto esta embebida en la membrana de la célula del hospedero, mientras que el oligosacárido esta expuesto en la superficie, siendo este el que es reconocido por la subunidad B de la toxina de cólera (34). Estudios cristalográficos han determinado que la región inferior por lo menos 2 subunidades B de la toxina CT, se unen a GM<sub>1</sub>, mientras que la subunidad A<sub>1</sub> queda del lado opuesto apuntando hacia fuera de la membrana (34). Una vez que la CT se une a GM<sub>1</sub>, la subunidad A<sub>1</sub> se libera (probablemente por la ruptura del puente bisulfuro) y penetra a la célula huésped por translocación (34).

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 A<sub>1</sub> (9, 34).

Estudios bioquímicos, sin embargo, han mostrado que el pentámero B no se inserta en la bicapa lipídica, sino más bien que este asemeja un iris cuyas subunidades se deslizan formando el poro por donde se introduce la subunidad A<sub>1</sub> (9, 34). 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 (9, 34).

La subunidad A<sub>1</sub> ribosila el ADP principalmente de las proteínas de membrana llamadas G<sub>s</sub> (34). Estas G<sub>s</sub> son un integrante de la familia de las proteínas G que hidrolizan GTP y están compuestas de 3 subunidades G $\alpha$ , G $\beta$  y G $\gamma$  (34). La unión y separación de estas subunidades, activa y desactiva a estas proteínas G<sub>s</sub> (34). G<sub>s</sub> es la proteína que regula la actividad de la adenilato ciclasa de la célula huésped con el consecuente aumento del AMP cíclico (AMP<sub>c</sub>) intracelular (9, 34). La forma activa de G<sub>s</sub> incrementa la actividad de la adenilato ciclasa como respuesta normal al estímulo de una hormona y se inactiva después de un corto tiempo (34). Este control de “encendido-apagado” asegura la producción de suficiente AMP<sub>c</sub> para realizar su trabajo en la célula pero no permite su acumulación y por lo tanto la alteración de otras funciones celulares (9, 34).

La ADP-ribosilación de las proteínas G<sub>s</sub> provoca un “corto circuito” manteniendo a estas proteínas activas, lo cual eleva los niveles de AMP<sub>c</sub> 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 (34).

El incremento de AMP<sub>c</sub> permite un aumento en la secreción de iones Cl<sup>-</sup> por las células de las criptas del intestino y un decremento de la absorción de NaCl por las células de las vellosidades intestinales (34). Esto da como resultado un movimiento neto de electrolitos hacia el lumen intestinal mediado por un gradiente osmótico trans-epitelial (34). 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 (34). Los pasos entre el incremento de los niveles de AMP<sub>c</sub> y la diarrea secretora no se conocen en su totalidad (34).

### 1.6.2. Pili Tcp

*Vibrio cholerae* forma en su superficie conjuntos de pili largos y filamentosos llamados Tcp (9). Estos pili contribuyen en forma importante en la colonización de la mucosa intestinal. El nombre de Tcp (*toxin coregulated pili*) se debe a que los genes que codifican para estos pili están regulados por los genes que codifican la toxina CT. La participación de los Tcp en la patogénesis de la enfermedad se ha comparado en voluntarios humanos inoculados oralmente con cepas mutantes incapaces de producir estos pili y por lo tanto no fueron virulentas para los voluntarios humanos (9).

La producción de Tcp esta codificada por un grupo de 15 genes (9, 34). El gen *tcpA* codifica para la producción de la subunidad principal de los pili; el *tcpB* codifica para una proteína estructural menor. Los siguientes tres genes están involucrados en la regulación de la expresión de estos pili y, por lo menos, otros cuatro genes en su ensamblado y secreción (9, 34). Estos incluyen el *tcpC*, gen que codifica para una proteína de membrana externa de función desconocida, y el *tcpJ*, que codifica para una peptidasa que libera la secuencia señal amino terminal de TcpA ya secretada. Existe por lo menos otro gen, el *tcpG*, localizado fuera del cluster, que probablemente codifica para una chaperona (proteína que codifica para el envolvimiento apropiado de las proteínas secretadas) (9, 34).

### 1.6.3. Toxina ZOT y enterotoxina accesoria del cólera (Ace)

En 1991, Fasano *et al.*, describieron una toxina poco común producida por *Vibrio cholerae*, la toxina Zot (*zona occludens toxin*). Esta fue la primera descripción de una toxina bacteriana que actúa rompiendo los desmosomas (*zona occludens*) que mantienen unidas a las células de la mucosa y preservan la integridad de la membrana. Estos desmosomas son muy efectivos como barrera, ya que impiden que aún los iones puedan pasar de una célula a otra de la mucosa. Este impedimento hace que los iones tengan que ser transportados a través de las membranas mediante una bomba de iones específica. Esta característica



permite controlar el flujo de agua y iones a través de la mucosa intestinal. La ruptura de estas uniones no sólo permite que el contenido del lumen se difunda a tejidos adyacentes sino también produce alteraciones en el balance iónico, de tal forma que se altera la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado y se produce una diarrea.

El gen *zot* esta inmediatamente arriba del operon *ctxAB*, y aún no se sabe si todas las cepas de *Vibrio cholerae* lo tienen. Tampoco se conoce si *zot* se corregula con *ctx* y con otros factores de virulencia ya estudiados en *Vibrio cholerae*.

La enterotoxina accesoria (*Ace*) de *Vibrio cholerae* fue identificada por Trucksis *et al.*, en 1993. Esta toxina no se relaciona con la toxina colérica o con *Zot*. La producción de *Ace* causa diarrea en animales pero su papel en la enfermedad de humanos se desconoce aún. El gen *Ace* esta localizado inmediatamente al lado (corriente arriba) del marco de lectura abierta (ORF) que codifica para *Zot*. El gen *ace* codifica para un péptido de aproximadamente 96 aminoácidos con un peso molecular de 11.3 kDa (9, 34).

### **1.7. Epidemiología**

En el año 2000, 56 países notificaron oficialmente un total de 137 071 casos de cólera y 4 908 muertes asociadas con esta infección a la Organización Mundial de la Salud (OMS). De estos, 118 932 casos, el 87% del total se presentaron en países de África, así como 4 610 muertes, el 94% del total de las muertes. En el mismo periodo, se reportaron 11 246 casos de cólera con 232 decesos en países asiáticos; una cifra tres veces menor a la reportada en 1999 (40).

Este año marcó también la reaparición del cólera en el Pacífico, donde no se habían reportado brotes de la enfermedad en más de 10 años. Oceanía informó de 3 757 casos y 26 decesos y aún en Europa se reportaron 35 casos sin ningún fallecimiento (40).

Durante el siglo XIX el cólera se diseminó ampliamente en centro y Sudamérica. Los brotes, sin embargo, persistían pocos años después de cada presentación. En 1833 se reportaron brotes de cólera en México y en Cuba. El último caso de cólera en México se reportó en ese mismo año en Juchitán, Chiapas. En 1895, se presentaron los últimos brotes de la enfermedad en Brasil, Argentina y Uruguay. En Estados Unidos el primer brote del siglo XIX se reportó en Nueva York en 1832, con brotes particularmente persistentes en Nuevo Orleans hasta 1875. Para el comienzo del siglo XX, la enfermedad había desaparecido en ese país (41, 42).

En 1978 se reportó en Louisiana, EUA, el primer brote de cólera del siglo XX, asociado a una cepa del serotipo Inaba El Tor (9, 41). Brotes pequeños de cólera persistieron a lo largo de la costa del Golfo de México durante varios años (9, 41).

En 1983 se reportó en México un caso aislado de cólera asociado a *Vibrio cholerae* O1 Inaba Clásico (7). No se reportaron casos adicionales a este hasta 1991, cuando la séptima pandemia hizo su aparición en Sudamérica. Los primeros casos de cólera se reportaron en Perú asociados a *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor. En un corto periodo se reportaron 480 000 casos de cólera y 3 000 muertes en ese país (9).

El primer caso de cólera en México se reportó el 12 de junio de 1991. Para finales de ese año se habían confirmado 2 690 casos y 34 muertes. De estos el 57% se presentaron en hombres. La mayoría de los casos ocurrió a finales del verano y durante el otoño (el pico más alto fue en octubre). Durante 1992, la mayoría de los casos se presentaron en adultos, también durante los meses de julio y octubre. Se reportaron 8 162 casos bacteriológicamente confirmados de los cuales 99 (1.22%) murieron. Para 1993, se reportaron 1 415 casos y el 1.8% falleció. Las tasas de incidencia más elevadas fueron reportadas en los estados del sur y en los estados del Golfo de México (41).

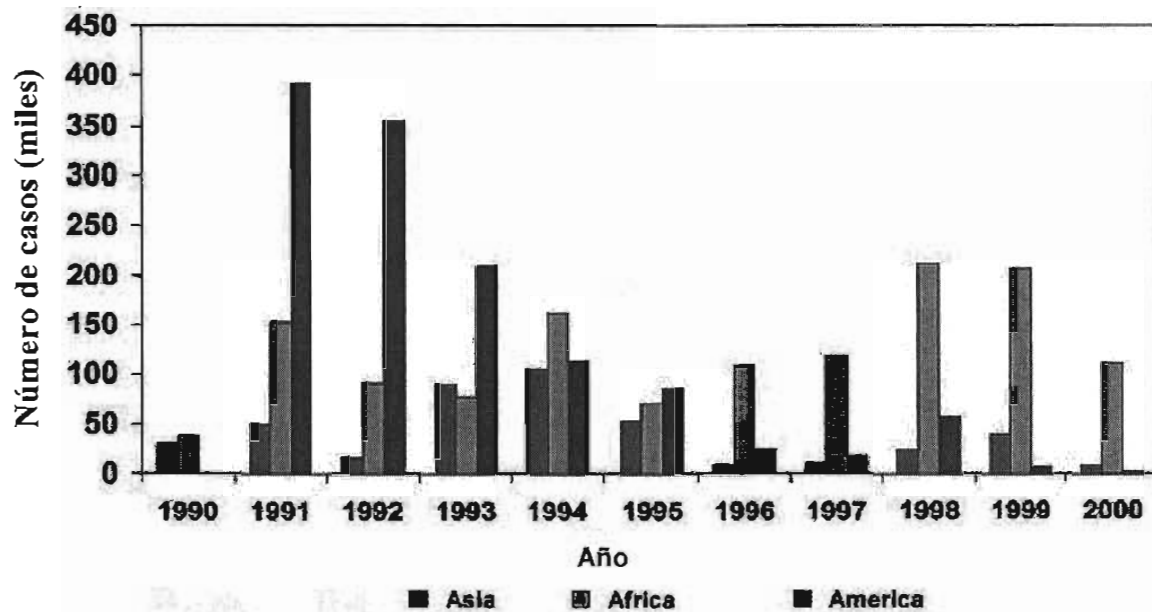
Durante el año 2000 se presentó una disminución en el número de casos y muertes por cólera en el continente Americano. En ese año se reportaron un total de 3 101 casos y 40 muertes.

Los países que reportaron mayor disminución de casos fueron Brasil, Ecuador, Guatemala y Nicaragua. En México sólo se reportaron 5 casos de cólera y ningún deceso. Sin embargo, El Salvador tuvo un aumento en el número de casos reportados (631 casos y 2 muertes). En suma, el 2000 vio una reducción global del número total de casos de cólera en el continente Americano sin una disminución en la tasa de mortalidad (figura 1).

Hasta 1992 las cepas de *Vibrio cholerae* no O1 se habían aislado únicamente de casos esporádicos y pequeños brotes de diarrea, pero nunca durante epidemias. La aparición y diseminación en la India y Bangladesh de casos clínicos similares a cólera asociados con el aislamiento de un *Vibrio cholerae* no O1 del serotipo O139 marcó, por primera vez, un cambio en este panorama, al asociarse el aislamiento de un serotipo no O1 con epidemias de diarrea severa semejante al cólera. El serotipo O139 es el responsable actual de aproximadamente 15% de casos de cólera bacteriológicamente confirmados en uno de los países endémicos del Asia (40, 43).

En el 2002, se reportó una epidemia en Bangladesh causada por *Vibrio cholerae* O139 que afectó a 30 000 personas. Esta cepa epidémica presentó algunas características diferentes a las cepas de la epidemia de 1992-1993 asociadas con este germen (44).

Como se ha reportado, las cifras de morbilidad y mortalidad por cólera han disminuido en muchos países, posiblemente porque el microorganismo ya es endémico en ellos. Una vez que la inmunidad contra el *Vibrio cholerae* O1 se ha difundido, la mayoría de los adultos quedan protegidos contra la enfermedad y los casos serios se limitan a infantes. Desafortunadamente la inmunidad contra *Vibrio cholerae* O1 no protege contra el serotipo O139 (43).



**Figura 1. Casos de cólera reportados a la OMS, por continente y año, 1990-2000.**

Debido a que no se puede predecir donde o que tan rápido este nuevo serotipo de *Vibrio cholerae* puede diseminarse, los países afectados deben mantener un sistema de vigilancia permanente para asegurar el acceso a tratamiento médico, agua potable y una adecuada red de drenaje y alcantarillado como formas de prevenir la diseminación de la enfermedad (40, 43).

### 1.7.1. Epidemiología molecular.

En el pasado la vigilancia epidemiológica del cólera se vio limitada principalmente por los sistemas de tipificación que eran poco sensibles. Tradicionalmente, mediante métodos bacteriológicos se diferenciaban a las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae* O1 en dos serotipos, Inaba y Ogawa y en dos biotipos, clásico y El Tor, lo que provocaba una pobre discriminación, particularmente porque estas características fenotípicas no son estables (9).

Los acontecimientos inesperados de la aparición de la enfermedad en el continente Americano desde 1978 a 1993, los avances de la tecnología con la aplicación de técnicas de subtipificación molecular a cepas de *Vibrio cholerae* promovieron un rápido incremento del conocimiento de la epidemiología molecular del cólera.

Con el advenimiento de sondas moleculares específicas de DNA, Kaper *et al.* (25) en 1982 utilizaron el polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLPs) del gen que codifica para la subunidad A de la toxina colérica (*ctxA*) para mostrar que las cepas aisladas en los Estados Unidos tenían un solo locus para este gen en el cromosoma, que eran clonales y fueron diferentes de otros aislados de la séptima pandemia

Otros estudios de subtipificación molecular de *Vibrio cholerae* utilizando RFLPs de un vibriofago localizado en el cromosoma y de los genes del RNA ribosomal (*rrn*), mostraron que los asilamientos de la costa del Golfo de México en Estados Unidos estaban relacionados entre ellos pero que eran diferentes de las cepas aisladas en otras partes del mundo. Situaciones análogas se han encontrado en cepas de *Vibrio cholerae* O1 aisladas en Australia, obtenidas tanto de pacientes como del medio ambiente (10, 25).

En 1991, cuando el cólera irrumpió en América Latina, se aplicaron técnicas de subtipificación molecular para identificar y caracterizar la cepa causante de la epidemia.

Wachsmuth *et al.* en 1993 (10) utilizaron varias técnicas moleculares, como ribotipificación, RFLPs del gen *ctxA*, secuenciación de la subunidad B de la toxina colérica (*ctxB*) y electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) para caracterizar 197 cepas de *Vibrio cholerae* O1 aisladas en diferentes partes del mundo. Sus resultados mostraron que existían cuando menos cuatro clonas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor. La clona de la séptima pandemia (hemisferio oriental); la clona de la costa del Golfo de México de los Estados Unidos; una clona australiana y otra de América Latina. Esta última es probablemente una variante de la séptima pandemia en el hemisferio occidental, mientras que la clona aislada en el Golfo de México evolucionó, aparentemente, en forma separada.

Con la finalidad de saber si existía una relación entre las cepas de *Vibrio cholerae* O1 toxigénicas aisladas desde el inicio de la epidemia de Latino América en 1991 con cepas de *Vibrio cholerae* O1 no toxigénicas, Evins *et al.* (45), mediante MLEE, ribotipificación y electroforesis de campos pulsados (PFGE) caracterizaron una colección de cepas *Vibrio cholerae* O1 aisladas en diferentes países del Hemisferio Occidental. Sus resultados mostraron que el cólera en América Latina no se podía atribuir a una sola clona diseminada sino, cuando menos a dos, las cuales fueron fácilmente distinguibles por los tres métodos utilizados.

Concluyeron también que la mayoría de las cepas no toxigénicas analizadas por ellos no estaban relacionadas genéticamente con las cepas toxigénicas de la epidemia latino americana.

En el caso de cepas no O1 de *Vibrio cholerae* asociadas con diarrea de tipo cólera, a la fecha, sólo aquellas del serotipo O139 parecen tener esta capacidad. En 1993, Shimada *et al.* (19) reportaron que las cepas O139 hibridaban con sondas específicas para los genes de la toxina colérica A y B.

En México, Cravioto *et al.* (20) demostraron que el genotipo multilocus de las cepas O139 que fueron aisladas en Tailandia era idéntico al del *Vibrio cholerae* O1 Ogawa biotipo El Tor aislado en México durante la epidemia de 1991.

En 1995, Coelho *et al.* (46) mostraron que los patrones de amplificación de los ISR en cepas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo Clásico, *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor y *Vibrio cholerae* O139 eran diferentes y, que por lo tanto, esta herramienta molecular era muy útil para el estudio epidemiológico de este tipo de microorganismo.

Nandi *et al.* (47, 48) en 1997 demostraron que las cepas *Vibrio cholerae* O1 y O139 epidémicas tenían nueve operones de *rrn*, mientras que las cepas de serotipos diferentes al O1 y al O139 tenían diez operones de *rrn*. El número de operones de *rrn* se ha relacionado

en forma directamente proporcional a la ventaja selectiva de supervivencia del organismo en ambientes que fluctúan constantemente.

Durante la migración del microorganismo de un ambiente “típico”, como es el agua, a otro “no típico”, como el intestino humano, la bacteria esta expuesta a una serie de cambios ambientales. La modulación observada en el número de operones de *rrn* puede ser necesaria para la sobrevivencia del organismo en el intestino humano, así como para mantener la plasticidad genómica mediada por rearrreglos en estos operones. Se ha sugerido que la posibilidad de que el genoma sufre rearrreglos que aumenta cuando hay más repeticiones de operones de *rrn*.

Con la finalidad de determinar el linaje de *Vibrio cholerae* O139, Faruque *et al.* (49) analizaron cepas representativas de este serogrupo aisladas en diferentes lugares del mundo, desde su aparición en 1992 y las compararon con una colección de *Vibrio cholerae* O1, no-O1 y no-O139 aisladas entre 1969 y 1999. Los resultados de este estudio mostraron que los vibrios O139 provenían de diferentes linajes y que este serogrupo aparentemente comprendía cepas epidémicas y no epidémicas derivadas de diferentes progenitores, ya sea *Vibrio cholerae* O1 o *Vibrio cholerae* no-O1, respectivamente.

A pesar de toda esta información quedan por resolver una serie de aspectos sobre la relación entre las características genéticas de poblaciones de *Vibrio cholerae* de diferentes serotipos, su capacidad para causar enfermedad y para diseminarse en el ambiente. El presente trabajo aborda algunos de estos aspectos.

## **Objetivo General**

Analizar la relación genética y epidemiológica de cepas de *Vibrio cholerae* de diferentes serotipos asociadas a cólera y enfermedades similares.

## **Objetivos Particulares**

Definir a través del sistema de enzimas multilocus los genotipos (ETs) de las cepas de *Vibrio cholerae*.

Construir con los ETs de cepas de *Vibrio cholerae* los dendogramas que permitan el análisis de las relaciones genéticas entre los diferentes serotipos de esta especie y su relación con el cólera y con otras enfermedades diarreicas en humanos.

Definir a través del sistema de PCR del RNA ribosomal de cepas de *Vibrio cholerae* los perfiles de polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP's).

Asociar los RFLP's de los productos de PCR del RNA ribosomal de cepas de *Vibrio cholerae* con los genotipos multilocus para determinar la relación en la filogenia de las cepas estudiadas.



## Material y Métodos

### Enzimas Multilocus (MLEE)

**Cepas de *Vibrio cholerae*.** El estudio se realizó con 397 cepas de *Vibrio cholerae* O1 y no O1 que forman parte del cepario del Laboratorio de Genómica y Epidemiología molecular del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

De estas 397 cepas, 143 pertenecían a la colección de cultivos del Instituto Nacional de Salud de Tokio, Japón, utilizadas como sistema de referencia serológica a nivel internacional. Las cepas de los serogrupos O1 (biotipos Inaba y Ogawa) a O83 fueron donadas por el Dr. Cheasty del Laboratorio Central de Salud Pública de Londres, Inglaterra, y aquellas de los serogrupos O84 a O140, y las cepas O155 y CA-385 fueron donadas por el Dr. Shimada del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón.

El resto de las cepas estudiadas fueron aisladas entre 1932 y 1993 de diferentes fuentes y en diferentes partes del mundo. Cinco cepas pertenecientes al serotipo O139 aisladas en Tailandia fueron proporcionadas por el Dr. Echeverría. Se utilizaron también cepas de *Vibrio cholerae* O1 El Tor obtenidas del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Estados Unidos, aisladas en Australia, Rumania, Perú y Louisiana; así como una cepa O139 de un caso de infección humana importado a los Estados Unidos en 1993 (Tabla 2).

Se estudiaron también 244 cepas aisladas entre de 1991 a 1995 en México y Guatemala: De estas, 191 cepas se aislaron en Sonora, Tabasco y otros 14 estados de la Republica Mexicana, las cuales fueron donadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) y los Laboratorios Estatales de Salud Pública de Sonora y de Tabasco. Las 53 cepas restantes fueron aisladas de humanos en Guatemala y donadas por el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (Tabla 2).

**Tabla 2. Procedencia de las cepas de *Vibrio cholerae* empleadas en este estudio.**

Cepas de México y Guatemala aisladas de 1991 a 1995		Cepas de Referencia de Japón Aisladas de 1932 a 1993		Cepas del centro de control y prevención de enfermedades (CDC)	
FUENTE	No.	FUENTE	No.	FUENTE	No.
Humanos	172	Humanos	118	Tailandia	5
Pozo y agua residual	41	Animales	13	Australia	1
Alimentos crudos <sup>1</sup>	15	Agua salobre	6	Rumania	1
Alimentos (otros) <sup>2</sup>	2	Agua marina	3	Perú	1
Ambiental (agua)	7	No estipulado	3	Louisiana (EUA)	1
No estipulado				Caso importado	1
TOTAL	244	TOTAL	143	TOTAL	10

<sup>1</sup> pescado

<sup>2</sup> vegetales

### **Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE)**

La técnica de enzimas multilocus se realizó según la metodología descrita por Selander *et al.* (24). Se estudiaron 17 loci de enzimas del metabolismo básico de bacterias para determinar la variación alélica: 6PG (6-fosfogluconato deshidrogenasa), G6P (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), IDH (isocitrato deshidrogenasa), NSP (nucleótido fosforilasa), ALD (alanina deshidrogenasa), SHK (shikimato deshidrogenasa), CAT (catalasa), LAP ((leucina aminopeptidasa), GOT (glutámico oxaloacético transaminasa), ME (enzima málica), MDH (malato deshidrogenasa), PLP (fenilalanil-leucina peptidasa), PGI (fosfoglucona isomerasa), HEX (hexokinasa), PGM (fosfoglucomutasa), IPO (indofenol oxidasa) y THD (treonina deshidrogenasa).

**Tabla 2. Procedencia de las cepas de *Vibrio cholerae* empleadas en este estudio.**

Cepas de México y Guatemala aisladas de 1991 a 1995		Cepas de Referencia de Japón Aisladas de 1932 a 1993		Cepas del centro de control y prevención de enfermedades (CDC)	
FUENTE	No.	FUENTE	No.	FUENTE	No.
Humanos	172	Humanos	118	Tailandia	5
Pozo y agua residual	41	Animales	13	Australia	1
Alimentos crudos <sup>1</sup>	15	Agua salobre	6	Rumania	1
Alimentos (otros) <sup>2</sup>	2	Agua marina	3	Perú	1
Ambiental (agua)	7	No estipulado	3	Louisiana (EUA)	1
No estipulado	7			Caso importado	1
<b>TOTAL</b>	<b>244</b>	<b>TOTAL</b>	<b>143</b>	<b>TOTAL</b>	<b>10</b>

<sup>1</sup> pescado

<sup>2</sup> vegetales

### **Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE)**

La técnica de enzimas multilocus se realizó según la metodología descrita por Selander *et al.* (24). Se estudiaron 17 loci de enzimas del metabolismo básico de bacterias para determinar la variación alélica: 6PG (6-fosfogluconato deshidrogenasa), G6P (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), IDH (isocitrato deshidrogenasa), NSP (nucleótido fosforilasa), ALD (alanina deshidrogenasa), SHK (shikimato deshidrogenasa), CAT (catalasa), LAP ((leucina aminopeptidasa), GOT (glutámico oxaloacético transaminasa), ME (enzima mállica), MDH (malato deshidrogenasa), PLP (fenilalanil-leucina peptidasa), PGI (fosfoglucona isomerasa), HEX (hexokinasa), PGM (fosfoglucomutasa), IPO (indofenol oxidasa) y THD (treonina deshidrogenasa).

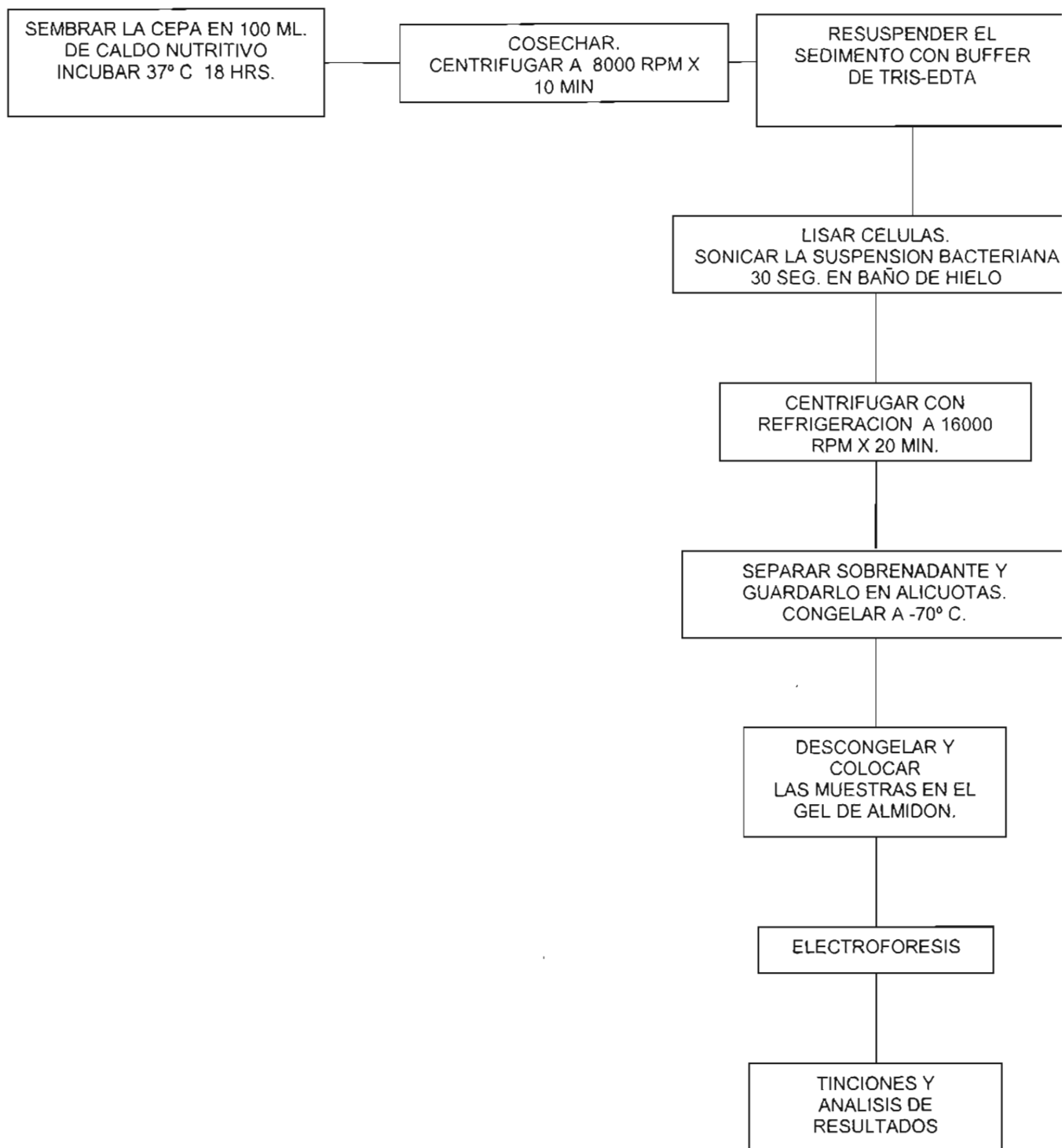
## **Cultivo de cepas *Vibrio cholerae* y preparación de extractos solubles de enzima**

Las cepas bacterianas se incubaron a 37°C y agitación (125 rpm) por 18 a 24 h. en 100 mL medio de infusión cerebro corazón (Bioxon) adicionado con NaCl al 1%, pH 8.6.

Se cosecharon los cultivos en botellas de 250 mL y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y a los botones celulares se les agregó 1.5 mL de amortiguador de cosecha (tris-EDTA) (apéndice I) resuspendiéndolos con pipetas Pasteur. Las suspensiones se mantuvieron en baño de hielo. Para el estudio electroforético se prepararon por separado extractos solubles de proteínas de cada una de las suspensiones bacterianas anteriormente mencionadas (Figura 2). Estas suspensiones se sonicaron en tubos cónicos de 15 mL mantenidos en baño de hielo con 30 pulsos de 1 segundo cada pulso. Las suspensiones se centrifugaron a 16,000 rpm por 20 min a 4°C. Los extractos (sobrenadantes) se dividieron en alícuotas y se congelaron a -70°C en criotubos hasta su uso.

Los extractos obtenidos se analizaron por electroforesis horizontal en geles de almidón de papa (Connaught Laboratories, Ltd). Para preparar el gel se utilizaron 48 g de almidón disueltos en 420 mL de un amortiguador específico (Tris-citrato pH 8 o Fosfato de potasio pH 6.7) para cada una de las enzimas que se deseaba analizar (Tabla 3).

La suspensión de almidón se calentó hasta ebullición en un matraz Erlen Meyer de 1 lt con golpeteos constantes y fuertes sobre las paredes del matraz (figura 3); posteriormente se desgasificó por 1 minuto (figuras 4 y 5) e inmediatamente se vació en un molde de acrílico (190mm x 210mm x 9mm), y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 2 horas. A término de este tiempo se envolvió con plástico (ega-pack) para evitar deshidratación. Los geles se utilizaron en las siguientes 24 h. después de su preparación.



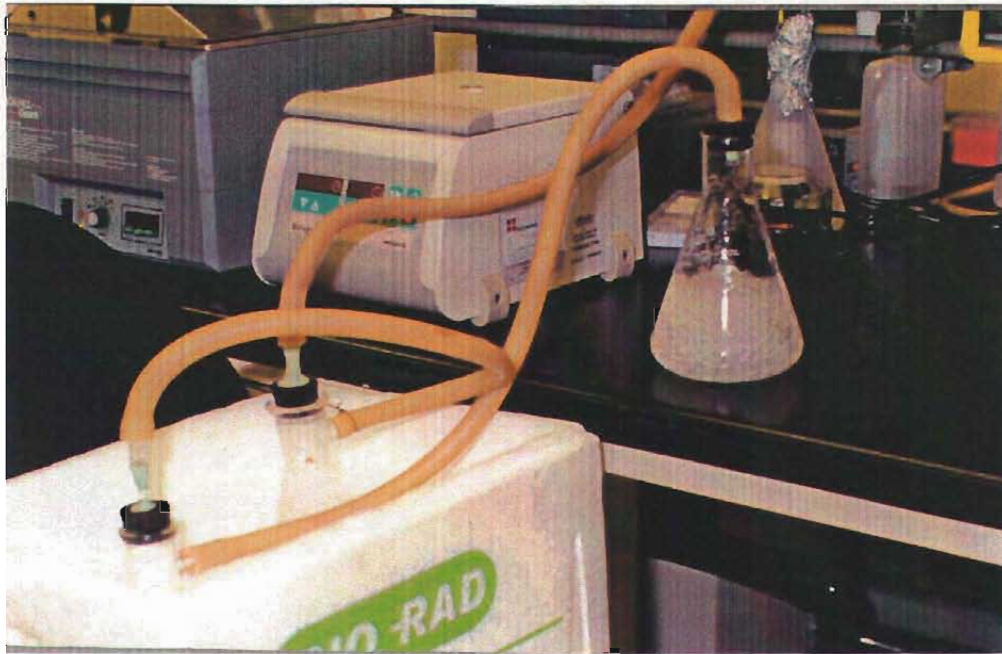
**Figura 2. Diagrama de flujo de la técnica de Enzimas multilocus (MLEE).**

**Tabla 3. Sistemas de amortiguadores para electroforesis de enzimas bacterianas.**

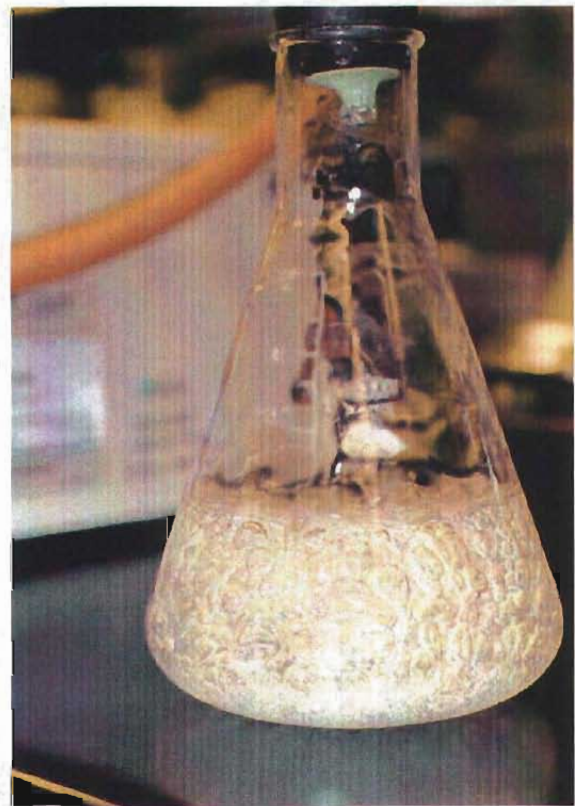
Sistema	Amortiguador para electroforesis	Amortiguador para geles	Voltaje
A	Tris-citrato pH 8.0	Tris-citrato pH 8.0 (dil. 1 :29)	120 V
B	Fosfato de potasio pH 6.7	Fosfato de potasio PH 7.0	100 V



**Figura 3. Ebullición de la suspensión de almidón para la preparación del gel.**



**Figura 4. Degasificación del almidón para evitar la formación de burbujas en el gel.**



**Figura 5. Degasificación del almidón.**



Para colocar las muestras, se hizo un corte horizontal en el gel a manera de carril (figuras 6 y 7), en el cual se colocaron pequeños trozos de papel filtro (Whatman 3) de 9mm x 5mm a intervalos de aproximadamente 3 mm de distancia entre ellos. Estos trozos de papel filtro se habían sumergido individualmente en las suspensiones de proteínas de cada cepa bacteriana (figuras 8 a 11).

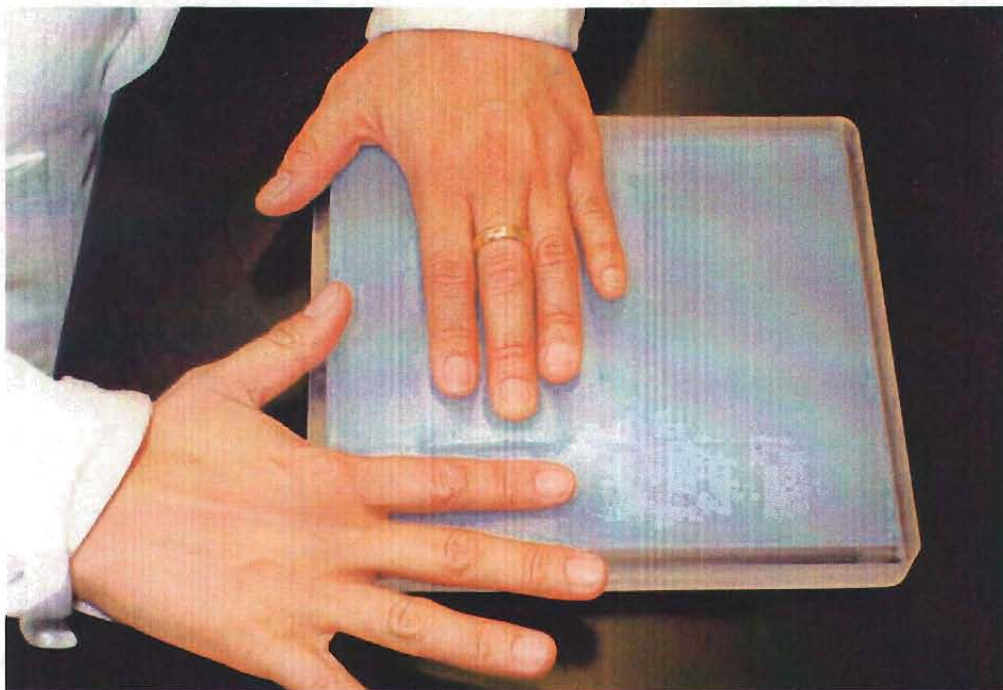
Estas muestras se mantuvieron siempre en baño de hielo para evitar una disminución en su actividad enzimática. Como marcador se utilizó una solución de amaranto, impregnada también en pequeños trozos de papel filtro colocados en los 2 extremos del gel.

Durante la electroforesis se mantuvo un voltaje constante, el cual dependía del sistema de amortiguador utilizado un máximo de 100 mA (Tabla 3, figura 12). Sobre cada gel se puso un recipiente con hielo para evitar su calentamiento durante la electroforesis.

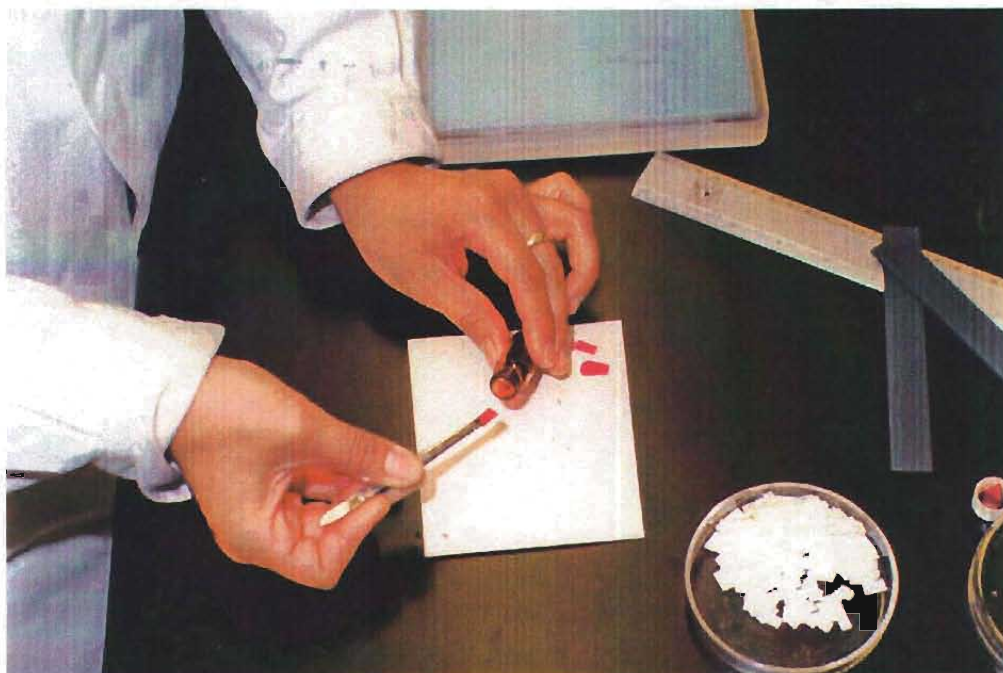


**Figura 6. Corte para la formación del carril en el gel de almidón.**

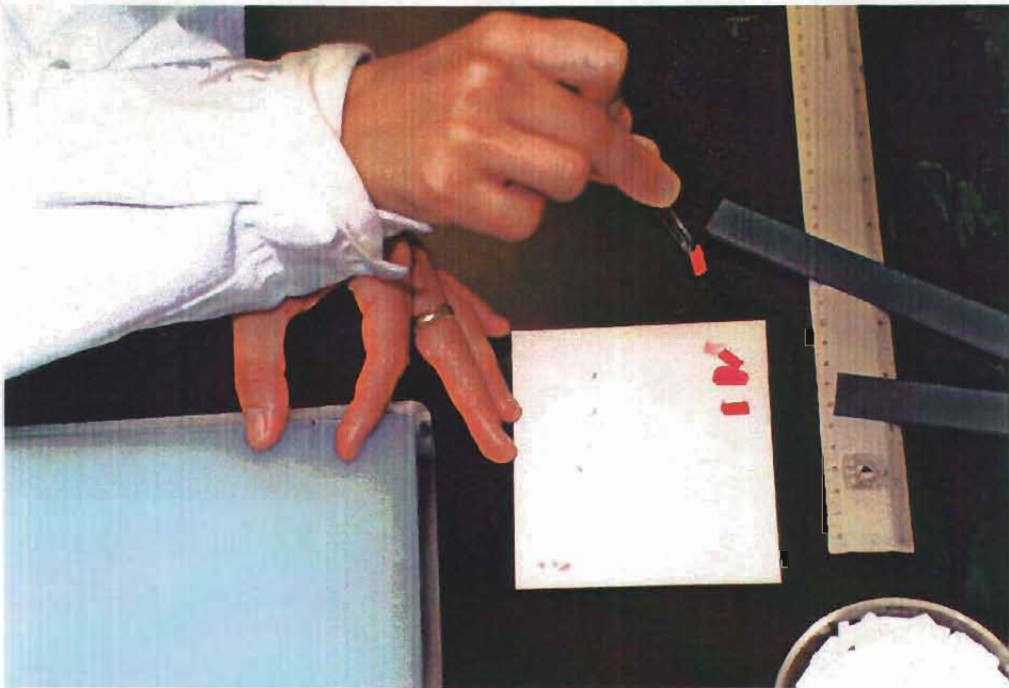




**Figura 7. Carril en el gel de almidón para colocar las muestras.**



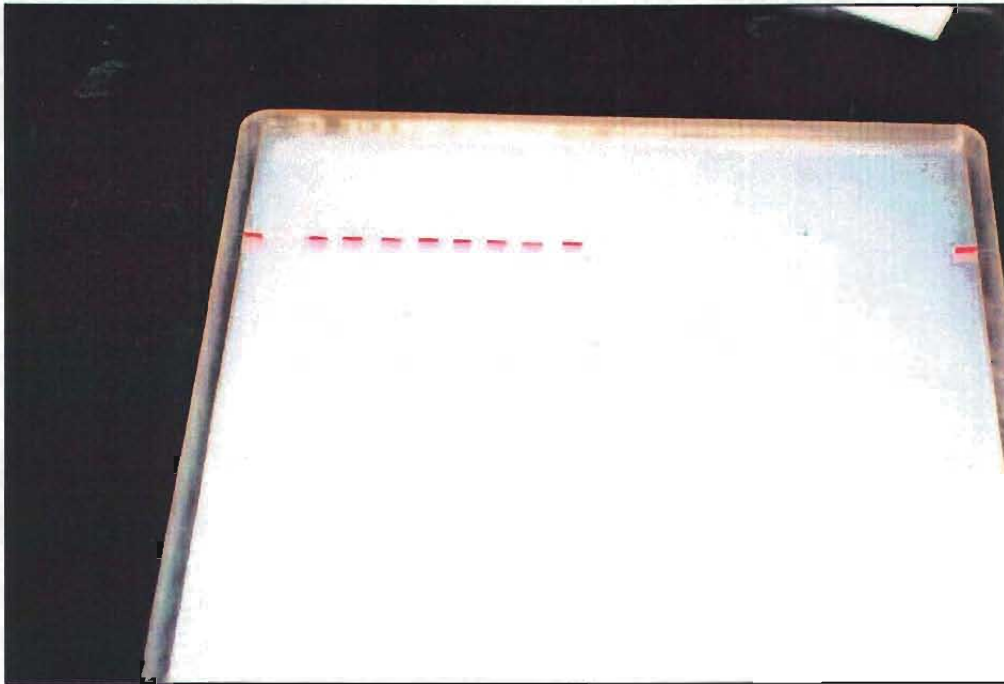
**Figura 8. Toma de la muestra con trozos de papel filtro.**



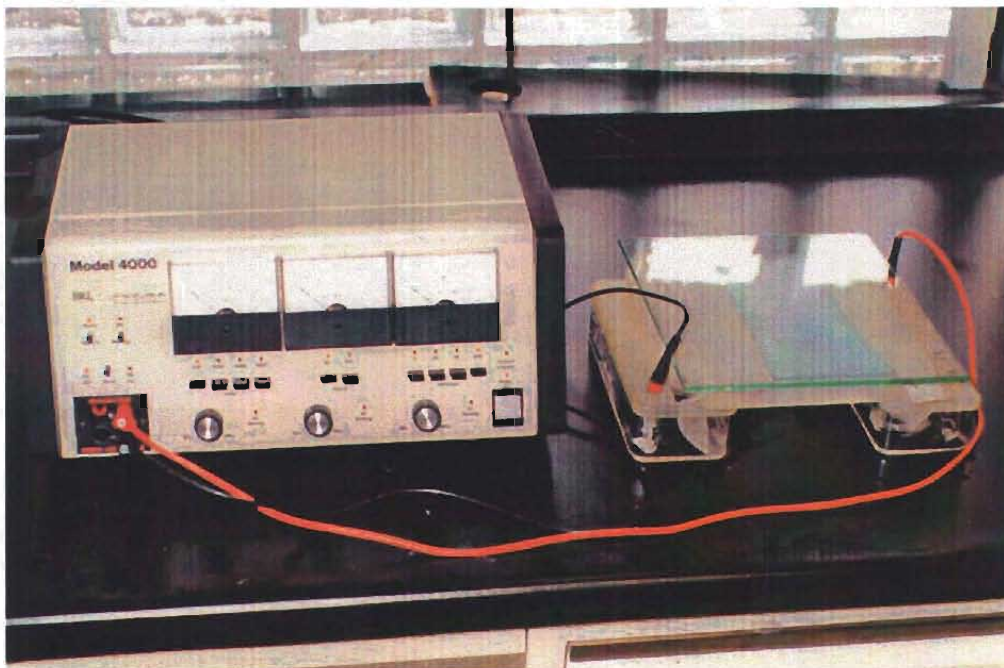
**Figura 9. Colocación de las muestras y marcadores en el carril del gel..**



**Figura 10. Colocación de las muestras y marcadores en el carril del gel.**



**Figura 11. Gel con las muestras listo para el corrimiento electroforético.**



**Figura 12. Electroforesis.**



Al término de este proceso el gel se cortó en 3 o 4 rebanadas horizontales de 1 mm de espesor (figura 13 y 14); cada una de las cuales se incubó con una solución que contenía el sustrato específico de la cada enzima analizada (Tabla 4) (apéndice I). Los geles se incubaron a 37°C en la oscuridad hasta la aparición de las bandas de las enzimas, y posteriormente se fijaron con una solución 1:5:5 de ácido acético, metanol industrial y agua.

El corrimiento electroforético de cada enzima (figuras 15 a 18) se analizó por comparación con la movilidad de las demás, tomando como estándar el corrimiento encontrado con mayor frecuencia (24).

### **Análisis computacional de datos**

Para el análisis de los datos se empleó un programa de cómputo para genética de poblaciones proporcionado por el Dr. Whittam. Este programa determina la distancia genética entre pares de aislados o tipos electroforéticos, calculando la proporción de loci en los cuales se presentan alelos distintos. Utilizando coeficientes de peso, se da mayor valor a las diferencias de los loci con menor variación que a los loci más polimórficos. Con la matriz de coeficientes de distancia genética se elaboró un dendograma para conocer la relación genética entre las cepas (24).

Este análisis dio como resultado una combinación de formas electroforéticas según el número de enzimas estudiadas, denominadas como perfiles electroforéticos o tipos electroforéticos (ETs), los cuales eran característicos y distinguían a cada una de las cepas estudiadas (24).

**Tabla 4. Enzimas, sistemas de amortiguadores y soluciones para tinción de enzimas.**

Enzima	Sistema amortiguador	Sustrato y enzimas acoplamiento	Amortiguador y sales tinción	Coenzima	Catalizador y colorante
ALD	A	DL-alanina 50mg (A7627) <sup>a</sup>	fosfato de sodio pH 7 50 mL	NAD (127981) <sup>b</sup> 2mL	PMS (P3876) <sup>a</sup> 0.5mL MTT 1 mL
G6P	A	Glucosa 6-fosfato (G7250) <sup>a</sup> 100mg	Tris-HCl pH 8 50 mL MgCl <sub>2</sub> 1 mL	NADP (128058) <sup>b</sup> 1mL	PMS 0.5mL MTT(M2128)1 mL
6PG	A	Ácido 6-fosfogluónico (P 7627) <sup>a</sup> 10 mg	Tris-HCl pH 8 20 mL MgCl <sub>2</sub> 0.1 M 10 mL	NADP 1mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
IDH	A	Ácido isocítrico (I 1252) 50 mg	Tris -HCL pH 8 50 mL MgCl <sub>2</sub> 2mL	NADP 1mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
MDH	B	DL ácido málico pH 7 (M0875) 6 mL	Tris- HCL pH 8 50 mL	NAD 2mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
ME	B	DL ácido málico pH 7 6 mL	Tris- HCL pH 8 50 mL MgCl <sub>2</sub> 2mL	NADP 1.5mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
SHK	A	RT ácido shikimico	Tris -HCL pH 8 50 mL MgCl <sub>2</sub> 2mL	NADP 1.5mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
THD	A	L-treonina (T8625) 50 mg	Tris- HCL pH 8 50 mL	NAD 2 mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
IPO <sup>c</sup>	B		Tris- HCL pH 8 50 mL MgCl <sub>2</sub> 2mL	NAD 2 mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
CAT <sup>c</sup>	B	Ver apéndice I			

<sup>a</sup> número de catálogo de Sigma

<sup>b</sup> número de catálogo de Boehringer Mannheim GmbH

<sup>c</sup> ver apéndice I

**Tabla 4. Enzimas, sistemas de amortiguadores y soluciones para tinción de enzimas.**

**Continuación.**

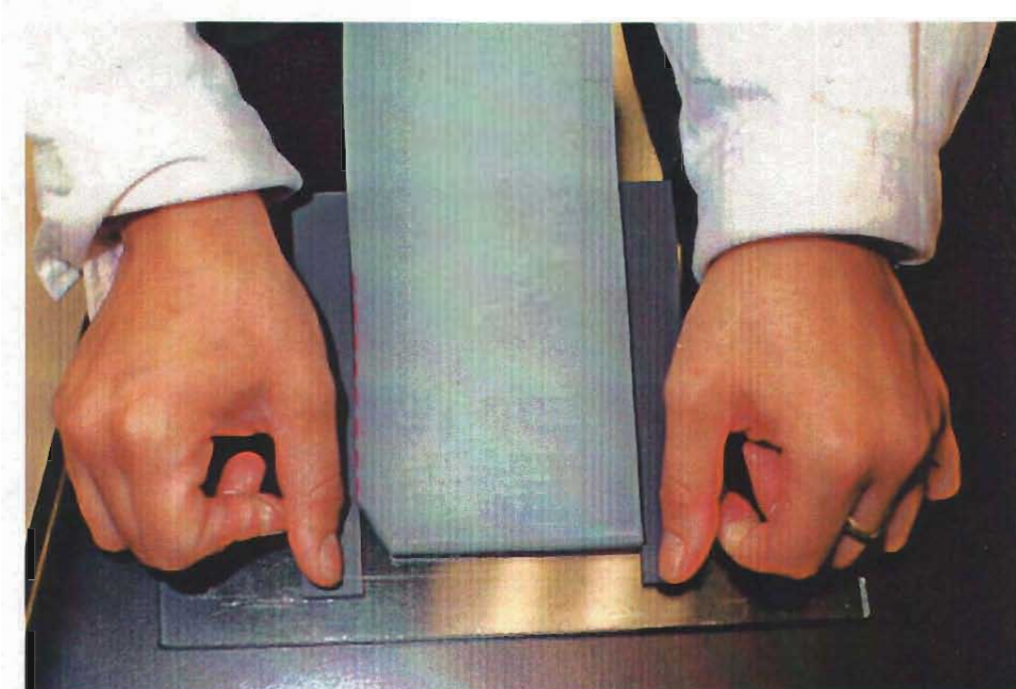
Enzima	Sistema amortiguador	Sustrato y enzimas acoplamiento	Amortiguador y sales tinción	Coenzima	Catalizador y colorante
GOT	B	Piridoxal-5'-fosfato (P9255) <sup>a</sup> 1 mg Ácido L-aspártico 50 mg Ácido α-cetoglutarico (K1750) 100mg	Tris -HCL pH 8 50 mL		Fast Blue BB 100 mg
HEX <sup>c, d</sup>	B	D-glucosa (G7250) 200mg ATP (A5394) 50 mg Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa(G8878) <sup>a</sup> 1mL	Glycyl-glicina pH 7.5 25 mL MgCl <sub>2</sub> 2mL	NADP 1mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
NSP <sup>c, d</sup>	A	Inosina (I 4125) <sup>a</sup> 20 mg Xantina oxidasa (X1875) 1 mL	Fosfato de sodio pH 7 25mL.		PMS 0.5mL MTT 1 mL
PGM	B	Glucosa-1-fosfato y glucosa-1, 6-difosfato (G1259) <sup>a</sup> 5 mL Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5 mL	Tris-HCL pH 8 5 mL Agua desionizada 25 mL MgCl <sub>2</sub> 5 mL	NADP 0.5 mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL
LAP	B	L-leucil-β-naftylamida-HCl (L0376) <sup>a</sup> 30mg	fosfato de potasio pH 5.5 50 mL MgCl <sub>2</sub> 1mL		"Fast Black K" (F7263) 30 mg
PLP <sup>c, d</sup>	B	L-fenilalanyl-L-leucina 20 mg Peroxidasa (P8125) 10 mg Veneno de víbora (V7000) 10 mg	Tris-HCL pH 8 25 mL MnCl <sub>2</sub> 0.25M 0.5 mL		<i>o</i> -dianisidina (D3252)10 mg
PGF <sup>c, d</sup>	B	Fructosa-6-fosfato (F3627) 10 mg Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.3mL	Tris-HCL pH 8 25 mL MgCl <sub>2</sub> 0.3 mL	NADP 0.6 mL	PMS 0.5mL MTT 1 mL

<sup>a</sup> número de catálogo de Sigma

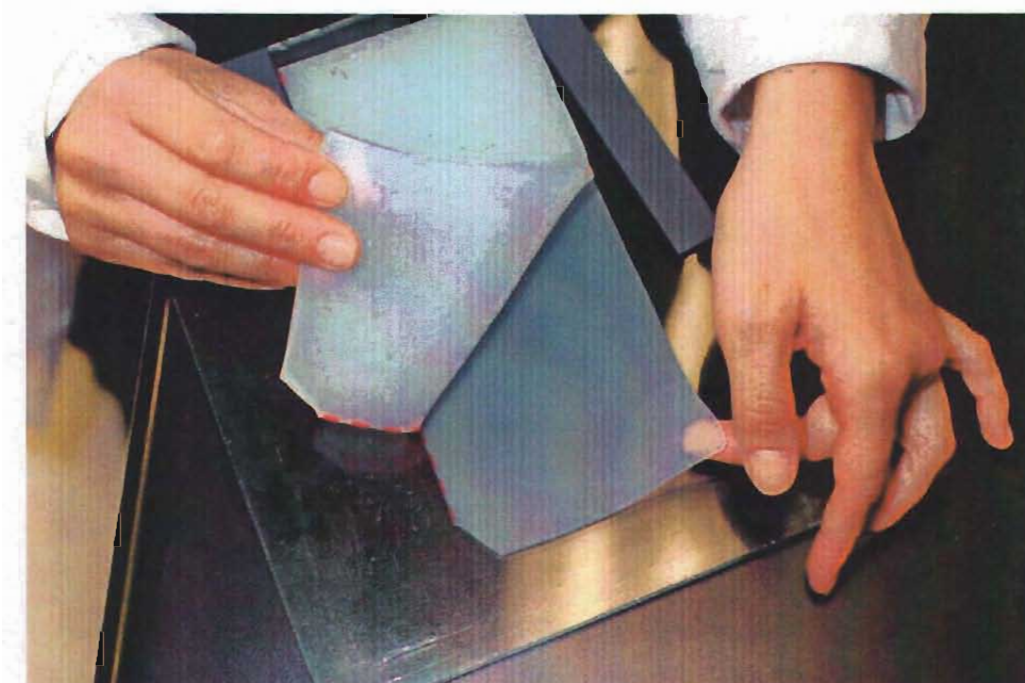
<sup>b</sup>número de catálogo de Boehringer Mannheim GmbH

<sup>c</sup> ver apéndice I

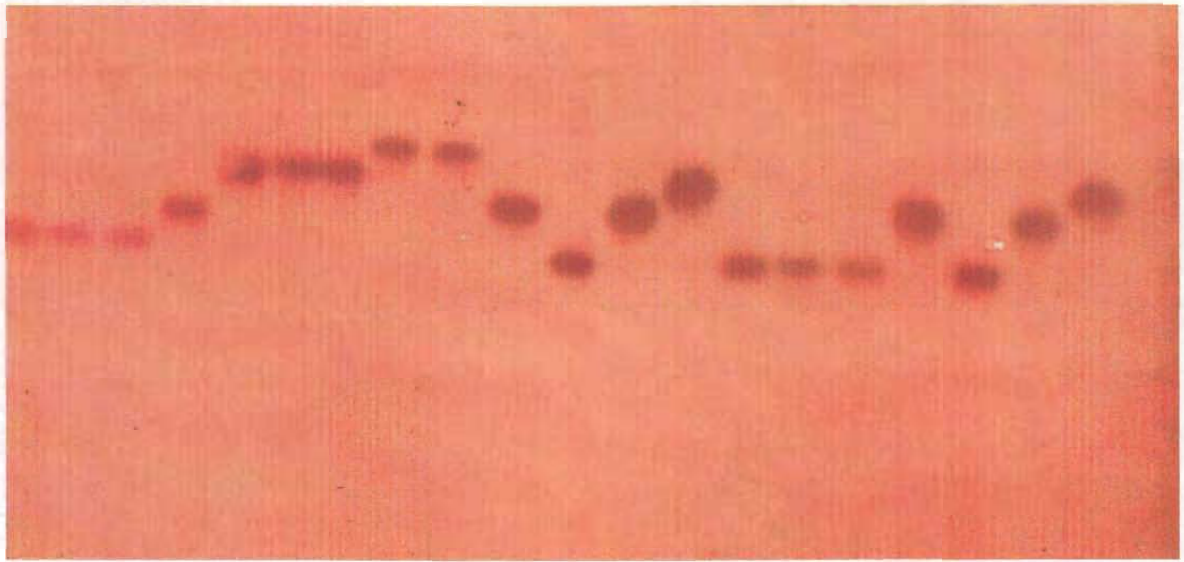
<sup>d</sup>tinción con Agar-agar



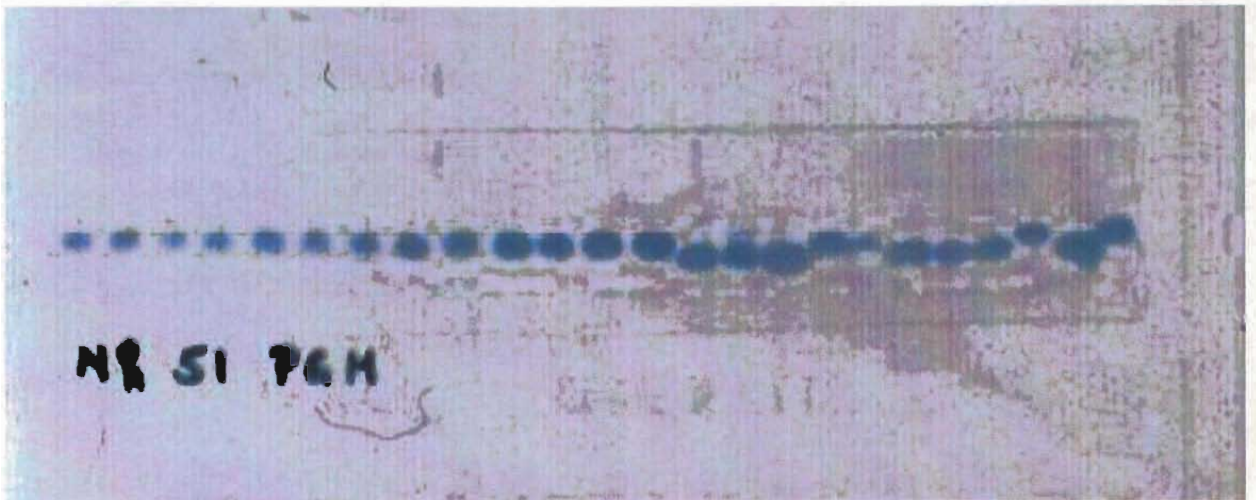
**Figura 13. Corte horizontal del gel.**



**Figura 14. Cortes horizontales del gel de 1 mm de espesor.**



**Figura 15. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima leucina amino peptidasa.**



**Figura 16. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima fosfoglucomutasa.**



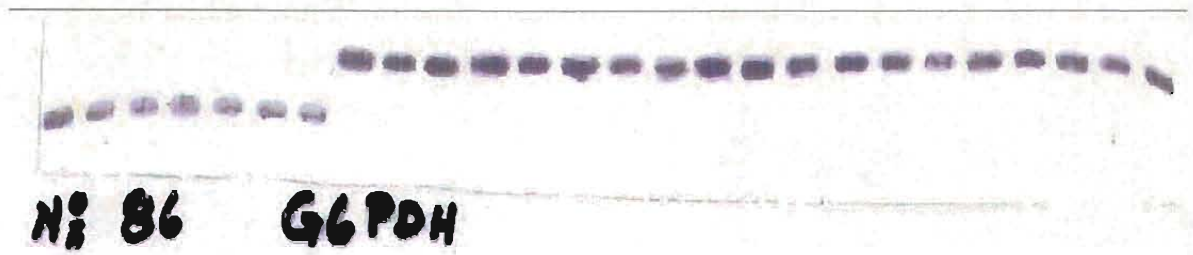


Figura 17. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

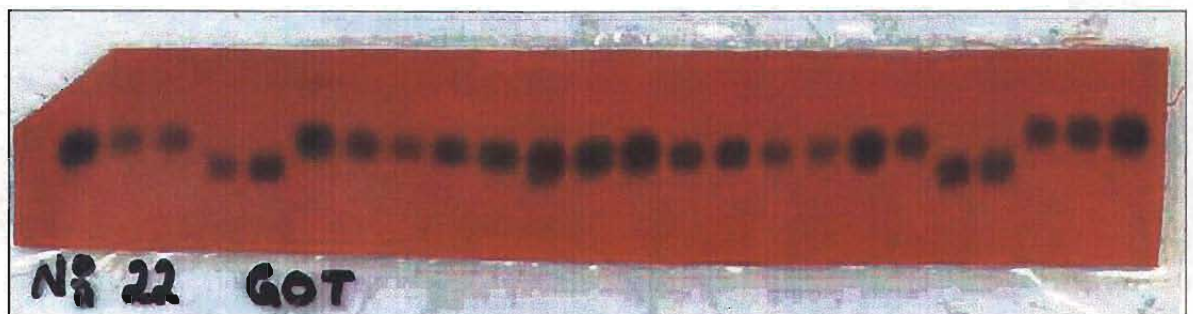


Figura 18. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima transaminasa glutámico oxaloacética.



Figura 19. Corrimiento electroforético y tinción de la enzima fenilalanil leucina peptidasa.

## PCR-Ribotipificación.

Sobre la base de los resultados obtenidos con la técnica de MLEE se eligió un grupo de cepas de *Vibrio cholerae* para esta parte del estudio. Las cepas analizadas por PCR-Ribotipificación pertenecían tanto al cluster epidémico de cepas del serotipo O1 epidémicas, como a *Vibrio cholerae* no O1 de diferentes serotipos que tenían un mismo genotipo multilocus (Tabla 5).

**Cultivo de *Vibrio cholerae* y extracción de DNA cromosómico.** Las cepas seleccionadas para PCR-Ribotipificación se cultivaron por separado a 37°C durante 18 a 24 h en 5 mL de caldo Luria Bertani (Gibco BRL) con 1% de NaCl a pH 8.6. La extracción de DNA cromosómico se realizó utilizando una modificación del método de Albert *et al.* (14).

1. El cultivo bacteriano se cosechó por centrifugación durante 3 min a 15 000 rpm en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y descartó el sobrenadante.
2. El botón bacteriano se resuspendió en 567  $\mu$ L de TE (Tris-EDTA). Se añadieron 30  $\mu$ L de SDS al 10% y 3  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL), con una concentración final de 100  $\mu$ g/mL de proteinasa K en 0.5% de SDS. Se mezcló suavemente e incubó 1h a 37°C.
3. Se añadió a esta suspensión 100  $\mu$ L de NaCl 5M y se mezcló suavemente antes de agregar 80  $\mu$ L de CTAB/NaCl (apéndice II). La mezcla se homogenizó suavemente y se incubó por 10 min a 65°C.
4. Se agregaron posteriormente 550  $\mu$ L de cloroformo /alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente y se centrifugo por 5 min a 14,000 rpm.
5. Se recuperó el sobrenadante (evitando romper o mezclar la interfase con el sobrenadante) y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio. Se agregó posteriormente un volumen igual de una solución de fenol /cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló suavemente antes de centrifugarse por 5 min a 14,000 rpm.

6. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio y se agregaron aproximadamente 0.6 mL de isopropanol del volumen total para precipitar el DNA. Se agitó suavemente hasta que se observó la precipitación del ácido nucleico. Se colocó el tubo en hielo para inducir una precipitación total. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 seg para obtener un botón del DNA. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 100  $\mu$ L etanol al 70%, con la finalidad de eliminar el CTAB y otros contaminantes remanentes en el DNA y se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 20 seg. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente.
7. El DNA se disolvió en 100 $\mu$ L agua desionizada estéril.
8. Por último, 5 $\mu$ L de cada preparación de DNA se mezclaron con 3 $\mu$ L de amortiguador de carga (solución de azul de bromofenol-sacarosa) (apéndice II) para realizar un corrimiento a 100 volts por 45 min. en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

**Tabla 5. Cepas de *Vibrio cholerae* para PCR-Ribotipos.**

ET	FMU	SEROGRUPO	LUGAR Y FECHA	FUENTE
196	88554	O15	India (1968)	Humano
	88586	O47	India (1973)	Humano
	88590	O51	India (1973)	Humano
	88592	O53	India (1974)	Humano
	88607	O68	Japón (1978)	Agua mar
	87242	O7	Campeche(1992)	Agua pozo
	256	88613	O74	India (1979)
87250		NT	Hidalgo (1991)	Humano
87264		NT	Veracruz(1991)	Humano
128	88561	O22	India (1968)	Humano
	88228	O22	CDC	
131	87268	O6	Campeche(1991)	Humano
	88573	O34	India (1968)	Humano
247	88729	O14	Guatemala(1993)	Humano
	88631	O92	Japón (1987)	Agua río
73	87311	O68	Tabasco (1992)	Humano
	88562	O23	India (1971)	Humano
5	88565	O26	Filipinas(1972)	Humano
	88576	O37	India (1969)	Humano
129	88641	O102	China (1988)	Humano
	88669	O130	India (1981)	Humano
65	88643	O104	China (1988)	Humano
	88664	O125	India (1981)	Humano
	88671	O132	Tailandia(1981)	Humano
	87271	NT	Guerrero (1991)	Humano
	88366	O41	Sonora (1993)	Fosa séptica
	88374	O35	Sonora (1993)	Agua residual
	88351	O42	Sonora (1993)	Pescado
	87282	O24	Veracruz(1991)	Humano
	87434	O24	Tabasco (1992)	Humano
	87240	O5	Campeche(1992)	Agua de pozo
	87304	O62	Tabasco (1992)	Humano
	87295	O79	Zacatecas(1991)	Humano
	88371	O29	Sonora (1993)	Agua residual
	88766	O62	Guatemala(1993)	Humano
	88769	O29	Guatemala(1993)	Humano
	88678	O139	India (1993)	Humano
	87395	O1 Inaba Clásica	Quintana Roo(1983)	Humano
88696	O1 Inaba El Tor	Luisiana USA(1978)	Humano	
90500	O1 Inaba El Tor	Tabasco (1995)	Humano	
88538	O1 Ogawa El Tor	India (1941)	Humano	
88215	O1 Ogawa El Tor	Tabasco (1993)	Humano	
87772	O1 Inaba El Tor	India (1942)	Humano	
88539	O1 Inaba El Tor	DEPT(1991)	Humano	
87258	O1 Inaba El Tor	Teacal(1991)	Humano	
88699	O1 Inaba El Tor	Perú(1991)	Humano	

### Amplificación por PCR del 16S-23S RNA ribosomal y espacio intergénico.

Para la amplificación por PCR de los genes 16S-23S y su espacio intergénico se utilizaron los iniciadores reportados por Ibrahim *et al.* (50):

16S: 5'GAG TTT GAT CCT GGC TCA 3'

23S: 5'CCC GTC CTC TCG TAC T 3'.

Estas secuencias se alinearon con las secuencias del RNA ribosomal de *Vibrio cholerae* reportadas en el banco de genes del NCBI.

La amplificación del DNA se realizó en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ , la mezcla de PCR para cada una de las amplificaciones consistió en:

Reactivos	por tubo
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	26 $\mu\text{L}$
amortiguador 2 expand	6 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	0.5 $\mu\text{L}$
DNTP's	4 $\mu\text{L}$
Oligo 1	1.5 $\mu\text{L}$
Oligo 2	1.5 $\mu\text{L}$
Taq	0.2 $\mu\text{L}$
"Expand" *	0.3 $\mu\text{L}$
DNA	10 $\mu\text{L}$

\*"Expand" (Boehringer Mannheim)

La concentración de cada uno de los reactivos fue la siguiente: "amortiguador 2" 10X (Boehringer Mannheim) ( 200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 22.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL), 10 mM de cada uno de los desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (Applied Biosystems), 30 pmol de cada uno de los iniciadores (Oligo 1 y

Oligo2), 1 unidad de Taq polimerasa (Gibco BRL), 1.5 unidades de enzima "Expand" (Boehringer Mannheim) y 10 µl del DNA bacteriano (≈10 ng /µL), por último la mezcla de reacción se cubrió con 2 gotas de aceite mineral ligero y se procedió a la amplificación.

La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 480 bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 80°C por 5 minutos, temperatura de desnaturalización 94°C por 1 minuto 30 seg; temperatura de alineación 57°C por 1 minuto 30 seg; temperatura de extensión 72°C por 2 minutos 30 segundos, el proceso se repitió 30 ciclos y por último 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

Se estudiaron por electroforesis horizontal 5 µL de los productos amplificados en geles de agarosa al 1 % con amortiguador TBE 0.5X. Los productos de PCR se corrieron en paralelo con un marcador de peso molecular de 1 Kb.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

### **Restricción enzimática de los productos de PCR con enzimas y detección de los perfiles polimórficos de fragmentos largos de restricción (RFLP's).**

Antes de proceder a la digestión de los productos amplificados se realizó un análisis de restricción exhaustivo de las secuencias del operón del RNA ribosomal ya reportadas en el banco de genes del NCBI.

Con la finalidad de encontrar polimorfismo en el operón de RNA ribosomal de *Vibrio cholerae* se utilizaron las siguientes enzimas de restricción (Gibco BRL):

<i>A</i> l $\pi$	A↓CRYGT
<i>D</i> deI	C↓TNAG
<i>H</i> aeII	RGCGC↓Y

<i>Hha</i> I	GCG↓C
<i>Hpa</i> I	GTT↓AAC
<i>Hin</i> II	G↓ANTC
<i>Mbo</i> I	↓GATC
<i>Nci</i> I	CC↓SGG
<i>Rsa</i> I	GT↓AC
<i>Taq</i> I	T↓CGA

La restricción de los productos de PCR se realizó según los siguientes reactivos, concentraciones y volúmenes:

Reactivos	Volumen
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	3μL
amortiguador 10x	2μL
Enzima 10U	1μL
PPCR	15μL

La mezcla de restricción se preparó en tubos Eppendorf de 0.5 μL y se incubó por 18 horas a 37°C en baño de agua. Se determinaron los diferentes RFLP's mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida (18cm x 18 cm y 1 mm de espesor) al 8% con amortiguador TBE 0.5X (apéndice II).

Se tomaron 10 μl de cada una de los productos de restricción y se mezclaron con amortiguador de carga antes de depositarse en los diferentes pozos. Se corrieron en paralelo con su respectivo producto de PCR sin digerir y con un marcador de peso molecular de 123 pb. La electroforesis se realizó por aproximadamente 6 horas a 100 volts y 100 mA hasta que el amortiguador de carga salió totalmente del gel para así obtener una buena separación de las bandas.

Finalizada la electroforesis el gel se fijó durante 18 h en una solución de etanol 50%: ácido acético 5%. Se lavó 4 veces (30 minutos cada uno) con agua desionizada y agitación suave y se procedió a realizar la tinción de plata (Gelcode Pierce) a temperatura ambiente por 1 hora con agitación suave (apéndice II).

Se desecharon las soluciones y el gel se lavó 2 veces por 10 segundos con agua desionizada, para eliminar el exceso de  $\text{AgNO}_3$ . Para el revelado, se agregó una mezcla de solución reductora y solución de aldehído (apéndice II) y, se incubó el gel hasta que aparecieron las bandas sobre un fondo de color ámbar claro. Se desechó la solución y se enjuagó el gel dejándolo por un máximo de 1 hora en una solución estabilizadora con agitación suave.

Por último, los geles se lavaron con agua desionizada y se les agregó solución fijadora. Cada uno de los geles se leyeron en escáner de alta resolución Sharp JX-610. Los resultados se analizaron con el programa “Whole Band Analyzer” de Bio Image. La construcción del dendograma se realizó con el método UPGMA.

### **Amplificación por PCR del espacio intergénico (ISR) de RNA ribosomal.**

Para la amplificación por PCR del ISR de los genes 16S-23S se diseñaron los iniciadores con base a la secuenciación del genoma de *Vibrio cholerae* (AE003852 y AE003853) reportado en el gene bank del NCBI:

16S: 5' CTG GGG TAG AGT CGT AAC AAG 3'

23S: 5' TTA GTA CGT CCT TCA TCG CCT CTG 3'

Estos iniciadores van de la posición 1478 a 1498 de la región 3' del gen 16S a la posición 42 a 63 de la región 5' del gen 23S ambos iniciadores fueron diseñados sobre las secuencias más conservadas de cada uno de los genes.



La amplificación del DNA se realizó en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ , la mezcla de PCR para cada una de las amplificaciones consistió en:

<b>Reactivos</b>	<b>por tubo</b>
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	32.8 $\mu\text{L}$
amortiguador con MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu\text{L}$
dNTP's (10mM)	1 $\mu\text{L}$
Oligo 1	0.5 $\mu\text{L}$
Oligo 2	0.5 $\mu\text{L}$
Taq	0.2 $\mu\text{L}$
DNA	10 $\mu\text{L}$

La concentración de cada uno de los reactivos fue la siguiente: amortiguador 10X para PCR (Gibco BRL) (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP's (Applied Biosystems) 10 mM (mezcla de trabajo 10mM de cada uno de los desoxinucleótidos dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 30 pmol de cada uno de los iniciadores (Oligo 1 y Oligo2), 1 unidad de Taq polimerasa (Gibco BRL), 10  $\mu\text{L}$  del DNA bacteriano ( $\approx 1 \text{ ng} / \mu\text{L}$ ), por último la mezcla de reacción se cubrió con 2 gotas de aceite mineral ligero y se procedió a la amplificación.

El PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 480 bajo las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización 94°C por 2 minutos; temperatura de alineación 58°C por 30 seg.; temperatura de extensión 72°C por 1 minuto, el proceso se repitió 30 ciclos y por último 1 ciclo a 72°C por 4 minutos.

Se estudiaron por electroforesis horizontal 5  $\mu\text{L}$  de los productos amplificados en geles de agarosa al 1 % con amortiguador TBE 0.5X. Los productos de PCR se corrieron en paralelo con un marcador de peso molecular de 100 pb.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

## RESULTADOS.

### Enzimas Multilocus (MLEE).

Con objeto de estudiar la relación genética entre cepas de *Vibrio cholerae* pertenecientes a diferentes serotipos aisladas de humanos y del ambiente se realizó un estudio para determinar los genotipos multilocus de 397 cepas de *Vibrio cholerae*. Estas 397 cepas incluían las primeras 143 cepas tipo del total de 193 que forman el sistema de referencia serológica para *Vibrio cholerae* establecido por Shimada *et al.* (5, 6). El resto lo conformaban 10 cepas del serogrupo O1 provenientes de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta Georgia, EUA y 244 cepas de *Vibrio cholerae* aisladas en México y Guatemala. De estas 244 cepas, 230 (58% del total) pertenecían a 59 serogrupos y las 14 cepas restantes no pudieron ser tipificadas con el esquema actual. Las cepas aisladas en México y Guatemala representaban, por lo tanto, el 30% de la diversidad de serotipos presentes en el estudio.

Se escogieron y analizaron los mismos 17 loci genéticos en cada cepa. Todos los loci fueron polimórficos, con un promedio de 9.5 alelos por locus (Tabla 6). Se encontró un total de 279 ETs en las 397 cepas estudiadas. Cada uno representado por un perfil de alelos característico. Las cepas aisladas en México y Guatemala aportaron 146 de los 279 ETs y las cepas del sistema de referencia serológica para *Vibrio cholerae* aportaron los 133 ETs restantes. Estos resultados sugieren que la población estudiada fue muy diversa.

La figura 20 muestra las distancias genéticas entre los 279 ETs encontrados. De ellos, 275 se agruparon en dos divisiones principales (I y II), las cuales divergen entre sí en una distancia de 0.7, correspondiente a 11 locus diferentes. Los 4 ETs restantes fueron los que formaron los linajes “x” y “y”, los cuales divergen a una distancia de 0.9, lo cual indica que las cepas que conformaron estos últimos 4 ETs tenían poca relación entre sí, así como con el resto de las cepas estudiadas. La media de la diversidad genética por locus para los 279 ETs fue de 0.436.

La división I, integrada por la mayoría de las cepas de *Vibrio cholerae* estudiadas estuvo formada por 6 grupos (subdivisiones Ia-If) (Tabla 6).

La subdivisión Ia la constituyeron 214 ETs, pertenecientes a 316 cepas. Esta subdivisión presentó tres conglomerados (*clusters*): A, B y C (figuras 21, 22 y 23), a los cuales correspondieron 204 de los 214 ETs. Estos tres conglomerados divergen entre sí en una distancia genética de 0.4. Las subdivisiones Ib y If estaban conformados por una cepa del serogrupo O8 y del serogrupo O56, respectivamente, cada una con un solo ET.

**Tabla 6. Diversidad genética de *Vibrio cholerae* por locus basada en los ETs.**

Muestra	Número de Cepas	ETs	Media del número alelos	H <sup>a</sup>
Colección cepas				
Total	397	279	9.5	0.436
División I y II	392	275	7.5	0.421
División I	380	263	6.7	0.397
Subdivisión Ia				
Rama A	103	37	3.4	0.297
Rama B	148	123	4.8	0.309
Rama C	55	44	3.3	0.274
Subdivisión Ic	51	40	3.2	0.384
División II	12	12	2.8	0.375

<sup>a</sup>H media de la diversidad genética por locus.

La subdivisión Ic estaba formada por 51 cepas distribuidas en 40 ETs. De estos, 8 pertenecían a cepas de los serogrupos O50, O75, O78, O82 y O126, provenientes de la India, una cepa O155 aislada en Tailandia y las cepas O92 y OI07, aisladas en Japón. Las cepas restantes de esta subdivisión la formaban aislamientos de México y Guatemala. La subdivisión Id estaba conformada por 8 cepas en 3 ETs. De estas, 7 cepas aisladas en México y Guatemala no pudieron ser tipificadas con el esquema utilizado y la octava era

una cepa aislada en la India perteneciente al serotipo O74. La subdivisión Ie estaba formada por una sola cepa de *Vibrio cholerae* O1 Inaba, El Tor (ET 259) aislada en 1942 en India. Esta cepa estaba muy alejada del conglomerado, conformado por las demás cepas pertenecientes a los serotipos O1 y O139 (Figura 21).

La figura 21 muestra 37 ETs en total (rama A), con un conglomerado muy compacto formado por 4 ETs donde se localizan todas las cepas del serogrupo O1 y O139. El ET 2 incluía una cepa Inaba, El Tor (CDC 2164-78) aislada en Louisiana (EUA) en 1978 y otra cepa O1 Inaba biotipo Clásico aislada en 1983 de un turista que había regresado recientemente a Estados Unidos de Cancún, México. Este ET parece, por lo tanto, ser una clona endémica de la costa del Golfo de México.

El ET 3 estuvo conformado por dos cepas O1 Inaba El Tor aisladas de humanos en Tabasco, México entre 1991 y 1993, 38 cepas O1 Ogawa, El Tor, aisladas en México en los estados de Tabasco, Morelos y el Estado de México, una cepa aislada en Australia y otra en Rumania. Este grupo representaba el conglomerado de la séptima pandemia o sea la clona diseminada en México y América Central e identificada en México, a partir de 1991.

El ET 4 estaba representado por 13 cepas O1 Inaba, El Tor, 11 aisladas en México (Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Veracruz, Puebla e Hidalgo), una aislada en Guatemala y otra en el Perú. El ET 4 era la clona original causante de la epidemia en el Continente Americano que se presentó en 1991.

La diferencia entre los ET 2, 3 y 4 (tabla 7, figura 21), estuvo dada por uno solo de los 17 locus estudiados: la leucil-amino-peptidasa (LAP). Por tal motivo, la distancia genética entre estos ETs fue de 0.05. La cepa O1 Ogawa, El Tor aislada en Tabasco y representada por el ET 3.1, difirió del ET 3 en el alelo de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6P).

Las cepas de los serogrupos O37 (India) y O102 (China) pertenecían al ET 5 (tabla 7, figura 21) el cual difiere en un solo locus, la fosfogluconato isomerasa (PGI), del conglomerado

epidémico O1/O139. Una segunda cepa O37 aislada en Guatemala pertenecía al ET 6, el cual difería del ET 5 en uno solo de sus locus, la enzima transaminasa glutámico oxaloacética (GOT). Otras dos cepas O37 aisladas de agua de pozo en Campeche estaban muy alejadas genéticamente del ET 5.

**Tabla 7. Perfiles alélicos de enzimas multilocus del conglomerado A.**

ET	Serogrupo	N	6 P G	G 6 P	I D H	N S P	A L D	S H K	C A T	L A P	G O T	M E	M D H	P L P	P G I	H E X	P G M	I P O	T H D
2	O1 <sup>a</sup>	2	3	4	3	3	3	1	3	4	3	3	2	4	3	3.5	3	3	1
3	O1 <sup>b</sup> /O139	47	3	4	3	3	3	1	3	3	3	3	2	4	3	3.5	3	3	1
4	O1 <sup>c</sup>	13	3	4	3	3	3	1	3	4.5	3	3	2	4	3	3.5	3	3	1
3.1	O1 <sup>d</sup>	1	3	3.8	3	3	3	1	3	3	3	3	2	4	3	3.5	3	3	1
5	O37/O102	2	3	4	3	3	3	1	3	4	3	3	2	4	4	3.5	3	3	1
<b>Subdivisión Ie</b>																			
259	O1 <sup>e</sup>	1	3.5	2	3	3	0	1	1	4.5	3	3	2	5	3	1	3	3	1

<sup>a</sup> una cepa O1 Inaba, Clásica y una cepa O1 Inaba, El Tor.

<sup>b</sup> 38 aislados O1 Ogawa, El Tor, 7 aislados O139, 2 aislados O1 Inaba, El Tor.

<sup>c</sup> 13 aislados O1 Inaba, El Tor de México, Guatemala y Perú.

<sup>d</sup> un aislado O1 Ogawa, El Tor de México.

<sup>e</sup> Inaba, El Tor cepa de la colección de referencia

Se identificaron cepas con el mismo tipo electroforético (ET) pero pertenecientes a diferentes serogrupos (tabla 8, figuras 22 y 23). Por ejemplo, los ETs 128 y 131 (figura 22) incluían cepas O22 y O34 aisladas en 1968 en India y las cepas O6 y O14 provenientes de Campeche en 1991 y de Guatemala en 1993, respectivamente.

En el conglomerado C (figura 23) el ET 196 estuvo conformado por 7 cepas de diferente serotipo; 4 de ellas (O15, O47, O51 y O53) aisladas entre 1968 y 1974 de humanos en India, una cepa O68 aislada en 1978 en el Mar de Japón y 2 cepas O7 aisladas de agua de pozo y pescado entre 1992 y 1993, provenientes de los Estados de Campeche y Sonora en México.

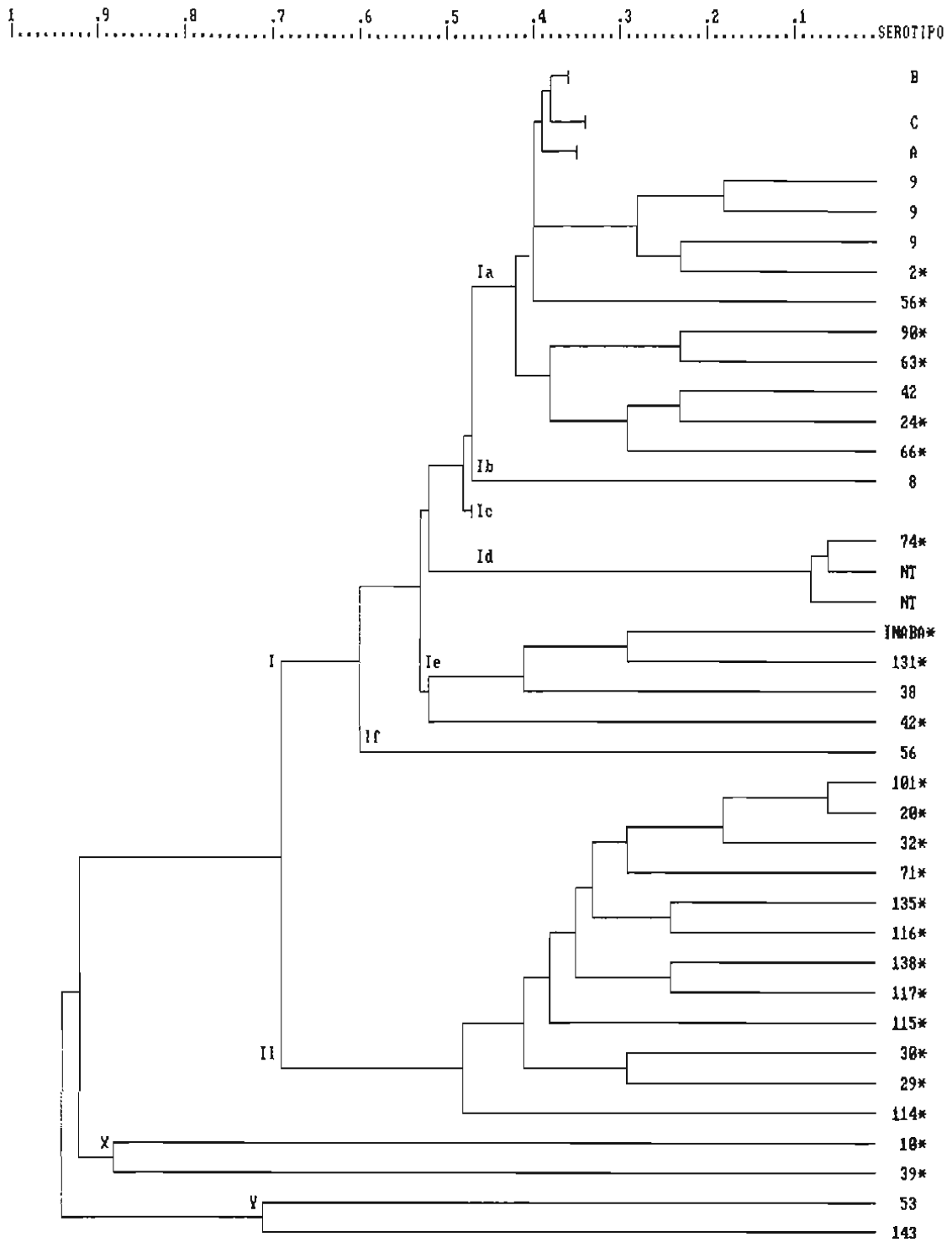


Figura 20. Dendrograma que muestra la relación genética de los 279 Ets de *Vibrio cholerae* basado en el análisis de enzimas multilocus (MLEE). El dendrograma se construyó con el método UPGMA. La subdivisión Ic y los conglomerados A, B y C están interrumpidos. \*Cepas de la colección del sistema de referencia serológica.

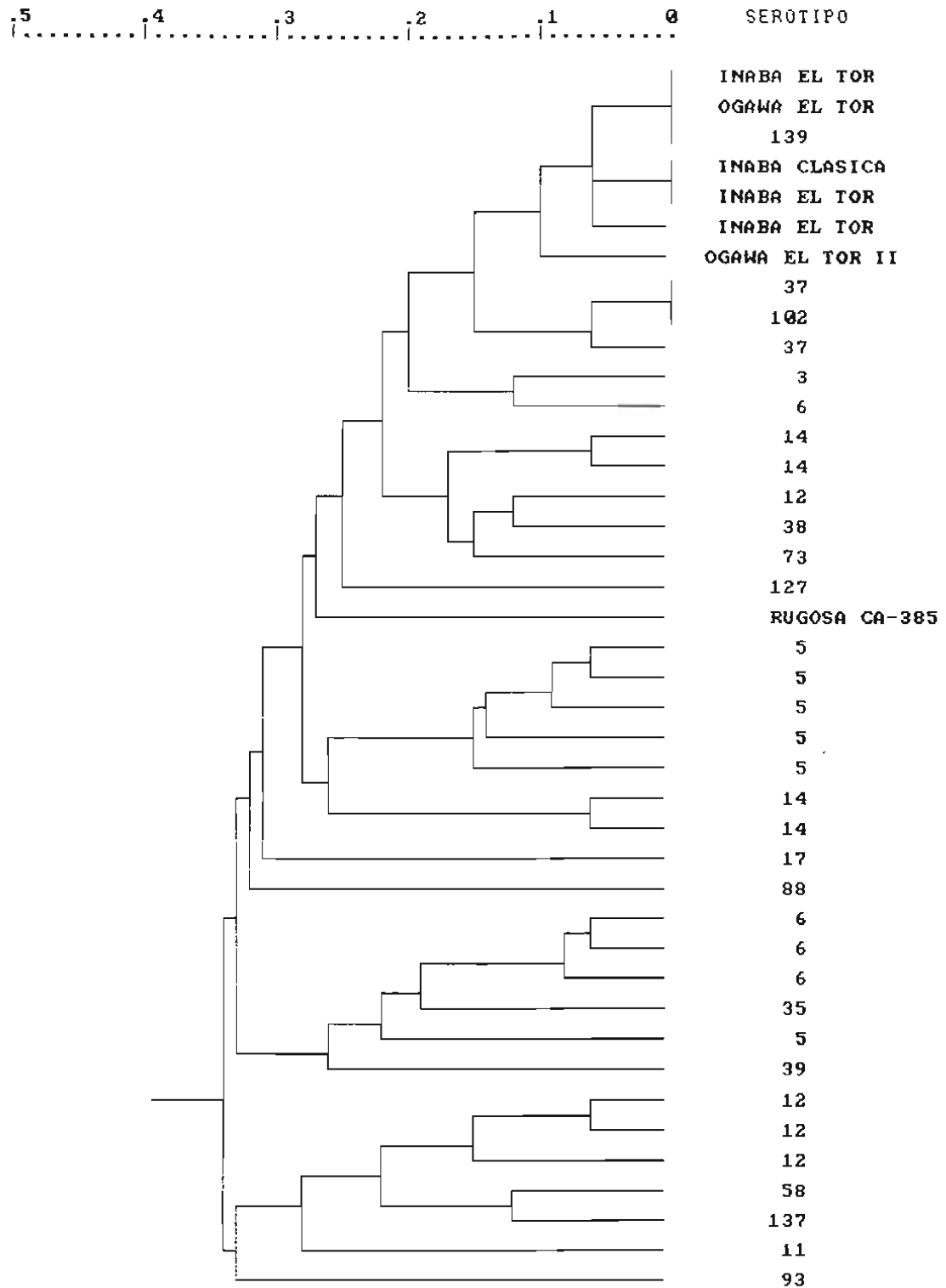


Figura 21. Dendrograma que muestra la relación genética de 37 Ets de *Vibrio cholerae* del conglomerado A basado en el análisis de enzimas multilocus (MLEE). El dendrograma se construyó con el método UPGMA.

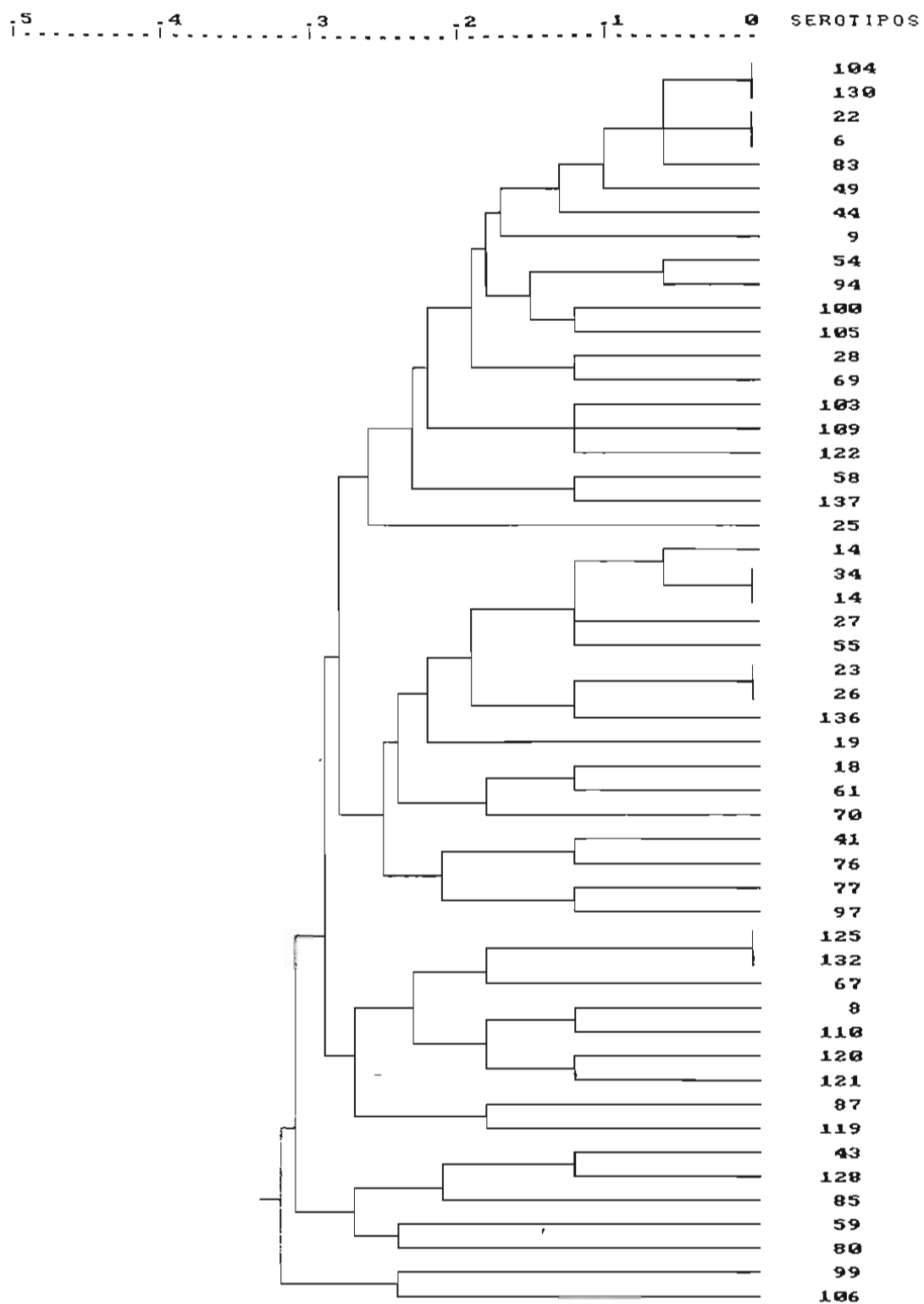


Figura 22. Dendrograma que muestra la relación genética de las cepas de *Vibrio cholerae* del conglomerado B basado en el análisis de enzimas multilocus (MLEE). El dendrograma se construyó con el método UPGMA.



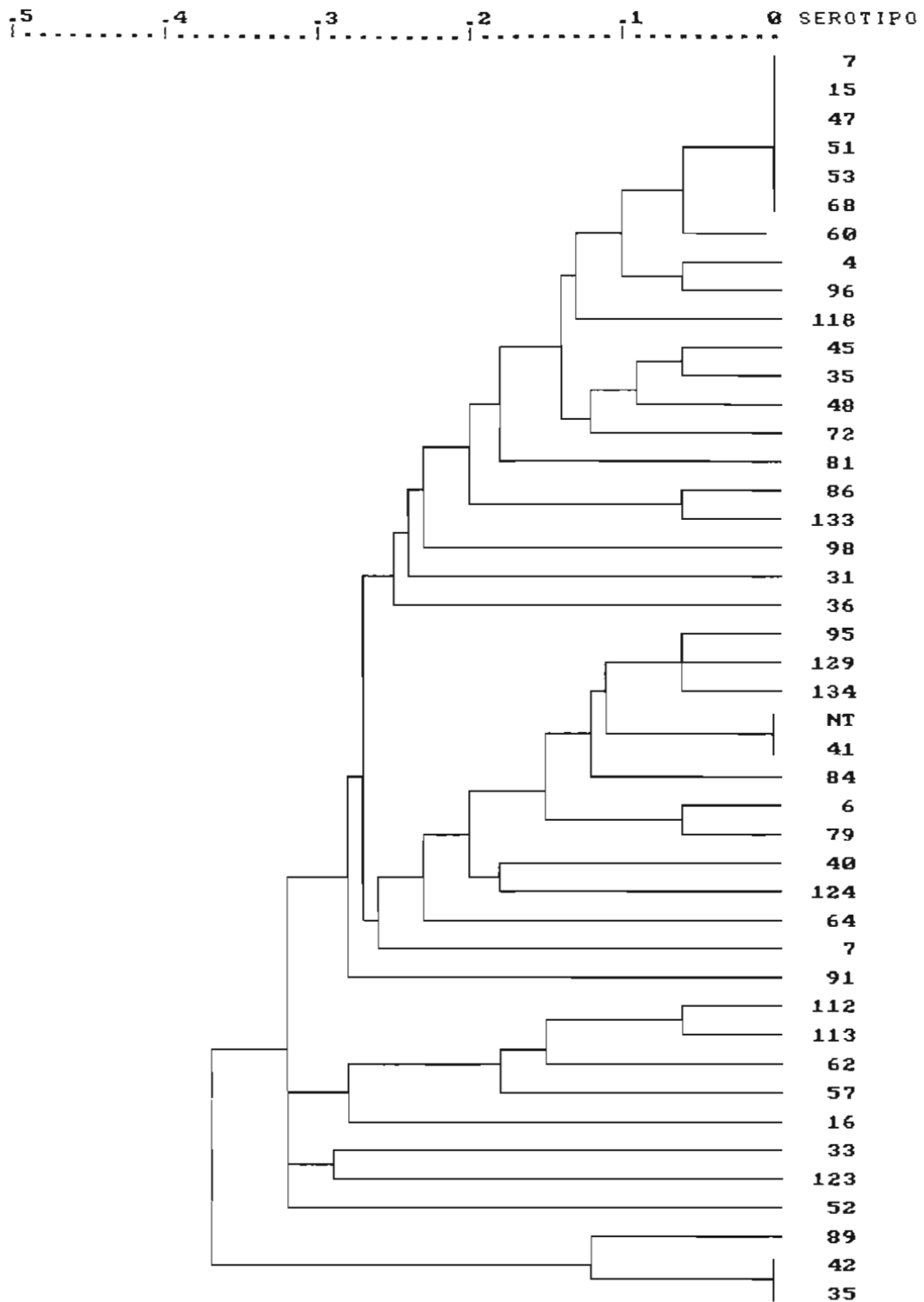


Figura 23. Dendrograma que muestra la relación genética de 40 Ets de *Vibrio cholerae* del conglomerado C basado en el análisis de enzimas multilocus (MLEE). El dendrograma se construyó con el método UPGMA.

Con estos resultados se puede inferir que el ET 196 estaba conformado por bacterias pertenecientes a una clona presente en diferentes continentes. Esta clona había persistido con modificaciones debidas probablemente a mutaciones o recombinaciones en su región *rfb*, cuando menos 24 años.

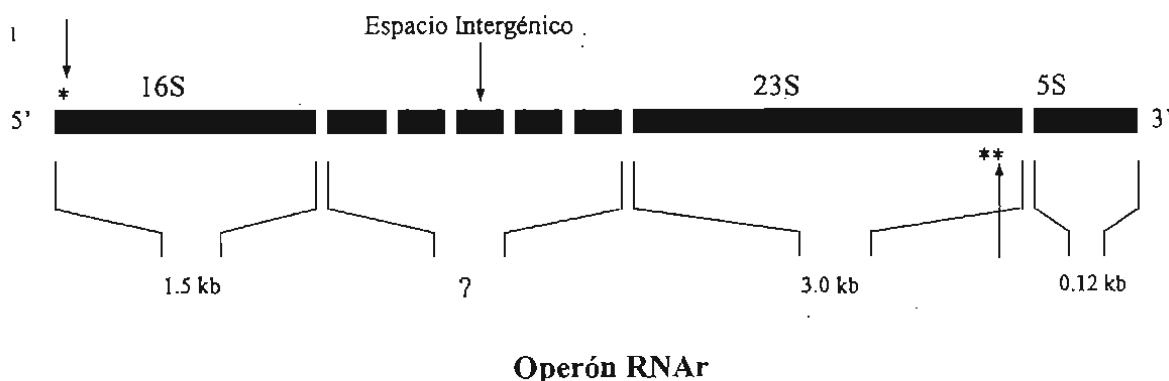
Finalmente, la división II estaba constituida por 12 ETs, cada uno representado por una sola cepa y/o serogrupo. Estas cepas tenían una procedencia muy diversa ya que se habían aislado en Asia, América y Europa (figura 20).

### Resultados del PCR-ribotipificación.

La tabla 8 muestra los ETs caracterizados por PCR-ribotipificación encontrados en dos o más cepas pertenecientes a diferentes serogrupos aisladas en diversas localidades.

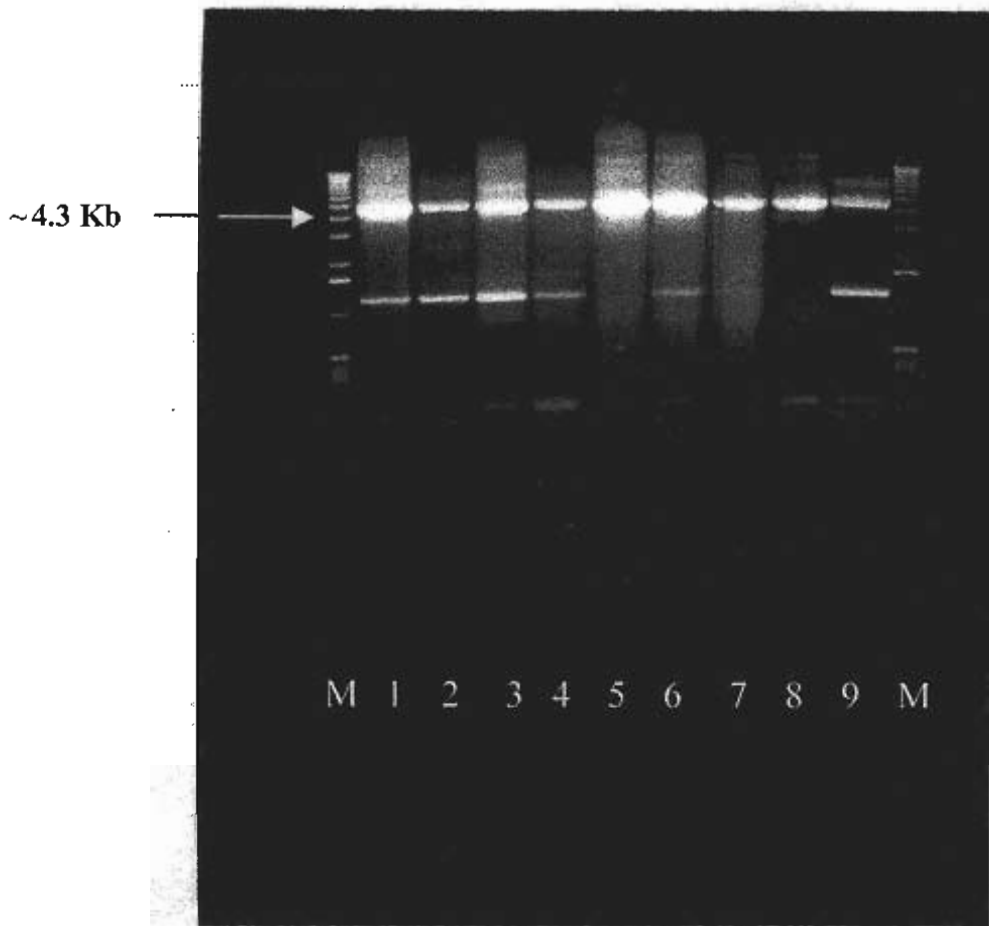
La amplificación del operón RNA ribosomal generó un producto de aproximadamente 4 300 pb que abarcaba desde el nucleótido 9 del gen 16S hasta el nucleótido 2 669 del gen 23S RNAr (figuras 24 y 25).

Figura 24. Operón del RNAr.



<sup>1</sup> \* posición 5' – 3' del iniciador de amplificación de la base 9 a 27

\*\* posición 5' – 3' del iniciador de amplificación de la base 2669 a 2654



**Figura 25: Productos de amplificación del operon RNA ribosomal de *Vibrio cholerae* carriles 1-9, carril 1 control +. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.**

Estos productos de amplificación se digirieron con la enzima de restricción *Hinf*I. Los perfiles con una o más bandas de diferencia fueron considerados como patrones diferentes; por lo cual se obtuvieron cuatro perfiles de restricción o PCR-ribotipos (figuras 26 y 27).

Los cuatro perfiles de PCR-ribotipos obtenidos mostraron claramente las diferencias existentes entre cada uno de ellos, los asteriscos (figura 28) muestran las bandas o sitios polimórficos que diferencian a cada perfil.

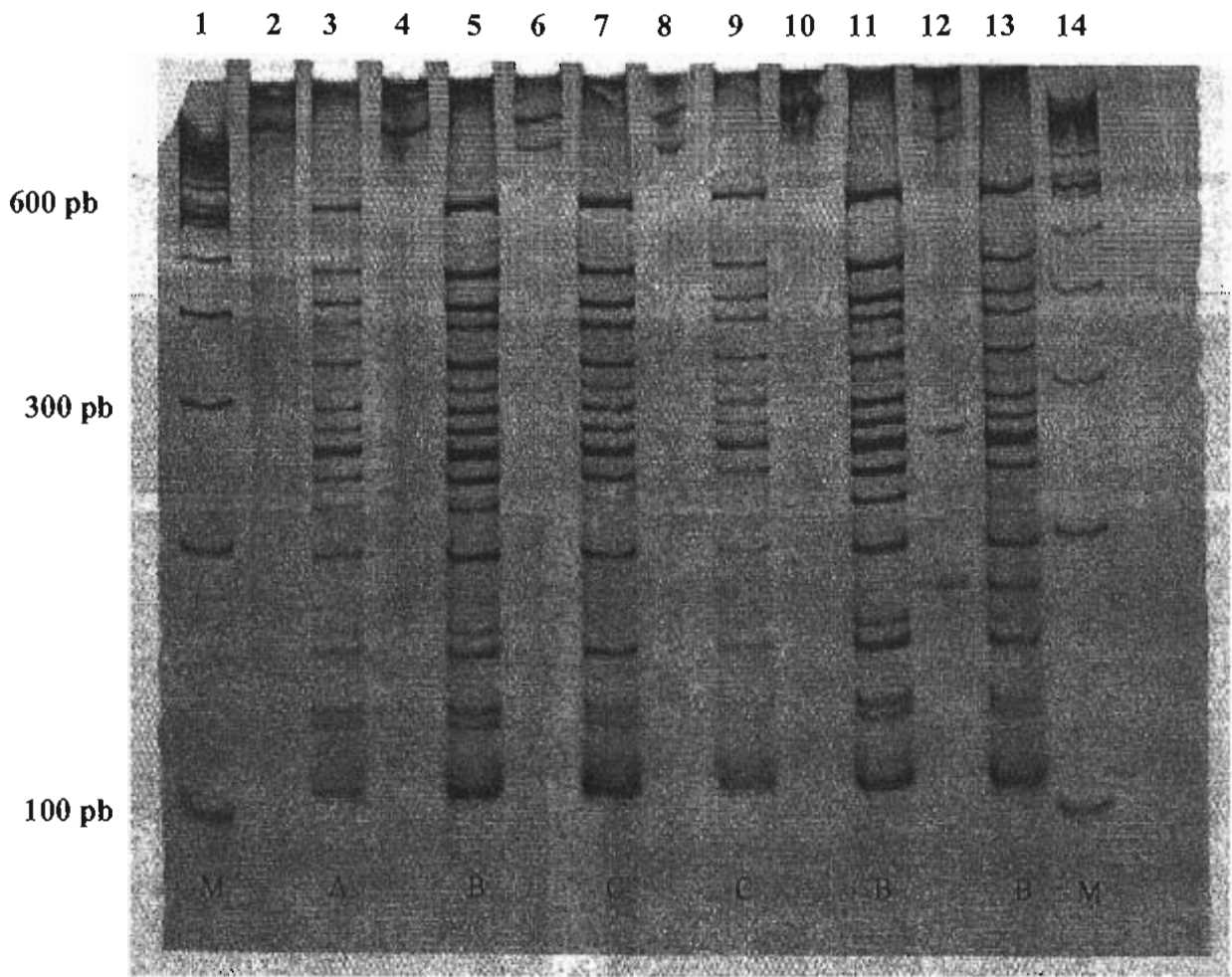


Figura 26: PCR-ribotipos con *HinfI* de *Vibrio cholerae*. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 muestran los productos de amplificación (pPCR) sin digerir. El carril 3 muestra el PCR-ribotipo A, los carriles 5, 11 y 13 muestran el PCR-ribotipo B y los carriles 7 y 9 el PCR-ribotipo C, los carriles 1 y 14 son el marcador de peso molecular de 100 pb. Gel de noliacrilamida al 8% teñido con nlatá.

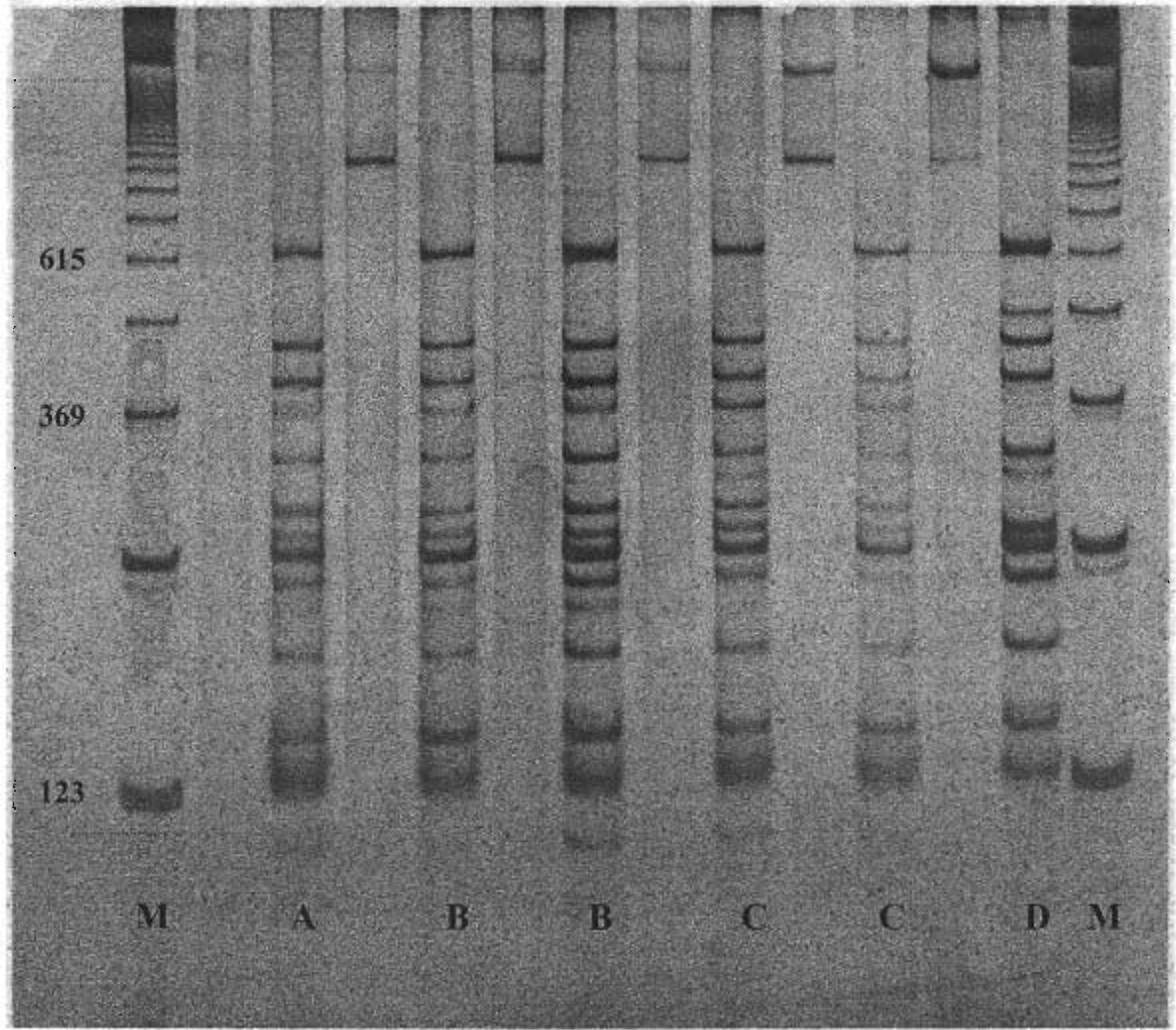


Figura 27: PCR-ribotipos con *Hinf*I de *Vibrio cholerae*. La figura muestra los 4 PCR-ribotipos encontrados. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 son los productos de PCR sin digerir. En el carril 3 el PCR-ribotipo A, carriles 5 y 7 el PCR-ribotipo B, carriles 9 y 11 PCR-ribotipo C y carril 13 el PCR-ribotipo D. Carriles 1 y 14 marcador de peso molecular 123 pb. Gel de poliacrilamida al 8% teñido con plata.

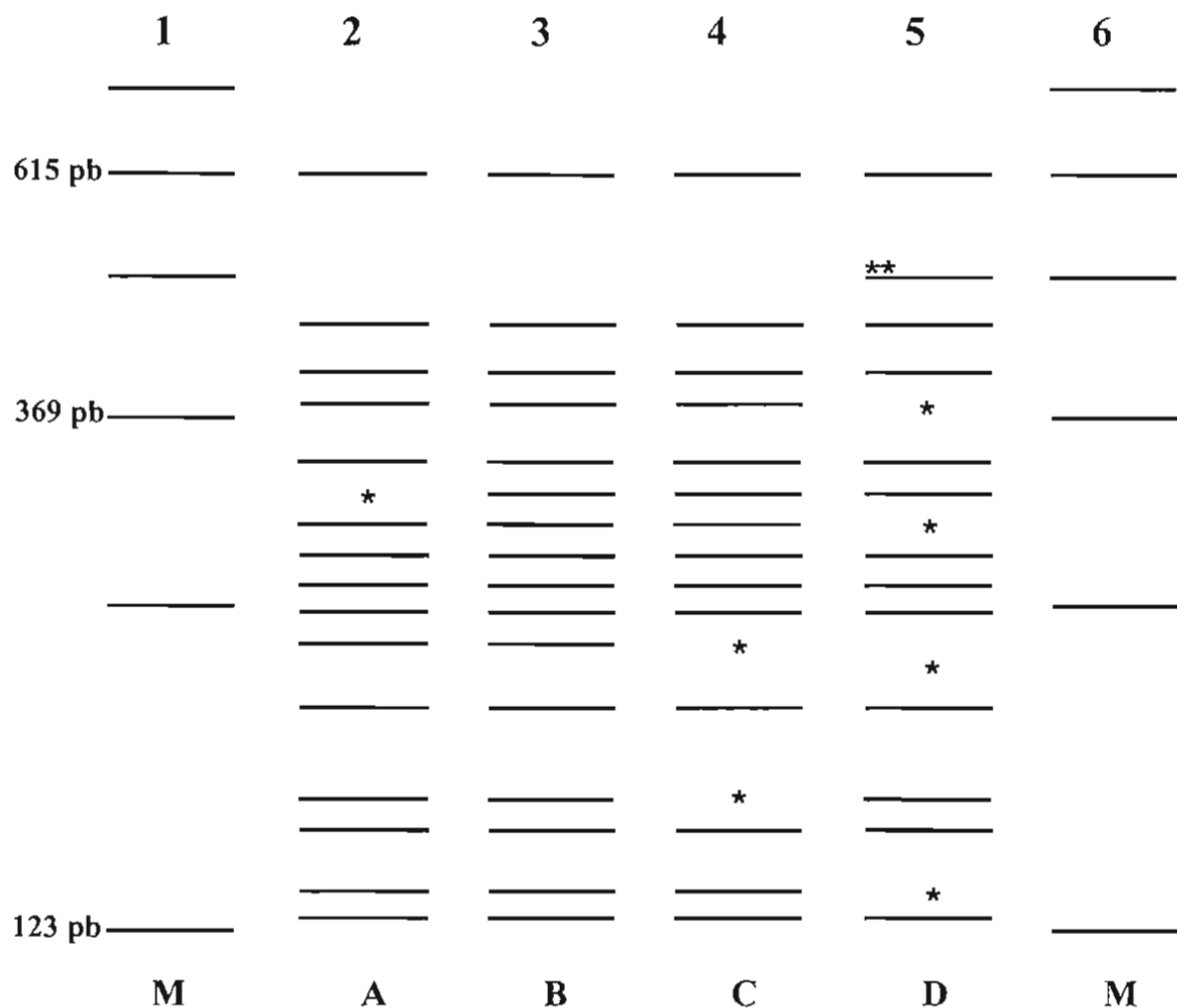


Figura 28: Perfiles de la restricción del fragmento 16S-23S RNA ribosomal con la enzima *HinfI*. Los carriles 2, 3, 4 y 5 son los PCR-ribotipos A, B, C, y D respectivamente, los asteriscos muestran las bandas o sitios polimórficos que diferencian a cada perfil. El perfil A no presentó la banda de  $\approx 307$  pb, el perfil B si la presentó la banda de  $\approx 307$  pb, el perfil C careció de las bandas de  $\approx 140$  pb y la de  $\approx 222$  pb, por último el perfil D no presentó las bandas de  $\approx 140$  pb,  $\approx 222$  pb,  $\approx 297$  pb y  $\approx 381$ pb pero presenta una banda adicional de  $\approx 492$  pb. Carril 1 y 6 marcador de peso molecular de 123 pb.

En la tabla 8 se observa la distribución de los PCR-ribotipos con relación a los ET's y en la figura 29 se muestra como se reparten estos ribotipos a lo largo del mismo. El PCR-ribotipo B es el más ancestral, seguido del PCR-ribotipo D que aparentemente es clonal, siendo los ribotipos A y C los de más reciente aparición. La presencia los PCR-ribotipos B y C a lo largo de la figura 29 sugieren que hubo recombinación entre ellos.

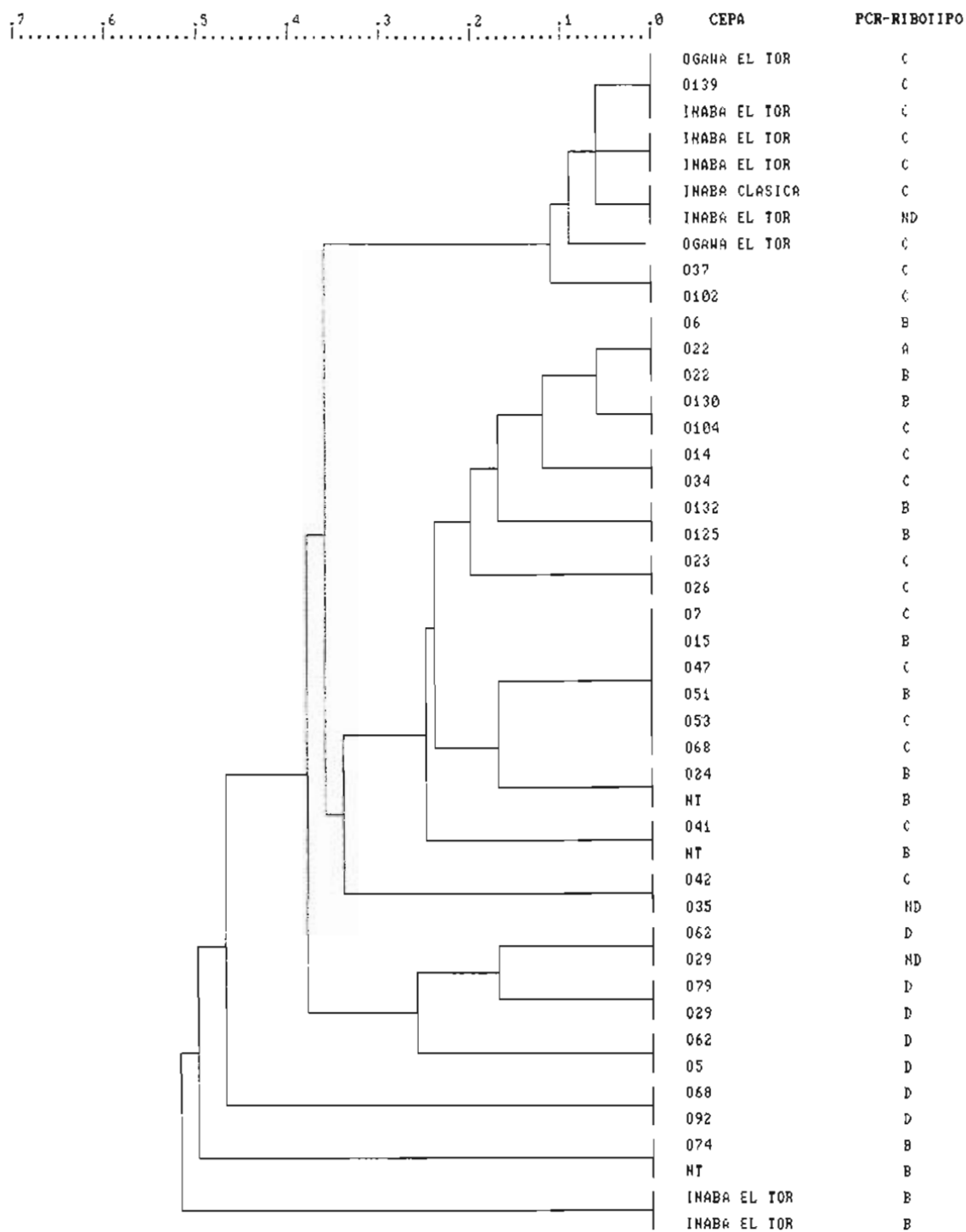
El conglomerado donde se localizaron las cepas de *Vibrio cholerae* O1 aisladas durante epidemias estuvo formado por el PCR-ribotipo C únicamente, incluyendo las cepas de *Vibrio cholerae* O139 y O37, lo cual sugiere una buena estabilidad o poca recombinación del operón RNA ribosomal y su espacio intergénico en este grupo de cepas. La cepa de referencia O1 Inaba el Tor (ET 259) que formó la subdivisión Ie, presentó un PCR-ribotipo B (figuras 20 y 29).

La variación encontrada en los perfiles de PCR-ribotipos a lo largo de la diversidad genética determinada por MLEE en las cepas de la presente colección fue muy baja. El grado de conservación de los PCR-ribotipos fue sorprendente considerando la gran gama de serogrupos, zonas geográficas, fuentes de aislamiento y años en que se aislaron las cepas de *Vibrio cholerae* utilizadas en el presente estudio.

La figura 30 muestra el número de cepas y el porcentaje de ellas que perteneció a cada uno de los PCR-ribotipos, siendo el más frecuente el perfil C (43.5%) seguido de los perfiles B (30.5%), D (13%) y por último el A (2.2%).

### **Resultados de los PCR de los espacios intergénicos (ISR).**

Los PCR de los ISR (figura 31) produjeron un patrón de bandas idéntico para los diferentes perfiles de PCR-ribotipos. Las cepas presentaron dos bandas de ~530 pb y de ~600 pb, observándose también dos bandas más débiles (~700 pb y ~800 pb) en los perfiles A, C y



**Figura 29. Dendrograma que muestra la relación genética de 20 Ets de *Vibrio cholerae* que agruparon cepas de diferentes serogrupos y su asociación con los perfiles de PCR- ribotipos. El dendrograma se construyó con el método UPGMA.**

\*NT cepa que no tipificable.

+ND PCR- ribotipo no determinado.



**Tabla 8: Distribución de los perfiles PCR-Ribotipos de *Vibrio cholerae* y su asociación con ET's, serotipos fecha y fuente de aislamiento, obtenidos en diferentes localidades.**

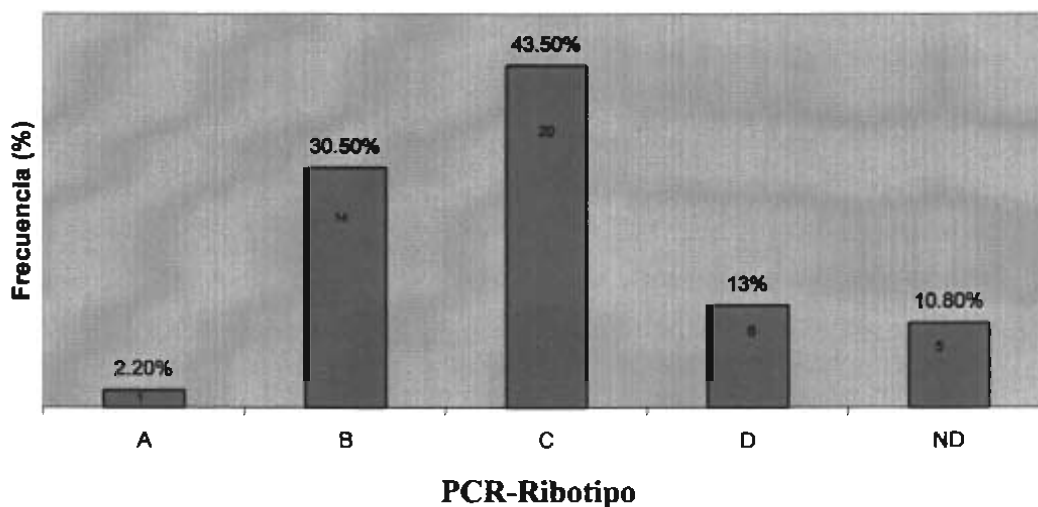
PCR ribotipo	ET	Serotipo	Localidad (fecha)	Fuente
B	196	O15	India (1968)	Humano
C		O47	India (1973)	Humano
B		O51	India (1973)	Humano
C		O53	India (1974)	Humano
C		O68	India (1978)	Agua mar
C		O7	Campeche (1992)	Agua pozo
B	252	O74	India (1979)	Humano
B		NT	Veracruz (1991)	Humano
B	128	O22	India (1968)	Humano
A		O22	CDC	
B		O6	Campeche (1991)	Humano
C	131	O34	India (1968)	Humano
C		O14	Guatemala (1993)	Humano
D	247	O92	Japón (1987)	Agua río
ND		O68	Tabasco (1992)	Humano
C	73	O23	India (1973)	Humano
C		O26	Filipinas (1972)	Humano
C	5	O37	India (1969)	Humano
C		O102	China (1988)	Humano
B	129	O130	India (1981)	Humano
C		O104	China (1988)	Humano
B	65	O125	India (1981)	Humano
B		O132	Tailandia (1981)	Humano
B	171	NT	Guerrero (1991)	Humano
C		O41	Sonora (1993)	Fosa séptica
ND	181	O35	Sonora (1993)	Agua residual
C	181	O42	Sonora (1993)	Pescado
B	124	O24	Veracruz (1991)	Humano
B		O24	Tabasco (1992)	Humano
D	234	O5	Campeche (1992)	Agua pozo
D		O62	Tabasco (1992)	Humano
D	52	O79	Zacatecas (1991)	Humano
D		O29	Sonora (1993)	Agua residual
D	257	O62	Guatemala (1993) <sup>2</sup>	Humano
ND		O29	Guatemala (1993) <sup>2</sup>	Humano

**Tabla 8. Distribución de los perfiles PCR-Ribotipos *Vibrio cholerae* y su asociación con ET's, serotipos fecha y fuente de aislamiento, obtenidos en diferentes localidades. Continuación**

PCR ribotipo	ET	serotipo	Localidad (fecha)	Fuente
C	2	Inaba Clásica	Quintana Roo (1983)	Humano
ND		Inaba El Tor	Louisiana USA(1978)	Humano
C	3	O139	India (1993)	Humano
C		Inaba El Tor	Tabasco (1995)	Humano
C		Ogawa El Tor	India (1941)	Humano
C		Ogawa El Tor	Tabasco (1993)	Humano
B	259	Inaba El Tor	India (1942)	Humano
B		Inaba El Tor	DEPT <sup>1</sup> (1991) <sup>2</sup>	
C	4	Inaba El Tor	Teacal (1991)	Humano
C		Inaba El Tor	Perú (1991)	Humano

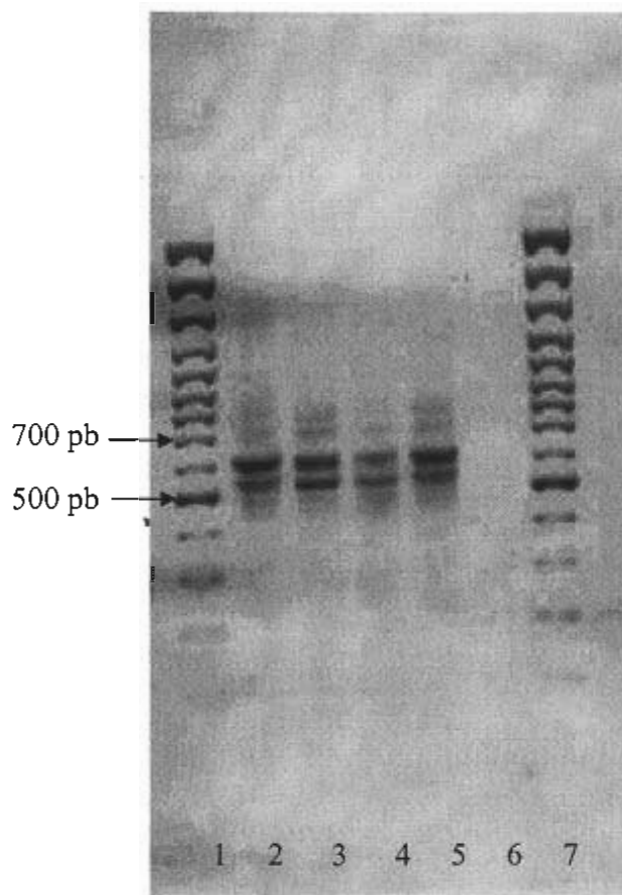
<sup>1</sup> Departamento de patógenos entéricos. Colindale UK.

<sup>2</sup> Fecha de recepción.



\* ND no determinado

**Figura 30. Distribución de las cepas de *Vibrio cholerae* de acuerdo al número de aislamientos en cada PCR-ribotipo.**



**Figura 31: Productos de amplificación de los ISR. Gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 7 marcador de 100 pb. Carril 2 PCR-ribotipo A, carril 3 PCR-ribotipo C, carril 4 PCR-ribotipo B, carril 5 PCR-ribotipo D, carril 6 control -.**

## Discusión y Conclusiones.

La diversidad genética encontrada en el presente estudio tuvo una media de 0.436 por locus entre los 279 ETs de *Vibrio cholerae* analizados (cuadro 6).

Este dato fue mayor a los reportados para la colección de referencia de *Escherichia coli* (0.343) (51), pero más bajo que el encontrado para *Salmonella enterica* (0.627) (52). En un estudio previo realizado con la técnica de enzimas multilocus, Salles y Momen (53), estudiaron la variación alélica de 260 aislados de *Vibrio cholerae*, la mayoría del serogrupo O1, hallando 73 ETs, con una variación de 4.3 alelos por locus y una diversidad genética de 0.326 por locus. La diferencia entre estos hallazgos está relacionada probablemente con la gran variedad de serotipos no-O1, regiones geográficas y fuentes de aislamiento de donde se obtuvieron las cepas del presente estudio.

Los resultados actuales sugieren también que, cuando menos entre las cepas de la subdivisión Ia, existe una tasa de transferencia horizontal y recombinación en genes de metabolismo básico lo suficientemente alta para evitar el desarrollo y mantenimiento de alelos distintivos por periodos de tiempo largos. Los datos sugieren que la frecuencia de recombinación intragénica y de distribución en genes de metabolismo básico en *Vibrio cholerae* son más altos que los encontrados para *Escherichia coli* (54) y *Salmonella enterica* (52); a esta misma conclusión llegaron Karaolis *et al.* (55) a través de un análisis comparativo de secuencias del gen aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) de *Vibrio cholerae*. Aún así, los hallazgos en la subdivisión Ia indican que estos linajes clonales pueden persistir por décadas. Los ejemplos más obvios de esto son las cepas epidémicas y pandémicas pertenecientes a los serogrupos O1 y O139 (tabla 8).

Por otro lado, existe evidencia basada en estudios realizados con un número de cepas y serotipos limitado (55, 56) que los genes *rfb* de *Vibrio cholerae* están sujetos a transferencia horizontal con relativa alta frecuencia. El hecho de que cepas de un mismo ET puedan

expresar diferentes lipopolisacáridos (antígeno "O"), puede estar explicado por la presencia de recombinación o por la aparición de mutaciones espontáneas en los genes *rfb* que codifican para el antígeno somático (O). Los resultados actuales muestran que cepas de un mismo serogrupo frecuentemente se encuentran en linajes divergentes aún cuando estos estén poco relacionados genéticamente.

Un ejemplo de esto se puede observar en la cepa del serogrupo O139, la cual surgió en India y Bangladesh debido a la adquisición de genes que mediaban la síntesis del LPS del serogrupo O139 en una cepa de *Vibrio cholerae* O1 El Tor.

Otro ejemplo de esto es la cepa de *Vibrio cholerae* O37, responsable de un brote de cólera en Sudan en 1968 (57). En 1995, mediante la "huellas digital" de IS1004 Bik *et al.* (56), determinaron que la cepa O37 aislada en Sudan esta relacionada con cepas de *Vibrio cholerae* del serogrupo O1 biotipo clásico. La cepa de referencia O37 (ET 5), aislada en 1969 de un paciente en India representa probablemente la misma clona que la cepa O37 de Sudan. Como se observó en los resultados del presente estudio esta cepa O37 está estrechamente relacionada con cepas O1 El Tor y con otras cepas epidémicas O1 (figura 21), confirmando los resultados obtenidos por IS1004. De hecho, el ET 5 se distingue de los ET 2, 3 y 4 del cluster O1/O139 por el locus de PGI (alelo 4 vs. alelo 3, respectivamente).

Honma *et al.* (58) estudiaron una cepa O37 que producía hemolisina O37-Hly, la cual era antigénicamente similar a la hemolisina producida por el serogrupo O1 El Tor (El Tor-Hly), pero difería en el tamaño molecular por la presencia de una inserción de 4 pb que generaba un codón de alto en la región río abajo del gen. Esto indicaba que la O37-Hly era una proteína truncada que se había derivado de otra proteína El Tor-Hly, con la cual compartía el 90% de la secuencia de la región N-terminal. De la colección de cepas de México y Guatemala se estudiaron 3 cepas O37; una aislada de un paciente en Guatemala (ET 6) con un genotipo MLEE idéntico al de la cepa O37 de referencia (ET 5), excepto por el locus de la enzima GOT (alelo 4 vs. 3). Las otras dos cepas O37 se aislaron en Campeche, México y provenían de pozos de agua. Estas cepas presentaron seis y siete locus

diferentes respectivamente, en relación con la cepa O37 de referencia y con la aislada en Guatemala. Cabe mencionar finalmente, que la cepa de referencia O102, aislada en 1988 de un paciente con diarrea en China presentaba un genotipo MLEE idéntico (ET 5) al de la cepa de referencia O37.

En el presente estudio se pudo determinar también la existencia de una clona de *Vibrio cholerae* O37, con potencial epidémico, la cual se había aislado en India y África en 1968 y 1969. Ante la estrecha relación entre el serogrupo O1 El Tor con otras clonas epidémicas del serogrupo O1, esta cepa de *Vibrio cholerae* O37 representa un caso similar al de la clona de *Vibrio cholerae* O139, ya que una vez que se estableció en el linaje de las cepas del serogrupo O1, adquirió un nuevo antígeno somático mediante transferencia horizontal y rearrreglos de los genes de la región *rfb*.

Colwell *et al.* (72, 73) han propuesto que bajo condiciones especiales las cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 pueden convertirse al serogrupo O1 y viceversa, y de utilizar este mecanismo como una posible estrategia de supervivencia en el ambiente. Aparentemente el mecanismo propuesto por el cual suceden estos cambios serían por mutaciones espontáneas de los genes que codifican para el antígeno somático "O" y/o por inducción o represión de estos genes como respuesta a cambios físicos, químicos o biológicos en el ambiente. Este fenómeno de seroconversión puede tener un papel importante en la epidemiología del cólera. Como se observa en el figura 21 las cepas O37 y O102 que conforman un mismo ET (ET 5), sugiere que estas cepas pueden representar casos en los cuales clonas O1 han pasado a formar nuevos serogrupos. En el grupo de cepas de este estudio los únicos casos de aparente conversión de serogrupo no O1 a serogrupo O1, serían las cepas O139 y la cepa de referencia O1 Inaba, El Tor (ET 259), la cual formó la subdivisión Ie (figura 20) y esta alejada genéticamente del grupo de cepas epidémicas O1, grupo A de la subdivisión Ia (figura 20).

La fuente exógena putativa de la región *rfb* involucrada en la transformación de la cepa O1 El Tor en la clona epidémica O139, fue identificada con base en las reacciones cruzadas de

serotipificación como cepas de los serogrupos O22, O4, u O155 (15, 56, 59). Los análisis moleculares, en estos casos, mostraron que dichas cepas tuvieron en común con O139 dos marcos de lectura abierta en la región *rfa D* presentes en la cepa O139 pero ausentes en las cepas O1.

A través del estudio del contenido genético y organización de la región *rfb* adyacente a las secuencias de IS1358 en cepas O139 y de otros trece serogrupos, incluidos O22 y O155, Dumontier y Berche (60) identificaron una clona del serogrupo O22 aislada en India (cepa de Shimada 169-68) como posible donadora de estos genes, aunque no se puede eliminar la posibilidad de que hubieran existido rearrreglos múltiples en la cepa O1 receptora. Como se determinó en el presente análisis la cepa O22 (ET 128) forma parte del cluster B de la subdivisión Ia y difiere de las cepas O1 y O139 en cuatro y cinco loci, respectivamente.

En las cepas estudiadas en la presente investigación, nueve del serogrupo O155 correspondieron a siete ETs diferentes. La cepa O155 (ET 224) aislada en 1993 en Tailandia y otros cinco ETs representados por cepas aisladas en Tabasco y Campeche, formaron parte de la subdivisión Ic, aunque hay que aclarar que este cluster no es compacto. El último ET de las cepas del serogrupo O155 se conformó por dos cepas aisladas en Sonora, México, como parte del grupo B de la subdivisión Ia. De este modo podemos concluir que las cepas del serogrupo O155 pertenecen a un grupo de ETs moderadamente diverso, ninguno de los cuales está estrechamente relacionado a los ETs de las clonas epidémicas O1/O139. Esto sugiere que los genes que medían la expresión del LPS O155 se transfirieron con relativa alta frecuencia.

Debido a que los genes que codifican para factores de virulencia pueden ser transferidos horizontalmente y la conversión antigénica puede realizarse por la adquisición y/o pérdida de los genes *rfb*, existe la posibilidad de que cualquier *Vibrio cholerae* pueda ser transformado en una cepa potencialmente virulenta y, más aún, en una cepa epidémica (55, 61). La relación evolutiva estrecha de las clonas epidémicas O1, O139 y O37 indican que pueden surgir nuevas clonas epidémicas o fuertemente virulentas a través de la

modificación del linaje que ya es epidémico o esta muy relacionado con dicha clona. De este modo las cepas O139 evolucionaron de la clona O1 El Tor, la cual adquirió un transposon que contenía los genes para el LPS O139, la cápsula junto con la delección de la mayoría de los genes que mediaban la síntesis del serotipo O1 (62). La clona toxigénica O37 causante de brotes de cólera en Sudan e India a finales de la década de 1960, también esta muy relacionada con el cluster de las clonas epidémicas O1/O139.

Se ha sugerido que cepas ambientales de *Vibrio cholerae* pueden servir como reservorios del  $\phi$ CTX o más aún que pueden surgir como cepas patógenas siempre y cuando adquieran los genes de virulencia (55, 57). Asimismo, Boyd *et al.*(63) en el 2000 reportaron la presencia del  $\phi$ CTX tanto en su forma replicativa como profago integrado al cromosoma en cepas de *Vibrio mimicus*. Aunado a esto, el análisis de la secuencia de los genes *orfU* y *zot* de los  $\phi$ CTX provenientes de *Vibrio mimicus* y *Vibrio cholerae* demuestra que ambos genes son idénticos lo que sugiere que hubo transferencia horizontal del fago entre estas dos especies. Por lo anterior es interesante mencionar que las cepas ambientales de *Vibrio cholerae* no O1 incluidas en este estudio no se agruparon en conglomerados distintivos o aún en un linaje evolutivo propio, sino que se localizaron a lo largo de los dendogramas y algunas tuvieron el mismo ET que cepas de *Vibrio cholerae* no O1 aisladas de humanos.

Tomando en cuenta que la prevalencia de genes de virulencia en cepas ambientales de *Vibrio cholerae* no está bien entendida más los resultados reportados por Boyd *et al.* (63) en cepas de *Vibrio mimicus*, consideramos importante realizar estudios con otras técnicas que puedan ayudar a dilucidar la relación que existe entre cepas de *Vibrio cholerae* y *Vibrio mimicus* ambientales y aquellas provenientes de humanos tanto de brotes epidémicos como en los periodos entre epidemias, ya que estas dos especies pueden ser reservorios importantes de los genes de virulencia y por lo tanto tener un papel importante en el surgimiento de nuevas cepas de *Vibrio cholerae* .



La información derivada de los PCR-ribotipos ha sido utilizada para tipificar y diferenciar organismos estrechamente relacionados (64, 65, 66 67, 68 69). Una de las metas del presente estudio fue utilizar este método y asociar los perfiles de PCR-ribotipos con los genotipos multilocus y diferenciar cepas *Vibrio cholerae* que estuvieron relacionadas genéticamente, especialmente aquellas cepas con diferentes serogrupos que por MLEE se encontraban en un mismo ET o estrechamente relacionados con los serogrupos O1/O139 epidémicos.

Esta técnica ha sido utilizada para tipificar cepas pertenecientes a diferentes géneros, incluyendo *Listeria*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* (31, 64, 65, 66). Los investigadores que la han utilizado concluyen que se trata de una técnica rápida y precisa para la genotipificación, útil en estudios epidemiológicos de los géneros bacterianos mencionados. Por otro lado, otros investigadores (50) han sugerido su utilización como metodología rápida para caracterizar, diferenciar y discriminar entre las especies de los géneros *Acinetobacter* y *Francisella*.

Esta técnica se ha utilizado también para tipificar microorganismos anaerobios como *Clostridium difficile* (67, 68) con el objeto de dar seguimiento a brotes de infecciones nosocomiales. Stubbs *et al.* (69) construyeron una biblioteca de 116 PCR-ribotipos con la finalidad de facilitar el análisis epidemiológico de cepas virulentas de este microorganismo.

Urakawa *et al.* (70) analizaron los patrones de restricción del 16S de 35 especies de la familia Vibrionaceae y concluyeron que esta técnica era útil para la clasificación e identificación de esta familia. Wong *et al.* (71) compararon tres técnicas de tipificación para *Vibrio parahaemolyticus* y determinaron que PCR-ribotipificación era práctica como método de rutina para tipificar y subtipificar cepas provenientes de brotes epidémicos, así como para evaluar la relación genética y epidemiológica de este género bacteriano.

En el presente estudio los perfiles de los PCR-ribotipos de cepas de *Vibrio cholerae* presentaron poca diversidad y los perfiles generados por los ISR fueron idénticos. Los

cuatro perfiles de PCR-ribotipos diferentes que se obtuvieron no mostraron una relación con el fenotipo bioquímico, el serotipo, el tipo electroforético (ET), con brotes epidémicos o la fuente o zona geográfica de donde se obtuvieron. Esto difiere de los resultados encontrados por Coelho *et al.* (33), en los cuales *Vibrio cholerae* O1 biotipo Clásico, biotipo El Tor y O139 presentaron patrones diferentes en los perfiles de los espacios intergénicos (ISR), lo que los llevó a recomendar a esta técnica como herramienta para el estudio epidemiológico de *Vibrio cholerae*. La diferencia con los resultados del presente estudio se pueden deber a que los iniciadores que utilizaron Coelho *et al.* se hicieron basados en secuencias reportadas para *Escherichia coli* y el PCR se realizó en condiciones de baja astringencia, en contraste con el uso de iniciadores específicos para *Vibrio cholerae* y un PCR con condiciones de alta astringencia, utilizados en la presente investigación.

Los resultados actuales mostraron que los perfiles fueron reproducibles. Sin embargo, la variación entre los PCR-ribotipos de las cepas de *Vibrio cholerae* estudiadas fue baja y no permitió hacer una diferenciación entre las cepas que por MLEE estuvieron estrechamente relacionadas. Sin embargo, la baja variabilidad entre los perfiles de los PCR-ribotipos nos indica el alto grado de conservación en el RNA ribosomal y su espacio intergénico (ISR), por lo que se puede inferir que los (ISR) tienen un número de genes de tRNA altamente conservados. La recombinación y conversión génica pueden explicar en parte este alto grado de conservación.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chun *et al.* (30) los cuales analizaron las secuencias de las regiones ISR del RNA ribosomal en *Vibrio cholerae* y *Vibrio mimicus* y mostraron su poca utilidad para diferenciar y discriminar entre cepas de *Vibrio cholerae* estrechamente relacionadas como las cepas epidémicas, aunque la información generada por las ISR fue útil para distinguir *Vibrio cholerae* de *Vibrio mimicus*. Se desconoce aún la importancia que pudieran tener las diferencias encontradas en los PCR ribotipos. La comparación y el análisis de las secuencias de los diferentes perfiles probablemente ayude a escudriñar las variaciones interserotipo e intercistricas que permitan contestar preguntas como la anterior. Sobre la base de la baja variabilidad encontrada en este estudio en los

PCR-ribotipos, se puede proponer que este método es más apropiado para realizar estudios de índole taxonómico, filogenético y de evolución que como métodos para diferenciación entre genotipos multilocus de *Vibrio cholerae* o para caracterizar clonas provenientes de brotes epidémicos.

## Referencias.

1. Pestana de Castro AF, Almeida WF. Cholera on the American Continents. Pestana de Castro A. F, Almeida W. F. (eds). 1993. International life sciences institute press. Washington D.C., USA.
2. Shears P. Cholerae. Ann Trop Med Para 1994;88(2):109-122.
3. Lipp E, Huq A, Colwell R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin Microbiol Rev 2002;15(4):757-770.
4. Baumann P, Schubert RH W. Family II. *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245<sup>AL</sup>, 1984, p. 516-550. In N. R. Krieg and J. G. Holt Ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams and Williams Co., Baltimore USA.
5. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, *et al.* Extended Serotyping Scheme for *Vibrio Cholerae*. Curr Microbiol 1994;28:175-178.
6. Yamai S, Okitsu T, Shimada T, Katsube Y. Distribution of serogroups of *Vibrio Cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. Kansenshogaku Zasshi 1997;71(10):1037-1045.
7. Giono S, Gutierrez L, Rodriguez G, *et al.* *Vibrio cholerae* O1 Fenotipos y Genotipos México. Gac Med Méx 1995;131:28-35.
8. Brock DT. Milestones in Microbiology. 1975. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.
9. Wachsmuth K, Olsvik O, Evins G, Popovic T. Molecular epidemiology of cholera. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Wachsmuth K., Blake P., Olsvik O., Ed. 1994. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.
10. Wachsmuth K, Evins G, Fields P, Olsvik O, Popovic T, Bopp C, Wells J, Carrillo C, Blake P. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. J Infect Dis 1993;167:621-626.
11. De SN. Enterotoxicity of bacteria free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. Nature 1959;183:1533-1534.

12. Dutta NK, Panse MW, Kulk DR. Role of cholera toxin in experimental cholera. *J Bacteriol* 1959;78:594-595.
13. Center for Disease Control. Cholera-Western Hemisphere. *MMWR* 1992;41:667-668.
14. Center for Disease Control. Cholera outbreak-Peru, Ecuador and Colombia. *MMWR* 1991;40:225-227.
15. Berche P, Poyart C, Abachin E, Lelievre H, Vandepitte J, Dodin A, Fournier JM. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1994;170:701-704.
16. Albert M, Ansaruzzaman M, Bardhan P, *et al*. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* 1993;342:387-390.
17. Shimada T., Arakawa E., Itoh K. Two strains of *Vibrio cholerae* non-O1 possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* serogroup O139 synonym “Bengal”. *Curr Microbiol* 1995;29:1-3.
18. Mandal B.K, Epidemic cholera due to a novel strain of *Vibrio cholerae* non-O1. The beginning of a new pandemic? *J Infect* 1993;27:115-117.
19. Shimada T, Nair BG, Deb BB, Albert M, Sack. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet (Letter)* 1993;341:1346-1347.
20. Cravioto A, Beltrán P, Delgado G, *et al*. Non-O1 *Vibrio cholerae* O139 “Bengal” is genetically related to *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa isolated in Mexico. *J Infect Dis* 1994;169:1412-1413.
21. Popovic T, Fields P, Olsvik O, Weel J, *et al*. Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. *J Infect Dis* 1995;171:122-127.
22. Calia K, Murtagh , Ferraro M, Calderwood S. Comparison of *Vibrio cholerae* O139 with *Vibrio cholerae* O1 Classical and El Tor biotypes. *Infec Immun*. 1994;62(4):1504-1506.
23. Stroehner UH, Jedani KE, Dredge BK, *et al*. Genetic rearrangements in the *rfb* regions of *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1995;92:10374-10378.

24. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam T. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:873-884.
25. Kaper JB, Bradford HB, Roberts NC, Falkow S, Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the US gulf coast. *J Clin Microbiol* 1982;16:129-134.
26. García-Martínez J, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez Varela F, Zorraquino A. Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol and Med Microbiol* 1996b;14(4):231-244.
27. Lan R, Reeves P. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiol* 1998;144:1213-1221.
28. Antón A, Martínez-Murcia A, Rodríguez-Varela F. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *J Mol Evol* 1998;47:62-72.
29. García-Martínez J, Martínez-Murcia AJ, Antón A, Rodríguez Varela F. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of the same *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *J Bacteriol* 1996;178(21):6374-6377.
30. Chun J, Huq A, Colwell R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(5):2202-2208.
31. Dasen S, LiPuma J, Kostman J, Stull T. Characterization of PCR-ribotyping for *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2422-2424.
32. Schoolnik G, Yildiz F. The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. *Genome Biology* 2000;1(3):rev 1016.1-1016.3.
33. Heidelberg J.F, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 2000;406:477-484.
34. Salyers A, Whitt D. Cholera (*Vibrio cholerae*). In *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. 1994; p p 141-156. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.

35. Miller J. Bacteriophage and the evolution of epidemic cholera. *Infect Immun* 2003;71(6):2981-2982.
36. Waldor MK, Mekalanos JJ, Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996;272:1910-1914.
37. Karaolis D, Somara S, Maneval D, Johnson J, Kaper J. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type IV pilus and phage receptor in cholera bacteria. *Nature* 1999;399:375-379.
38. Faruque S, Zhu J, Kamruzzaman A, Mekalanos J. Examination of diverse toxin-coregulated pilus-positive *Vibrio cholerae* strains fails to demonstrate evidence for *Vibrio* pathogenicity island phage. *Infect Immun* 2003;71(6):2993-2999.
39. O'Shea Y, Boyd EF. Mobilization of *Vibrio* pathogenicity island between *Vibrio cholerae* isolates mediated by CP-T1 generalized transduction. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:153-157.
40. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Cholera 2000. *World Health Organization* 2001;76 (31):233-240.
41. Tauxe R, Seminario L, Tapia R, Libel M. The Latin American epidemic. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Wachsmuth K, Blake P, Olsvik O. Ed. 1994. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.
42. Blake P. Endemic cholera in Australia and the United States. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Wachsmuth K, Blake P, Olsvik O. Ed. 1994; American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.
43. Swerdlow D, Ries A. *Vibrio cholerae* non-O1- the eighth pandemic? *The Lancet* 1993;342:382-383.
44. Burton A. Cholera O139 comeback in Bangladesh. *The Lancet infectious diseases* 2003;3:603.
45. Evins G, Cameron D, Wells J, Green K, Popovic T, Giono S, Wachsmuth K, Tauxe R. The emerging diversity of electrophoretic types of *Vibrio cholerae* in the western hemisphere. *J Infect Dis* 1995;172:173-179.

46. Coelho A, Vicente ACP, Baptista MAS, Momen H, Santos FARW, Salles CA. The distinction of pathogenic *Vibrio cholerae* groups using arbitrarily primed PCR fingerprints. *Res Microbiol* 1995;146:671-683.
47. Nandi S, Khetawat G, Sengupta S, Majumder R, Kar S, Bhadra R, Roychoudhury S, Das J. Rearrangements in the genomes of *Vibrio cholerae* strains belonging to different serovars and biovars. *J Sys Bacteriol* 1997;47(3):858–862.
48. Khetawat G, Bhadra R, Nandi S, Das J. Resurgent *Vibrio cholera* O139: Rearrangement of cholera toxin genetic elements and amplification of *rrn* operon. *Infect Immun* 1999;67(1):148-154.
49. Faruque S, Manujendra S, Asadulghani, Sack D, Sack B, Takeda Y, Nair B. The O139 serogroup of *Vibrio cholerae* comprises diverse clones of epidemic and non epidemic strains derived from multiple *V. cholerae* O1 or non-O1 progenitors. *J Infect Dis* 2000;182:1161-1168.
50. Ibrahim A, Gerner-Smidt P and Sjostedt A. Amplification and restriction endonuclease digestion of large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2894-2896.
51. Selander RK, Caugant DA, Whittam TS. Genetic structure and variation in natural population of *Escherichia coli*. P.p 1625-1648. In FC Neidhardt, JL Ingraham, Kb Low, B Magasanik, M Schaechter, HE Umbarger Ed. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol 2. 1987. ASM. Washington D.C. USA.
52. Selander RK, Li J, Nelson K. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. p.p 2691-2707. In FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikov, M Riley, M Schaechter, HE Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed, vol 2. 1996. ASM Press. Washington D.C. USA.
53. Salle CA, Momen H. Identification of *Vibrio cholerae* by enzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:544-547.



54. Whittam TS. Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia coli*, p.p 2708-2720. In FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikov, M Riley, M Schaechter, HE Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed, vol 2. 1996. ASM Press. Washington D.C. USA.
55. Karaolis DKR, Lan R, Reeves PR. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental non toxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 1996;177:3191-3198.
56. Bik EM, Bunschoten AE, Gouw RD, Mooi FR. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J* 1995;14:209-216.
57. Karaolis DKR, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3134-3139.
58. Honma Y, Yamamoto K, Iwanaga M. Aberrant gene for El Tor hemolysin from *Vibrio cholerae* non-O1, NO37. *FEMS Microbiol Lett* 1995;133:151-154.
59. Vimont S, Dumontier S, Escuyer V, Berche P. The *rfa D* locus: a region of rearrangement in *Vibrio cholerae* O139. *Gene* 1997;185:43-47.
60. Dumontier S, Berche P. *Vibrio cholerae* O22 might be a putative source of exogenous DNA resulting in the emergence of the new strain of *Vibrio cholerae* O139. *FEMS Microbiol Lett* 1998;164:91-98.
61. Mekalanos JJ, Rubin EJ, Waldor MK. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;18:241-248.
62. Bik EM, Gouw RD, Mooi FR. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J Clin Microbiol* 1996;34:1453-1461.
63. Boyd EF, Moyer KE, Shi Lei and Waldor MK. Infectious CTX $\phi$  and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infec Immun* 2000;68(3):1507-1513.

- 63a. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(3):403-431.
64. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid Identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(4):945-952.
65. Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, Lavenia A, Di-Michele M, Tomasini T, Monti-Bragadin C. PCR-ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *J Clin Microbiol* 1996;34:2440-2443.
66. Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia*. determined by PCR ribotyping. *J Clin Microbiol* 1992;30:2084-2087.
67. Cartwright CP, Stock F, Beekmann S, Williams EC, Gill VJ. PCR amplification of rRNA intergenic spacer regions as a method for epidemiologic typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1995;33(1):184-187.
68. Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmée M, Rossier A, Babut F, Petit JC. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2000;38(7):2484-2487.
69. Stubbs SLJ, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR-ribotypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(2):461-463.
70. Urakawa H, Tsukamoto KK, Ohwada K. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP analysis among the family *Vibrionaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 1997;152:125-132.
71. Wong H, Lin Ch. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4233-4240.
72. Colwell RR, Huq A, Chowdhury MA, Brayton PR, Xu B. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. *Can J Microbiol* 1995;41(10):946-950.

## Apéndice I.

### Medios de cultivo.

Infusión cerebro corazón (BHI) (Bioxon # cat. 112-1).

Luria Bertani (Gibco BRL # cat 12795 027).

### Amortiguador de cosecha.

Tris base (Sigma T1503)10 mM 1.211g

EDTA (1mM) 0.372g

Aforar a 1 litro de agua desionizada estéril. Ajustar pH 7.5.

### Colorante de migración para MLEE.

Etanol absoluto (J.T Baker 9000 03) 6.6 mL

Agua desionizada 18.4 mL

Amaranto 0.031g

### Solución de paro (stop) para geles de almidón.

Agua desionizada 1500 mL

Metanol industrial 1500 mL

Ácido acético (Merck 109951) 300 mL

Mezclar y guardar en un frasco ámbar.

### Gel

Almidón hidrolizado de papa para geles

(Connaught laboratories limited) 48g

Amortiguador

(especifico para cada enzima) 420 mL

Colocar en un matraz Erlen Meyer de 1 litro y hervir hasta que la solución sea translúcida y espesa, desgasificar y vaciar a los moldes.

### **Amortiguadores para los geles y electroforesis.**

#### **Amortiguador de fosfatos pH 7 (Gel)**

Fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) (Tecnología Química F 1260)	6.36 g
Ácido cítrico (Tecnología Química A 1340)	1.524g
Agua desionizada	6000mL
Ajustar pH con lentejas de hidróxido de potasio.	

#### **Amortiguador de fosfatos PGI pH 6.7 (para electroforesis)**

Fosfato de potasio monobásico( $K_2HPO_4$ ) (Tecnología Química F 1280)	108.87g
Hidróxido de sodio (NaOH) (Merck # 6498)	14.35g
Agua desionizada	6000mL

#### **Amortiguador Tris citrato pH 8 (Gel)**

Diluir el amortiguador Tris citrato pH 8 para electroforesis 200:5800 con agua desionizada.

#### **Amortiguador Tris citrato pH 8 (para electroforesis)**

Tris (Sigma T1503)	416g
--------------------	------

Acido cítrico	165g
Agua desionizada	5000mL

**Amortiguadores para tinción.**

**Amortiguador 0.2M Tris HCl (pH 8)**

Tris (Sigma T1503)	145.2g
Agua desionizada	6,000mL
HCl (Merck # 1.13386)	54mL

**Amortiguador de fosfatos para tinción pH 7**

**Solución A (pH4.4)**

0.2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O (monobásico) (Baker Analyzed # 3824)	27.6g
Agua destilada	1000mL

**Solución B (pH 8.9)**

0.2M NaHPO <sub>4</sub> (dibásico anhidro)	28.4g
Agua destilada	1000mL

Mezclar:

Solución A	80mL
Solución B	80mL
Agua desionizada	3840mL

**Amortiguador 0.1M Fosfato de potasio (pH 5.5)**

Fosfato de potasio (monobásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	13.6g
Agua destilada	1000mL
NaOH	1.5g

### **0.1M MgCl<sub>2</sub>**

Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O) (Merck 5833)	40.6g
Agua desionizada	2000g

### **0.25 M MnCl<sub>2</sub>**

Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O) (Merck 105 927)	4.9g
Agua desionizada	100mL

### **Catalizador, colorantes, coenzimas y sustratos.**

NAD	β-nicotinamida adenina di nucleótido (DPN)	1g/100 mL H <sub>2</sub> O
NADP	β-nicotinamida adenina di nucleótido fosfato(TPN)	1g/100 mL H <sub>2</sub> O
NBT	Azul de tetrazolio	1g/100 mL H <sub>2</sub> O
MTT	MTT tetrazolio	1g/100 mL H <sub>2</sub> O
PMS	metosulfato de fenazina	1g/100 mL H <sub>2</sub> O

### **Acido Málico 2.0 M pH 7**

Acido málico (Sigma M0375)	536.4g
NaOH	320.0g

### **MDH (50 U/mL)**

Deshidrogenasa málica (Sigma M7508)	5000 unidades
Agua desionizada	100 mL

### **PGI (50U/mL)**

Fosfoglucoasa isomerasa (Sigma P9010)	5000 unidades
Agua desionizada	100 mL

### **XO (2U/mL)**

Xantina oxidasa (Sigma X1875)	50 unidades
Agua desionizada	25 mL

### **G-6-PDH (10U/mL)**

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma G8878)	1000 unidades
Glicerol 50% (Sigma G 9012) (50 mL H <sub>2</sub> O + 50 mL glicerol)	100 mL

### **Tinción de geles.**

#### *Deshidrogenasas.*

#### **Alanina deshidrogenasa (ALD)**

Amortiguador de fosfato de sodio pH 7	50 mL
DL-alanina (Sigma A7627)	50mg
NAD	2 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	50 mL
Glucosa-6-fosfato (Sigma G7250)	100mg
0.1 M MgCl <sub>2</sub>	1 mL
NADP	1 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	20 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	10 mL
Ácido 6-fosfogluconico (Sigma P7626)	10 mg

Mezclar y añadir:

NADP	0.5 mL
------	--------

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **Isocitrato deshidrogenasa (IDH)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	50 mL
ácido isocítrico	50 mg
NADP	1mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	2mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL



### **Malato deshidrogenasa (MDH)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	40 mL
2.0 M D-L ácido málico (pH 7)	6 mL
NAD	2 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **Enzima málica (ME)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	40 mL
2.0 M DL ácido málico (pH 7)	6 mL
NADP	1.5 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	2 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **Shikimic (SHK)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	50 mL
Acido shikimico (RT)	30 mg
NADP	1 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	2 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **L-treonina deshidrogenasa (THR)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	50 mL
L-treonina (Sigma T8625)	50 mg
NAD	2 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### **Indofenol oxidasa (IPO)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	40 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	1mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

Exponer a la luz a temperatura ambiente.

### **Catalasa (CAT)**

#### 1. Solución A

Añadir en orden:

Agua desionizada	50 mL
Tiosulfato de sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O) (Merck 106 512)	750mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (solución al 50%)	1.5 mL

2. Agregar sol. A al gel, incubar a temperatura ambiente por 10 min. (no más de 20 minutos)

3. Preparar sol. B justo antes de utilizarse:

Solución stock:

Agua desionizada	50 mL
KI (yoduro de potasio) (Merck 105 044)	750mg

**Solución B:**

Añadir 10 mL de la solución stock a 60 mL de agua desionizada (dilución 1:7)  
(no funciona disolver 1/7 del peso de KI directamente en agua)

4. Después de la pre-incubación, lavar el gel con abundante agua.

5. Añadir 40 mL de la sol. B y agitar suavemente

6. Lavar el gel con abundante agua en cuanto aparezcan bandas blancas contra un fondo azul. Agregar agua en lugar de solución de paro. Leer el gel inmediatamente ya que el gel se sigue obscureciendo y las bandas débiles pueden desaparecer.

***Transferasas.***

**Transaminasa glutámico oxaloacética (GOT)**

En un matraz pesar:

Piridoxal-5'-fosfato (Sigma P9255)	1 mg
Ácido L-aspártico	50 mg
Ácido $\alpha$ -cetoglutámico (Sigma K1750)	100mg
Sal "Fast blue BB" (Sigma F3378)	100mg

En el momento de teñir añadir:

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	50 mL
------------------------------------	-------

**Hexokinasa (Hex)**

0.1M Amortiguador Glycyl-glycina (pH 7.5)	25 mL
D-glucosa	200mg
ATP (Sigma A5394)	50 mg
NADP	1 mL

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	2mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

Agar:

0.1M Amortiguador Glycyl-glycina (pH 7.5)	30mL
Agar-Agar (Merck 1.01614.1000)	600mg

Hervir hasta la total disolución de agar, enfriar a 60°C agregar la solución de tinción mezclar suavemente sin hacer burbujas y vaciar sobre el gel.

### **Nucleótido fosforilasa (NSP)**

Amortiguador fosfato de sodio (pH 7)	25mL
Inosina RT (I4125)	20 mg
Xantina oxidasa (X1875)	1 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

Agar:

Amortiguador fosfato de sodio (pH 7)	30mL
Agar-agar	0.6g

Hervir hasta la total disolución de agar, enfriar a 60°C agregar la solución de tinción mezclar suavemente sin hacer burbujas y vaciar sobre el gel.

### **Fosfoglucomutasa (PGM)**

Agua desionizada	25 mL
Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	5 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	5 mL

Glucosa-1-fosfato y glucosa-1, 6-Difosfato	5 mL
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	5 mL
NADP	0.5 mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

### ***Hidrolasas.***

#### **Leucino aminopeptidasa (LAP)**

Amortiguador 0.1M fosfato de potasio (pH 5.5)	50 mL
0.1M MgCl <sub>2</sub>	1mL

En el momento de teñir añadir:

L-leucyl-β-naftyl-amida (Sigma L0376)	30mg
“Fast black salt”(Sigma F7253)	30mg

#### **Fenil alanyl-leucina peptidasa (PLP)**

L-Fenilalanyl-L-leucina (Sigma P3876)	20 mg
Peroxidasa (Sigma P8125)	10 mg
Orto-dianisidina di-HCl (Sigma D3252)	10 mg
Veneno de víbora (Sigma V7000)	10 mg

En el momento de teñir añadir:

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	25 mL
0.25M MnCl <sub>2</sub>	0.5 mL

Mezclar en el agitador magnético

Agar:

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	30 mL
Agar-agar	600mg

Hervir hasta la total disolución de agar, enfriar a 60°C agregar la solución de tinción mezclar suavemente sin hacer burbujas y vaciar sobre el gel.

### ***ISOMERASAS.***

#### **Fosfo-glucosa isomerasa (PGI)**

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	25 mL
Fructosa-6-fosfato (Sigma F3627)	10 mg
0.1M MgCl <sub>2</sub>	0.3 mL
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma G8878)	0.3mL
NADP	0.6mL

En el momento de teñir añadir:

PMS	0.5 mL
MTT	1 mL

Agar:

Amortiguador 0.2 M Tris HCl (pH 8)	30 mL
Agar-agar	600mg

Hervir hasta la total disolución de agar, enfriar a 60°C agregar la solución de tinción mezclar suavemente sin hacer burbujas y vaciar sobre el gel.

## **Apéndice II.**

### **Extracción DNA.**

Agua tratada con DEPC (Diethylpyrocarbonato)	
Amortiguador TE	
Dodecyl sulfato de sodio (SDS)	10%.
NaCl	5M.
Proteinasa K	20 mg/mL.
Solución de CTAB/NaCl	
Cloroformo / alcohol isoamílico	24:1
Fenol / cloroformo / alcohol isoamílico	25:24:1
Isopropanol	Absoluto.
Etanol	70%.
Amortiguador TBE	0.5X.
Amortiguador de carga	
Bromuro de etidio	10 mg/mL.

### **Amortiguador TBE 5X.**

Tris base	54g
Acido bórico (Merck 100165)	27.5g
EDTA 0.5M pH 8	20 mL
Aforar a un litro de agua desionizada estéril.	

### **Amortiguador TBE 0.5X.**

Diluir 1:10 el amortiguador TBE 5X con agua desionizada estéril.

### **Amortiguador TE (pH**

100 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar las soluciones en autoclave por 20 minutos. Guardar el amortiguador a temperatura ambiente

### **EDTA 0.5M pH8.**

EDTA 186.1g

Agregar 800 mL de agua desionizada, colocar en un agitador magnético y ajustar a pH 8 con lentejas de NaOH. Aforar a un litro y esterilizar en autoclave.

### **Dodecyl sulfato de sodio (SDS) al 10%**

SDS 10g

Aforar a 100 mL de agua estéril, calentar suavemente hasta obtener total disolución.

### **Cloruro de Sodio (NaCl) 5M**

NaCl (Merck) 290g

Aforar a 1 litro de agua desionizada. Esterilizar en autoclave.

### **Proteinasa K 20 mg/mL**

Proteinasa K (Gibco #cat. 25530 015) 200mg

Tris 50 mM pH 8 10 mL

Disolver la proteinasa K en el Tris 50 mM. Alicuotar en tubos eppendorf y congelar a -20°C.

### **Tris 50 mM pH 8**

Tris base 6.1 g

Aforar a 1 litro de agua desionizada. Esterilizar en autoclave.



### **Solución de Hexadecyltrimethylammonium bromide/NaCl (CTAB/NaCl)**

NaCl 0.7M	4.06g
Aforar a 100 mL de agua desionizada.	
CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) (Sigma H6269)	10 g
Aforar a 100mL con la solución de NaCl 0.7M. Calentar suavemente hasta disolver.	

### **Cloroformo / alcohol isoamílico 24:1**

Cloroformo (Merck 1.15854)	24 volúmenes.
Alcohol isoamílico (Merck 100 979)	1 volumen.

### **Fenol / cloroformo / alcohol isoamílico 25:24:1**

Fenol saturado y amortiguado pH 7.49 (Gibco ultra pure #cat.15513 039)	25 volúmenes.
Cloroformo	24 volúmenes.
Alcohol isoamílico	1 volumen.

### **Etanol al 70%**

Etanol absoluto	70 mL
Agua desionizada	30 mL

### **Isopropanol absoluto**

Isopropanol (Merck 9634)

### **Enzimas para PCR.**

Enzima Expand (Boehringer Mannheim # cat. 1681 834).

Taq polimerasa (Gibco BRL # cat. 18038 042).

Desoxinucleótidos (Applied biosystems # cat.808 0007).

### **Amortiguador de carga (solución de azul de bromofenol-sacarosa).**

Solución de azul de bromofenol en agua estéril 0.25% (peso /Vol.)

Solución de sacarosa al 40% en agua estéril (peso /Vol.)

Mezclar las dos soluciones y guardar a 4°C.

### **Bromuro de Etidio (10mg/mL)**

Bromuro de etidio(Gibco ultra pure #cat.15582 018)

1 g

Agua desionizada estéril

100mL

Mezclar en agitador magnético por muchas horas hasta asegurar la disolución del colorante.

Guardar la solución en frasco ámbar y temperatura ambiente.

### **Enzimas de restricción.**

*Alf*II (Gibco BRL # cat. 1209 183)

*Dde*I (Gibco BRL # cat. 835 293)

*Hae*III (Gibco BRL # cat. 693 936)

*Hha*I (Gibco BRL # cat. 688 541)

*Hpa*II (Gibco BRL # cat. 15209 018)

*Hinf*I (Gibco BRL # cat. 15223 019)

*Mbo*I (Gibco BRL # cat. 15248 016)

*Nci*I (Gibco BRL # cat. 1062 573)

*Rsa*I (Gibco BRL # cat. 15424 013)

*Taq*I (Gibco BRL # cat. 15218 035)

### **Poliacrilamida al 20%.**

Acilamida (Gibco ultra pure #cat.15512 015)

19.3g

Bis-acrilamida (Gibco ultra pure #cat.15516 016)

0.7g

TBE 0.5X

cbp 100mL

Mezclar en agitador magnético hasta asegurar la disolución. Guardar la solución en frasco ámbar a 4 °C.

### **Persulfato de amonio al 10%.**

Persulfato de amonio(Gibco ultra pure #cat.15523 012)

10g

Agua desionizada estéril

100mL

Disolver el persulfato de amonio, alicuotar en tubos eppendorf y guardar a -70°C.

### **Geles de acrilamida al 8%.**

Acrilamida al 20 %

10 mL

Persulfato de sodio al 10%

85.7µL

TEMED (Gibco ultra pure #cat.15524 010 )

14.2µL

TBE 0.5X

cbp 25 mL

Mezclar en el momento de preparar el gel.

### **Solución fijadora para geles de acrilamida.**

Etanol absoluto

50 mL

Acido acético

5 mL

Agua desionizada

cbp 100 mL

### **Tinción de plata.**

Gelcode, kit tinción de plata (Pierce #cat.24597).

Solución de nitrato de plata (concentrada)

Diluir 1:15

Solución aldehído reductor (concentrado)

Diluir 1: 7.5

Solución base reductora (concentrada)

Diluir 1: 7.5

Solución estabilizadora (concentrada)

Diluir 1: 45

Las diluciones se hacen con agua desionizada (18  $\Omega$ ). Las soluciones de trabajo de nitrato de plata (se reutilizó hasta 3 veces) y estabilizadora se guardaron en frasco ámbar a 4°C. Las soluciones de trabajo aldehído reductor y base reductora se prepararon y mezclaron al momento de ser utilizadas.