



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
*Vibrio cholerae*  
DE LOS CANALES DE XOCHIMILCO”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:

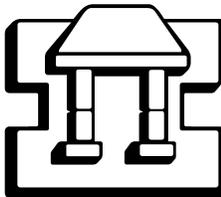
**GUILLERMO ALEJANDRO SOLÍS SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA**

**2005**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México.**





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.

## **Agradecimientos:**

Al Dr. **Pedro Ramírez** por su apoyo incondicional y sus acertadas sugerencias en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. **Carlos Eslava Campos** del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina por su apoyo y asesoría.

A las integrantes de mi comité tutorial, QFB **Esperanza Robles Valderrama**, Dra. **Patricia Bonilla Lemus**, y a la M. en C. **Elizabeth Ramirez Flores** del proyecto CyMA de la UIICSE, por su observaciones en la revisión de este trabajo.

Al M. en C. **Armando Navarro Ocaña** del laboratorio de Salud Pública y Cepario de la Facultad de Medicina, por su ayuda en la determinación serológica.

A la M. en C. **Eva Salinas Cortés**, a la M. en C. **Ariadna Cruz Córdova** y la M. en C. **Leticia Martínez Romero**, del laboratorio de Microbiología Ambiental, por su apoyo brindado en la realización de los ensayos moleculares.

A las **Biólogas Blanca Martínez, Rocío Ibarra**, del laboratorio de Bacteriología de la UIICSE por su amistad y ayuda.

A la Dra. **Nandini Sarma**, del laboratorio de Zoología Acuática, por su ayuda en el conteo de zooplancton.

A la Bióloga **Dolores Hurtado Bocanegra**, del laboratorio de Bacteriología de la UIICSE por su ayuda en la determinación de clorofilas.

Al M. en C. **José Luis Gama Flores**, por sus consejos y amistad, y a quien considero una parte importante de mi desarrollo académico.

A los Proyectos DEGAPA-PAPIIT IX-219704 e IN-210205.

## **Dedico esta tesis**

A mi padre **Demetrio Solís Romero**, gracias por haberme dado lo mas preciado para mi, La Vida, por tu apoyo, paciencia y sobre todo tu confianza.

A mis hermanos **Angélica, Lourdes y Cesar**, gracias por estar conmigo en todo momento y en especial a ti Angy gracias por haberte quedado con nosotros, son la mejor familia y no los cambiaria por nada.

A mis sobrinos **Rodrigo y Daniel**, cuando sean grandes y lean esto, sepan que ustedes son los mejores sobrinos que jamás pude haber deseado, los quiero mucho, y un consejo: vivan cada día de sus vidas lo mejor que puedan ya que de la vida se aprende de los que te ayudan pero también de la que te hace daño.

A ti **Nancy**, gracias por estar conmigo, por brindarme tu ayuda y en especial tu comprensión y paciencia, por brindarme tantos momentos de alegría, te quiero.

A mis amigos **Miguel Ortiz, Oscar Anzaldo y Ángeles Serrano**, difícilmente encontraría amigos como ustedes, gracias por brindarme su amistad.

A mis amigos y compañeros de carrera de la FES Iztacala **Maritza, Sagrario, Lucrecia, Chabela, Omar, Adrian, Yarely, Alejandra, Diana, José de Jesús, Antonio, Paloma, Margarita, Claudia, y Keila** aunque no quiera, gracias por haber compartido conmigo un momento de sus vidas, siempre estarán en mi memoria y en mi corazón.

A mis compañeras del laboratorio de salud pública, **Jady, Consuelo, Noemí, Roció, Norma, Laura y Lilian**, por hacer mas amena mi estancia en el laboratorio.

*A la memoria de mi madre*

*Concepción Sánchez Garduño*

"Hay dos formas de ver la vida: una es creer que no existen milagros, la otra es creer que todo es un milagro."

Albert Einstein

<b>Índice</b>	<b>Págs.</b>
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	5
Generalidades.....	5
Antecedentes Internacionales.....	6
Antecedentes en México.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	12
General.....	12
Particulares.....	12
METODOS.....	13
Área de estudio.....	13
Parámetros físico-químicos.....	17
Parámetros biológicos.....	17
Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> .....	17
Identificación bioquímica.....	18
Sensibilidad a antimicrobianos.....	19
Tipificación serológica.....	21
Análisis molecular.....	21
Hemólisis.....	21
RESULTADOS.....	23
Parámetros físico-químicos.....	23
Parámetros biológicos.....	24
Aislamiento e identificación bioquímica.....	24
Sensibilidad a antimicrobianos.....	25
Tipificación serológica.....	25
Análisis molecular.....	26
Hemólisis.....	26

Morfología colonial.....	26
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS.....	50
ANEXOS.....	57
Anexo I.....	57
Anexo II.....	59
Anexo III.....	60

## Índice de Cuadros y Figuras

Págs.

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo.....	13
Figura 1. Mapa de ubicación del área de estudio y las estaciones de muestreo...	14
Figura 2. Estación 1, Laguna de Xaltocán.....	15
Figura 3. Estación 2, Canal Texhuilo.....	15
Figura 4. Estación 3, Isla de Tlilac.....	16
Figura 5. Estación 4, Barrio Sn. Lorenzo.....	16
Cuadro 2. Componentes químicos contenidos en las tarjetas de identificación bioquímica GNI+.....	19
Cuadro 3. Composición de la tarjeta de susceptibilidad de Gram-Negativos GNS-604.....	20
Cuadro 4. Secuencias utilizadas para el análisis de genes de virulencia de <i>Vibrio cholerae</i> .....	22
Cuadro 5. Promedio mensual y anual de parámetros determinados en agua.....	28
Cuadro 6. Concentración de clorofila “a” (mg/m <sup>3</sup> ) en los canales del lago de Xochimilco.....	28
Cuadro 7. Promedio mensual de los parámetros biológicos determinados en agua.....	29
Cuadro 8. Especies bacterianas identificadas en muestras de agua de los canales del lago de Xochimilco.....	29
Cuadro 9. Frecuencia de aislamientos de serogrupos de <i>Vibrio cholerae</i> por estación de muestreo durante los 11 meses de estudio en las estaciones 1 y 2.....	30
Cuadro 10. Frecuencia de aislamientos de serogrupos de <i>Vibrio cholerae</i> por estación de muestreo durante los 11 meses de estudio en las estaciones 3 y 4.....	31
Figura 6. Comparaciones entre el número de aislamientos de <i>Vibrio cholerae</i> y los parámetros físico-químicos y biológicos.....	32

Cuadro 11. Similitud de serogrupos presentes en las estaciones de muestreo.....	33
Figura 7. Dendograma de similitud entre estaciones.....	34
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de amplificadas por PCR del DNA de <i>Vibrio cholerae</i> .....	34
Cuadro 12. Patrones de resistencia a antimicrobianos identificados en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> aisladas de los canales de Xochimilco.....	35
Figura 9. Comparación de la morfología colonial de <i>V. cholerae</i> , cultivos realizados en Agar Sangre e incubados por siete días a temperatura ambiente.....	36
Cuadro 13. Frecuencia de serogrupos con morfología colonial arrugada y lisa en cepas de <i>Vibrio cholerae</i> de los de Xochimilco.....	37
Cuadro 14. Relación entre la susceptibilidad a antimicrobianos y la morfología presentada por las cepas de <i>V. cholerae</i> .....	38

## RESUMEN

Por mucho tiempo se considero que *Vibrio cholerae* era un organismo típico de ambientes marinos y estuarinos cuya presencia dependía principalmente de las cantidades de sales presentes en el agua, sin embargo recientes estudios han demostrado que *Vibrio cholerae* posee estrategias de supervivencia como la formación de biopelículas y asociaciones con algunos organismos del zooplancton lo que favorece su persistencia en diversos ambientes acuáticos. El presente estudio tuvo como objetivo determinar de *Vibrio cholerae* en los canales de Xochimilco y los factores involucrados con su virulencia y supervivencia, para lo cual se realizaron muestreos mensuales en cuatro puntos de los canales de Xochimilco; se analizaron 48 muestras de agua y se midieron los parámetros físico-químicos (DBO<sub>5</sub>, Oxígeno disuelto, pH, temperatura del agua) y biológicos (clorofila y zooplancton). Los resultados no mostraron una relación entre los parámetros físico-químicos y el número de aislamientos obtenidos de *V. cholerae*. En relación a los parámetros biológicos: la clorofila, no mostró relación con el número de aislamientos de *V. cholerae*, por otra parte se observó una relación con las poblaciones de zooplancton en especial con el grupo de los copépodos, la tipificación por serología mostró 27 serogrupos No-O1/No-O139, siendo O14 y O135 los mas comunes; el ensayo por PCR múltiplex, mostró solo la presencia del gen *toxR*; el 37 % de los aislamientos fueron resistentes a amoxicilina / ácido clavulánico, se observó que 32% de los aislados cambiaban su morfología colonial lisa a colonias con apariencia reseca y con surcos que ha sido definida como rugosa, Se analizó la capacidad de las cepas para producir hemolisinas, al respecto se observó hemólisis parcial ( $\alpha$ ) en el 75% de los aislados y solo el 25% de las cepas causó hemólisis completa. La presencia de *V. cholerae* en los canales de Xochimilco es resultado de la eutrofización antropogénica, incrementando las poblaciones de fitoplancton y zooplancton, este último, asociado a la presencia de *V. cholerae*; asimismo la morfología arrugada, la susceptibilidad a antimicrobianos y la producción de hemolisinas, hacen de las cepas de *V. cholerae* aislado de los canales de Xochimilco un organismo virulento y potencialmente hacen del cuerpo de agua un importante reservorio y posible vehículo de transmisión de *V. cholerae* No-O1/No-O139.

## INTRODUCCIÓN

En los países en vías de desarrollo uno de los aspectos más importantes relacionados con la salud pública, es la calidad del agua la cual tiene una estrecha relación con enfermedades del tracto intestinal entre otras y que son provocadas por la ingestión tanto de agua como de alimentos contaminados y en particular de aquellos que se consumen crudos, como las hortalizas regadas con agua contaminada que contiene agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos y parásitos, algunos de ellos de particular interés médico por su capacidad infectiva. Esta característica epidemiológica hace necesario el monitoreo constante de los cuerpos de agua destinados a diversos usos como son fuente de abastecimiento de agua potable, recarga de mantos freáticos y aquella que se destina para el riego de cultivos y particularmente en la reutilización del agua.

Aún cuando la carga de bacterias es alta en las aguas residuales la supervivencia de las bacterias patógenas en los ambientes acuáticos se ve seriamente afectada por factores ambientales bióticos y abióticos, tales como la bacterivoría por protozoos, oxígeno disuelto, pH, temperatura, concentración de sales, cantidad y disponibilidad de nutrientes. Bajo estas circunstancias bacterias patógenas como *Vibrio cholerae* pueden desarrollar estrategias de supervivencia formando asociaciones comunitarias por medio de biopelículas con miembros de su misma especie o con organismos de especies diferentes en torno a un sustrato como son las raíces de plantas acuáticas, peces, mariscos e integrantes del zooplancton, en éstos, las bacterias se protegen de los factores adversos en el medio acuático, asegurando además un suministro constante de nutrientes para la comunidad bacteriana, ya sea por la presencia de corrientes de agua que lleven los nutrientes necesarios a toda la biopelícula, o por el intercambio y utilización de productos de desecho entre los miembros de la biopelícula (Kolter y Losick, 1998).

Por otro lado las biopelículas formadas por *V. cholerae* se encuentran asociadas con la producción de un exopolisacárido (EPS), el cual le da una apariencia rugosa a la colonia bacteriana al ser cultivada en laboratorio en medios no selectivos. El fenotipo rugoso (arrugado), ha sido descrito con anterioridad en otras especies bacterianas como: *Salmonella enterica Enteritidis*, *Salmonella enterica Typhimurium*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter sakasaki*, los ensayos realizados en estas bacterias sugieren que las variantes arrugadas representan una subpoblación que tiene un papel específico en la formación de biopelículas, nichos ecológicos específicos o ambientes particulares. En el caso de *V. cholerae* puede proveer una ventaja evolutiva o adaptativa a la población bacteriana en un ambiente en particular (Rashid *et al.*, 2003).

La expresión del EPS se presenta como respuesta a factores ambientales adversos promoviendo la supervivencia y persistencia en el ambiente de *V. cholerae* (Ali *et al.*, 2002). Otro mecanismo de supervivencia utilizada por *V. cholerae* es la capacidad que posee para entrar en un estado de latencia en el cual la bacteria se encuentra viable pero no cultivable en los medios de laboratorio convencionales, esto debido a que durante este estadio *V. cholerae* cambia morfológicamente, reduciendo su tamaño a una forma ovoide además de reducir drásticamente su metabolismo (Karper *et al.*, 1995). Factores ambientales (cambios climáticos), falta de condiciones sanitarias que contribuyen al consumo de alimentos y agua contaminados así como la adaptación microbiana, pueden contribuir a la aparición del cólera ya sea como brotes epidémicos y/o de pandemias (Huq y Colwell, 1996).

*V. cholerae* es un habitante común de ambientes acuáticos estuarinos y costeros sin estar relacionado directamente con contaminación de origen humano, este es el agente etiológico causante de la enfermedad conocida como cólera. Este organismo incluye a una amplia variedad de serotipos y biotipos tanto

patógenos como no patógenos. En la actualidad se conoce que el serogrupo O1 Clásico y El Tor, ambos con los biotipos Ogawa, Inaba e Hikojima así como el serogrupo O139 son los únicos capaces de provocar epidemias de cólera.

Una de las propiedades más importantes de *V. cholerae* patogénico es la producción de una toxina llamada colérica (por sus siglas en inglés CT) y su capacidad para adherirse por medio del elemento TCP (toxin coregulated pilli) para colonizar el intestino delgado del hospedero (Liang *et al.*, 2003). El gen *toxR* juega un papel importante en la regulación de la expresión de los factores de virulencia de *V. cholerae* O1 y O139. Adicionalmente a estos factores también se incluyen otras toxinas (Ace, Zot), factores accesorios de colonización, proteínas de membrana externa, hemolisinas y hemaglutininas. El conjunto de estos factores pueden contribuir bajo ciertas circunstancias y en cepas específicas a la virulencia de este patógeno (Sengupta *et al.*, 2003). CT es una enterotoxina formada por una subunidad A y cinco subunidades B, codificadas por los genes *ctxA* de 301pb y *ctxB* respectivamente; TCP es una estructura fimbrial formada por trece subunidades, codificadas por igual número de genes (*I,P,H,A,B,Q,C,R,D,T,E,F,J*), de los cuales *tcpA* es la mayor subunidad constituida por 618pb para el biotipo Clásico y 412pb para el biotipo El Tor (Ghosh *et al.*, 1997). Al parecer los principales genes involucrados en la virulencia se encuentran agrupados en dos regiones del cromosoma de *V. cholerae* conocidas como islas de patogenicidad, la primera región denominada elemento genético CTX, el cual se ha demostrado que forma parte del genoma de un bacteriófago filamentoso CTX $\Phi$ , y la segunda región denominada TCP-factor accesorio de colonización (ACP) o referido como Isla de patogenicidad TCP (Faruque *et al.*, 1998).

Así mismo este organismo es capaz de recibir y transferir mediante las islas de patogenicidad genes relacionados con la producción de toxinas, factores de colonización, resistencia a antibióticos, polisacáridos de la cápsula que le confieren resistencia a cloro así como nuevos antígenos de superficie. Se ha

demostrado que bajo condiciones adecuadas se puede dar la inducción de partículas genómicas denominadas *ctx $\phi$* , involucradas en la transferencia horizontal de genes por fagos. El fago filamentoso puede ser propagado de esta manera en el ambiente e infectar a otras células de *V. cholerae*, el virus en su fase lisogénica puede integrar su genoma en sitios específicos del cromosoma bacteriano (RS) activando genes de patogenicidad en ésta, o bien de manera extracromosomal la forma replicativa del fago aumenta su número para posteriormente ser liberado al ambiente (Ehara *et al.*, 1997; Jouravleva *et al.*, 1998; Karaolis *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2003).

## ANTECEDENTES

### Generalidades

El agente responsable del cólera fue descrito por primera vez por Paccini en Italia en 1854, encontrando un gran número de bacterias largas y curvadas en pacientes con cólera y a las cuales llamó *Vibrio cholerae*. Posteriormente Robert Koch retomó este trabajo en sus estudios del cólera en Egipto, demostrando que la causa de la enfermedad era el organismo en forma de coma que Paccini había descubierto, Koch nombró a este organismo *Kommabazillen* posteriormente nombrado *Vibrio comma* nombre por el que fue conocido durante décadas, sin embargo debido a los trabajos de Paccini fue cambiado finalmente por su nombre actual *V. cholerae* (Karper *et al.*, 1995).

Una gran variedad de microorganismos estaban integrados dentro del género *Vibrio*, que al igual que este eran Gram-negativos, en forma de bastones y con un flagelo polar. Fue hasta la década de los sesenta del siglo pasado que algunos de los criterios para definir el género *Vibrio* fueron establecidos y el Subcomité Internacional de Taxonomía de Vibrios recomendó una clasificación provisional en la cual la mayoría de las especies antes clasificadas dentro del género *Vibrio* fueron excluidas. Posteriormente sobre la base bioquímica se diferenció a los miembros del género *Vibrio* de otros géneros taxonómicamente más cercanos (Faruque *et al.*, 1998).

*Vibrio cholerae* se encuentra dentro del Dominio Bacteria, Phylum BXII Proteobacteria, Clase III Gammaproteobacteria, Orden XI Vibrionales, Familia I Vibrionales, según el Manual Bergey de sistemática bacteriológica (Garrity *et al.*, 2001). Son bacilos cortos, Gram-Negativos, ligeramente enrollados que miden de 1.4 a 2.5  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho, posee gran motilidad debido a un flagelo polar (monotrico) de 259 nm de largo. No forma endosporas ni microquistes, es aerobio y anaerobio facultativo (Karper *et al.*, 1995).

### Antecedentes internacionales

En 1989, Jonson *et al.*, reportaron que *V. cholerae* expresa antígenos de superficie durante la infección, los cuales no se presentan en cultivos *in vitro* hecho de vital importancia para el entendimiento de la patogenicidad e inmunidad de enfermedades infecciosas.

En 1994, Shimada *et al.*, publicaron un esquema de serotipificación ampliado con 155 serogrupos en total, una herramienta de gran utilidad en investigaciones ecológicas y etiológicas de la enfermedad ocasionada por *V. cholerae*. En el mismo año, Waldor y Mekalanos, investigaron la expresión de algunos factores de virulencia conocidos en cepas de *V. cholerae* Clásico y El Tor y en aislamientos clínicos del serogrupo O139, demostrando que en contraste con otras cepas No-O1, O139 expresaban *tcpA*, la mayor subunidad de la toxina correguladora del pilius, y al igual que en cepas O1 la expresión de la toxina colérica (CT), *Tcp* y otras proteínas de membrana externa están reguladas por *toxR*. El mismo año (1995) trabajos realizados por Waldor *et al.* mostraron la relación existente entre el lipopolisacárido (LPS) y el antígeno O de *V. cholerae* O1, como factores importantes para la colonización del intestino delgado y la resistencia a suero.

En 1995, Bik *et al.*, obtuvieron evidencia que demostraba la transferencia horizontal de genes involucrados en la síntesis de polisacáridos. Esta variación se debe a la adquisición de un nuevo fragmento genético denominado *otn*, el cual probablemente fue originado en una cepa No-O1 no toxigénica, y reemplazó una amplia sección de la región *rfb* de cepas O1, por recombinación homóloga, este evento fue determinante en la aparición de la epidemia de cólera en Asia a principios de la década de los noventa.

En 1996, Huq y Colwell, asocian los factores ambientales al surgimiento de brotes epidémicos, relacionando estos factores con la supervivencia y reproducción bacteriana, en especial de *V. cholerae*.

En 1997 Borroto, realiza una revisión bibliográfica sobre la ecología de *V. cholerae* del serogrupo O1 en ambientes acuáticos, mostrando que la naturaleza endémica y estacional del cólera depende de la supervivencia de *V. cholerae* O1 en estado viable pero no necesariamente cultivable en nichos ecológicos específicos durante periodos interepidémicos. El patógeno encuentra las condiciones favorables en ambientes con características de salinidad moderada, alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas, pH neutro o ligeramente alcalino y la presencia de macrofitas, fitoplancton, zooplancton, peces, moluscos y crustáceos. Dichas condiciones ecológicas son típicas de estuarios y zonas costeras, donde *V. cholerae* O1 es considerado miembro autóctono de dichos ambientes.

En 1997 Ehara *et al.*, caracterizaron los fagos filamentosos de *V. cholerae* O139 y O1, encontrando dos tipos de fagos denominados fs1 (6.4kb) y fs2(8.5kb). El genoma de f1 codifica una nueva enterotoxina homóloga a la toxina Zot (zonula ocludens toxin). Al mismo tiempo Ghosh *et al.* examinaron 24 cepas de *V. cholerae* No-O1 y No-139 de aislamientos clínicos y ambientales, encontrando que en algunos de ellos se presentan genes relacionados con virulencia *ctxA* y *tcpA*, y la mayoría presentó *toxR*.

En 1997, Ghosh *et al.*, examinaron los genes asociados a virulencia, *ctxA*, *tcpA*, *toxR*, en cepas No-O1/No-O139, encontrando en la mayoría la presencia de *toxR*.

En 1998, Sharma *et al.*, realizaron estudios de PCR en cepas No-O1/No-O139 provenientes de pacientes con diarrea en Calcuta, para determinar la

presencia de los principales genes relacionados con virulencia (*ctxA*, *zot*, *ace* *tcpA*), además de los genes para las toxinas termo-estable termo-lábil y verotoxina (*Stx*). Sin embargo, no encontraron ninguno de estos genes en las cepas estudiadas. El análisis de polimorfismo genético (RFLP), ribotipos y PFGE muestran que algunos serogrupos causantes de diarrea, lo hacen mediante mecanismos distintos a los descritos para los serogrupos O1/O139, por lo que se propone la nomenclatura de enteropatógenas a estos serogrupos (Sharman *et al.*, 1998).

En 1999, Yildiz y Schoolnik, muestran que la producción de un exopolisacárido en variantes rugosas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor le confiere resistencia al cloro y capacidad para la formación de biopelículas, encontrando también que contienen secuencias homólogas con genes de bacterias de otras especies.

En 2000 Chakraborty *et al.*, estudian la presencia de los genes *ctxAB*, *tcpA*, *toxR* y *toxT*, demostrando la presencia y expresión de genes de virulencia en diversos serogrupos ambientales, lo cual sugiere que las cepas ambientales de *Vibrio cholerae* aparentemente constituyen un reservorio de genes de virulencia.

En 2001, Karaolis *et al.*, mediante la comparación del gen *asd* concluyen que no hay diferencias entre la sexta y la séptima pandemia, la cual fue causada por una cepa No-O1, lo cual es evidencia de transferencia horizontal de genes.

En 2001, Singh *et al.*, realizan un análisis de las relaciones clonales entre serogrupos O1/O139 No-O1/No-O139 en aislamientos clínicos y ambientales, encontraron que las cepas de *Vibrio cholerae* de origen clínico o ambiental, poseen la habilidad de producir una nueva toxina secretora la cual es diferente a la producida por *Vibrio cholerae* toxigénico O1 y O139. Por lo que concluyen que el

medio acuático es un reservorio de cepas de los serogrupos O1, O139, No-O1/No-O139.

En 2002 Zo *et al.*, mediante perfiles genómicos de aislamientos de *V. cholerae* O1 ambientales y clínicos en áreas endémicas de cólera en Bangladesh, muestran que la composición de poblaciones ambientales de *V. cholerae* toxigénico son idénticas a las poblaciones causantes de cólera endémico. Cualquier cambio en la composición en las poblaciones de *V. cholerae* en el ambiente acuático ocasionados por fluctuaciones estacionales en el ambiente como la introducción de nuevas cepas por micro-evolución o importadas de otros sistemas, pueden causar cambios en la composición y comportamiento de las poblaciones clínicas, principalmente en la dinámica del cólera epidémico.

En 2003, Louis *et al.*, estudiaron la correlación entre la aparición de *V. cholerae* en la bahía de Chesapeake (Ma, USA) y los factores ambientales por un periodo de tres años. Sus resultados sugieren que temperaturas alrededor de 19 °C y salinidades de entre 2 y 14 ppt influyen en el incremento de la población de *V. cholerae*.

### **Antecedentes en México**

En 1995, Ramírez-García *et al.*, realizaron un estudio ecológico de *Vibrio cholerae* en la laguna de Mecoacán, para determinar al nicho ecológico de este organismo en ambientes salobres y su importancia epidemiológica, demostrando que *V. cholerae* O1 es una especie endémica que forma parte de la microbiota de la laguna que presenta un patrón estacional con incrementos en la época de lluvias y disminución en la época de secas. En este estudio se observó además una asociación con el plancton y con niveles de salinidad de hasta 21 partes por mil, sin embargo, no se encontró relación con la contaminación fecal.

En 1997, Ramírez-Pérez aisló *Vibrio* spp de muestra de agua, ostión y sedimento de la laguna de Mecoacán, Tabasco, encontrando sólo la presencia de

*Vibrio cholerae* del serogrupo No-O1, además de otras especies de *Vibrio* como *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus*, el cual fue proporcionalmente más abundante que los demás, encontrando una relación significativa entre la temperatura y la presencia del organismo en la laguna .

En 1998, Isaac-Márquez *et al.*, realizaron un estudio en pozos de agua para consumo humano, en diferentes localidades de Campeche, mostraron la presencia de *Vibrio cholerae* del serogrupo No-O1, predominando principalmente O14, O155 y O112, los aislamientos además mostraron resistencia principalmente a la ampicilina y a carbenicilina.

En 1999, Beltrán *et al.*, analizaron 397 cepas incluyendo cepas de referencia y cepas provenientes de México y Guatemala mediante un sistema de enzimas multilocus, encontraron una gran diversidad genética entre las cepas analizadas, sin embargo en dicho estudio también se observó que algunas de las cepas de *V. cholerae* No-O1 presentan asociación genética con algunas cepas del serogrupo O1, lo que sugiere, que ciertos linajes de cepas No-O1 tienen distribución intercontinental. Asimismo se encontró que el serogrupo O37 está relacionado con los serogrupos O1/O139. Las relaciones evolutivas entre O1, O139 y O37 indican que nuevas clonas de cólera pueden surgir a partir de la modificación de linajes con potencial epidémico.

## **JUSTIFICACIÓN**

*Vibrio cholerae* es un microorganismo de gran importancia clínica y epidemiológica, agente etiológico del cólera, responsable de 7 pandemias en los últimos dos siglos y que actualmente es endémico en el sureste asiático, partes de África y Latinoamérica.

La aparición y reaparición de epidemias y pandemias de cólera así como la persistencia de *Vibrio cholerae* en ambientes acuáticos están relacionados con factores de patogenicidad y virulencia, supervivencia en el ambiente y reservorios interepidémicos, lo que hace indispensable realizar investigaciones enfocadas al estudio de la ecología de *Vibrio cholerae* y su efecto sobre los factores antes mencionados.

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar los principales factores de patogenicidad de *V. cholerae* así como los factores ambientales que afectan su distribución y persistencia en los canales del lago de Xochimilco.

## OBJETIVOS

### **General**

Determinar la presencia de *Vibrio cholerae* en los canales de Xochimilco así como los factores relacionados con virulencia y persistencia en el ambiente.

### **Particulares**

1. Aislar *V. cholerae* de los canales de Xochimilco.
2. Evaluar la influencia de factores físico-químicos y biológicos con la presencia de *V. cholerae*.
3. Identificar los tipos de antígenos somáticos O presentes en los aislamientos.
4. Determinar los factores de virulencia presentes en los aislamientos, evaluando la presencia de los genes *toxR*, *tcpA*-Clásico / El Tor, *ctxA* y su capacidad hemolítica.

## MÉTODOS

### Área de estudio

Xochimilco se localiza al sureste de la Ciudad de México, DF, al pie de la sierra Chichinautzin a una altura promedio de 2240 m.s.n.m.; ésta población fue fundada sobre un gran lago y una de las características más sobresalientes es su sistema de canales producto de la construcción de islotes artificiales o “chinampas” hechas por capas de troncos, raíces, lianas y tierra, que se utilizan como zonas de cultivo. En la actualidad Xochimilco cuenta con 180 Km de canales, de los cuales 14 Km son turísticos y los 176 Km restantes pertenecen a la zona chinampera, donde se continúan sembrando y cosechando alimentos que son comercializados en los mercados de la localidad; tiene una extensión de 215 hectáreas, de las que aproximadamente 50 son cuerpos de agua: lagos, ciénagas y canales con casi 271 especies vegetales y árboles como el ahuejote (que solo crece en Xochimilco) y el alcanfor. Su clima es templado con lluvias en verano y temperatura promedio anual de 15 °C. Su rehabilitación formó parte del Plan de Rescate Ecológico de Xochimilco, iniciado en 1989 para recuperar esta zona, que en 1987 fue declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO.

Para el presente estudio se seleccionaron cuatro puntos de muestreo en los canales de Xochimilco (Cuadro 1, Figura 1), dos en áreas urbanas (Figuras 2 y 5) y dos en el área de reserva ecológica (Figuras 3 y 4), se realizaron muestreos mensuales de Marzo de 2002 a Marzo de 2003.

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo

Nombre	Latitud Norte	Longitud oeste
Laguna de Xaltocán	19° 15' 20.8''	99° 05' 55.4''
Canal Texhuilo	19° 16' 05.5''	99° 05' 19.6''
Isla de Tlilac	19° 17' 02.7''	99° 05' 38.1''
Barrio de San Lorenzo	19° 16' 09.8''	99° 05' 51.1''

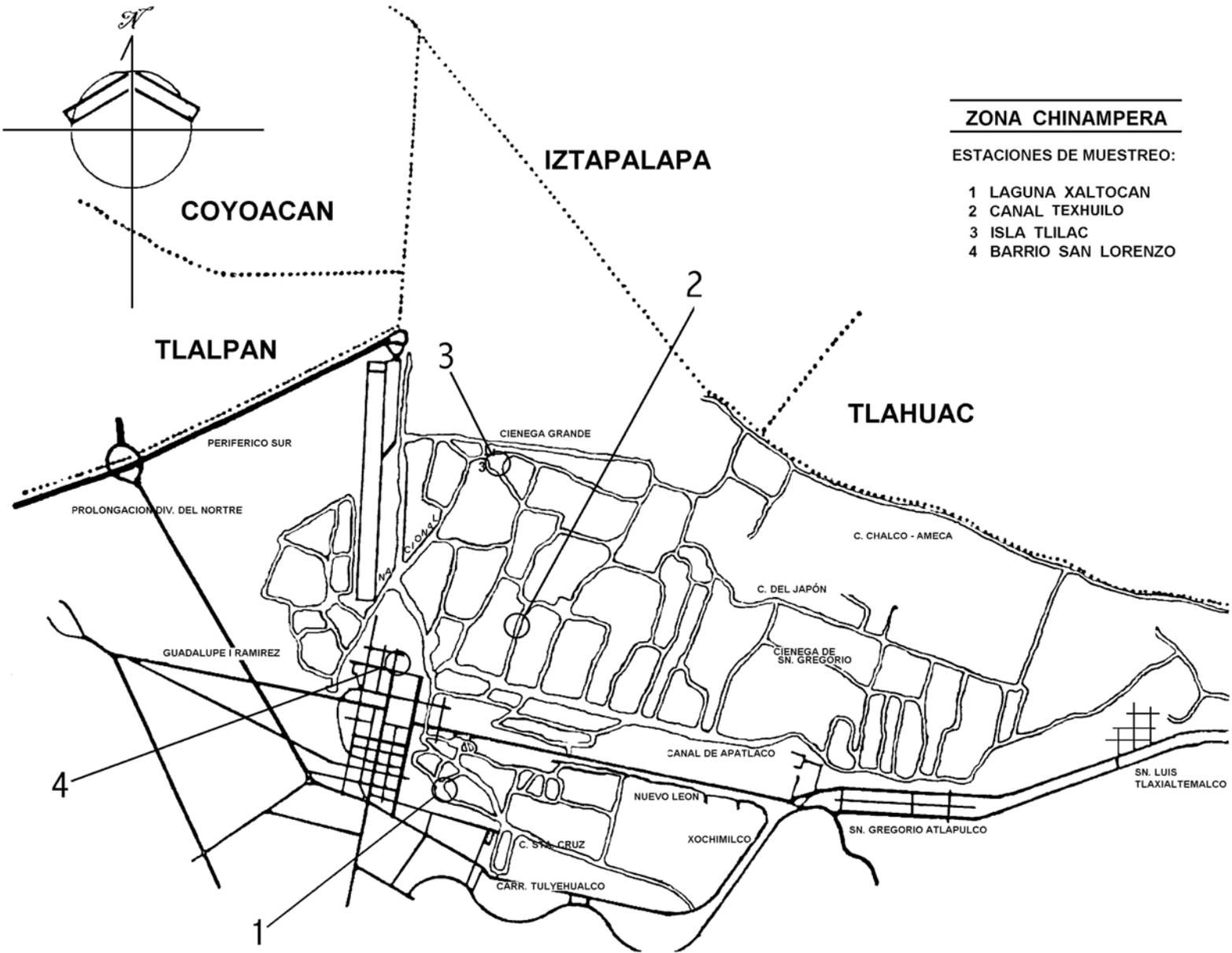


Figura 1. Mapa de ubicación del área de estudio y las estaciones de muestreo.



Figura 2. Estación 1, Laguna de Xaltocán, es un cuerpo de agua de aproximadamente 150 m de diámetro donde confluyen distintos canales de uso turístico, rodeado por casas habitación e invernaderos para cultivo de flores.



Figura 3. Estación 2, Canal Texhuilo, es un canal de aproximadamente 30 m de ancho por 500 m de longitud, ubicado en la zona de reserva ecológica y rodeado por chinampas para cultivo de distintas hortalizas.



Figura 4. Estación 3, Isla de Tlilac, el punto de muestreo se encuentra a un costado de esta isla ubicada en el lago del mismo nombre, el cual es un cuerpo de agua de aproximadamente 300 m de diámetro, ubicado también en la zona de reserva ecológica rodeada por chinampas para cultivo de hortalizas.



Figura 5. Estación 4, Barrio Sn. Lorenzo, es un pequeño canal poco transitado de apenas 5 m de ancho, rodeado de establos y rastros.

Se analizaron un total de 48 muestras de agua en las cuales se midieron los siguientes parámetros:

### **Parámetros físico-químicos**

**Demanda Bioquímica** de Oxígeno al 5° día (DBO<sub>5</sub>) para el análisis de este parámetro se tomaron muestras de 2 litros de agua que se transportaron en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio para lo cual se siguió el método de dilución descrito en Standard Methods (A.P.H.A., 1999).

**Oxígeno disuelto**, se determinó con un Oxímetro (51-B, YSI, Ohio, USA) realizando mediciones *in situ* a 30 cm de profundidad.

**pH**, este se determinó con un potenciómetro digital (Conductronic, México) tomando mediciones *in situ* a 30 cm de profundidad.

### **Parámetros biológicos**

**Clorofila-a**. Se tomaron muestras de 600 ml de agua en una botella de polietileno, protegida de la luz con papel aluminio y transportándose en hielo para su análisis en laboratorio mediante la técnica de extracción con acetona (Bravo, 1990).

**Zooplankton**, se filtraron 80 litros de agua con una red para plancton de 52 µm de apertura de malla concentrando hasta 200 ml aproximadamente y fijando la muestra con 4 ml de formol concentrado (Hutchinson, 1987).

### **Aislamiento de *Vibrio cholerae***

Para el aislamiento de la bacteria se realizó concentración de las muestras de agua utilizando hisopo de Moore (Gutiérrez, 1992), este se sumergió en el cuerpo de agua durante 24 hrs, posteriormente la muestra se transportó a temperatura ambiente, en una bolsa de polietileno con medio de transporte de AMIES

(modificado, Anexo I) hasta su análisis. En el laboratorio se siguió la técnica descrita por Sánchez *et al.* (1991) que consiste en transferir 10 ml del medio AMIES con la muestra previamente homogenizada a un matraz de 125 ml conteniendo 50 ml de agua peptonada a doble concentración alcalina (APA, Anexo II). Los matraces se incubaron a 37°C durante 6 hrs. y con este enriquecimiento se inocularon placas de agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS, Bioxon, México). Por otro lado se tomaron 5 ml de la biopelícula formada en la superficie del mismo medio APA (doble concentración) y se inocularon en 50 ml de medio APA concentración sencilla, se incubó a 37°C durante 18 a 24 hrs y nuevamente se tomó la biopelícula formada en la superficie del medio y se sembró en una placa de agar TCBS. De las dos cajas de TCBS inoculadas se seleccionaron de cada una cinco colonias típicas (redonda, convexa, de color amarillo y de consistencia viscosa) las cuales se identificaron por las pruebas bioquímicas de rutina: Triple azúcar y hierro (TSI; Difco, Detroit, USA), movilidad-indol-ornitina (MIO; Detroit, USA), lisina-hierro-arginina (LIA) (Bioxon, México) y Oxidasa (Bactident; Merk, Darmstadt, Alemania).

### Identificación bioquímica

Las colonias que mostraron un perfil bioquímico sugestivo de *Vibrio cholerae* se identificaron en forma definitiva utilizando el sistema automatizado Vitek (bioMerieux, Vitek, Inc., Mo, USA) con tarjetas de identificación GNI+ (bioMerieux, Vitek, Inc., Mo, USA) la cual esta diseñada para la identificación de microorganismos de la familia enterobacteriaceae bacterias gramnegativas no fermentadoras de glucosa y miembros de la familia vibrionaceae. El sistema se compone de una tarjeta con 30 pocillos, de los cuales 28 contienen caldos bioquímicos, un caldo para control negativo y otro para control positivo de crecimiento (Cuadro 2).

La prueba se realizó hidratando de manera automática cada uno de los pocillos de la tarjeta GNI+ con 100 µl de una suspensión de bacterias sugestivas

de ser *V. cholerae*, equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC /ml en un lector automático de la escala de McFarland (bioMerieux Vitek, Inc., Mo, USA), las tarjetas se incuban a 37 °C en el lector / incubador.

Cuadro 2. Componentes químicos contenidos en las tarjetas de identificación bioquímica GNI+

Medio	Abreviatura	Componentes principales	Concentración / pocillo
DP 300	DP3	2, 4, 4 tricloro-2-hidroxi-difenileter	4.5 µg
Glucosa	OFG	Glucosa	30 µg
Control de crecimiento	GC	Triptofano	0.3 µg
Acetamida	ACE	Acetamida	0.1mg
Esculina	ESC	Esculina	22.5 µg
Plant / Indican	PLI	Indoxil-beta-D-glucosido	45 µg
Urea	URE	Urea	0.15 µg
Citrato	CIT	Citrato	52.5 µg
Malonato	MAL	Malonato	0.16 µg
Triptofano	IDA	Triptofano	0.15 µg
Polimixina B	PXB	Polimixina B	4.5 µg
Lactosa	LAC / TLA	Lactosa	96 µg
Maltosa	MLT	Maltosa	30 µg
Manitol	MAN	Manitol	19 µg
Xilosa	XIL	Xilosa	30 µg
Rafinosa	RAF	Rafinosa	30 µg
Sorbitol	SOR	Sorbitol	19 µg

### Sensibilidad a antimicrobianos

Para esta prueba se utilizó el mismo sistema automatizado (bioMerieux Vitek, Inc., Mo, USA) con tarjetas para sensibilidad de Gram-negativos GNS-604 Vitek (bioMerieux Vitek, Inc., Mo, USA). El sistema consta de 40 pozos con una serie de agentes antimicrobianos liofilizados, que son suspendidos en medio de crecimiento. La concentración de los antibióticos esta diseñada para identificar

niveles bajos y altos de resistencia, ya que cada antibiótico se prueba con dos concentraciones expresadas en  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (Cuadro 3)

La prueba se realiza utilizando el mismo procedimiento previamente descrito. La interpretación de los resultados se da en forma automática por la lectura de crecimiento de las bacterias en cada uno de los pozos, tanto de concentración alta como baja, e interpretando como resistencia intermedia aquellas cepas que crecieron en los pozos que contenían la concentración mas baja del antibiótico, asimismo las bacterias que crecieron en la concentración mas alta del antibiótico se consideran resistentes, mientras que los pozos que no mostraron crecimiento bacteriano fueron considerados sensibles.

Cuadro 3. Composición de la tarjeta de susceptibilidad de Gram-Negativos GNS-604

Antimicrobiano	Concentraciones $\mu\text{g} / \text{ml}$	Rango de CMI $\mu\text{g} / \text{ml}$	
Amikacina	2, 8, 32	$\leq 2$	$\geq 64$
Amoxicilina / Ácido Clavulanico	4/2, 8/4, 16/8	$\leq 8$	$\geq 32$
Cefazolina	4, 16, 64	$\leq 8$	$\geq 32$
Cefepim	4, 8, 16	$\leq 4$	$\geq 32$
Ceftazidim	4, 8, 64	$\leq 8$	$\geq 32$
Ceftriaxona	16, 64, 128	$\leq 8$	$\geq 64$
Cefuroxim	4, 16, 64	$\leq 4$	$\geq 32$
Ciprofloxacina	1, 4	$\leq 0.5$	$\geq 4$
Gentamicina	0.5, 2, 8	$\leq 0.5$	$\geq 16$
Meropemem	2, 4, 8	$\leq 2$	$\geq 16$
Nitrofurantoina	32	$\leq 32$	$\geq 128$
Norfloxacina	4, 8	$\leq 4$	$\geq 16$
Ofloxacina	1, 4, 10	$\leq 1$	$\geq 8$
Piperacilina	8, 32, 64	$\leq 8$	$\geq 256$
Ticarcilina / Ácido Clavulanico	32/2, 64/2, 128/2	$\leq 16$	$\geq 256$
Trimetoprima / Sulfametoxazol	2/38(40), 8/152(160)	$\leq 10$	$\geq 320$

### Tipificación serológica

Para la obtención de antígeno somático (O) se obtuvo la biomasa celular a partir de agar Soya-Trypticaseina (TSA, Difco, Detroit, USA) en tubo inclinado, una vez finalizada la incubación se le adicionaron 10 ml de solución salina 0.85% a cada uno de los tubos, esto para desprender la biomasa, la suspensión bacteriana se sometió a vapor efluente durante 1 hr. Posteriormente se agregó formalina (solución salina 0.85%, formol 0.06%) para su conservación y análisis. La tipificación se realizó retando el antígeno de cada uno de los aislamientos de *V. cholerae* contra los 155 sueros específicos (SERUNAM), obtenidos de conejos Nueva Zelanda blanco.

### Análisis molecular

Para el análisis genético se utilizó DNA genómico de *V. cholerae* siguiendo la técnica para extracción de Fenol / Cloroformo (Maloy, 1990, Anexo 3). Se utilizaron 4 secuencias específicas para el análisis de genes relacionados con virulencia en *V. cholerae* (Cuadro 4), utilizando la técnica de PCR de tipo múltiplex. Se utilizaron las siguientes condiciones de termociclador: una fase inicial de desnaturalización 94 °C, 3 min, una fase de alineamiento 57 °C, 1.5min, 35 ciclos de 1min / 72 °C (desnaturalización), 1 min / 94 °C (alineamiento de los oligos), 1min / 57 °C (extensión de los oligos), finalmente un ciclo de extensión de 8min / 57 °C. Los productos de PCR fueron revelados en geles de Agarosa al 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 100 Volts (Biorad, CA, USA) visualizados en un transiluminador UV (modificado de Rivera *et al.*, 2001).

### Hemólisis

Para determinar la capacidad hemolítica de la cepas de *V. cholerae*, fueron sembradas en agar base sangre (Difco, Detroit, USA) con 5% de sangre desfibrinada de carnero (Hemoproveedores, México), posteriormente se incubaron a 35 °C durante 24 horas.

Cuadro 4. Secuencias utilizadas para el análisis de genes de virulencia de *Vibrio cholerae*

Oligo	Pb	Amplicón (pb)	Secuencia
ctx A	24	301	F: 5' CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG 3'
	24		R: 5' TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG 3'
tcp A Clásico	24	617	F: 5' CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG 3'
	24		R: 5' ACCAAATGCAACGCCGAATGGAGC 3'
tcp A El Tor	25	471	F: 5' GAAGAAGTTTGTAAGAAGAAGAACAC 3'
	22		R: 5' GAAAGGACCTTCTTTCACGTTG 3'
tox R	26	880	F: 5' CGGGATCCATGTTCGGATTAGGACAC 3'
	28		R: 5' CGGGATCCTACTCACACTTTGATGGC 3'

---

 Rivera *et al.*, 2001

## **RESULTADOS**

### **Parámetros físico-químicos**

Se encontró que la demanda bioquímica de oxígeno al quinto día ( $DBO_5$ ) mostró un valor promedio anual de 24.0 mg/l (Cuadro 5) el cual no rebasó los límites máximos permisibles de 30 mg/l que establece la norma oficial mexicana (NOM-003-ECOL-1997) para contaminantes de aguas residuales tratadas que se reutilizan en servicios al público. Sin embargo, el análisis individual por mes y por estación de muestreo reportó en algunos casos valores que sobrepasan dichos límites. De éstos los más notables se identificaron en la estación 2 en la que el valor obtenido en los meses de agosto y octubre fueron de 95 y 77.44 mg/l respectivamente; otros resultados fuera de norma se observaron en las estaciones 3 en el mes de febrero del 2003 (72.59 mg/l) y en la estación 4 (62.70 mg/l) en el mes de mayo del 2002.

El análisis de oxígeno disuelto reportó concentraciones promedio anual de 6.45 mg/l (Cuadro 5 y Figura 6). Los límites mínimos permisibles que se establecen en los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua (CE-CCA-001/89) para el desarrollo de la vida acuática, se encuentran entre 3 y 4 mg/l. En la estación 4 en los meses de septiembre (2002), febrero y marzo (2003) se determinaron cifras menores a 2.4 mg/l, es decir fuera del mínimo que marcan los criterios referidos.

El pH mostró una tendencia a la alcalinidad con un promedio anual de 8.98 (Cuadro 5 y Figura 6), con respecto a la temperatura del agua, esta se mantuvo por arriba o igual a los 20 °C en los meses de mayo a octubre de 2002 y entre los 15 a 19 °C en los meses de noviembre de 2002 a marzo de 2003, siendo el promedio anual de 19°C (Cuadro 5, Figura 6).

### Parámetros biológicos

Para conocer el grado de eutrofización del cuerpo de agua se cuantificó la clorofila-a. Los resultados mostraron concentraciones desde 3 mg / m<sup>3</sup> hasta 1.4 g / m<sup>3</sup>, los meses de marzo a junio del 2002 fueron en los que se observaron los niveles más altos, mientras que de agosto a noviembre del mismo año se presentaron las menores concentraciones; el análisis por estación mostró que los niveles más elevados se presentaron en las estaciones 1 y 4 (Cuadro 6, Figura 6).

En relación al zooplancton éste se dividió en dos grupos tomando en consideración la constitución quitinosa del caparazón en: rotíferos y microcrustáceos el cual agrupó a cladóceros y copépodos. El grupo de los rotíferos mostró valores mensuales entre 2,000 y 10,000 ind. / L, con un incremento mayor a 25,000 ind. / L en marzo de 2002. Con respecto a los microcrustáceos se observaron valores mensuales entre 41 y 1,693 ind. / L, en este caso fueron los meses de marzo a agosto de 2002 en los que presentó la mayor abundancia, mientras que de septiembre de 2002 a febrero de 2003 las cuentas fueron menores (Cuadro 7 y Figura 6).

### Aislamiento e identificación bioquímica

Se analizaron 48 hisopos de Moore colocados en los canales de Xochimilco en el período de marzo 2002 a marzo 2003, a partir de cultivos en agar TCBS se aislaron un total de 148 colonias bacterianas, de las cuales 3 pertenecen al género *Pseudomonas*, 5 al género *Aeromonas* y 140 al género *Vibrio*, de estos últimos, 128 se identificaron como *Vibrio cholerae*, 11 *Vibrio algynoliticus* y en 1 no se pudo establecer la especie (Cuadro 8). El mayor número de aislamientos se obtuvo en los meses de Junio de 2002 y Marzo de 2003, al realizar el análisis por estación de muestreo se encontró que las estaciones 2 (Canal Texhuilo) y 3 (Isla de Tlilac) fueron las que presentaron el mayor número de aislamientos (Cuadros 9, 10 ).

### Sensibilidad a antimicrobianos

La sensibilidad a los antimicrobianos mostró que 37% de los aislamientos (47 cepas), fueron resistentes a antimicrobianos del grupo de los  $\beta$ -Lactámicos principalmente a la amoxicilina / ácido clavulánico (Cuadro 12). El resto de las cepas (81) fueron sensibles a todos los antimicrobianos incluidos en la tarjeta de sensibilidad (GNS-604). Al realizar la correlación entre los serogrupos identificados y la susceptibilidad a antimicrobianos mostró que los serogrupos O14, OND O54 y O18 presentaron el mayor número de cepas resistentes.

### Tipificación serológica

La tipificación por serología de las cepas identificadas como *V. cholerae*, mostró la existencia de 27 serogrupos siendo O135 y O 14 los más frecuentes en el estudio. El serogrupo O14 fue el otro más común, el cual se aisló en junio de 2002 en las estaciones 2 y 3, en octubre en la estación 1, y en marzo de 2003 en la estación 3. El 20% de los aislamientos no aglutinó con los 155 sueros utilizados en el estudio, por lo que se agruparon como O No Determinado (OND), éstos se identificaron durante la mayor parte del estudio principalmente en las estaciones 1 y 3, excepto en los meses de marzo y diciembre de 2002 y enero de 2003. Al igual que en la frecuencia de aislamiento, las estaciones 2 y 3 fueron en las que se observó la mayor diversidad de serogrupos. Ninguno de los Vibrios identificados correspondió a los serogrupos patógenos O1/O139 (Cuadro 9 y 10).

Al realizar el análisis de similitud de los serogrupos determinados por estación se observó que el serogrupo O135 es el único que se aisló en las cuatro estaciones, asimismo el serogrupo O14 se determinó en las estaciones 1, 2, y 3, (Cuadro 11). Por otra parte, se realizó un dendograma de similitud por el método de Bray-Curtis donde se observaron 3 grupos de similitud: el grupo I formado por las estaciones 1 y 2 (63.5%), el grupo II formado por la estación 3 y las respectivas

del grupo I (46.4%) y el grupo III formado por la estación 4 y las respectivas del grupo II (34.8%) (Figura 7).

### Análisis Molecular

El ensayo de PCR para determinar la presencia de genes relacionados con la virulencia de *V. cholerae*, mostró la amplificación del gen *toxR* (Figura 8) en 101 (79%) de las 128 cepas estudiadas. Además se observaron dos amplicones uno de 700 pb en una cepa del serogrupo O-ND y otro de 200 pb en 24 cepas de los serogrupos O31 (1), O39 (1), O43 (1), O ND (1), O135 (18), O142 (1) y O153 (1).

### Hemólisis

Se analizó la capacidad de las cepas para producir hemolisinas, al respecto se observó hemólisis parcial ( $\alpha$ ) en el 75% de los aislados y solo el 25% de las cepas causó hemólisis completa ( $\beta$ ).

### Morfología colonial

Al evaluar la producción de hemolisinas, se observó que 32% de los aislados cambiaban su morfología colonial lisa a colonias con apariencia reseca y con surcos que ha sido definida como rugosa. El fenotipo rugoso se presentó entre 3 y 7 días posteriores al inicio de la incubación a temperatura ambiente, algunos cultivos tardaron hasta 14 días en cambiar la morfología, después de este tiempo el resto de las cepas (87) permaneció sin cambios en su morfología (Figura 9). Los serogrupos que en mayor proporción cambiaron a morfología arrugada fueron: O14 (9), O135 (4), O42 (3), O127 (3), O121 (3), O110 (3), O38 (2), O18 (2), mientras que los serogrupos que presentaron morfología lisa fueron: O135 (34), O54 (5), O74 (3), O36 (3), O18 (3), O126 (3), O42 (2) (Cuadro 13).

Al realizar un análisis comparativo entre sensibilidad a antimicrobianos y morfología colonial se observó que la proporción de cepas sensibles fue mayor en las colonias lisas; por otro lado al evaluar la proporción de cepas resistentes entre colonias lisas y arrugadas se encontró que las cepas arrugadas fueron más resistentes que las lisas (Cuadro 14).

Cuadro 5. Promedio mensual y anual de parámetros determinados en agua

Parámetro	Promedio Mensual											Promedio Anual
	2002						2003					
	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	
DBO <sub>5</sub> (mg / l)	39.28	24.76	20.79	35.01	11.10	34.09	12.645	7.0	ND	43.70	11.7	24.00
OD (mg / l)	5.8	ND	8.2	5.5	4.8	4.3	5.1	7.7	8.1	6.8	8.3	6.45
pH	8.93	8.57	8.03	8.31	7.48	8.78	7.75	8.01	8.11	8.18	7.94	8.98
Temp / agua	22	ND	22	20	21	20	17	16	15	17	18	19

Cuadro 6. Concentración de clorofila "a" (mg/m<sup>3</sup>) en los canales del lago de Xochimilco

	2002											2003	Promedio Anual
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene		
	Estación 1	1,015	1,406	1,004	1,116	47	15	38	32	188	415	445	
Estación 2	51	31	9	9	10	44	3	9	15	45	43	24	
Estación 3	10	5	70	70	6	25	11	0	8	43	35	26	
Estación 4	196	106	54	55	646	74	257	8	149	266	661	225	
Promedio	318	387	284	312	177	39	77	12	90	192	296		

Cuadro 7. Promedio mensual de los parámetros biológicos determinados en agua

Parámetro	Promedio Mensual											
	2002						2003					
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
Rotíferos (ind / l)	25780	4561	9427	5135	6072	7014	2348	4750	2024	4589	3282	6121
Microcrustaceos (ind / l)	401	481	1693	322	289	503	235	101	41	87	89	68

Cuadro 8. Especies bacterianas identificadas en muestras de agua de los canales del lago de Xochimilco

Especie	Nº Aislamientos	%
<i>Vibrio cholerae</i>	128	86
<i>Vibrio alginoliticus</i>	11	7
<i>Aeromonas veronii</i> biovar sobria	3	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1
<i>Aeromonas hydrophilla</i>	1	1
<i>Aeromonas veronii</i> biovar veronii	1	1
<i>Pseudomonas studzeri</i>	1	1
<i>Vibrio</i> sp	1	1
Total:	148	100

Cuadro 9. Frecuencia de aislamientos de serogrupos de *Vibrio cholerae* por estación de muestreo durante los 11 meses de estudio en las estaciones 1 y 2

Estación 1	2002											2003		Total:
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	
O135			2	1		1		2		5	1	1		13
O ND				1	1								6	8
O121						2								2
O74											2			2
O14								1						1
O39	1													1
O43	1													1
O54					1									1
O69						1								1
Total:	2	ND	2	2	2	4	0	3	0	5	1	3	6	30

Estación 2	2002											2003		Total:
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	
O135					1		1		2		3	3	5	15
O54			1					3						4
O ND				2	1									3
O14				3										3
O147				1										1
O19					1									1
O31						1								1
O36				1										1
O39						1								1
O42									1					1
O52			1											1
O74						1								1
Total:	0	ND	2	7	3	3	1	3	3	0	3	3	5	33

Cuadro 10. Frecuencia de aislamientos de serogrupos de *Vibrio cholerae* por estación de muestreo durante los 11 meses de estudio en las estaciones 3 y 4

Estación 3	2002											2003		Total:	
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar		
O ND			2		2	1						4	2	11	
O14				4									2	6	
O18						1	4							5	
O42			1								1	1	1	4	
O127			1									1	1	3	
O38				3										3	
O121						1		1						2	
O129											1			1	
O135											1			1	
O142											1			1	
O151													1	1	
O7										1				1	
Total:	0	ND	4	7	2	3	4	1	1	1	3	3	4	7	39

Estación 4	2002											2003		Total:
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	
O135			1	4					1		2	1		9
O ND					1		1	1	1					4
O110							3							3
O126												3		3
O36								2						2
O127				1										1
O128							1							1
O153											1			1
O56									1					1
O8				1										1
Total:	0	ND	1	6	1	0	5	4	2	3	4	0	0	26

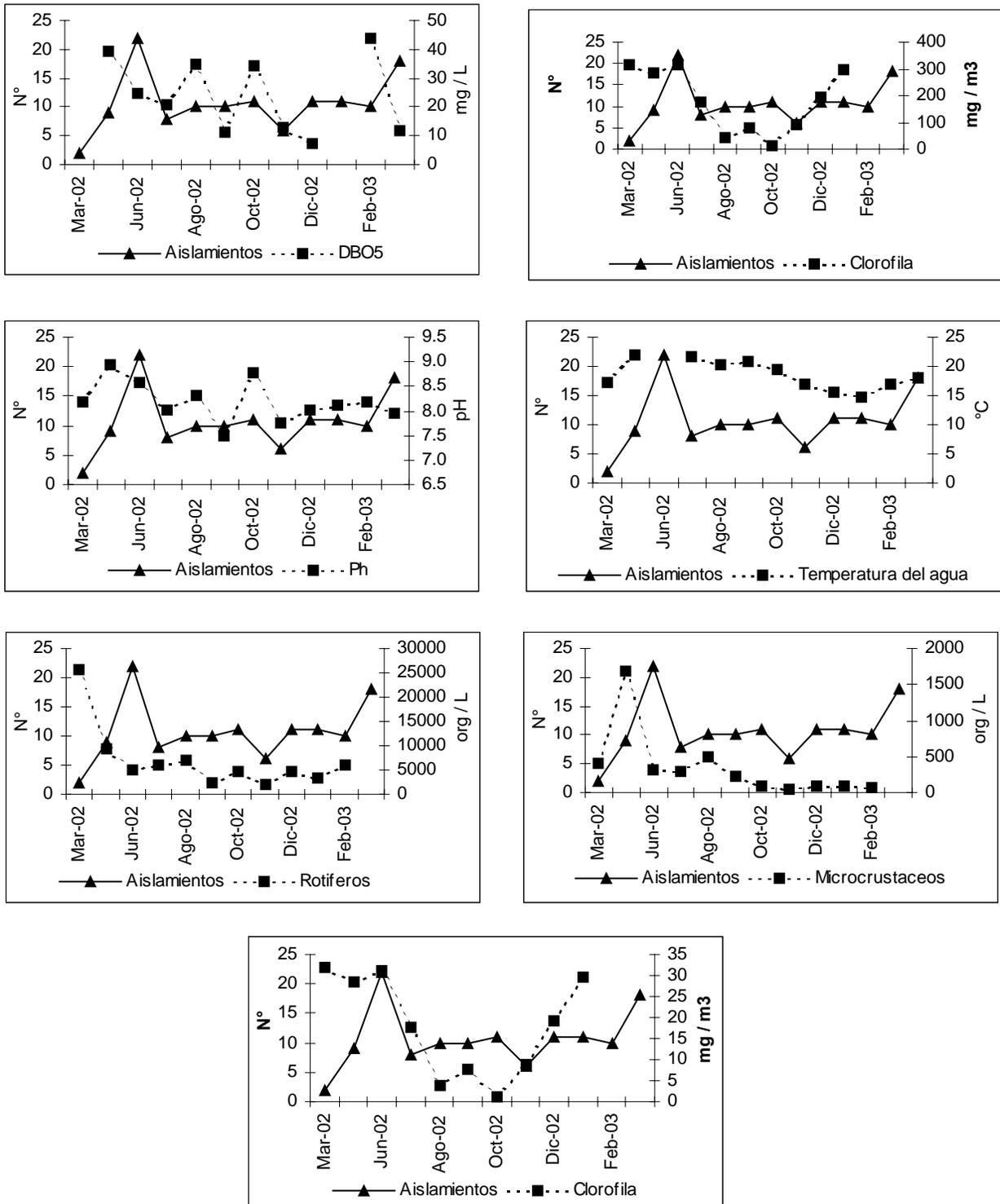


Figura 6. Comparaciones entre el número de aislamientos de *Vibrio cholerae* y los parámetros físico-químicos y biológicos.

Cuadro 11. Similitud de serogrupos presentes en las estaciones de muestreo

Serogrupo O	Estación 1	Estación 2	Estación 3	Estación 4
135	13	15	1	9
14	1	3	6	
39	1	1		
54	1	4		
74	2	1		
121	2		2	
69	1			
43	1			
36		1		2
42		1	4	
19		1		
31		1		
52		1		
147		1		
110			3	1
7			1	
8			1	
18			1	
38			1	
56			3	
126			5	
127				1
128				1
129				3
142				3
151				1
153				1

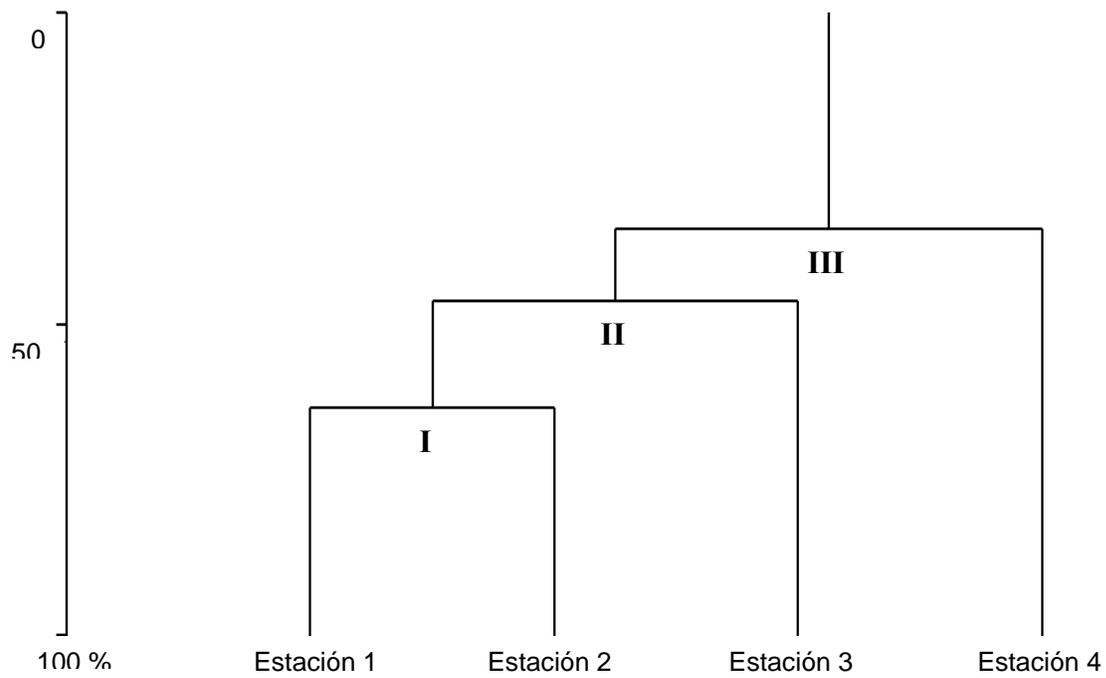


Figura 7. Dendrograma de similitud entre estaciones.

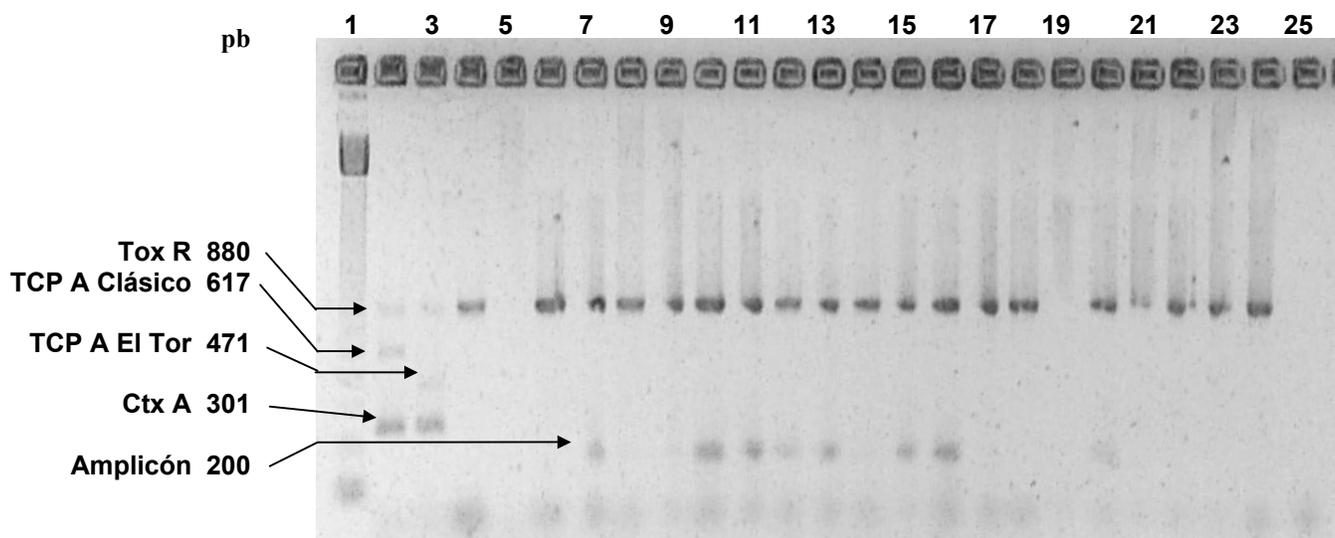


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de amplificadores por PCR del DNA de *Vibrio cholerae*: Amplificación del gen *ToxR*. Líneas: 1 marcador de peso molecular 123pb; 2, *V. cholerae* O1 Clásico; 3, *V. cholerae* O1 El Tor; 4-25, cepas ambientales de *Vibrio cholerae*.

Cuadro 12. Patrones de resistencia a antimicrobianos identificados en cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de los canales de Xochimilco

Susceptibilidad antimicrobiana (CMI)	Aislamientos	%
R - Amoxiciclina / Ácido clavulanico $\geq 32$	33	26
I - Amoxiciclina / Ácido clavulanico 16	6	4.6
R- Amoxiciclina / Ácido clavulanico $\geq 32$		
I - Cefazolina 16	4	3.0
I – Cefepime 16		
I - Amoxiciclina / Ácido clavulanico 16		
R - Piperacilina 128	1	0.7
R – Amoxiciclina / Ácido clavulanico $\geq 32$		
R - Cefepime $\geq 32$	1	0.7
+		
R - Amoxiciclina / Ácido clavulanico $\geq 32$		
I - Ticarcilina 32	1	0.7
R - Amoxiciclina / Ácido clavulanico $\geq 32$		
I- Cefazolina 16	1	0.7
Susceptibles	81	63
Total :	128	100

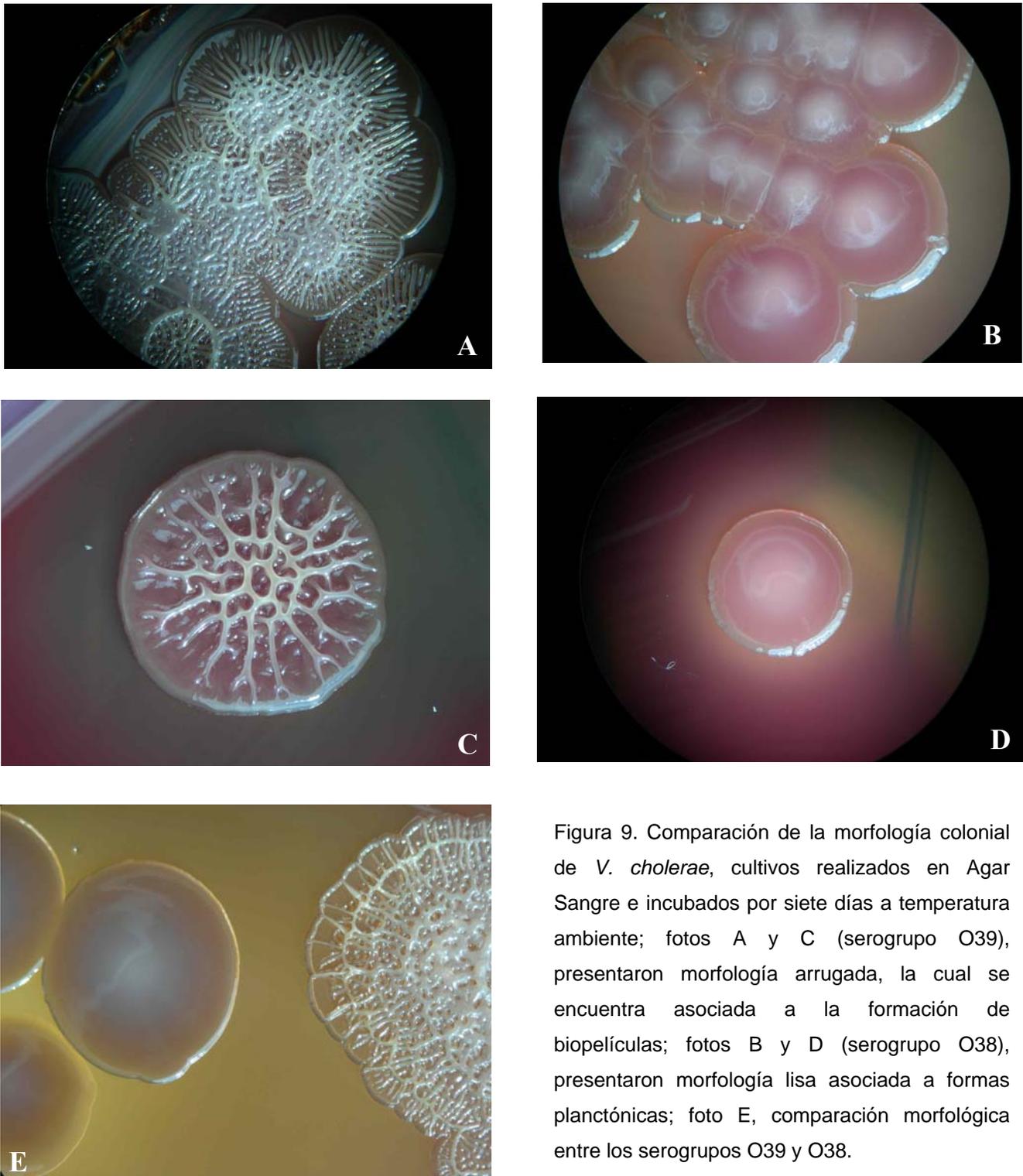


Figura 9. Comparación de la morfología colonial de *V. cholerae*, cultivos realizados en Agar Sangre e incubados por siete días a temperatura ambiente; fotos A y C (serogrupo O39), presentaron morfología arrugada, la cual se encuentra asociada a la formación de biopelículas; fotos B y D (serogrupo O38), presentaron morfología lisa asociada a formas planctónicas; foto E, comparación morfológica entre los serogrupos O39 y O38.

Cuadro 13. Frecuencia de serogrupos con morfología colonial arrugada y lisa en cepas de *Vibrio cholerae* de los de Xochimilco

Arrugada			Lisa		
Serogrupo	Nº cepas	%	Serogrupo	Nº cepas	%
O14	9	7	O135	34	27
O135	4	3	O54	5	4
O42	3	2	O74	3	2
O127	3	2	O36	3	2
O121	3	2	O18	3	2
O110	3	2	O126	3	2
O38	2	2	O42	2	2
O18	2	2	O7	1	<1
O8	1	<1	O56	1	<1
O69	1	<1	O52	1	<1
O39	1	<1	O43	1	<1
O147	1	<1	O39	1	<1
O142	1	<1	O38	1	<1
O129	1	<1	O31	1	<1
O128	1	<1	O19	1	<1
O-ND	5	4	O153	1	<1
			O151	1	<1
			O14	1	<1
			O127	1	<1
			O121	1	<1
			O-ND	21	16
Total:	41	32	Total:	87	68

Cuadro 14. Relación entre la susceptibilidad a antimicrobianos y la morfología presentada por las cepas de *V. cholerae*

Susceptibilidad a antimicrobianos	Morfología		Total:
	Rugosa Aislamientos	Lisa Aislamientos	
Resistente	22 (54%)	25 (29%)	47 (38%)
Susceptible	19 (46%)	62 (71%)	81 (62%)
Total:	41 (100%)	87 (100%)	

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron algunos factores ambientales físico-químicos y biológicos y su efecto sobre el comportamiento de *V. cholerae* en los canales de Xochimilco, también se evaluó la presencia de los principales genes relacionados con la virulencia de la bacteria.

Diversos factores están involucrados en la persistencia e incremento de enfermedades infecciosas como es el caso del cólera (Huq y Colwell, 1996). El carácter endémico y estacional del cólera depende de la supervivencia de *V. cholerae* 01 en estado viable, pero no necesariamente cultivable en nichos ecológicos localizados en ambientes acuáticos durante períodos interepidémicos. Para comprender la ecología de *V. cholerae* es preciso conocer los ecosistemas acuáticos que pudieran albergarlo y como contribuyen a la endemidad del cólera en América Latina (Borroto, 1997).

La supervivencia de *V. cholerae* depende de diversos factores tales como las condiciones físico-químicas del cuerpo de agua, asociaciones específicas de la bacteria con animales o plantas acuáticas y/o la existencia de asociaciones ecológicas específicas que envuelven diversos componentes en el ambiente acuático. Sin embargo, el efecto que estos factores tienen sobre la conservación y expresión de diversos genes involucrados con la patogenicidad de *V. cholerae* aún no se conoce (Faruque *et al.*, 1998).

Una causa importante de estrés ambiental es la variación del pH, dado que el vibrión del cólera es muy sensible a la acidez. El pH que presentaron los canales de Xochimilco fue alcalino, este factor favorece la supervivencia de la bacteria en el agua como lo demuestra el trabajo realizado por Miller *et al.* en 1984 donde demuestran que el pH óptimo para la supervivencia de *V. cholerae* es de 7 a 8.5. Sin embargo, de acuerdo con los resultados observados (Figura 6), este

factor no muestra una relación directa con el número de aislamientos obtenidos, ya que mientras el pH se mantuvo alcalino (7.5-8.9) el número de aislamientos varió en cada uno de los meses del estudio.

Otro factor ambiental determinado fue la temperatura del agua, la cual está determinada por factores climáticos, circulación del agua, morfología y batimetría del sistema acuático (Ramírez-García *et al.*, 1995). Bajo esta perspectiva los canales de Xochimilco no presentan corrientes de agua ya que es un sistema cerrado y la profundidad de sus canales no supera los 3 metros en los lugares más profundos, lo cual contribuye a que no se presenten variaciones significativas en la temperatura del agua. Los datos de temperatura obtenidos en nuestro estudio variaron entre 15 y 23 °C en los diferentes meses que se realizó el estudio, sin embargo, ésta se mantuvo en los niveles óptimos para el desarrollo de *V. cholerae*. Lo anterior se pudo corroborar ya que aunque en los meses de noviembre a febrero la temperatura disminuyó, el número de aislamientos en los mismos meses presentó un incremento (Figura 6). A diferencia de la información que se tiene para *V. cholerae* O1 en la que se refiere que la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria es de 37 °C inhibiéndose el mismo a temperaturas menores a los 15 °C, en el caso de cepas ambientales No-O1 no se tienen datos relacionados con su temperatura óptima de crecimiento (Borroto, 1997).

Factores como la temperatura y el pH tienen relación con la cantidad de nutrientes presentes y por lo tanto afecta las poblaciones fitoplanctónicas en el cuerpo de agua, siendo los de pH alcalino los que presentan mayor cantidad de nutrientes en comparación con los ácidos que son pobres en nutrientes (Wetzel, 1981). La producción de pigmentos fotosintéticos en un cuerpo de agua está relacionada con la productividad del mismo, ésta a su vez se encuentra determinada por la cantidad y tipo de comunidades fitoplanctónicas (algas) que se desarrollan de acuerdo con las condiciones ambientales de temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto y nutrientes (Ramírez-García *et al.*, 1995). Algunas

---

investigaciones han reportado ciertas asociaciones entre *V. cholerae* y algas verdes (*Volvox* sp., *Rhizoclonium fontanum*) (Islam *et al.*, 1989; Islam *et al.*, 1999, Lipp *et al.*, 2002), la matriz mucilaginosa de *Anabaena* sp, y con algunas plantas acuáticas (Shukla *et al.*, 1995). Todos estos sustratos aunque no son quitinosos pueden ser utilizados por *Vibrio* como lo hace cualquier otra bacteria. *V. cholerae* se adhiere a los caparazones quitinosos de algunos miembros zooplancton y por tal motivo ha sido considerada su participación de forma indirecta en la persistencia de la bacteria en el ambiente acuático.

Por otro lado es importante mencionar que la concentración de zooplancton y el aislamiento de *V. cholerae* tuvieron una relación directa en especial con la de copépodos presentes en los canales de Xochimilco (Figura 6). Este comportamiento ha sido reportado como una estrategia de la bacteria para mantenerse en el ambiente formando asociaciones, en especial con individuos que poseen cubiertas quitinosas como los copépodos (Huq y Colwell, 1996; Huq *et al.*, 1983; Borroto, 1997; Louis *et al.*, 2003). *V. cholerae* produce quitinasa enzima que degrada la quitina de los crustáceos del zooplancton, utilizándola como sustrato y fuente de nutrientes (Lipp *et al.*, 2002).

De los aislamientos obtenidos el mayor número corresponde a *V. cholerae*, sin embargo, también es importante resaltar la presencia de *Vibrio alginolyticus* (Cuadro 8), esta bacteria es de distribución cosmopolita y se ha relacionado con infecciones de la piel, oído medio y externo, ojos y sangre; en pacientes inmunodeprimidos, por lo que se considera un organismo oportunista (Schmidt *et al.*, 1979), esto es importante dadas las características y utilización de la zona como área de esparcimiento.

Las pruebas de resistencia a antimicrobianos realizadas en el estudio mostraron una resistencia significativa a los antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos principalmente a la amoxicilina, el cual es uno de los antibióticos más

prescritos tanto en atención primaria como en hospitales, sin embargo, en el tratamiento del cólera se utilizan antibióticos como la tetraciclina, doxiciclina, trimetoprim / sulfametoxazol o furazolidona, los cuales no se incluyeron en este ensayo (Cuadro 3) (Karper *et al.*, 1995). El patrón de susceptibilidad a antimicrobianos observado en las cepas de Xochimilco, parece ser común en cepas No-O1/No-O139 especialmente ambientales a nivel mundial incluyendo México, reportándose incluso la aparición de cepas con resistencia a los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento del cólera (Sciortino *et al.*, 1996; Isaac-Márquez *et al.*, 1998; Urassa *et al.*, 2000).

Los resultados de serología muestran la presencia únicamente de *V. cholerae* No-O1 / No-O139. Esta situación es común en periodos interepidémicos característica que tiene nuestro país desde hace aproximadamente 3 años cuando se reportó el último caso, de acuerdo con el boletín epidemiológico que publica el sistema único de información para la vigilancia epidemiológica (SUIVE, 1998-2004). A partir de 1998 y hasta el 2001 la morbilidad decreció y sólo se reportaron algunos casos aislados sin ninguna muerte. Al mismo tiempo se ha dejado de aislar *V. cholerae* O1 tanto en muestras ambientales como en clínicas. Estudios realizados en la laguna costera de Mecoacán Tabasco (Ramírez-García *et al.*, 1995) y tomas de agua en tres localidades de Campeche (Isaac-Márquez *et al.*, 1998), mostraron aislamientos únicamente de serogrupos No O1 / No O139.

Tres serogrupos de los 27 serogrupos identificados en este estudio (O19, O142, O147) no han sido reportados previamente en México. Ramírez-Pérez (2003) identificó previamente el serogrupo O135 en la laguna de Mecoacán, Tabasco en época de lluvias en 1998. Este fue uno de los serogrupos más comunes en este estudio, por otro lado los serogrupos O7, O8, O14, O38, O39 y O126 fueron reportados por Isaac-Márquez (1998) en pozos de agua para consumo humano en Campeche; los serogrupos O7, O8, O14, O18, O31, O36, O38, O39, O42, O43, O52, O54, O56, O69, O74, O110, O121, O126, O127, O128,

O129, O135, O151 y O153, fueron reportados por en Beltrán *et al.* (1999) en distintas localidades de México y Guatemala desde 1991 hasta 1997 Algunos serogrupos fueron considerados raros para el área de estudio debido a su frecuencia de aislamiento (1 de c/u), por el contrario los serogrupos O14, O43, O7, O8, O39, y O56 determinados en Xochimilco, tienen una amplia distribución México de 1992 a 1997, por lo que pueden ser considerados comunes.

Los serogrupos O7, O8, O14, O18, O19, O42, O56, O69 identificados en Xochimilco, han sido reportados en aislamientos ambientales y clínicos principalmente en India (Waldor *et al.*, 1994; Bik *et al.*, 1995; Gosh *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Chakraborty *et al.*, 2000; Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Faruque *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Mostrando que las cepas ambientales No-O1/No-O139 son de importancia en salud pública, debido a que algunos de estos serogrupos se han asociado ocasionalmente con casos esporádicos de diarrea e infecciones extraintestinales (Faruque *et al.*, 1998) en pacientes inmunodeprimidos, e incluso algunos de ellos se han relacionado con epidemias como el caso de O37, responsable de una epidemia en 1965 en Checoslovaquia y en otra en Sudan en 1968 (Li *et al.*, 2002). Aun así, el interés por estas cepas había sido poco, debido principalmente a que solo un reducido grupo de pacientes hospitalizados había sido relacionado con diarrea (Singh *et al.*, 2001).

El análisis de similitud entre los serogrupos presentes entre las cuatro estaciones muestra que las estaciones 1 y 2 comparten un importante porcentaje de serogrupos, mientras que las estaciones 3 y 4 tienen serogrupos particulares. Lo anterior probablemente se debe a que las estaciones 1 y 2 tienen un importante flujo de trajineras, siendo la estación 2 un canal de paso para las trajineras que van rumbo a la zona de Cuemanco y la reserva ecológica, en contraste la estación tres tiene poco tránsito y en la estación 4 el tránsito es sólo de la gente que vive en el área. Por lo cual se propone que es probable que las cepas aisladas formen

---

biopelículas en la base de las trajineras y a partir de estas se distribuyan por los canales de Xochimilco, para probar esta hipótesis es necesario realizar pruebas de polimorfismo genético para conocer la posible relación clonal entre las cepas aisladas en este estudio.

Los ensayos con pruebas de PCR múltiple para determinar genes relacionados con virulencia mostraron que estas cepas carecen de los genes *ctxA* y *tcpA*, solamente el gen *toxR* fue determinado en todas las cepas. Este gen es el principal regulador de virulencia y su expresión depende directamente de factores ambientales. Este gen por su parte controla la expresión de otros genes como son: CT (*ctxA*) que codifica a la toxina colérica; el gen *tcp* que codifica para la biogénesis del pilus, principal factor de anclaje y colonización del hospedero, además de distintos genes relacionados con factores de virulencia en cepas *V. cholerae* O1 y O139 (Gosh *et al.*, 1997; Honma *et al.*, 1997). Estos resultados concuerdan con los observados en cepas clínicas y ambientales de serogrupos O1/O139 y No-O1/No-O139, proveniente de distintas regiones de India y América, mostrando una alta prevalencia del gen *toxR* en todas ellas, sin embargo, se han reportado la presencia de los genes *ctxA* y *tcpA* en cepas de los serogrupos O2, O3, O4, O5, O12, O13, O15, O17, O18, O20, O44, O27, no aisladas en este estudio, así como en los serogrupos O7, O14, O18, O19 los cuales sí se identificaron en las cepas de Xochimilco (Waldor *et al.*, 1994; Gosh *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Chakraborty *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Faruque *et al.*, 2003).

Por otra parte se han reportado cepas que no producen la toxina CT de pacientes con infecciones tanto intestinales como extraintestinales, incluyendo cepas O1 carentes del gen *ctxA* clínicas y ambientales que son capaces de producir acumulación de fluido cuando se inoculan en ratones adultos. Algunos ensayos *in vitro* realizados con sobrenadante de cultivo de dichas cepas producen diversas exotoxinas con actividad proteolítica, hemolítica y citolítica que pueden ser

---

considerados como factores de patogenicidad (Karper *et al.*, 1995; Guhathakurta *et al.*, 1999). Uno de los factores observados en las cepas de *V. cholerae* estudiadas, fue la presencia de hemolisinas, la cual es común en el serogrupo O1 biotipo El Tor y poco común en el biotipo Clásico.

Estudios realizados por Yamamoto *et al.*, en 1984 en cepas No-O1/No-O139 muestran que ésta es idéntica a la hemolisina producida por *V. cholerae* El Tor, sin embargo, ensayos realizados por Singh *et al.*, (2001) muestran que ésta hemolisina no es responsable directa de la producción de fluido en intestino ligado de conejo, ya que las cepas no-hemolíticas de *V. cholerae* también son capaces de producirlo, no obstante, aunque la hemolisina no juegue un papel importante en la respuesta secretoria inicial, son necesarios ensayos que demuestren el papel que tiene la hemolisina en infecciones diarreicas causadas por *V. cholerae* No-O1/No-O139, mientras tanto, esta debe ser considerada como un factor de patogenicidad y por lo tanto de riesgo entre la población.

Al respecto, una característica importante observada en las cepas de *V. cholerae* estudiadas, fue la producción de hemolisinas en algunas de las cepas estudiadas, lo cual es un indicador potencial de patogenicidad de dicho organismo. La hemolisina es una enterotoxina de 65 kD con capacidad citolítica en eritrocitos y en cultivos celulares, tradicionalmente es usada para distinguir entre los biotipos El Tor y Clásico, ya que este último no producía la toxina (Karper *et al.*, 1995). Ensayos realizados en cepas O139 y No-O1/No-O139 muestran que la expresión de hemolisinas es mayor en cepas clínicas que en ambientales (Guhathakurta *et al.*, 1999), lo que sugiere que el trayecto a través del tracto digestivo influye en el control de la expresión de los genes responsables de la producción de hemolisina, como lo demostraron ensayos realizados con cepas no hemolíticas de O1 biotipo El Tor en ileon de conejo, donde se muestran que se necesita pasar varias veces por el tracto intestinal para producir hemolisinas (Tikoo *et al.*, 1994), asimismo este

---

ensayo demostró que la hemolisina no es la responsable directa de la acumulación de fluido en íleon ligado de conejo.

Se observó el cambio de morfología de lisa a arrugada como resultado de la posible producción de un exopolisacárido (EPS) (Alí *et al.*, 2002; Rashid *et al.*, 2003), en algunas de las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de Xochimilco (Figura 9). Este fenotipo, ha sido observado tanto en cepas O1/O139 como en No-O1/No-O139 clínicos y ambientales (Morris *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 2002; Rashid *et al.*, 2003), relacionando esta morfología con resistencia a cloro libre de hasta por 30 min en 2mg/L de cloro libre (Morris *et al.*, 1996; Yildis y Shoolnik, 1999), formación de biopelículas, la cuales a su vez están asociadas con la supervivencia del organismo en ambientes adversos y resistencia a antibióticos (Ali *et al.*, 2002; Yildis y Shoolnik, 1999), lo cual concuerda con los datos mostrados en el cuadro 14, donde se observa que la resistencia a antimicrobianos es mayor en el fenotipo arrugado que en el liso; por otra parte, estudios realizados retando cepas arrugadas de *V. cholerae* O1 El Tor en voluntarios mostraron que tanto el síndrome clínico del cólera como la respuesta inmunológica son comparables con los mostrados por el fenotipo liso, lo que sugiere que el fenotipo arrugado también se relaciona con virulencia en humanos, (Morris *et al.*, 1996). Por lo tanto el fenotipo arrugado mostrado en las cepas analizadas en este estudio podría ser una explicación a la persistencia de este organismo en los canales de Xochimilco.

## **CONCLUSIONES**

La presencia de *V. cholerae* en los canales de Xochimilco es resultado indirecto de la eutrofización del lago, lo que incrementa las poblaciones de fitoplancton y zooplancton, este último asociado con *Vibrio cholerae*.

Una tercera parte de las cepas de *Vibrio cholerae* mostró resistencia principalmente a ampicilina.

Los serogrupos O135 y O14 pueden considerarse comunes en los canales de Xochimilco y de distribución nacional.

Se identificó solo el gen *toxR* en las cepas de *V. cholerae* determinadas en los canales de Xochimilco, el cual regula la expresión de los genes *ctxA* y *tcpA* entre otros, mediante señales ambientales.

La presencia de fenotipos arrugados en las cepas aisladas de Xochimilco sugiere que *V. cholerae* presenta mecanismos de resistencia a los procesos de tratamiento de aguas negras y a la desinfección de agua tratada y potable, así mismo su capacidad hemolítica incrementa su nivel de riesgo para la salud.

Con base en los resultados mostrados en este estudio, se concluye que los canales de Xochimilco son un reservorio de cepas de *V. cholerae* virulentas y potencialmente patógenas, haciendo del cuerpo de agua un posible vehículo de transmisión de *V. cholerae* No-O1/No-O139.

Considerando la presencia y comportamiento de *V. cholerae* en el sitio de estudio, es posible asumir que tanto los factores ambientales, como la influencia de la población humana que vive en los alrededores del área de estudio, participan

y tienen un papel importante en la supervivencia, persistencia y distribución de este organismo patógeno en el agua de los canales de Xochimilco.

## **RECOMENDACIONES**

Para disminuir la presencia y persistencia *Vibrio cholerae* en los canales de Xochimilco se recomienda:

- Monitorear la eficacia del proceso de tratamiento de aguas residuales utilizadas para la recarga de los canales de Xochimilco.
- Disminuir la presencia de asentamientos irregulares en el área de reserva ecológica, con lo cual se disminuirían las descargas de aguas de desecho doméstico a los canales.
- Evitar el uso excesivo de fertilizantes y abono orgánico para los cultivos.
- Evitar el uso indiscriminado de antibióticos entre la población, ya que favorece el surgimiento de cepas resistentes.

La comprensión de las estrategias de supervivencia y persistencia de *Vibrio cholerae* patógeno en el ambiente, permitirá implementar mejores medidas de control epidemiológico

## REFERENCIAS

- ALI, A., Rashid, M. H., Karaolis, D. R. K. 2002. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. App. Environ. Microbiol. 68:5773-5778.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Ed. Washington D.C. 1268 pp.
- BIK, E. M., Bunschoten, A. E., Gouw, R. D., Mooi, F. R. 1995. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. EMBO J. 14:209-216.
- BORROTO, R. J. 1997. Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup 01 in aquatic environments. Rev. Panam. Sal. Pub. 2:327-333.
- BELTRÁN, P., Delgado, G., Navarro, A.; Trujillo, F., Robert K. S., Cravioto, A. 1999. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 37:581-590.
- BOLETÍN Semanal de Vigilancia Epidemiológica del Cólera en México. Semana 52, 1992 – 1997. Dirección general de Epidemiología, Secretaria de Salud.
- BRAVO, I.L. 1990. Determinación de clorofila a en embalses eutróficos y mesotróficos. En: VII Congreso Nal. de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Oaxaca, México 19-21.
- CHAKRABORTY, S., Mukhopadhyay, A. K., Barda, R. K., Ghosh, A. N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S. M., Takeda, Y., Colwell, R. R., Nair, G. B. 2000. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. App. Environ. Microbiol. 66:4022–4028.
- CRITERIOS Ecológicos de Calidad del Agua, Acuerdo CE-CCA-001/89.
- EHARA, M., Shimodori, S., Kojima, F., Ichinose, Y., Hirayama, T., John Albert, M., Supawat, K., Honma, y., Iwanaga, M., Amako, K. 1997. Characterization of filamentous phages of *Vibrio cholerae* O139 and O1. FEMS Microbiol. 154:293-301.

- FARUQUE, S. M., John Albert, M., Mekalanos, J. J. 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Molec. Rev. 62:1301-1314.
- FARUQUE, S. M., Kamruzzaman, M., Meraj, I. M., Chowdhury, N., Nair, G. B., Sack, R. B., Colwell, R. R., Sack, D. A. 2003. Pathogenic potential of environmental *Vibrio cholerae* strains carrying genetic variants of the toxin-coregulated pilus pathogenicity island. Infect. Immun. 71: 1020-1025.
- GARRITY, G. M., Winters, M., Searles, D. B. 2001. Taxonomic outline of the procaryotic genera: Bergey's manual of the systematic bacteriology. 2<sup>a</sup>. Springer-Verlag. USA. 39 pp.
- GHOSH, C., Nandy, R. K., Dasgupta, S. K., Nair, G. B., Hall, R.H., Ghose, A. C. 1997. A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element Tox R and other virulence factors in Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. Microb. Pathogen. 22: 199-208.
- GUTIÉRREZ, E., García, J., Saldaña, P., Moreno, F., Sánchez, M., López. 1992. Colección manuales: organización del trabajo de campo y muestreo ambiental de *Vibrio cholerae*. Vol 4. 2<sup>a</sup> Ed. IMTA. México.
- GUTHAKURTA, B. S., Sasmal, D., Pal, S., Chakraborty, S., Nair, G. B., Datta, A. 1999. Comparative analysis of cytotoxin, hemolysin, hemagglutinin and exocellular enzymes among clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O139 and non-O1, non-O139. FEMS Microbiol. Lett. 179:401-407
- HONMA, Y., Iwanaga, M. 1997. Conservation of cholera toxin gene in a strain of toxin non-producing *Vibrio cholerae* O1. FEMS Microbiol. 154: 111-116.
- HUQ, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R., Colwell, R. R. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. App. Environ. Microbiol. 456:275-283.
- HUQ, A., Colwell, R. R. 1996. Environmental factors associated with emergence of disease with special reference to cholera. East. Mediterran. Healt. J. 2(1): 37-45.
- HUTCHINSON, G. E. 1987. A treatise on limnology. Wiley, New York USA.

- ISLAM M. S., Draser, B. S., Bradley, D. J. 1989. Attachment of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to various freshwater plants and survival with filamentous algae *Rhizoclonium fontanum*. J. Trop. Med. Hyg. 92: 396-401.
- ISLAM M. S., Rahim, Z., Alam, M. J., Begum, S., Moniruzzaman, S. M., Umeda, A., Amakao, K., Albert, M. J., Sack, R. B., Colwell, R. R. 1999. Association of *Vibrio cholerae* O1 with the cyanobacterium, *Anabaena* sp, elucidated by polymerase chain reaction and transmission electron microscopy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93: 36-40.
- ISSAC-MÁRQUEZ, A. P., Lezama-Dávila, C. M., Eslava-Campos, C., Navarro-Ocaña, A., Cravioto-Quintana, A. 1998. Serotypes of *Vibrio cholerae* Non-O1 isolated from water supplies for human consumption in Campeche, México and their antibiotic susceptibility pattern. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93:17-22.
- JONSON, G., Svennerholm, A. M., Holmgren, J. 1989. *Vibrio cholerae* expresses cell surface antigens during intestinal infection which are not expressed during in vitro culture. Infect. Immun. 57:1809-1815.
- JOURAVLEVA, E. A., McDonald, G.A., Marsh, J.K., Taylor, R. K., Boesman-Finkelstein, M., Finkelstein, R. A. 1998. The *Vibrio cholerae* Mannose-Sensitive hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *V. cholerae* O139. Infect. Immun. 66:2535-2539.
- KARAOLIS, D. K., Lan, R., Kaper, J. B., Reeves, P. 2001. Comparison of *Vibrio cholerae* pathogenicity islands in sixth and seventh pandemic strains. Infect. Immun. 69:1947-1952.
- KARPER, J. B., Morris G. Jr., Levine, M. M. 1995. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 8(1): 48-86.
- KJELLEBERG, S., Molin, S. 2002. Is there role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?. Curr. Op. Microbiol. 5:254-258.
- KOLTER, R., Losick, R. 1998. One for all and all for one. Science. 280:226-7.
- LI, M., Shimada, T., Morris, J. G., Sulakvelidze, A., Sozhamannan, S. 2002. Evidence for the emergence of Non-O1 and Non-O139 *Vibrio cholerae*

- strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 70:2441-2453.
- LI, M., Kotetishvili, M., Chen, Y., Sozhamannan, S. 2003. Comparative genomic analyses of the vibrio pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1728 - 1738.
- LIANG, W., Wang, S., Yu, F., Zhang, L., Qi, G., Liu, Y., Gao, S., Kao, B. 2003. Construction and evaluation of safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *Infect. Immun.* 71:5498-5504.
- LIPP, E. K., Huq, A., Colwell, R. R. 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:757–770.
- LOUIS, V. R.; Russek-Cohen, E.; Chopun, N.; Rivera, I. N. G.; Gangle, B.; Jinag, S. C.; Rubin, A.; Patz, J. A.; Huq, A.; Colwell, R. R. 2003. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *App. Environ. Microbiol.* 69:2773-2785.
- MALOY, Stanley R. Experimental techniques in bacterial genetics. 1990 Jones and bartlett, Boston, USA. 180 p.
- MILLER C, Drasar B, Feachem R. 1984. Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physicochemical stress in aquatic environments. *J. Hyg.* 93:475–495.
- MORRIS, J. G. Jr., Sztein, M. B., Rice, E. W., Nataro, J. P., Losonsky, G. A., Panigrahi, P., Tacket, C. O., Jonson, J. A. 1996. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J. Infect. Dis.* 174:1364-8.
- MUKHOPADHYAY, A. K., Chakraborty, S., Takeda, Y., Nair, G. B.; Berg, D. E. 2001. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX $\phi$  prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 183: 4737-4746.
- PEARSON, G. D. N., Woods, A., Chiang, S. L., Mekalanos, J. 1993. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc. Natl. Sci.* 90: 3750-3754.

- RAMÍREZ-GARCÍA . P., Cortes, M. J. E., Sánchez Ch., J. J.; Carlos H., G. 1995. Nicho ecológico de *Vibrio cholerae* en el ambiente acuático vs. un estudio experimental. IMTA, Mexico. 117 pp.
- RAMÍREZ-PEREZ, M. 2003. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio* spp; en muestras de agua, ostión y sedimento en la laguna de Mecoaacán, Tabasco; México. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- RASHID, M. H., Chythanya, R., Ali, A., Karaolis, D. K. R. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol. Lett. 227:113-119.
- RIVERA, I. N. G., Chun, J., Huq, A., Sack, B., Colwell, R. R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. App. Environ. Microbiol. 67:2421-2429.
- SANCHEZ, Petra. 1991. Manual de métodos de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en agua. CETESB. Sao Paulo, Brasil. 90 p.
- SCIORTINO, C. V., Johnson, J. A., Hamad, A. 1996. Vitek system antimicrobial susceptibility testing of O1, O139, and Non-O1 *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 34:897–900.
- SCHMIDT U.; CHMEL, H.; COBBS, C. 1979. *Vibrio alginolyticus* Infections in Humans. J. Clin. Microbiol. 10: 666-668.
- SHUKLA, B. N., D. V. Singh, and S. C. Sanyal. 1995. Attachment of nonculturable toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 12:113–120.
- SENGUPTA, N., Paul, K., Chowdhry, R. 2003. The global regulator ArcA modulates expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 71:5583-5589.
- SHARMA, Ch., Thungapathra, M., Mukhopadhyay, A. K., Basu, A., Mitra, R., Basu, I., Bhattacharya, S. K., Shimada, T., Ramamurthy, T., Takeda, T., Yamasaky, S., Takeda, Y., Nair, G. B. 1998. Molecular analysis of Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the

- incidence cholera-like disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 36: 756-763.
- SHIMADA, T., Arakawa, E., Itoh, K., Okitsu, T., Matsushima, A., Asai, Y., Yamai, S., Nakazato, T., Balakrish Nair, G., John Albert, M., Takeda, Y. 1994. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.* 28:175-178.
- SINGH D. V., Matte, M. H., Matte, G. R., Jiang, S., Sabeena, F., Shukla, B. N., Sanyal, S. C., Huq., Colwell, R. R. 2001. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 910-921.
- SUIVE, Sistema Único de información Epidemiológica 1998-2003. Dirección general de Epidemiología, Secretaria de Salud. Mexico
- TAMPLIN, M. L., Glauzens, A. L., Huq, A., Sack, D. A., Colwell, R. R. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1977-1980.
- TIKOO, A., Singh, D. V., Sanyal, S. C. Influence of animal passage on haemolysis and enterotoxin production in *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains. *J. Med. Microbiol.* 40:246-251.
- URASSA, W. K., Mhando, Y. B., Mhalu, F. S., Mjonga, S. J. 2000. Antimicrobial susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O1 strains during two cholera outbreaks in Dar es Salaam, Tanzania. *East Afr Med J.* 77:350-3.
- WALDOR M. K., Colwell, R., Mekalanos, J. J. 1994. The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigens an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. *Microbiol.* 91:11388-11392.
- WALDOR M. K., Mekalanos, J. J. 1994. Tox R regulates virulence gene expression in Non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect. Immun.* 62: 72-78.
- WETZEL, R. G. 1981. *Limnología*. Ed. Omega. Barcelona, España. 269-271 pp.

- YAMAMOTO, K., Al-Omani, M., Honda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. 1984. Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization and immunological relatedness to El Tor hemolysin. *Infect. Immun.* 45:192-196.
- YILDIZ, F. H., Schoolnik G. K. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96:4028–4033.
- ZO, Y., Rivera, I. N. G., Russek-Cohen, E., Islam, M. S., Siddique, A. K., Yunus, M., Sack, R. B., Huq, A., Colwell, R. R. 2002. Genomic profiles of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1 in cholera endemic areas of Bangladesh. *Microbiol.* 99:12409–12414.

## ANEXO I

### Medio de transporte AMIES

#### Formulación:

Cloruro de sodio	3.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Cloruro de magnesio	0.1 g
Fosfato monopotásico	0.2 g
Fosfato disódico	1.15 g
Tioglicolato de sodio	1.0 g
Agar	4.0 g
Agua destilada	1000 g

#### Preparación:

Se suspenden 10 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada y calentar hasta disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y distribuir volúmenes de 400 ml en bolsa de polietileno de 20 litros.

**Medio de transporte AMIES modificado**

## Formulación:

Medio de transporte Amies	10.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Tioglicolato de sodio	0.5 g
Fosfato de sodio dibásico	0.05 g
Cloruro de calcio (1%)	9 ml
Agar	1.0 g
Agua destilada	991 ml

## Preparación:

Se suspenden 10 g del medio deshidratado y los reactivos. Se adiciona el agua destilada fría y se deja reposar por aproximadamente 15 minutos se calienta hasta la completa disolución evitando la ebullición y se esteriliza a vapor efluyente, durante 15 minutos. Después de esterilizar se adiciona el cloruro de calcio al 1% ajustando el pH final a 9.1 con hidróxido de sodio 1N.

## ANEXO II

### Agua peptonada alcalina (APA)

#### Concentración sencilla

Formulación:

Bacto peptona	10 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 8.8+- 0.2 a 25 °C	

#### Concentración doble

Formulación:

Bacto peptona	20 g
NaCl	20 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 8.8+- 0.2 a 25 °C	

Preparación:

Las sales se disuelven en el agua destilada , dejando reposar por aproximadamente 15 min, se ajusta el pH con solución 1 N de NaOH y se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

### ANEXO III

#### Preparación de DNA genómico bacteriano

##### Materiales:

- Buffer TE (Tris 10mM / EDTA 1mM)
- 10% (peso / volumen) dodecil sulfato de sodio (SDS)
- 20 mg / ml proteinasa K
- 20 mg / ml RNAsa A
- Fenol / Cloroformo 1:1
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Acetato de sodio 3M

##### Preparación:

1. Transferir 1.5 ml a un tubo de microcentrífuga y centrifugar a 12 000 r.p.m. por 2 minutos. Decantar el sobrenadante y secar bien.
2. Resuspender la pastilla en 457\*  $\mu$ l de buffer TE pipeteando repetidamente. Adicionar 30  $\mu$ l de SDS 10%, 20 mg/ml de RNAsa A y 10\*\*  $\mu$ l de Proteinasa K, mezclar e incubar 1 hr. a 37° C.
3. Adicionar un volumen igual de fenol / cloroformo, mezclar invirtiendo el tubo hasta que las fases queden completamente mezcladas y centrifugar a 12 000 r.p.m. por 2 min.

4. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo y adicionar un volumen igual de fenol / cloroformo, mezclar nuevamente y centrifugar a 12,000 r.p.m. por 2 min. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo.
5. Adicionar 1/10 de volumen de acetato de sodio.
6. Adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol y mezclar suavemente hasta que el DNA se precipite.
7. Tomar el DNA con una pipeta Pasteur con la punta cerrada.
8. Lavar en DNA sumergiéndolo la punta de la pipeta en etanol 70% por 30 segundos.
9. Resuspender el DNA en 100 – 200  $\mu$ l de buffer TE.
10. Para conocer la concentración de DNA en la muestra, diluir 10 $\mu$ l de DNA en 1 ml de buffer TE (1:100) y medir absorbancia a 260 nm. La concentración de la solución original de DNA en  $\mu$ g/ml = Abs x 50  $\mu$ g/ml.
  - \* Volumen ajustado, el original es de 467 $\mu$ l.
  - \*\* Volumen ajustado, el original es de 3 $\mu$ l.