



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES DE *VIBRIO*
CHOLERAE AISLADOS EN MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

MARIA ELENA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2009.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Lilia María Ernestina Vierna García

VOCAL: Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios

SECRETARIO: Profesor: Carlos Alberto Eslava Campos

1er. SUPLENTE: Profesor: Aída Navas Pérez

2° SUPLENTE: Profesor: Norma Trejo Medina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 36 DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA. FACULTAD DE MEDICINA. UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): BIOL. GUILLERMO ALEJANDRO SOLÍS SÁNCHEZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): MARÍA ELENA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

(nombre (s) y firma (s))

Y así después de esperar tanto, un día como cualquier otro decidí triunfar... decidí no esperar a las oportunidades sino yo mismo buscarlas, decidí ver cada problema como la oportunidad de encontrar una solución, decidí ver cada desierto como la oportunidad de encontrar un oasis, decidí ver cada noche como un misterio a resolver, decidí ver cada día como una nueva oportunidad de ser feliz.

Aquel día descubrí que mi único rival no eran más que mis propias debilidades, y que en éstas, está la única y mejor forma de superarnos.

Aquel día dejé de temer a perder y empecé a temer a no ganar, descubrí que no era yo el mejor y que quizás nunca lo fui.

Me dejó de importar quién ganara o perdiera; ahora me importa simplemente saberme mejor que ayer.

Aprendí que lo difícil no es llegar a la cima, sino jamás dejar de subir. Aprendí que el mejor triunfo que puedo tener, es tener el derecho de "Amigo". Descubrí que el amor es más que un simple estado de enamoramiento, "el amor es una filosofía de vida".

Aquel día dejé de ser un reflejo de mis escasos triunfos pasados y empecé a ser mi propia tenue luz de este presente; aprendí que de nada sirve ser luz si no vas a iluminar el camino de los demás. Aquel día decidí cambiar tantas cosas...

Aquel día aprendí que los sueños son solamente para hacerse realidad.

Desde aquel día ya no duermo para descansar... ahora simplemente duermo para soñar.

Walt Disney

Agradecimientos

Primero que nada tengo que agradecerle a Dios por haberme dado el privilegio de la vida y de disfrutar todas las cosas buenas que tiene.

A la UNAM por el orgullo de pertenecer a ella y aportarme los conocimientos y vivencias que hoy me permiten concluir uno de mis más grandes anhelos: el ser Química Farmacéutica-Bióloga

A la Facultad de Química, a sus profesores y compañeros, que no menciono por temor a omitir a algunos de ellos, pero con los que compartí miles de cosas, y aunque sé que cada quien seguirá su camino, seguramente algún día recordarán algunas de las experiencias que nos causaron alegría o angustia y que hoy quedan en el recuerdo.

A mi asesor el Dr. Carlos Eslava por acogerme en su laboratorio y por darme la oportunidad de hoy estar concluyendo ¡¡Mi tesis!! , muchas gracias por sus palabras de animo que siempre me da, por el tiempo que ha dedicado a escucharme y aconsejarme pero sobretodo por la infinita paciencia que me ha tenido.

De verdad Muchas Gracias....

A los chicos del laboratorio. Ale Benítez, Paloma, Ulises y Lulú por siempre ayudarme a resolver mis dudas a través de una respuesta de ustedes, en especial a Ulises y Lulú por sus acertadas correcciones y sugerencias en el escrito.

Un agradecimiento muy especial a mi supervisor técnico; Alejandro Solís, de quien he aprendido muchísimo y quien ha dedicado tiempo para enseñarme y supervisarme en mi trabajo experimental y escrito.

Ale. Mil Gracias..... por la paciencia.

En General a todos los que de alguna manera han contribuido con un granito de arena para mi crecimiento personal y profesional.

También tengo que mencionar a todas aquellas personas que no creyeron en mí y que de alguna forma intentaron truncar mi camino. Gracias por que ustedes me hicieron más fuerte y me dieron la oportunidad de esforzarme aún más para ser cada día mejor.

Solo queda una única palabra.

Gracias.....

DEDICATORIA

Hoy que estoy a punto de lograr el más importante sueño de mi vida quiero dedicarlo y compartirlo con las a las tres personas más importantes que tengo.

A mis papas. Los señores Rey Simón Castañeda Díaz y Elvira Hernández Navarro

Y a mi hermana Reyna Judith Castañeda Hernández

A ti papa, por siempre darme el ejemplo de entereza, por el esfuerzo que haces día con día para protegernos, por el infinito apoyo que me has brindado a lo largo de mi carrera, por que me has enseñado a no darme por vencida aún en momentos difíciles. por que hoy se que mi logro también es el tuyo y por todo el cariño que ha hecho de nosotros una bonita familia.

A ti mama, por que como toda amiga siempre estas ahí en cuanto te necesito incondicionalmente para apoyarme y brindarme la dosis suficiente de fortaleza, coraje, entusiasmo y amor que hoy me han hecho llegar a la meta. Te agradezco por que con tu carácter, me has estimulado para ser mejor cada día de mi vida, y por desear siempre lo mejor para mi. Quiero que sepas que a pesar de las dificultades o malos momentos que pasemos, siempre saldremos triunfantes ya que no hay nada más fuerte que el poder y el AMOR de Dios.

A ti hermanita; a quien considero mi mejor amiga; gracias por todo el gran apoyo que he recibido de tu parte, por aguantar a esta neurasténica que lo único que quiere a veces es solamente llamar la atención, gracias por tu infinita paciencia en todos los sentidos, por que de alguna manera he aprendido gracias a ti que cada tropiezo en la vida es una nueva oportunidad de aprender y de comenzar de nuevo para ser mejores día con día; por darme las palabras de aliento que hacen menos difícil mi andar por la vida pero sobre todo por quererme de manera incondicional aunque yo no le merezca.

Los Quiero Mucho.

Gracias.

INDICE

1.- Introducción.....	1
2.- Antecedentes.....	3
2.1.-La Bacteria.....	3
2.1.1.- Factores de Virulencia.....	4
2.2.- Epidemiología del Cólera.....	6
2.2.1.- Primera Pandemia.....	6
2.2.2.- Segunda Pandemia.....	6
2.2.3.- Tercera Pandemia.....	7
2.2.4.- Cuarta Pandemia.....	8
2.2.5.- Quinta Pandemia.....	8
2.2.6.- Sexta Pandemia.....	9
2.2.7.- Séptima Pandemia.....	9
2.3.- Panorama en México.....	10
2.4.- Estudios con Respecto a <i>Vibrio cholerae</i> en Otras Partes del Mundo.....	13
2.5.- Técnicas de Biología Molecular para Análisis Epidemiológicos.....	14
2.6.- Análisis de variabilidad.....	14
3.-Objetivos.....	18
3.1.- Objetivo General.....	18
3.2.- Objetivos Particulares.....	18
4.- Material y Métodos.....	19
4.1.- Recuperacion de cepas de <i>Vibrio cholerae</i>	19

4.2.- Análisis Clonal.....	21
4.2.1.- Selección de Cepas.....	21
4.3.- Extracción de DNA Genómico.....	22
4.3.1.- Método de Fenol Cloroformo.....	22
4.3.2.- Corrida en Gel de Agarosa del DNA Genómico.....	22
4.3.3.- Tinción del Gel.....	23
4.4.- Tipificación de <i>Vibrio cholerae</i> por el Método de ERIC-PCR.....	23
4.4.1.- Oligonucleótidos.....	23
4.4.2.- Mezcla de Reacción.....	23
4.4.3.- Ensayo de ERIC-PCR.....	24
4.4.4.- Separación por Electroforesis de los Fragmentos Obtenidos por ERIC-PCR.....	24
4.4.5.- Tinción del Gel de Poliacrilamida.....	25
4.4.6.- Análisis de los Fragmentos Amplificados por ERIC-PCR.....	25
4.4.7.- Elaboración del Dendrograma.....	25
5.- Resultados.....	26
6.- Discusión.....	38
7.- Conclusiones.....	45
8.- Bibliografía.....	46
9.- Anexos.....	50

1.- INTRODUCCION

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en la niñez de todo el mundo, por lo general su etiología se relaciona con la exposición a alimentos o agua contaminados. Actualmente, alrededor de mil millones de personas carecen de acceso a fuentes de agua potable y unos 2500 millones no tienen acceso a instalaciones básicas de saneamiento. Las diarreas solo detrás de la neumonía, son la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años. En 2004, las enfermedades diarreicas fueron responsables de 6,9% de los fallecimientos reportados en países de bajos ingresos. De los 1,5 millones de niños que fallecieron por enfermedades diarreicas en 2004, el 80% tenían menos de dos años. La diarrea es un padecimiento infeccioso ocasionado por diversos microorganismos de tipo bacteriano, viral y parásitos, la mayoría de los cuales se transmiten por agua o alimentos con contaminación fecal. La infección es más común cuando hay escasez de agua limpia para beber, cocinar y lavar. La falta de sistemas de prevención como las vacunas, así como la inadecuada infraestructura sanitaria, contribuye a su rápida propagación y de manera consecuente al incremento en el número de casos y muertes asociadas con el proceso infeccioso. La distribución de estas enfermedades varía constantemente, debido a cambios que se producen tanto en el microorganismo, como en el ambiente y en la población hospedante. Una enfermedad que cumple ampliamente con éstas características es el cólera, padecimiento que se presenta con una alta incidencia en países pobres con clima tropical, en donde llega a adquirir características endémicas y/o epidémicas. (Farfán S. 2002)

El cólera es una enfermedad diarreica ocasionada por la infección con la bacteria *Vibrio cholerae* que puede causar la muerte por una deshidratación severa. La enfermedad se genera en la mayoría de los casos por la falta de higiene, esta asociada con el consumo de agua y alimentos contaminados con la bacteria. (Liang W., *et al.*, 2007, Smith A. *et al.*, 2009.). *V. cholerae* es una bacteria patógena específica del humano, que habita en ambientes acuáticos como; ríos, estuarios y en los océanos. Estos a su vez son el vehículo que participa en la transmisión del microorganismo a través del consumo de los productos obtenidos de las aguas costeras como son pescados y mariscos. En las áreas endémicas de cólera, la enfermedad presenta un patrón estacional apareciendo de forma explosiva en varios focos durante el verano, hecho que sugiere la participación de factores ambientales en la aparición de las epidemias. El cólera representa un indicador fundamental del grado de desarrollo económico y

social y aunque no constituye una grave amenaza para los países con niveles adecuados de higiene, la enfermedad continua siendo un reto para los países que no pueden asegurar el acceso al agua potable y a un saneamiento ambiental optimo.

Hasta el momento solo *V. cholerae* toxigénico de los serogrupos O1/O139, se han relacionado con los brotes epidémicos y las pandemias de cólera, sin embargo, hasta el momento se desconoce que factores son los que participan en la aparición cíclica de estos microorganismos. Al respecto se ha propuesto la participación de eventos ambientales como es el caso del periodo estacional, o la presencia de cambios climáticos relacionados con los fenómenos llamados del Niño y la Niña (Farfán S. 2002). Al parecer estos contribuyen a regular la disponibilidad de nutrientes, cambios en la temperatura, cambios en las corrientes marinas lo que influye de manera indirecta para la aparición de *V. cholerae* O1/O139, tanto en áreas endémicas como en países en los que su presencia se da con muchos años de diferencia. Otra de las propuestas para responder a la posible “desaparición” del microorganismo, es el evento que se ha definido como microorganismos viables pero no cultivables. Este se caracteriza por el hecho de que la bacteria no se puede aislar de muestras ambientales aún empleando medios selectivos, aunque su presencia se pueda determinar por procedimientos alternos como es el empleo de anticuerpos marcados dirigidos contra su lipopolisacárido. Sin embargo, lo que no esta establecido son los factores que influyen para que la bacteria no se pueda recuperar y así establecer su presencia (Thompson F. *et al.*, 2004; Lipp E. *et al.*, 2002). También se ha propuesto la participación de cambios en su estructura antigénica, pero no de su genoma, hecho este último que propone la existencia de un fenotipo diferente pero con un mismo genotipo, evento que plantea la existencia de identidad clonal entre *V. cholerae* de los serogrupos O1/O139 con cepas de otros serogrupos. En este trabajo se presentan resultados sobre la caracterización de cepas de *V. cholerae* no O1/no O139 aisladas en diferentes sitios del lago de Xochimilco en la Ciudad de México, y su posible relación genotípica con *V. cholerae* de los serogrupos O1/O139.

2.- ANTECEDENTES

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

2.1.- La Bacteria

De acuerdo con el manual de Bergey de bacteriología sistemática, *Vibrio cholerae* se encuentra dentro del dominio Bacteria Phyllis BXII Proteobacteria, clase III gamaproteobacteria, orden XI Vibrionales, familia I Vibrionales. Son bacilos curvos en forma de coma, gram negativos, que miden de 1.5-2.5 μ m de largo y 0.5-0.8 μ m de ancho,



Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de *Vibrio cholerae* O1 (Martha Solano)

anaerobios facultativos, que utilizan los dos metabolismos, el fermentativo y el respiratorio. Son móviles, por la presencia de un flagelo polar (Figura 1). Posee dos cromosomas circulares; el cromosoma 1 (el mayor) posee 2 millones 961 mil 146 pares de bases (pb), en este se encuentran los genes que determinan las funciones básicas de la bacteria; mientras que el cromosoma 2 posee 1 millón 072 mil 314pb, con lo que forman un total del 4 millones 033 mil 466 pb, que en conjunto codifican para 3885 fragmentos de lectura abierta (Heidelbelrg J. *et al.*, 2000). Esta bacteria crece en medios enriquecidos como agar sangre dando colonias grises grandes convexas y hemolíticas; se desarrolla en medios ricos como tripticasa soya agar (TSA), agar luria (AL), e infusión de cerebro y corazón (BHI) entre otros. El medio selectivo para su aislamiento es el tioglicolato,

citrato, bilis sacarosa (TCBS), en este por la fermentación de la sacarosa, el pH cambia de neutro a ácido observándose colonias amarillas, gracias a los indicadores; azul de timol y azul de bromotimol, que contiene el medio de cultivo. Para su identificación se realizan pruebas como la capacidad del microorganismo para crecer en medios con 1, 6 y 8% de NaCl, además, se pueden caracterizar mediante su estructura antigénica, utilizando sueros específicos, definiendo las variedades del antígeno somático, componente del lipopolisacárido (LPS). Hasta la fecha se han reportado más de 200 serogrupos, de los cuales solo dos: O1 y O139 son los que tienen un alto potencial patógeno y epidémico para los humanos. (Beltrán *et al.*, 1998). En *V. cholerae* O1 se han identificado los biotipos: El Tor y El Clásico que además se dividen en las variedades antigénicas Inaba, Ogawa e Hikojima, siendo este último un intermedio entre los dos primeros. Los *vibrios* que no son aglutinados por los sueros antes referidos se han denominado como *vibrios* no aglutinables o como No O1/No O139, éstos últimos se aíslan de fuentes ambientales y aunque en general son responsables de casos esporádicos de gastroenteritis e infecciones intestinales, algunos de los serogrupos se han relacionado con brotes epidémicos.

2.1.1.- Factores de Virulencia

Como ya se menciono la patogénesis del cólera se debe a la ingestión de agua o alimentos contaminados y una vez que el microorganismo pasa la barrera ácida del estomago, coloniza el epitelio del intestino delgado por medio de los factores de colonización que presenta (Kaper *et al.*, 1995), una vez que la bacteria ha colonizado puede liberar algunos de los llamados factores de virulencia como son:

- a) Toxina Colérica (CT): es una toxina termolábil que tiene cinco subunidades B y una subunidad A. Los genes que codifican a CT están localizados en el profago CTX (Udden S. Et al., 2008). Las subunidades B tienen afinidad por los receptores gangliosidos GM1 de las células epiteliales, mientras que la subunidad A es transportada a través de la membrana celular y escindida en dos fragmentos; A1 y A2, el fragmento A1 es el responsable de la activación de la enzima adenilato ciclasa, causando la conversión de Adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato (AMPc). Este aumento de AMPc

induce la secreción activa de iones y agua a la luz intestinal causando la diarrea acuosa. (Kaper. *Et al.*, 1995, Farfan. 2002).

- b) Toxina Zot (*zona occludens toxin*): esta Toxina rompe las uniones estrechas (*zona occludens*), que mantienen a las células de la mucosa unidas y preservan la integridad de la membrana. Estas uniones actúan como una barrera, para que los iones no pueden atravesar directamente por lo que tienen que ser transportados a través de la membrana celular del enterocito por bombas específicas; este mecanismo es el responsable de la habilidad del cuerpo para retener agua. La toxina Zot destruye estas uniones y no sólo permite la fuga del contenido luminal sino que también altera el equilibrio iónico ocasionando el cuadro de diarrea.
- c) Toxina Ace (*accessory cholera enterotoxin*): es una potente toxina que ocasiona daño a nivel de la membrana ocasionando desequilibrio iónico. (Rosas I. *et al.*, 2004)
- d) Hemolisinas: se ha observado que la hemolisina/citolisina producida por *V. cholerae* O1 y No O1 y que sirve para diferenciar al biotipo El Tor del Clásico tiene un efecto citolítico en eritrocitos y en cultivo de células de mamíferos, además es letal en ratas. (Kaper *et al.*, 1995)
- e) Pili TCP: es un pilus tipo IV codificado por el operon *tcp*, este además de participar como factor de colonización y como sistema de secreción es el receptor del fago CTX (Tripathi *et al.*, 2007).

Por otro lado *Vibrio cholerae* puede desarrollar estrategias de supervivencia formando asociaciones comunitarias por medio de biopelículas involucrando miembros de su misma especie o con organismos de especies diferentes. Estas biopelículas se establecen en torno a sustratos bióticos o abióticos como son: peces, zooplancton, raíces de plantas acuáticas o rocas, donde las bacterias se protegen del medio asegurándose de un suministro constante de nutrientes necesarios para todos los integrantes del consorcio que forma la biopelícula. Sin embargo, la obtención de nutrientes también se puede dar por el intercambio y utilización de productos del metabolismo de los miembros del mencionado consorcio bacteriano (Liang W. *et al.*, 2007). Las biopelículas están formadas de un polisacárido que excreta la bacteria, lo que da a las colonias una apariencia rugosa en medios no selectivos. Desde la perspectiva epidemiológica se desconoce la participación de las biopelículas producidas por *V. cholerae*,

aunque, por el hecho de aislar al microorganismo de situaciones adversas del medio ambiente, se cree que puede mantenerla en un estado de aparente latencia hasta que las condiciones ambientales se hacen favorables lo que puede contribuir a la emergencia de nuevos brotes.

2.2.- Epidemiología del Cólera

El cólera es un padecimiento conocido desde la más remota antigüedad tanto por su expresión clínica como por sus características epidemiológicas. Sin embargo, fue hasta principios del siglo XIX cuando se empezaron a describir las diferentes pandemias del cólera, así como su distribución alrededor del mundo. Hasta el momento se han descrito siete pandemias de cólera y es así que se observó que desde la aparición de la primera, el padecimiento se extiende desde Asia a otros continentes y que afecta a muchos países presentándose por largos periodos de tiempo. Con excepción de la séptima pandemia que se origina en la Isla Sulawesi, Indonesia; las otras seis surgieron en el Delta del Río Ganges (Kaper *et al.*, 1995).

2.2.1.-Primera Pandemia (1817-1824)

La primera pandemia inició en 1817, emergiendo de las aguas del Río Ganges en el territorio actual de Bangladesh, extendiéndose hacia Europa, Asia y África. Las tropas inglesas del siglo XIX establecidas en la India, se encargaron de propagar la enfermedad más allá de sus bases militares en Bengala. Entre 1816 y 1818 la enfermedad se diseminó por vía terrestre hacia Nepal y Afganistán. Entre 1820 y 1822 se extendió por mar hacia Ceylan y la actual Indonesia, alcanzando también el sudeste asiático. Las expediciones inglesas en la Península Arábiga llevaron el contagio al Golfo Pérsico. A su vez, el tráfico de esclavos contribuyó a su propagación desde esta región hasta la costa este de África. Se ha considerado que fue el invierno y no tanto los cordones militares y las cuarentenas lo que limitó la propagación del bacilo en 1824 (Ciencia Médica, 1994).

2.2.2.- Segunda Pandemia (1826-1837)

En 1826 surge el segundo brote de cólera en la planicie del Ganges, en esta ocasión se vieron afectados países de Asia, Europa, África y por primera vez llega a América. Nuevamente fueron los conflictos bélicos los que contribuyeron a la propagación de la enfermedad. Por vía terrestre se extendió a Prusia, Austria, Suecia, Francia y hasta el Báltico. A través del mar llegó a Inglaterra e Irlanda y fueron los inmigrantes ingleses quienes en 1832 llevan la enfermedad al nuevo Mundo, arribando por Quebec en Canadá y pasando de ahí a los Estados Unidos de América y Cuba (Kaper *et al.*, 1995). A México llega en 1833, en ese entonces el Vicepresidente Valentín Gómez Farías pide a los médicos se dedicaran a estudiar las causas de este padecimiento, mientras que en la Ciudad de Oaxaca se estableció un hospital en el Convento de la Merced y se dispuso de atención médica y medicamentos gratuitos para toda la población. Más tarde en 1837 el cólera llega a Guatemala y Nicaragua, justo el año en el que comienza a desaparecer en otros países (Ciencia Médica, 1994).

2.2.3.-Tercera Pandemia (1848-1862)

Once años después en el año de 1848 se presenta la tercera pandemia, en esta ocasión fue la Guerra de Crimea, la que movilizó las tropas inglesas, francesas e italianas al mar negro llevando el Cólera a Grecia y Turquía. A México llega el 23 de diciembre de 1848 a través del *Apollo*, bergantín procedente de Hamburgo al fondear al puerto de Veracruz con un pasajero muerto por cólera. Sin embargo, aún surgen dudas acerca de su verdadera procedencia. La enfermedad se mantuvo endémica en algunos estados como Sonora en donde hubo algunos brotes entre abril de 1849 y finales de 1850, sucediendo lo mismo en los estados de Michoacán, Zacatecas y San Luis Potosí, concluyéndose que el consumo de bentónicos (mejillones, ostiones y ostras) crudos pudo ser el detonante de estas brotes. En el Estado de México llega el 25 de abril de 1850, propagándose a varios municipios, mientras que en la ciudad de México es probable que llegara el 28 de abril, hasta que oficialmente el Distrito fue declarado libre de Cólera el 2 de septiembre del mismo año. Durante ese lapso se reportaron 18498 casos de los cuales fallecieron 9584. Otro estado que también fue afectado por esta pandemia fue Puebla, el primer caso llega el 26 de junio cobrando su primera víctima, registrándose después el deceso de 2760 personas en esa ciudad, el 19 de septiembre se

presento el último caso (Vázquez G., 2009). Siguiendo su recorrido por América, llegó a Panamá por vía marítima y de ahí se distribuyó a varios países de Sudamérica. Fue durante esta pandemia en 1854 cuando John Snow demostró la participación del agua como la principal vía de transmisión del padecimiento. En base a sus observaciones epidemiológicas J. Snow señaló algunos de los factores que contribuían en la diseminación del cólera, por lo que propuso una limpieza estricta en las personas que cuidaban a los enfermos, el manejo apropiado de excreciones y ropa de cama, y lo más importante un manejo estricto del agua para consumo, el lavado y cocción de los alimentos, el aislamiento de los enfermos, así como la notificación inmediata de la aparición de un nuevo caso. También propuso medidas a largo plazo, como abastecimiento de agua potable, construcción de drenaje, mejoramiento de viviendas, difusión de hábitos de limpieza doméstica e higiene personal, la pandemia concluye en 1862 y por su contribución para el control del cólera J. Snow es considerado como el padre de la Salud Pública (Ciencia Médica, 1994).

2.2.4.- Cuarta Pandemia (1864-1875)

La cuarta pandemia inicia solo dos años después en 1864 y es entre otros factores por la expansión colonial europea, que se extiende al África ecuatorial. Es a través del tráfico de esclavos que llega a países de medio oriente y el Golfo Pérsico. En esta pandemia su arribo a México se da a través de Centroamérica afectando principalmente al sureste del país. En 1866 las autoridades sanitarias del país emitieron un documento para instruir a los prefectos sobre la conducta a observar ante la invasión del cólera. En esta ocasión llegó a la región meridional de América por vía marítima, afectando a Brasil en 1867 y a Paraguay en 1868, en total duró 11 años y concluye en 1875 (Ciencia Médica V.1 Núm. 1).

2.2.5.- Quinta Pandemia (1881-1896)

Comenzó en 1883 en el Ganges, el flujo migratorio de Europa a los Estados Unidos, lo propaga desde Rusia, al Báltico y el mar del Norte. Durante esta Pandemia el agente responsable del cólera fue descrito por primera vez por Pacinni, cuando observó un gran número de bacterias curvas en el contenido intestinal de pacientes con cólera, por lo que la llamo *Vibrio cholerae*.

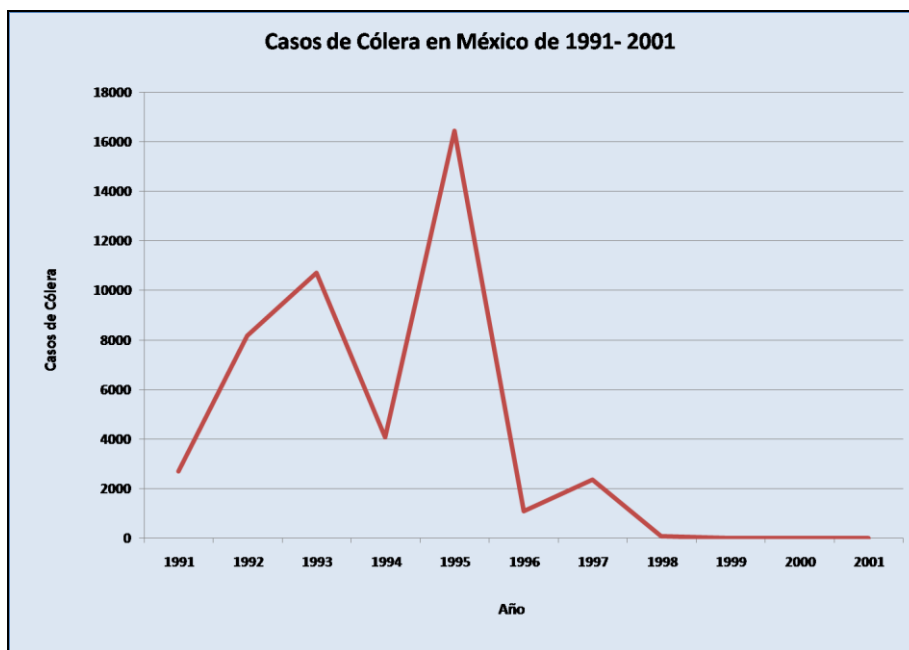
Sin embargo, existe gran discusión sobre quien identificó la bacteria ya que se dice que previamente en 1853 Koch, había hecho la descripción del microorganismo cuando el cólera llegó a Egipto. En su estudio Koch, a partir de las heces acuosas de pacientes con cólera, describe las características de la bacteria, refiriéndose a él como un “*Bacilo coma*” debido a su forma. En 1884 Koch solicitó su traslado a la India en donde el cólera es endémico, y fue ahí donde con microscopios perfeccionados y cultivando las heces en placas logró aislar la bacteria responsable del cólera. La quinta pandemia afectó a gran parte de Sudamérica causando grandes epidemias acompañadas de alta mortalidad en Argentina, Chile y Perú. En México se establecieron cercos sanitarios para controlar la diseminación de la enfermedad, el 12 de febrero de 1883 la Comisión de Epidemiología del Consejo Superior de Salubridad estimó que en la epidemia que afectó al sureste del país, la tasa de letalidad fue del 75% y fue en ese mismo año que se reportó el último caso de cólera en Juchitán, Oaxaca.

2.2.6.- Sexta Pandemia (1899-1923)

Se inició en el mismo lugar que las anteriores, afectó Asia, África el sudeste Europeo y Rusia, sin embargo, se mantuvo ausente en los países europeos más industrializados. En 1905 de la península de Sinaí en la estación de cuarentena se aisló una cepa *Vibrio cholerae* diferente al que ocasionó las primeras cinco pandemias, este nuevo *vibrio* se designó con el nombre El Tor y al primero como El Clásico, ambos presentan características antigénicas similares pero propiedades metabólicas y de sensibilidad a fagos diferentes hecho por lo que se consideran biotipos de *Vibrio cholerae*. Como en las anteriores pandemias su diseminación dependió de los movimientos militares y el aumento del comercio por vía marítima. En América se registró el último caso en 1911 y en Europa esto ocurrió en 1923. Después de éste año se confinó en el Delta del Ganges, su hábitat endémico original. Por motivos desconocidos esta sexta pandemia no tocó territorio mexicano, lo anterior dio lugar de manera errónea a considerar que la enfermedad estaba erradicada.

2.2.7.- Séptima Pandemia (1962-?)

Fue en 1962 cuando inicia la séptima pandemia en el sur de Asia de donde se disemina a otros continentes. En América aparece el 29 de enero de 1991 en la ciudad costera de Chancay, Perú afectando principalmente a los adultos. Las investigaciones médicas, epidemiológicas y de laboratorio mostraron que el agente causal era nuevamente la cepa de *Vibrio cholerae* O1, biotipo El Tor, el cual resulto menos agresivo que el biotipo Clásico y se asociaba con cuadros de diarrea leve. En México el primer caso de cólera de esta pandemia se reportó el 13 de junio de 1991 en la comunidad rural de San Miguel Totolmaloya, ubicada en la Sierra de Goleta en el Estado de México, en esta ocasión permaneció en nuestro país casi durante 10 años teniendo un máximo número de casos en 1995, fue en el año 2001 cuando se reporta el último caso de cólera en nuestro país. (Grafica 1).



Gráfica 1.- Casos de Cólera en México durante la séptima pandemia, según la OPS

En 1992, durante la séptima pandemia aparece en el sur de la India en el golfo de Bengala, una nueva clona epidémica que se extiende al sudeste de Asia y alcanza África Occidental en 1994. Los estudios microbiológicos determinaron que el agente implicado en estos brotes era una cepa de *V. cholerae* NO O1 que no aglutinaba con ninguno de los sueros existentes hasta ese momento, por lo que se preparo un suero de conejo con el microorganismo que correspondió al serogrupo O139. Investigaciones en India y Japón demostraron que este microorganismo

producía una toxina idéntica a la de *V. cholerae* O1, por estudios de biología molecular se determinó que esta cepa de *V. cholerae* O139 presentaba el gen que codifica para la producción de toxina colérica. Esta cepa al igual que los biotipos Clásico y El Tor del *V. cholerae* O1, demostró tener un gran potencial de diseminación.

2.3.- Panorama en México

Nuestro país se vio afectado por el cólera durante la última pandemia, el primer caso reportado se dio en Junio de 1991 relacionado con una cepa de *V. cholerae* O1 biotipo el Tor, serotipo Inaba. Este caso se identificó en un paciente de sexo masculino de 68 años de edad que se encontraba en la sierra de Goleta en el estado de México (Luna F. 2006). En 1995 Ramírez García *et al.*, realizaron un estudio ecológico de *V. cholerae* en la laguna de Mecoacan (Tabasco), para definir el nicho ecológico 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 y que presenta un patrón estacional con incrementos en la época de lluvias y disminución en la época de secas. En dicho estudio se observó además una asociación con el plancton y con niveles de salinidad de hasta 21 partes por 1000, sin embargo, no se encontró una relación con bacterias indicadores de contaminación fecal. Dos años después (1997), Ramírez Pérez en la misma laguna de Mecoacan, aisló *V. cholerae* de muestras de agua, ostión y sedimento, solo cepas de serogrupos no O1/no O139. En dicho estudio también se aislaron otras especies conformadas por *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus*, este último predominando en frecuencia con respecto a las demás especies; en el mismo estudio se encontró una relación significativa entre la temperatura y la presencia del microorganismo en la laguna.

En otro estudio Isaac, Márquez *et al.* (1998), realizaron el análisis de muestras de agua para consumo humano obtenidas de diferentes pozos de una localidad del estado de Campeche. Los resultados mostraron la presencia de *V. cholerae* No O1 predominando los serogrupos O14, O155 y O112, el estudio mostró además la existencia de cepas resistentes a ampicilina y a carbenicilina. Beltrán *et al.*, (1999), realizaron un estudio con el método de enzimas Multilocus, para analizar cepas de *Vibrio cholerae* No O1 de diferentes serogrupos aislados de muestras con distinto origen. En este estudio se identificaron 279 tipos electroforéticos que a su vez mostraron la existencia de numerosos lineajes clonales. En dicho estudio se identificó

además una clona del serogrupo O37 que en los años 60's se había reportado su potencial epidémico, estando ampliamente relacionada con las clonas epidémicas O139 y O1. Como conclusión, se hace mención de la posibilidad de que microorganismos no patógenos como *Vibrio cholera* no O1/no O139 puedan transformarse en cepas virulentas por medio de la transferencia horizontal de genes, o que a través de la regulación genética se presenten cambios en los genes de superficie lo que permite entender la relación clonal observada entre *Vibrio cholera* O1, O139 y en este caso O37. En México no hay reportes oficiales de cólera desde el año 2001, sin embargo, existe gran interés en el estudio de esta bacteria ya que los cambios climáticos pudieran contribuir a la aparición de nuevos brotes de cólera.

En el 2000 la organización Panamericana de la salud (OPS) reporto 5 casos de cólera en los estados de Campeche y Tamaulipas, con un menor numero de casos desde el resurgimiento de la epidemia. Gómez Pliego (2000), reportó que hortalizas y agua de riego constituían fuentes de infección de *Vibrio cholerae* en zonas de cultivo del Ejido de Cuautla, y propuso el diseño de clorinadores como alternativa para disminuir la concentración de bacterias. Medrano Martínez (2001), estudió las bases moleculares del requerimiento de condiciones de cultivo especiales para el control de los genes de virulencia *ctxAB* (de la toxina del cólera) y *tcpA* (pili corregulado de la toxina del cólera) por los reguladores *toxR* *toxT*, en *Vibrio cholerae* El Tor. Sánchez Cruz (2001) realizó un estudio de caracterización de cepas aisladas de muestras clínicas, y estableció la prevalencia de los serogrupos para poner de manifiesto las formas de adaptación ambiental de la bacteria (cepas lisas y rugosas), para crear condiciones que respondan precisa y oportunamente ante nuevos brotes. Por su parte García Reyes y Sánchez Sánchez (2001) reportaron la incidencia en el periodo de 1996 a 1998 de *Vibrio cholerae* en moluscos bivalvos que se expenden en la central de pescados y mariscos "La Nueva Viga". En el 2001 La Dirección General de Epidemiología reporto el último caso confirmado de cólera en el estado de Jalisco. Se han realizado otros estudios sobre *Vibrio cholerae* en México, que analizan diferentes aspectos de la bacteria, tal es el caso del estudio de Martínez P. (2002), quien realizó un estudio sobre la actividad de bacterivoría como factor de eliminación y mantenimiento constante de concentraciones bajas de *Vibrio cholerae* en un medio acuático natural. Más recientemente Solís S. (2005) realizó un estudio en los canales de Xochimilco, en este se identifico la presencia de *Vibrio cholerae* No O1/ No O139, predominando los serogrupos O135 y O14, en este estudio se encontró además resistencia principalmente a la

ampicilina y se identificó presencia del gen *toxR* en casi el 80% de las cepas. Finalmente Luna F. (2006) realizó el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en muestras de agua de la planta de tratamiento “Cerro de la estrella” y en muestras de raíz de lirio de los canales de Xochimilco.

Los datos antes referidos muestran de manera contundente que aunque no se ha identificado *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1/O139, la bacteria se encuentra en diferentes ambientes, lo que plantea incógnitas en relación a los factores que participan en la ausencia del aislamiento de los serogrupos epidémicos causantes de cólera.

2.4.- Estudios Anteriores con Respecto a *Vibrio cholerae* en Otras Partes del Mundo.

Jonson *et al.*, (1989), reportaron que *Vibrio cholerae* expresa antígenos de superficie durante la infección, los cuales no se presentan en cultivos *in Vitro*. Lo anterior sugiere la participación de factores ambientales que regulan la expresión de tales estructuras, lo que podría estar involucrado en cambios fenotípicos de la bacteria. Al igual que ha ocurrido en el caso de *Escherichia coli* el número de variedades antigénicas de *Vibrio cholerae* se ha incrementado con el paso del tiempo. Es así que Shimada *et al.*, en 1994 publicaron un esquema de serotipificación que en ese momento contaba con 155 serogrupos, estos se han incrementado y en la actualidad se conocen más de 200 variedades antigénicas de la bacteria. No obstante el incremento en el número de serogrupos, los únicos que continúan mostrando relevancia epidemiológica son las cepas de *Vibrio cholerae* O1/O139.

Otros estudios sobre *Vibrio cholerae* se han enfocado al conocimiento de la diversidad genética del microorganismo. Susanta Roy *et al.*, (1994), analizaron mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE), la asociación clonal de cepas de diferentes biotipos, en sus análisis encontraron que algunas cepas no O1/ no O139 tienen relación clonal con las cepas epidémicas lo que sugiere un origen común. Un hallazgo que revolucionó el conocimiento sobre *Vibrio cholerae* O1/O139 fue el reporte realizado por Waldor y Mekalanos (1996), quienes mostraron que el gene que codifica para la toxina del cólera (CT) se encuentra ubicado en un fago filamentoso y que el receptor para dicho fago es el pilus TCP. Yildiz y Schoolnik (1999), muestran que la producción de exopolisacárido en variantes rugosas de *V. 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.

Todos los estudios previamente señalados y otros más, muestran algunas de las características y propiedades relevantes de *Vibrio cholerae*, mismas que nos permiten entender tanto su potencial patógeno como la relevancia epidemiológica del microorganismo.

2.5.- Técnicas de Biología molecular para Realizar Estudios Epidemiológicos

Los estudios de genética de poblaciones bacterianas, se han incrementado en las dos últimas décadas principalmente para investigar bacterias de interés clínico. En años recientes se ha observado un aumento notable en la emergencia de nuevas enfermedades infecciosas y en la reemergencia de otras que se consideraban ya controladas. La situación es preocupante debido a que muchos de estos agentes patógenos causan enfermedades graves. En muchas de estas infecciones la resistencia a los antimicrobianos se está convirtiendo en un importante obstáculo para su control, principalmente por la aparición de cepas multirresistentes. La pregunta que surge es: ¿Qué es lo que realizan dichos microorganismos para lograr los cambios que les confieren propiedades de sobrevivencia aún en ambientes hostiles? Para responder esta pregunta, se han realizado una serie estudios encaminados a explicar los mecanismos que han desarrollado los microorganismos y así intentar implementar medidas para el control de las enfermedades producidas por dichos patógenos.

Entre los estudios realizados se incluyen los que analizan las características genéticas de las bacterias que permiten conocer la relación genética existente entre las cepas patógenas que causan la enfermedad y aquellas de la misma especie pero que no produce daño al hospedero (Farfán S. 2002).

2.6.- Análisis de Variabilidad

En biología molecular los métodos clásicos de tipificación fenotípica, frecuentemente son utilizados para los estudios taxonómicos y epidemiológicos. Las descripciones taxonómicas permiten determinar la familia, género, especie y subespecie del microorganismo, aunque, para

conocer la estructura poblacional es necesario medir la variabilidad genética que existe entre las distintas cepas de una población bacteriana

En las últimas décadas una gran cantidad de técnicas fenotípicas y genotípicas son utilizadas para identificar y relacionar entre aislados bacterianos, de las técnicas más importantes se han descrito la ribotipificación y técnicas apoyadas en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), de las cuales derivan: Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH), Análisis de restricción de rDNA amplificado (ARDRA), Amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD), Palíndromos extragénicos repetitivos (REP) y Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (RFLP), junto con éstas; Electroforesis por Enzimas Multilocus (MLEE), Tipificación de Secuencias Multilocus (MSLT). Otras técnicas también de interés epidemiológico usadas para el estudio de *Vibrio cholerae* son Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE) y Secuencias Consenso Intergénicas Repetitivas en Enterobacterias (ERIC). Todos estos procedimientos proporcionan valiosa información de nuevas estructuras poblacionales de algunas especies, surgiendo nuevas técnicas de tipificación de subespecie a nivel epidemiología por poseer un alto poder de discriminación, aunque, es importante considerar que cada una de estas técnicas tiene ventajas pero también sus limitaciones. Por ejemplo; la técnica AFLP consiste en tres simples pasos: a) Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción y la subsecuente ligación de los adaptadores a los sitios específicos a todos los fragmentos de restricción; b) Amplificación selectiva de estos fragmentos con dos primers que corresponden a las secuencias de los adaptadores y al sitio de restricción como sitio blanco y c) Separación electroforética de los productos de PCR en geles de poliacrilamida con la detección selectiva de fragmentos etiquetados con agentes fluorescentes y el posterior análisis de bandas. Esta técnica es una excelente herramienta para realizar análisis epidemiológicos a través de ensayos de PCR.

La hibridación Fluorescente *in situ*, utiliza células filtradas y probadas con oligonucleótidos pegados al rRNA 16S seguida de la visualización por microscopia epifluorescente la cual provee una manera eficiente de detección, identificación y cuantificación de *vibrios*.

Por otro lado MLEE se utiliza en el estudio e identificación de poblaciones genéticas este procedimiento se ha convertido en la técnica ideal para estudios epidemiológicos, por su reproducibilidad en los resultados obtenidos. MSLT, es una adaptación de MLEE, pero ambas técnicas indican la variación de los genes en estudio. MLST asigna hálelos directamente de secuencia nucleótidos y al igual que MLEE son comparadas por movilidad electroforética de las enzimas codificadas por los genes. Sin embargo, el equipo requerido es de alto costo y depende del campo de aplicación (Chokesajjawateen N. 2008).

RAPD-PCR, involucra la amplificación de fragmentos aleatorios de DNA usando primers arbitrarios y junto con REP-PCR amplifican secuencias localizadas entre sitios de DNA altamente repetitivos. En estudios de ambas técnicas se ha concluido que REP- PCR tiene un mayor poder de discriminación, por lo que es la más adecuada para estudios epidemiológicos.

La técnica RFLP-PCR consiste en un amplificación por PCR de ciertos genes, por ejemplo 16S rRNA seguida de de una restricción de los productos de PCR con endonucleasas para obtener patrones de bandeo y realizar el posterior análisis; la desventaja de esta técnica es que posee un bajo poder de discriminación.

La ribotipificación es una de las técnicas más usadas en el estudio de *Vibrio cholerae* y consiste en la restricción del cromosoma bacteriano con una endonucleasa seguidas de una electroforesis para la separación de los fragmentos obtenidos, luego se transfieren los fragmentos a una membrana y por ultimo se hace una hibridación con una secuencia complementaria etiquetada a rRNA 16S o 23S.

Electroforesis en Gel por Campos Pulsados provee una interferencia genómica robusta, pero el equipo requerido es altamente costoso y no se encuentra disponible en países donde el cólera es endémico. (Chokesajjawatee N. *et al.*, 2008)

En el presente trabajo se realizó el análisis de secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC-PCR), el método es un procedimiento rápido que se basa en el uso de iniciadores (primers) cortos. El principio de esta técnica esta basado en el empleo de secuencias ribosomales génicas altamente conservadas, por lo que se usa para la tipificación rápida de bacterias patógenas. (Hih-Chung W. *et al.*, 2001). Por su parte Marshall *et al.*, (1999), Hih-Chung W. *et al.*, (2001) y Smith A. *et al.*, 2009 reportaron el uso de primers

específicos para realizar ERIC-PCR en la evaluación genética y epidemiológica entre cepas de diferentes *vibrios*.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

- Definir los subtipos genéticos entre cepas de *Vibrio cholerae* No-O1/No-O139 aisladas de muestras de agua obtenidas de los canales del lago de Xochimilco y evaluar si existe relación clonal entre algunos de los aislados con cepas de *V. cholerae* de los serogrupos toxigénicos O1/O139.

3.2.- Objetivos Particulares

- Aislar y purificar las cepas de una colección de *Vibrio cholera* No O1/NoO139, que fueron aisladas durante el periodo 2002 y 2003.
- Seleccionar una muestra representativa de cepas de la colección, considerando su origen de aislamiento y el serogrupo, para realizar la extracción de DNA genómico
- Seleccionar cepas de *Vibrio cholerae* O1/O139 de la colección del cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina para obtener el DNA respectivo.
- Estandarizar e implementar la técnica ERIC-PCR para el análisis del DNA de las diferentes cepas de *Vibrio cholerae* incluidas en el estudio.
- Elaborar un árbol de identidad con el programa Multi-Variate Statistical Package (MVSP) para determinar la relación genética entre las diferentes cepas incluidas en el estudio.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Recuperación de Cepas de *Vibrio cholerae*

De cada uno de los tubos de conservación de la colección de 128 cepas de *Vibrio cholerae* aisladas durante los años 2002-2003 (Solís Sánchez. A. 2005), en 4 diferentes estaciones localizadas en el lago de Xochimilco, cuyas características principales son:

Estación 1.- Laguna de Xaltocán: es un cuerpo de agua de aproximadamente 150m de diámetro donde confluyen distintos canales de uso turístico rodeado por casa habitación e invernaderos para cultivos e flores (Solís A. 2005).

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

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

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

De cada cultivo en medio para conservación se tomo una asada que se sembró por estría abierta en AS (Agar Sangre):

Las cajas se dejaron incubar de 18 a 24 horas a 37°C y se observó crecimiento, pureza del cultivo y morfología colonial de la bacteria.

Una vez que se verificaron las características de los cultivos y se comprobó su pureza, se selecciono una colonia para hacer su transferencia tanto al medio selectivo TCBS (Tioglicolato, Citrato, Bilis Sacarosa) (BD Bioxon ®) como al medio diferencial Mac Conkey. (BD Bioxon ®) Nuevamente los cultivos se incubaron por 18 a 24 horas a 37°C, para nuevamente comprobar las características de las colonias de *Vibrio cholerae*.

Una vez que se identificaron las características morfológicas de *Vibrio cholerae* se selecciono una colonia para resembrar en agar TSA (Trypticase Agar Soya), de este último medio se tomaron muestras para realizar: A) Prueba de oxidasas, B) Hacer la transferencia a viales para conservar la bacteria, y C) Obtener la muestra para trabajo.

Prueba de Oxidasa

La prueba de las oxidasas sirve para determinar la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones.

El reactivo usado para la prueba de las oxidasas es una solución acuosa de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% (Diagostica Merck ®). Al adicionar el reactivo al cultivo las bacterias oxidasa positiva, se tiñen de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

La prueba de la oxidasa se realizó de la siguiente manera:

- Se preparo la solución de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%.
- Inmediatamente se procedió a impregnar un trozo de papel filtro con la solución reactivo.
- Inmediatamente se adiciono una gota de caldo y se dejo caer sobre el pedazo de papel filtro ya impregnado.
- Se dejo reaccionar un minuto y se observo el vire de color. Se considera positiva si el vire el color es de púrpura a negro y es negativo si no se presenta cambio de color.

4.2.- ANALISIS CLONAL

4.2.1.- Selección de Cepas

De las cepas aisladas se seleccionaron un total de 53 cepas al azar, tomando en cuenta las cuatro estaciones de muestreo ¹ y características como: serogrupo, morfología y hemólisis.

Cuadro 1.- Selección de Cepas por Origen, Serología, Morfología y Hemólisis, para Caracterización Molecular.

Estación 1				Estación 2					
N°	Cepa	Serogrupo	Morfología	Hemólisis	N°	Cepa	Serogrupo	Morfología	Hemólisis
5	VO39		Rugosa	Alfa	97	VO14		Rugosa	Alfa
49	VO135		Rugosa	Alfa	100	VO?		Lisa	Beta
52	VO?		Lisa	Alfa	101	VO147		Rugosa	Alfa
197	VO121		Lisa	Beta	103	VO36		Lisa	Beta
198	VO121		Rugosa	Beta	201	VO31		Lisa	Beta
200	VO69		Rugosa	Beta	202	VO74		Lisa	Alfa
319	VO135		Lisa	Beta	203	VO39		Lisa	Beta
320	VO14		Rugosa	Beta	389	VO54		Lisa	Beta
701	VO54		Lisa	Beta	390	VO52		Lisa	Beta
738	VO?		Rugosa	Beta	391	VO135		Rugosa	Beta
					393	VO42		Rugosa	Beta
					698	VO19		Lisa	Beta
					707	VO135		Lisa	Beta
Estación 3				Estación 4					
N°	Cepa	Serogrupo	Morfología	Hemólisis	N°	Cepa	Serogrupo	Morfología	Hemólisis
50	VO38		Lisa	Beta	112	VO127		Rugosa	Alfa
108	VO14		Lisa	Alfa	119	VO8		Rugosa	Beta
109	VO14		Rugosa	Beta	243	VO128		Rugosa	Alfa
206	VO121		Lisa	Beta	244	VO110		Rugosa	Alfa
207	VO18		Lisa	Alfa	245	VO?		Lisa	Beta
248	VO18		Rugosa	Beta	247	VO110		Rugosa	Alfa
324	VO121		Rugosa	Alfa	326	VO135		Rugosa	Alfa
400	VO127		Rugosa	Beta	409	VO36		Lisa	Beta
403	VO7		Lisa	Beta	411	VO?		Rugosa	Beta
404	VO142		Rugosa	Beta	413	VO135		Lisa	Beta
705	VO?		Rugosa	Beta	414	VO153		Lisa	Beta
715	VO135		Lisa	Beta	718	VO126		Lisa	Beta
716	VO42		Lisa	Beta	719	VO126		Lisa	Beta
731	VO?		Lisa	Beta					
743	VO151		Lisa	Beta					
745	VO42		Rugosa	Beta					
750	VO127		Lisa	Beta					

4.3.- EXTRACCIÓN DE DNA GENOMICO

4.3.1.- Método de Fenol Cloroformo

A partir de un cultivo en medio TSA inoculado la noche anterior, se tomo una colonia que se inoculo en un tubo con 3mL de caldo Luria, el cultivo se incubo 4h a 37°C y 150rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5415C) durante dos minutos a 12000rpm (7000 g).

El sobrenadante del cultivo se eliminó y a la pastilla con bacterias se le adicionaron 461 µL de buffer TE (Tris-EDTA) agregando con la pipeta suavemente para homogenizar, se agregaron 30µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10%, 3µL de RNAsa A (Sigma Aldrich®) y 6µL de proteinasa K (Sigma Aldrich®) hasta un volumen final de 500µL, la mezcla se incubó 1h a 56°C (Multi-Blok Heater LAB-LINE ®) Posteriormente se colocaron 500µL de fenol amortiguado, la muestra se mezcló por inversión del tubo hasta que las fases quedaron completamente mezcladas. El tubo se centrifugo nuevamente (7000 g) durante 2 minutos, se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo y se adicionaron 500µL de la mezcla fenol/cloroformo (1:1), la muestra se homogenizó por inversión de tubo y se centrifugó (7000g) por 2 minutos. La fase acuosa se paso a un tubo nuevo y se agrego 500µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó (7000g) durante 2 minutos. La fase acuosa se paso a un tubo nuevo y se le agrego acetato de sodio 3M en un volumen 1/10. A la mezcla anterior se le adicionaron 0.6 volúmenes de Etanol absoluto frío mezclando suavemente hasta que el DNA precipito, la muestra se incubo a -70°C durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó (Sigma1-15K) durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se elimino quedando el DNA precipitado. Este se suspende en 50µL de agua Milli-Q estéril y se congeló a -70°C hasta su uso.

4.3.2.- Corrida del Gel de Agarosa del DNA Genómico

La pureza e integridad del DNA obtenido se analizó por electroforesis en gel (6.2x10.2cm) de agarosa (Vivantis®) al 1.5% en TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X (Sigma Aldrich®) y se utilizó una cámara horizontal para electroforesis (BioRad®) y se corrió a 80V durante 50minutos.

4.3.3.- Tinción del Gel de Agarosa

El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (BioRad) al 2% durante 15 minutos, y se observó en un transiluminador para luz ultravioleta Foto/Phoresis I (FOTODYNE U.S.A.®).

4.4.- TIPIFICACIÓN DE *Vibrio cholerae* POR EL METODO DE ERIC-PCR

4.4.1.- Oligonucleótidos para la Técnica de ERIC-PCR

Con base en secuencias reportadas en la literatura (Wong Hin, 2001) se mandaron sintetizar los iniciadores ERIC-PCR1, 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' y ERIC-PCR2, 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' (Laboratorios Invitrogen®) para verificar la identidad clonal de las cepas de *Vibrio cholerae* en estudio.

4.4.2.- Mezcla de Reacción

Para el ensayo de PCR se realizó la mezcla de reacción, la cual estaba compuesta por lo siguiente:

Cuadro 2.- Mezcla de Reacción para la Amplificación de los Fragmentos

	Volumen (µL)
Amortiguador "A" (10X)	5.0
MgCl ₂ (50mM)	1.5
dNTP's (10Mm)	1.0
Primer ERIC 1(100pM)	1.0
Primer ERIC 2(100pM)	1.0
Taq Polimerasa (5U/µL)	0.25
DNA	1.0
H ₂ O	39.25
Volumen Final	50.0

4.4.3.- Ensayo ERIC-PCR

Para la caracterización de *V. cholerae* se realizó una PCR en un termociclador (iCycler BIORAD® Thermal Cycler) bajo las condiciones de amplificación que se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3.- Condiciones para Amplificación del DNA Genómico de *Vibrio cholerae* no O1/noO139 Aisladas del Lago de Xochimilco por ERIC-PCR

Proceso	Temperatura °C	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95	7 min	1
Desnaturalización	90	45 s	
Alineamiento	52	1 min	30
Elongación	70	5 min	
Elongación	70	10 min	1

4.4.4.- Separación por Electroforesis de los Fragmentos Obtenidos por ERIC-PCR

Para la separación de los fragmentos obtenidos en la PCR se preparo un gel de poliacrilamida de acuerdo a las características mostradas en el cuadro 4.

Cuadro 4.- Gel de Poliacrilamida para la Separación de Fragmentos Obtenidos en el Ensayo de ERIC-PCR

Reactivo	(mL)
Agua	31.35
Solución Acrilamida-BisAcrilamida (29:1)	8.3
TBE 5X	10.0
Persulfato de Amonio al 10%	0.35
TEMED	0.017

La mezcla se homogenizo suavemente y se transfirió a una cámara de electroforesis vertical (DIGE Approved Amersham Biosciences U.S.A) para formar un gel de 18x16cms procurando no formar burbujas, posteriormente se coloco el peine para formar los carriles en los que se

colocaron las muestras de DNA. El gel se dejó polimerizar durante un lapso de 40 minutos, una vez solidificado en cada pozo se colocaron las muestras conformadas por una mezcla que estaba preparada con 20µL del producto obtenido en el ensayo de PCR y 10µL de Buffer de carga (ver Anexo). Para la separación de las bandas se utilizó una fuente de poder (Power Pac 300 de BioRad U.S.A) a un voltaje constante de 100V y un tiempo de 212min., se utilizó TBE 1X como buffer de corrida (Ver Anexo) así como un marcador de peso molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas®).

4.4.5.- Tinción del Gel de Poliacrilamida

Para visualizar el patrón de bandas obtenidas, los geles se tiñeron con bromuro de Etidio (BioRad®) al 2% durante 15 minutos, posteriormente se analizó en documentador de imágenes con exposición a luz UV (MacroVue UVis-20). De cada gel se tomó una foto con una cámara (Kodak EDAS 290) para su posterior análisis.

4.4.6.- Análisis de los Fragmentos Amplificados por ERIC-PCR

Para hacer la caracterización de las cepas de *Vibrio cholerae* en estudio se realizó el análisis de bandas obtenidas utilizando el programa LabWorks Software 4.5 (UVP Biomalgin Systems ®) para posteriormente elaborar el árbol de identidad de las diferentes cepas.

4.4.7.- Elaboración del Dendrograma

De acuerdo al patrón del bandeo obtenido se realizó una matriz previamente estandarizada para obtener el Dendrograma utilizando el Software Multi-Variate Statistical Package (MVSP).

5.- RESULTADOS

Aislamiento de *Vibrio cholerae*

A partir de la colección de 128 cepas que se sembraron 12 no cumplieron con las características físicas y bioquímicas de *Vibrio cholerae*, por lo que fueron descartadas. Las colonias identificadas en placas de agar sangre son: grandes, grisáceas, convexas, húmedas productoras de α o β hemólisis. En dichos cultivos se analizó la capacidad de las cepas para la formación de colonias rugosas (biopelículas), en los casos positivos las colonias se observan rugosas y secas a partir de las 24h. de incubación (Figura 2). Al analizar la morfología colonial en medio Mac Conkey se observaron colonias lactosa negativa por lo que se obtuvo colonias muy pequeñas, translúcidas, pequeñas convexas y lisas (Figura 3B). En el medio TCBS, las colonias obtenidas se observaron de un tamaño entre 1 y 2 mm de diámetro aproximadamente, planas y difíciles de desprender del medio, todas las cepas aisladas fueron de color amarillo debido a su capacidad para fermentar sacarosa (Figura 3C). Mientras que en el medio TSA el crecimiento de *V. cholerae* mostró colonias pequeñas, blancas, opacas, convexas, húmedas. En caso de formar exopolisácarido se tornan rugosas y secas (Figura 3D).

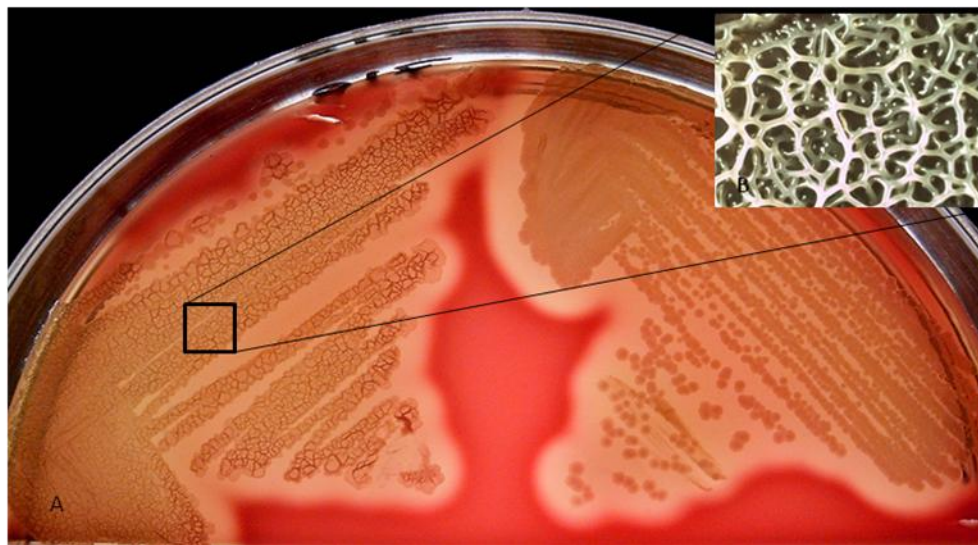


Figura 2.- A) Crecimiento de *Vibrio cholerae* con morfología arrugada en Agar Sangre; B) Formación de exopolisácarido vista desde el microscopio 2X.

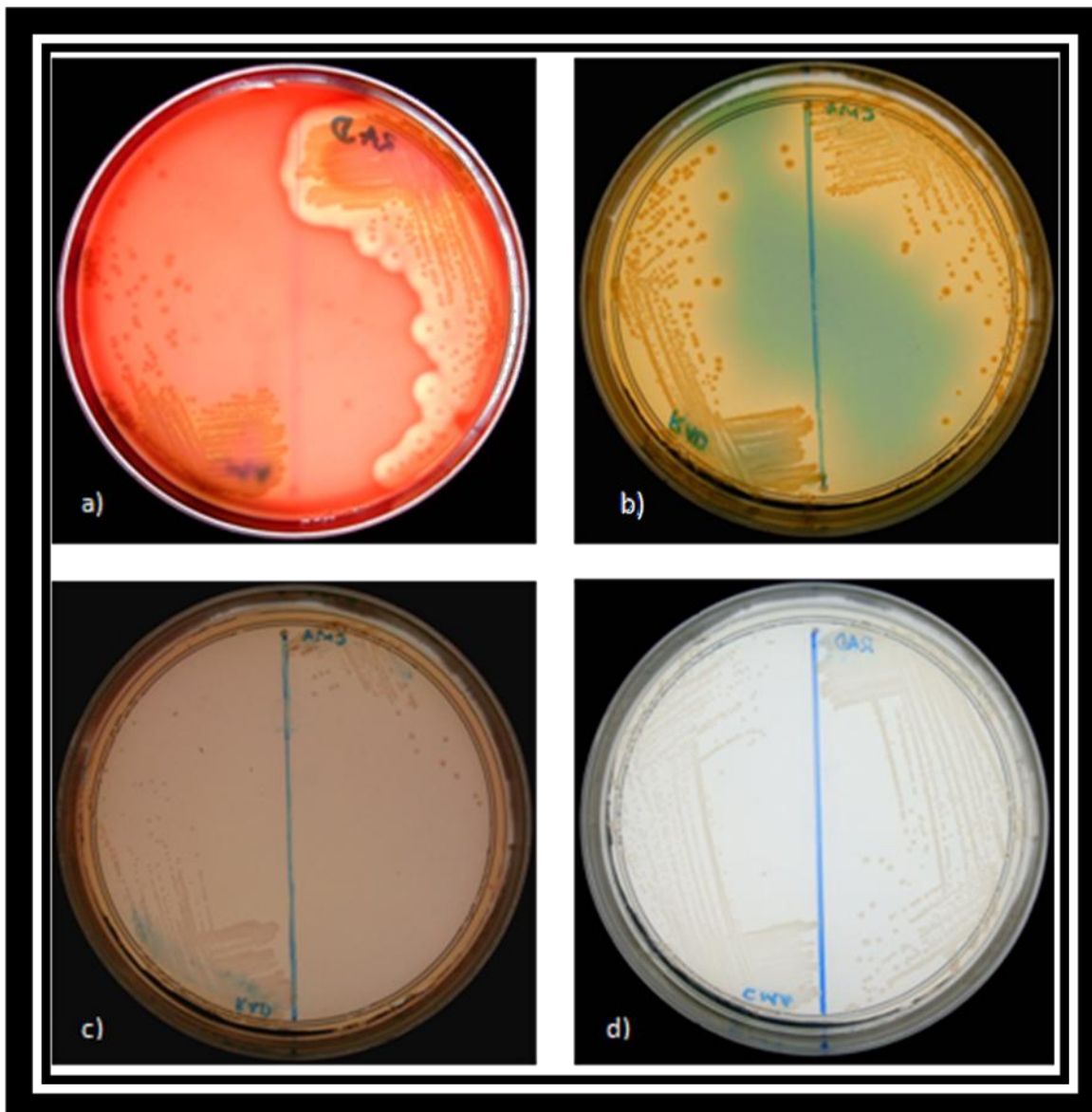


Figura 3.- Características Morfológicas de los Cultivos Realizados en los Diferentes Medios para la Recuperación de *Vibrio cholerae* a) Colonias en Agar Sangre de una Cepa O1 Clásica no Hemolítica y El Tor que presenta β hemólisis. b) Crecimiento en Medio TCBS de *Vibrio cholerae*, Colonias Amarillas Debido a la Acidez Producto de la Fermentación de la Sacarosa. c) Medio Mac Conkey que Presenta Colonias Lactosa Negativas. d) Crecimiento en TSA.

Con respecto a la hemólisis y morfología, predominó la morfología beta con 74.14% del total de las cepas, presentándose el mayor número en la estación 3, la hemólisis alfa solo tuvo el 25.86% del total y de ésta el mayor número se obtuvieron en la estación 1 y 2 con 9 cepas cada una. Otro parámetro que se tomó en cuenta para el análisis fue la morfología en donde obtuvimos 64.65% de cepas lisas y 35.34% de cepas arrugadas; predominando las estaciones 2 y 3 de las lisas y la estación 3 de las arrugadas. (Cuadro 5)

Cuadro 5.- Hemólisis y Morfología obtenidas en las cepas recuperadas.

	Hemólisis				Morfología			
		Alfa		Beta		Arrugada		Lisa
Estación 1	9	7.76%	17	14.65%	10	8.62%	16	13.79%
Estación 2	9	7.76%	21	18.10%	6	5.17%	24	20.70%
Estación 3	5	4.31%	32	27.60%	15	12.93%	22	18.96%
Estación 4	7	6.03%	16	13.79%	10	8.62%	13	11.20%
Total	30	25.86%	86	74.14%	41	35.34%	75	64.65%

Con respecto al serogrupo, el que más se repitió fue el O135 con más del 30%, y predominando en las estaciones 1, 2 y 4; el O? con 22.4% repitiéndose con mayor frecuencia en la estación 3 y el O14, este último se encontró en mayor número en la estación 3 y se mantuvo ausente en la 4. El siguiente cuadro se describe mejor los resultados acerca de los serogrupos más representativos de cada una de las estaciones en las que se realizó el aislamiento de la bacteria.

Cuadro 6.- Serotipos recuperados de las 4 diferentes estaciones

Estación	O135	**O?	O14	O18	O54	O121	O127	O42	O38	O110	O126	O39	**O D
1	12	8	1	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1
2	12	3	3	0	4	0	0	1	0	0	0	1	6
3	1	11	6	5	0	2	3	3	3	0	0	0	3
4	10	4	0	0	0	0	1	0	0	3	2	0	3
Total	35	26	10	5	5	4	4	4	3	3	2	2	13
%	30.17%	22.41%	8.62%	4.31%	4.31%	3.45%	3.45%	3.45%	2.58%	2.58%	1.72%	1.72%	11.20%

* O? Serogrupo que no aglutino con ningún suero disponible en el momento de la serología (Solís A. 2005)

**OD Serogrupos diferentes en cada estación que solo se identificaron una ocasión

Para confirmar la identidad de los cultivos se realizó la prueba de oxidasas, en este ensayo todos los cultivos mostraron vire del color azul violeta del reactivo a café oscuro, por lo que la prueba se considero positiva para todas las cepas comparadas contra un control positivo *Vibrio cholerae* E 8021 O1 Clásica y un control negativo, *E. coli* HB101 que no presento vire de color al estar en contacto con el reactivo. (Figura 4)



Figura 4.- Prueba de las Oxidasas, Presentando Vire de Color con el Reactivo

Extracción de DNA Genómico

La extracción de DNA para *Vibrio cholerae* se llevo a cabo de forma eficiente mediante la técnica de Fenol Cloroformo y su pureza e integridad se probó en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 5).

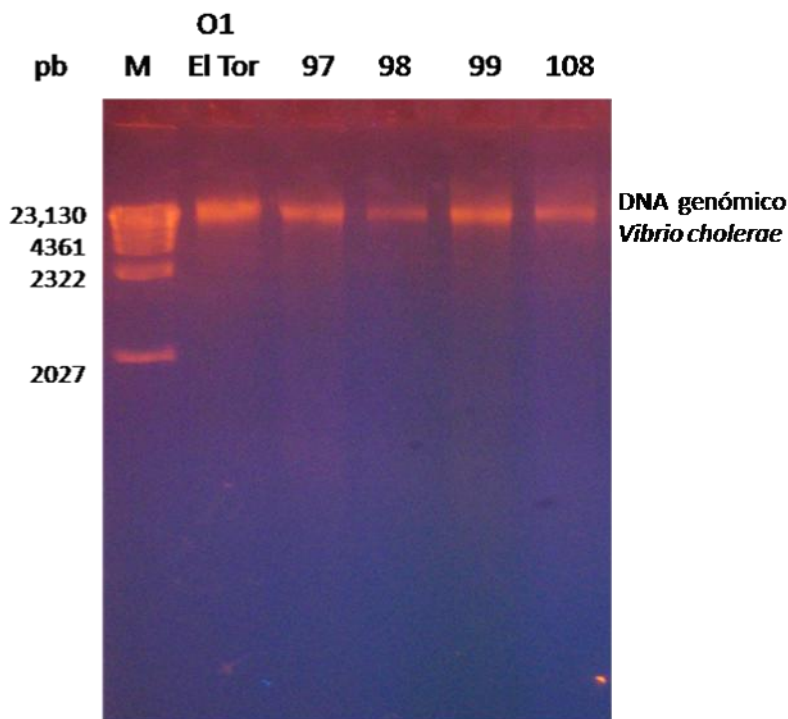


Figura 5.- Electroforesis en Gel de Agarosa al 0.8%. Se Observa la Pureza del DNA Genómico Obtenido por Extracción con Fenol Cloroformo. Marcador (M) DNA λ /Hind III Fragments (Difco BRL) y en el Resto de los Carriles 3 μ L de Buffer de Carga con 7 μ L de la Muestra Previamente Mezclados.

ERIC-PCR

El análisis por PCR con dos iniciadores específicos (ver material y métodos) de 53 cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de muestras de origen ambiental mostraron perfiles conformados entre 6 y 19 bandas de amplificación de un total de 27 perfiles con diferentes tamaños (Figura 6). El número de pares de bases (pb) que se encontraron vario entre 1200pb (el más grande) y 96pb (el más pequeño). Las bandas significativas que se presentaron en mas del 80% de las cepas fueron las siguientes: 1100 (94.3%), 1000 (84.9%), 600 (86.8%) y 450 (88.68%), las que se presentaron en mas del 40% de las sepas pero menos del 80%: 1200 (46.4%), 950 (56.6%), 900 (50.1%), 660 (52.8%) y 330 (47.2%).

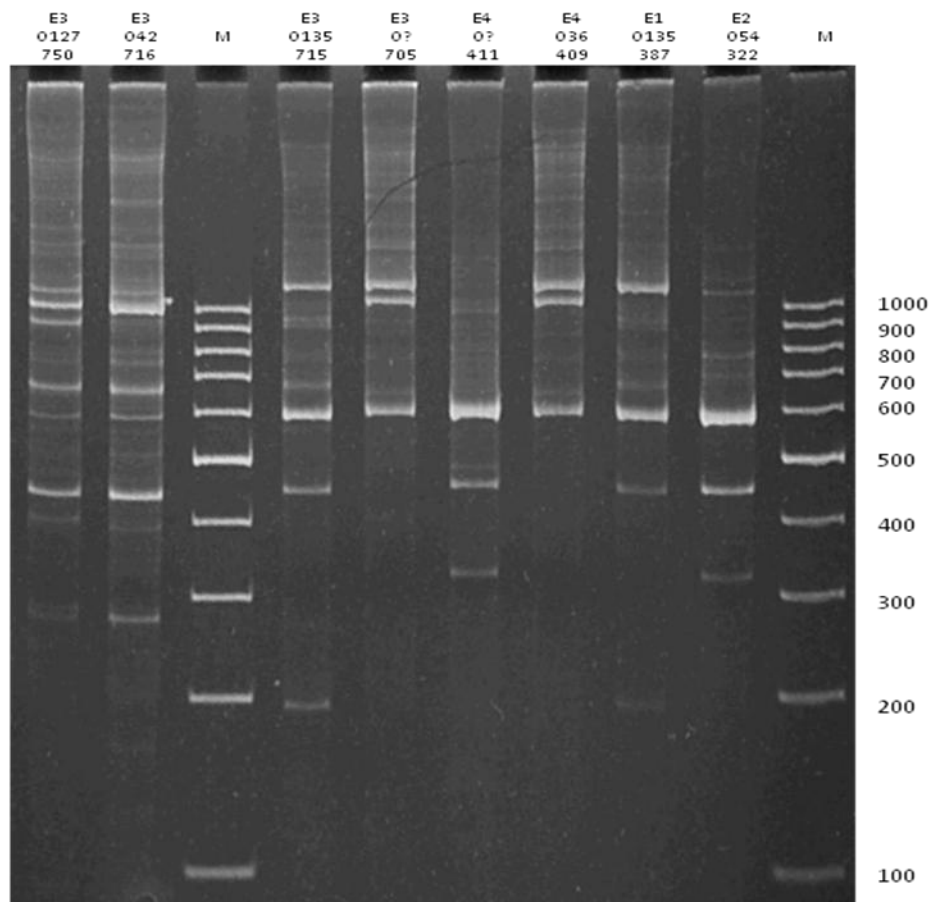


Figura 6.- Análisis de Fragmentos Amplificados por la Técnica de ERIC-PCR. Visualizados por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE) al 5%, Teñidos con Bromuro de Etidio (2%) y observados en un Transiluminador con Luz Ultra ioleta (LUV). Marcador (M)

Cepa	Serogrupo	1200	1100	1000	980	900	860	800	770	750	700	660	600	550	530	500	450	400	380	360	330	290	280	260	220	190	120	96
5	O39																											
49	O135																											
52	O7																											
197	O121																											
108	O121																											
200	O69																											
319	O135																											
320	O14																											
701	V054																											
738	O7																											
87	O14																											
100	O7																											
101	O147																											
103	O36																											
201	O31																											
202	O74																											
203	O39																											
389	O54																											
390	O52																											
391	O135																											
393	O42																											
698	O19																											
707	O135																											
50	O38																											
108	O14																											
109	O14																											
206	O121																											
207	O18																											
248	O18																											
324	O121																											
400	O127																											
403	O7																											
404	O142																											
705	O7																											
715	O135																											
716	O42																											
731	O7																											
743	O151																											
745	O42																											
750	O127																											
112	O127																											
119	O8																											
243	O128																											
244	O110																											
245	O7																											
247	O110																											
326	O135																											
409	O36																											
411	O7																											
413	O135																											
414	O153																											
718	O126																											
719	O126																											

**Cuadro 7.-Perfil de Amplificación de las Muestras por la Técnica de ERIC-PCR
Patrones de Bando de las Cepas de *Vibrio cholerae* Utilizadas como Controles**

Cepa	1200	1100	1000	950	900	860	800	770	750	700	660	600	550	530	500	450	400	380	360	330	290	280	260	220	190	120	96
E 8021 O1																											
Clásica																											
87145 O1																											
El Tor																											
CVD-103																											
2740 O1																											
El Tor																											
88678 O139																											
96316 O139																											
E.coli																											
Citrobacter																											
Pseudomona																											

Cuadro 8.-Perfil de Amplificación de las Cepas de Referencia por la Técnica de ERIC-PCR

En los cuadros 7 y 8 se muestra el perfil de bandeo obtenidos por la técnica de ERIC- PCR de las cepas de *V. cholerae* en estudio y las de referencia respectivamente. De acuerdo al análisis obtenido por el software utilizado (MVSP), en las cepas ambientales se observó mayor diversidad con respecto a las cepas de referencia las cuales mostraron un perfil de proximidad mayor entre ellas (Cuadro 8), de acuerdo con lo anterior se decidió realizar también una relación acerca del origen, y propiedades como hemólisis, y morfología.

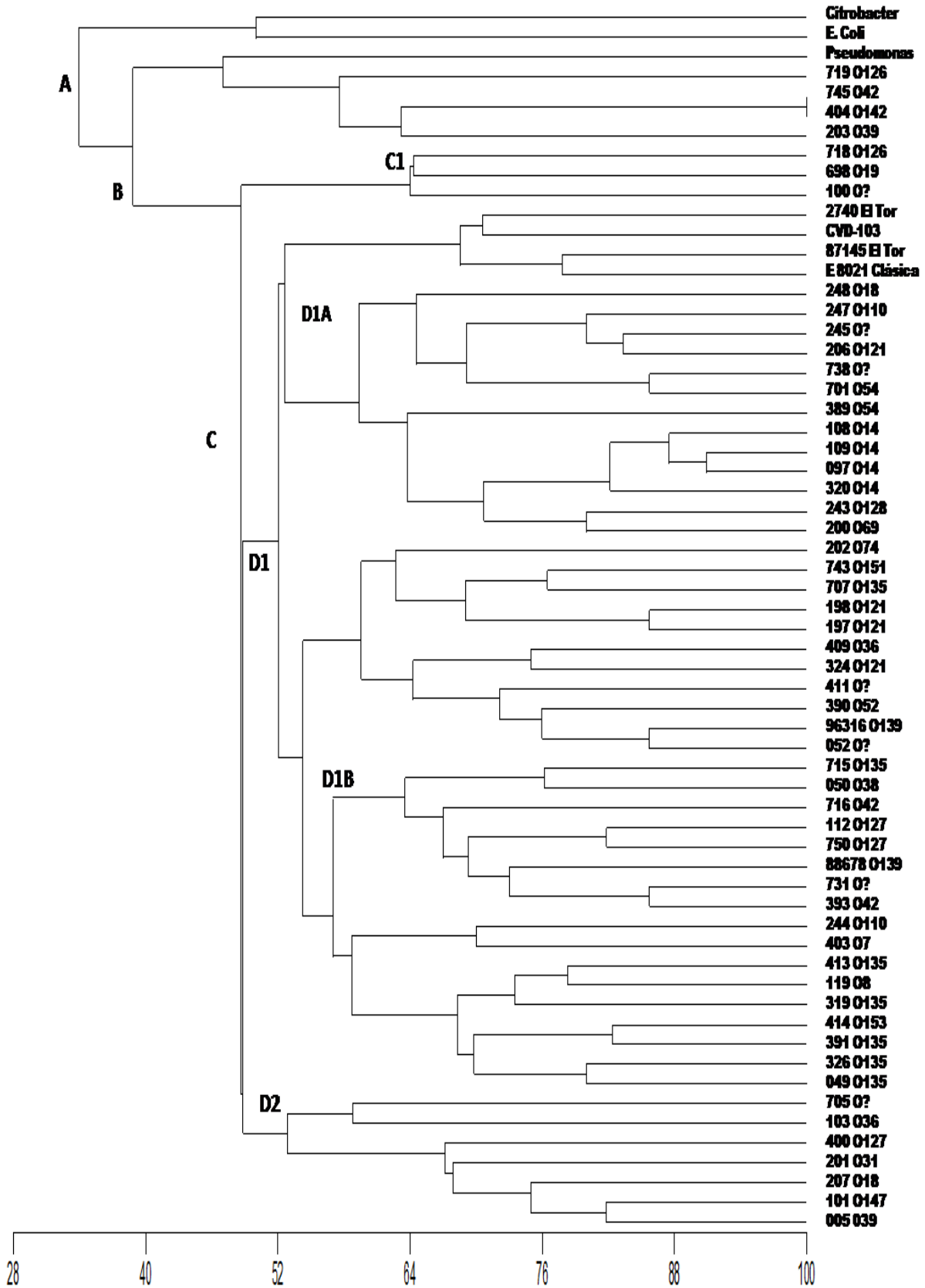


Figura 7.- Dendrograma Obtenido de Acuerdo a los Patrones de Bando por ERIC-PCR

En el árbol filogenético que se presenta en la figura 6 se observan cuatro grupos representativos: A, B, C y D. En el grupo A se encuentra el grupo más distante de *V. cholerae* comparado contra las cepas de referencia, en el cual tenemos a dos de las cepas que se usaron como controles negativos, que son; *Citrobacter sakazakii* y *Escherichia coli* HB101.

En el grupo B, se encuentra la cepa *Pseudomonas*, y cuatro de las muestras ambientales, estas cuatro cepas presentan beta hemólisis, la morfología es de tres cepas lisas y una rugosa, todas con diferente serogrupo, predominando las estaciones 2, 3 y 4.

Cuadro 9.- Cepas Incluidas en el Grupo B del Dendrograma				
	Serogrupo	Hemolisis	Morfología	Estación
<i>Pseudomonas sp.</i>	--	--	--	--
719	O126	Beta	Lisa	4
745	042	Beta	rugosa	3
404	O142	Beta	Lisa	3
203	O39	Beta	Lisa	2

En el Grupo C; el más grande de todos se encuentran el resto de los *vibrios*, este grupo se dividió en el grupo D que tiene dos ramificaciones D1 y D2. D1 tiene el grupo D1A, en el cual se presentan los controles de *V. cholerae* O1 junto con 13 de las cepas ambientales. En el análisis de distancias de este grupo se obtuvieron 5 cepas con alto porcentaje de similitud con los controles positivos; las cepas 247, 738, 701, 320 y 108 las primeras cuatro con las cepas 87145 O1 El Tor mientras que la 108 con 96316 O139. En este grupo hubo dos serogrupos que se repitieron; el O14 y el O54 con cuatro y dos cepas respectivamente; también se encontraron dos cepas de serogrupo no determinado. Con respecto a la hemólisis 8 cepas fueron beta y 5 alfa hemolíticas, mientras que con la morfología hubo 8 rugosas y el resto lisas. Hubo la presencia de cepas de las 4 estaciones predominando las estaciones 1 y 3. (Cuadro 10).

En el grupo D1B esta representado principalmente por las dos cepas de referencia O139 y 26 de las cepas ambientales del estudio: en este grupo 7 cepas fueron del serogrupo O135, mientras que del O121 y O? se tienen 3 cepas de cada uno; el resto de los serogrupos se mostró entre una y dos veces. La beta hemólisis fue predominante con 18 cepas y el resto alfa, la morfología con 18 cepas rugosas y 8 lisas. Con respecto al punto de muestreo, se obtuvo 8, 7, 6 y 5 cepas de las estaciones 4, 3, 2 y 1 respectivamente (Cuadro 11).

Al obtener el análisis de distancias en este grupo observamos que 17 cepas tienen más del 70% de similitud con las cepas de referencia, de las cuales: 707, 198, 409, 324, 411, 390, 52, 731, 393 y 413 están estrechamente relacionadas con la cepa 96316 (O139); mientras que: 202, 197, 403, 244 y 715 tuvieron similitud con 87145 El Tor; dos cepas 750 y 319 se relacionaron únicamente con E8021 Clásica. De estas cepas que se mencionaron se encontró que cinco de ellas además de estar relacionadas con las cepas de referencia están ligadas a los otros controles, tal es el caso de 390 que además tiene similitud con E 8021 Clásica y 2740 O1 El Tor; la 52 y la 731 con la E 8021 Clásica y las 715 y la 393 con la cepa 88678 (O139).

Cuadro 10.- Cepas incluidas en el Grupo D1A del Dendrograma

	Serogrupo	Hemólisis	Morfología	Estación
<i>V. ch. 2740 El Tor</i>	O1			
<i>V. ch. CVD 103</i>	O1			
<i>V. ch. 87145 El Tor</i>	O1			
<i>V. ch. E 8021 Clásica</i>	O1			
248	O18	Beta	rugosa	3
*247	O110	Alfa	rugosa	4
245	O?	Beta	rugosa	4
206	O121	Beta	lisa	3
*738	O?	Beta	rugosa	1
*701	O54	Beta	lisa	1
389	O54	Beta	lisa	2
*108	O14	Alfa	lisa	3
109	O14	Beta	rugosa	3
97	O14	Alfa	lisa	2
*320	O14	Alfa	rugosa	1
243	O128	Alfa	rugosa	4
200	O69	Beta	rugosa	1

(*) Cepas que Tuvieron Mayor o Igual al 70% de Similitud con Respecto a las Cepas de Referencia O1 de Acuerdo al Software MVSP.

Cuadro 11.- Grupo D1B del Dendrograma				
	Serogrupo	Hemólisis	Morfología	Estación
*202	O74	Alfa	lisa	2
743	O151	Beta	lisa	3
*707	O135	Beta	lisa	2
*198	O121	Beta	rugosa	1
*197	O121	Beta	lisa	1
*409	O36	Beta	lisa	4
*324	O121	Alfa	rugosa	3
*411	O?	Beta	rugosa	4
*390	O52	Beta	lisa	2
V. ch. 96316	O139			
*52	O?	Alfa	lisa	1
*715	O135	Beta	lisa	3
50	O38	Beta	lisa	2
716	O42	Beta	lisa	3
112	O127	Alfa	rugosa	4
*750	O127	Beta	lisa	3
V. ch 88678	O139			
*731	O?	Beta	lisa	3
*393	O42	Beta	rugosa	2
*244	O110	Alfa	lisa	4
*403	O7	Beta	lisa	3
*413	O135	Beta	lisa	4
119	O8	Beta	lisa	4
*319	O135	Alfa	lisa	1
414	O153	Beta	lisa	4
391	O135	Beta	rugosa	2
326	O135	Alfa	rugosa	4
49	O135	Alfa	rugosa	1

El último grupo es el D2, en que solo se incluyeron 7 cepas, todas mostrando serogrupos diferentes, 4 con alfa y 3 con beta hemólisis, así como 4 cepas rugosas y 3 lisas, predominando las estaciones 2 y 3 con tres cepas cada una y una cepa de la estación 1. Cabe mencionar que de acuerdo al análisis de distancias la cepa 201 de este grupo, mostró similitud mayor al 70% con una de las cepas de referencia.

Cuadro 12.- Grupo D2 en el Dendrograma				
	Serogrupo	Hemólisis	Morfología	Estación
705	O?	beta	rugosa	3
103	O36	alfa	lisa	2
400	O127	beta	rugosa	3
*201	O31	alfa	lisa	2
207	O18	alfa	rugosa	3
101	O147	alfa	lisa	2
5	O39	beta	rugosa	1

6.- DISCUSIÓN

El cólera es un padecimiento causado por *Vibrio cholerae* toxigénico, que representa un importante problema de salud pública en países en desarrollo. La vigilancia epidemiológica en conjunto con estudios moleculares de cepas aisladas en diferentes regiones, han mostrado la existencia de diversidad clonal entre cepas epidémicas lo que sugiere la emergencia continua de nuevas clonas (Bidinost C. *et al.*, 2004).

Vibrio cholerae esta integrado por mas de 200 variedades antigénicas que se conocen como serogrupos, de estos O1 y O139 son los que incluyen cepas toxigénicas responsables del cólera epidémico. Los otros serogrupos, conocidos como no O1/no O139, se encuentran distribuidos en ambientes acuáticos de diferentes partes del mundo. Algunos de estos han sido implicados en casos de gastroenteritis leve, aunque, también se han asociado con pequeños brotes epidémicos. (Keymer D., 2007). La aparición en la India de cólera epidémico relacionado con una cepa de *Vibrio cholerae* O139 que resulto ser una variante de *Vibrio cholerae* O1, mostró la factibilidad de la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas de este grupo de bacterias. En el surgimiento de *V. cholerae* O139 se identifico la transferencia del grupo de genes que codifican para el lipopolisacárido de una cepa O22 a *V. cholerae* O1 (Faruque, S. 2003.), en otro estudio Udden N. (2008), encontraron que cepas O141 de origen ambiental adquirió el profago CTX, el cual codifica a la toxina del cólera, sugiriendo que dicha cepa podría ser una variante patogénica. La aparición en la India de cólera epidémico relacionado con una cepa de *Vibrio cholerae* O139 que resulto ser una variante de *Vibrio cholerae* O1, mostró la factibilidad de la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas de este grupo de bacterias. En el surgimiento de *V. cholerae* O139 se identifico la transferencia del grupo de genes que codifican para el lipopolisacárido de una cepa O22 a *V. cholerae* O1 (Faruque, S. 2003.), o bien en otro estudio Udden N. (2008), encontraron que cepas O141 de origen ambiental adquirió el profago CTX, el cual codifica a la toxina del cólera, sugiriendo que dicha cepa podría ser una variante patogénica. Este y otros eventos similares no solo cambiaron la dinámica con respecto a la etiología del cólera en la India, también se pudo confirmar el potencial que existe para el intercambio de material genético entre cepas virulentas y avirulentas en el medio ambiente acuático. En México la séptima pandemia inició en julio de 1991 y el último caso se reporto 10 años después (2001), durante el tiempo que duro la epidemia se reportaron 45,583 casos con 542 defunciones. Un hecho importante es que no

obstante que las condiciones sanitarias de las áreas endémicas no cambiaron, la presencia de *Vibrio cholerae* O1 se hace negativa sugiriendo que el microorganismo ha sido eliminado del ambiente.

En el Laboratorio del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM, se han realizado diferentes trabajos, enfocados al estudio de *Vibrio cholerae*, para conocer su importancia epidemiológica. Estos estudios se han realizado entre otros lugares en el lago de Xochimilco, en este sitio se identificó la presencia de *Vibrio cholerae* de serogrupos no O1/ no O139. Sin embargo, no obstante que no se identificó en ninguna de las cepas la presencia del gen que codifica para la toxina CTX (*ctx*), el 80% de las mismas presenta Tox R, gene responsable de regular la expresión de *ctx*. Lo anterior sugiere la posibilidad de que cepas *ctx*⁻, puedan adquirir dicho gene y dar lugar a la emergencia de nuevas cepas epidémicas.

En el presente trabajo se muestran resultados sobre la relación clonal de 128 cepas de *Vibrio cholerae* de diferentes serogrupos aisladas en el lago de Xochimilco durante 2002 y 2003 (Solís A. 2005), con cepas de *V. cholerae* O1/O139 aisladas en diferentes partes del mundo. Una de las actividades que primeramente se realizaron, consistió en recuperar los cultivos que se encontraban almacenados en el cepario del laboratorio. El resultado mostró una recuperación del 90% de los cultivos, aunque se puede considerar que se obtuvo un alto porcentaje de recuperación, el no obtener el 100% indica que el procedimiento para almacenar los cultivos no funciona en forma óptima por lo que es importante considerar otros métodos. Entre estos de los más recomendables incluyen la criopreservación y la liofilización, ambos permiten mantener la viabilidad de los cultivos por periodos de tiempo más prolongados y a la vez evitan la pérdida de información genética de los microorganismos. Durante el proceso de recuperación de los cultivos se observó la presencia de dos tipos de morfología colonial: lisa y rugosa (Figura 2), principalmente al cultivar en gelosa sangre. Las colonias con morfología rugosa fueron descritas por White (1938), esta característica no está relacionada con la deficiente expresión del lipopolisacárido de la bacteria, por el contrario se debe a la secreción de una matriz de polisacáridos que le confieren a las bacterias propiedades relacionadas con un mayor índice de adherencia, resistencia al cloro y a los antimicrobianos. Dicho exopolisacárido se describe en la actualidad como **biopelícula** y se ha observado principalmente en bacterias ambientales encontrándose en asociación con Fitoplancton y zooplancton (Liang W. *et al.*, 2007). Estudios con cepas de *V. cholerae* productoras de biopelícula, refieren que éstas son

más resistentes a factores como el estrés ambiental, la depredación protozoaria, el tratamiento del agua con agentes químicos como el cloro, y el estrés osmótico y oxidativo (Liang W. *et al.*, 2007; Hammer B. *et al.*, 2003). La capacidad de adaptación de la bacteria a condiciones de estrés, se debe a la expresión del factor sigma RNA polimerasa (RpoS), responsable de incrementar la expresión de HapR, proteína central que participa en la regulación del sistema conocido como **Quorum sensing**. Dicho sistema controla además funciones fisiológicas relacionadas con la patogénesis, la motilidad, conjugación, competencia y esporulación (Hammer B. *et al.*, 2003; Joelson A. *et al.*, 2007). A diferencia de otras bacterias patógenas que inducen la formación de factores de virulencia y / o la formación de biopelículas en altas densidades celulares; *Vibrio cholerae* reprime este comportamiento cuando existe una alta densidad de bacterias, por lo que la cascada del Quorum sensing, regula la transcripción de los genes involucrados en la producción de EPS como respuesta a la detección de señales moleculares extracelulares. Así las bacterias detectan y responden a múltiples señales auto inductoras, las que en hábitas naturales podrían favorecer la diferenciación de especie dentro de un consorcio y al mismo tiempo coordinar el comportamiento del grupo, para realizar actividades que sería imposible llevar a cabo por una sola bacteria. La presencia de un importante número de cepas productoras de biopelículas aisladas en muestras ambientales, plantea que esta es una estrategia utilizada por *V. cholerae* para mantenerse en ambientes poco propicios, pero en condiciones adecuadas para adquirir información genética como pudiera ser el caso del fago CTX (Chakraborty S. *et al.*, 2000; Faruque S. M *et al.*, 2007).

En la extracción de DNA genómico se puede utilizar el método de Fenol cloroformo que es uno de los más usados debido a la excelente recuperación de material genético (Maniatis *et al.*, 1982). Otro procedimiento es con Kits comerciales que aunque facilitan el trabajo y ahorran tiempo, su costo es alto y no siempre son eficientes para todo tipo de bacterias. Lo anterior por el hecho de que su empleo se estandariza con una bacteria específica y no siempre las condiciones de uso se adaptan a otros microorganismos. En el estudio inicialmente usamos dos equipos comerciales, el primero ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen® USA), permitió obtener una buena recuperación de DNA, lamentablemente por el número de cepas y por el costo del equipo no fue posible usarlo. El otro equipo de extracción que probamos fue Fermentas ®, aunque de menor costo los resultados obtenidos no fueron satisfactorios principalmente porque nuestros cultivos eran productores de biopelículas y el rendimiento de

DNA en estos casos era pobre. Por lo antes expuesto se utilizó el método de Fenol cloroformo con algunas modificaciones, las cuales se hicieron para trabajar con las cepas que producían exopolisacárido. Los resultados obtenidos con este procedimiento fueron satisfactorios tanto en la cantidad como en la pureza del DNA obtenido (Figura 5). La técnica de ERIC-PCR emplea como iniciadores secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC), este procedimiento se ha utilizado para definir líneas clonales de diferentes bacterias. Aunque ERIC-PCR es capaz de diferenciar aislados de *V. cholerae* O1 y No O1 la estrecha relación entre las cepas O1 y O139 no ha sido reportada (Zo *et al.*, 2002)

En nuestro trabajo se utilizó la técnica de ERIC-PCR para evaluar si cepas de *Vibrio cholerae* no O1 aisladas en el lago de Xochimilco presentaban relación clonal con cepas de *Vibrio cholerae* O1/O139 obtenidas de aislamientos clínicos y ambientales. Para el análisis de las bandas de amplificación del DNA obtenidas en el ensayo ERIC-PCR se elaboró una matriz que primeramente se estandarizó y posteriormente se analizó con el software MVSP. Con este último se generó un dendrograma (árbol filogenético) creado en base al algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic). Los resultados de amplificación obtenidos mostraron 27 diferentes bandas con pesos que van de los 0.95 a las 2kb; en el ensayo se identificaron 4 bandas (1.1kb, 1kb, 0.6 y 0.46kb) que fueron comunes (85%), para la mayoría de las cepas estudiadas. Chokesajjawatee N. *et al.*, (2008) en un estudio similar al nuestro, obtuvieron bandas con pesos de 0.6, 0.70, 0.9, 1.0, 1.1, 1.4, 3.5, 4.5 y 10kb. Los resultados en ambos estudios difieren solo en los fragmentos amplificados con tamaño superior 1.1kb que no fueron observados en nuestro estudio. Lo anterior pudiera estar relacionado con el tipo de matriz utilizada para la separación de fragmentos, ya que mientras Chokesajjawatee N. *et al.*, 2008, utilizaron geles de agarosa al 1%, nosotros empleamos geles de poliacrilamida al 5%. Por las características del soporte empleado las condiciones de la corrida en la electroforesis también fueron diferentes. Sin embargo, en el análisis de las bandas obtenidas con las cepas control, se identificó un patrón más homogéneo que mostró 5 bandas con pesos de 0.33 0.45, 0.6, 0.950 y 1.1 kb, que se repetían en casi todas las cepas, de éstas las de 0.6kb, 0.950kb y 1.1 kb coinciden con lo reportado por Chokesajjawatee N. *et al.*, 2008. Esta última observación sugiere que probablemente no fueron las condiciones utilizadas para la separación de fragmentos las que influyeron en el patrón obtenido en nuestro estudio, más bien este pudiera estar relacionado con la identidad de nuestras cepas noO1/noO139. Consideramos que ambos

resultados son interesantes, sin embargo, para confirmar nuestras observaciones es necesario emplear condiciones similares para poder comparar lo obtenido en los dos estudios.

El hecho de haber utilizado los geles de poliacrilamida al 5 %, fue debido a que la separación de los fragmentos fue mucho más clara y con mayor resolución, que los corrimientos en gel de agarosa al 1.2%. Con este último tipo de gel se observaban bandas más gruesas que en el gel de acrilamida en el que se obtenía un mayor número de fragmentos. Es probable que en los geles de agarosa se estén observando aglomerados de varias bandas que no se separan, lo que dificulta su análisis. Wong Hin y Lin Chih (2001), reportan en su trabajo la presencia de bandas poco visibles al utilizar geles de agarosa, lo anterior dio lugar a que la diferenciación del patrón del bandeo fuera poco consistente. Esta última observación es similar a la que obtuvimos confirmando que para llegar a una mejor caracterización, se debe hacer la estandarización con ambos tipos de geles.

Para el análisis de bandas y la elaboración del dendrograma (Figura 7), utilizamos el programa MVSP, que se encuentra disponible en la red. El análisis del diagrama mostró 4 agrupamientos principales, en el primero (A) se ubicaron las cepas utilizadas como controles (*E. coli* y *Citrobacter Sakazakii*) no relacionados con el género *Vibrio*. El resultado obtenido correlaciona con lo esperado lo que asegura que el sistema de caracterización funciona. El segundo grupo (B), incluyó una cepa de *Pseudomonas* y cuatro de *Vibrio cholerae* de nuestro estudio todas con la propiedad de producir hemólisis tipo beta. Lo anterior confirma la relación filogenética entre *Pseudomonas* y *Vibrio* de serogrupos no relacionados con el cólera (Prescott *et al.*, 2002). Estudios al respecto señalan relación filogenética entre las γ -proteobacterias, el árbol filogenético elaborado al respecto, muestra que la distancia entre *V. cholerae* y *Pseudomonas* es menor que la existente con *E. coli* y *Citrobacter*. Las cepas de *V. cholerae* que se integraron en el dendrograma en el grupo B, tienen baja similitud con las cepas epidémicas O1/O139. Lo anterior sugiere que dichas cepas no constituyen un riesgo, para definir las como potencialmente epidémicas susceptibles de adquirir la información genética relacionada con la expresión de la toxina del cólera.

El tercer grupo (C), se dividió en dos subgrupos, en el primero (C1) se incluyeron las cepas 718, 698 y 100 con similitud con *V. cholerae* O1 entre 30 y 60 %. El otro subgrupo (D) que se formó del grupo C se dividió a su vez en dos grandes ramificaciones (D1A y D1B). En D1A se

incluyeron las cepas de *V. cholerae* del serogrupo O1 el Tor y O1 clásico. En este mismo grupo se integraron 4 cepas de nuestro estudio [247 (O110), 738 (OND), 320 (O14) y 108 (O14)], las que mostraron similitud con cepas de *V. cholerae* O1 (las tres primeras) y O139 la última. Este resultado sugiere la posibilidad de que estas cuatro cepas, pudieran ser consideradas como posibles cepas emergentes por lo que se requiere profundizar en el estudio de su genoma.

Con respecto al subgrupo D1B en éste se localizaron además de las cepas control 88678 y 96316 del serogrupo O139, 26 de las cepas del estudio. Al realizar el análisis de identidad se observó que 10 de estas cepas mostraron identidad superior al 70% con la cepa 96316 O139 y dos con la cepa 88678 O139. Una observación más fue que tres de las primeras 10 cepas (52[ND], 390 [O52], 731[ND]) presentaron además similitud con una cepa O1 E 8021 Clásica, y las dos que mostraron similitud con 88678 O139 una presentó relación con la cepa 87145 O1 El Tor y la otra con 96316 O139. Mientras que 202 (O74), 244 (O110) y 403 (O7), mostraron similaridad únicamente con 87145 O1 El Tor y 319 con E 8021 Clásica.

Resultados con las mismas características fueron reportados previamente por Beltrán P. *et al.*, (1999), quienes utilizando el ensayo de enzimas multilocus identificaron que cepas de *V. cholerae* no O1 mostraban identidad con *V. cholerae* O1 y O139, en dicho estudio los autores proponen al igual que nosotros hemos sugerido, que estas cepas no O1 pudieran sufrir modificaciones genéticas y emerger como cepas potencialmente epidémicas.

Finalmente el último grupo que se constituyó (D2) integra 7 cepas no O1 de las cuales solo la cepa 201 (O31) tuvo un 75.2% de similitud con *V. cholerae* 96316 (O139).

Los resultados obtenidos son interesantes ya que 22 de las 53 cepas estudiadas mostraron similitud igual o mayor al 70% con las cepas epidémicas de *V. cholerae* de las cuales 6 fueron de la estación 1; 5 de la estación 2; 6 de la Estación 3 y 5 cepas de la estación 4. Este último análisis nos muestra que las cepas aunque de serogrupos diferentes, al parecer tienen un origen común y se distribuyen ampliamente por los canales de Xochimilco.

En relación a la posible fuente de transmisión al lago de Xochimilco, de las cepas de *V. cholerae*, sabemos que el nivel de agua de los canales se mantiene por el suministro que provienen de la plantas de tratamiento “Cerro de la Estrella”. Luna F. (2006), realizó un muestreo en dicha planta de tratamiento y encontró diferentes especies de *Vibrios* entre ellos *V. cholerae*. Tal hecho sugiere que la población de la Cd. de México está colonizada con *V. cholerae*, microorganismo que no se busca de manera intencional en las heces de pacientes con

cuadro clínico de diarrea. Por otro lado el que no se realice el aislamiento de *V. cholerae* O1/O139 de muestras ambientales, no asegura que haya sido erradicado de nuestro país y que es probable tal y como ocurre en áreas endémicas que se encuentre en un estado de latencia o controlado por otros microorganismos. Al respecto existe la hipótesis de que en áreas endémicas, fagos del tipo lítico participan en la aparición cíclica de *V. cholerae* O1/O139 (Faruque *et al.*, 2005). Solís A. (comunicación personal), recientemente realizó el aislamiento de un fago en muestras de agua, dicho fago tiene actividad lítica principalmente sobre cepas de *V. cholerae* O1. Lo anterior sugiere que en el ambiente acuático en el que realizó dicho aislamiento pudieran existir cepas de *V. cholerae* O1, o algunas genéticamente relacionadas. El estudio realizado por nosotros apoyando en técnicas moleculares básicas, muestra la existencia de cepas ambientales de *V. cholerae* con un alto grado de similitud con cepas epidémicas de *V. cholerae* O1/O139. Por lo antes expuesto es importante realizar y mantener la vigilancia epidemiológica y estudios en pacientes con diarrea que vivan en el área de la delegación Xochimilco, para poder conocer si estas cepas pudieran estar involucradas en la etiología de dichos cuadros clínicos y detectar oportunamente la posible reemergencia de cepas epidémicas de *V. cholerae* causantes de cólera.

7.- CONCLUSIONES

Se realizó la recuperación con técnicas convencionales de 116 cepas de una colección de 128 cepas ambientales de *Vibrio cholerae* No O1/NoO139 aisladas en el periodo 2002-2003, que se encontraban en el laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de UNAM, de las cuales se logró recuperar el 90.6%.

La amplificación del DNA genómico con primers específicos utilizando la Técnica de ERIC PCR, mostró que el 41% de las cepas analizadas mostraron alta similitud (igual o mayor al 70%) con cepas referencia de *Vibrio cholerae* O1/O139.

Por sus características filogenéticas y de relación con *Vibrio cholerae* O1/O139, las cepas de *Vibrio cholerae* no O1/no O139 analizadas, pudieran representar cepas con potencial para convertirse en cepas epidémicas.

Es importante realizar estudios genéticos más profundos, para definir plenamente la posibilidad de que las cepas de *Vibrio cholerae* no O1/no O139 representan un riesgo para la reemergencia del cólera en México.

Se requiere realizar estudios similares al del presente trabajo, en cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de las zonas que fueron endémicas durante la epidemia del cólera iniciada en 1991.

7.- BIBLIOGRAFIA

Bidinost C., Saka H., Aliendro O., Sola C., Panzetta-Duttari G., Carranza P., Echenique J., Patrio E., Bocco J. **2004**. Virulence factors of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Cordoba, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 36: 158-163.

Beltrán R., Delgado G., Navarro A., Trujillo F., Selander K., Cravioto A. **1999**. Genetic Diversity of population Structure of *Vibrio cholerae*. *Journal of clinical Microbiology*. 37: 581-590.

Chakraborty S., Mukhopadhyay A. K., Bhadra R. K., Ghosh A. N., Mitra R., Shimada T., Yamasaki S., Faruque S. M., Takeda Y., Colwell R. R., Nair B. **2000**. Virulence Genes in Environmental Strains of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4022-4028.

Chokessajjawatee N., Zo Young-Gun., Colwell R. R., **2008**. Determination of Clonality and Relatedness of *Vibrio cholerae* Isolates by Genomic Fingerprinting Using Long-Range Repetitive Element Sequence-Bases PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 5392-5401.

Colombo M. M.; Mastrandea S.; Leite F.; Santona A.; Uzzau S.; Rappelli P.; Pisano M.; Rubino S.; Cappuccinelli P. **1997**. Tracking of clinical and environmental *Vibrio cholerae* O1 strains by combined analysis of the presence of the toxin cassette plasmid content and ERIC PCR. *FEMS Immunología Medical Microbiology*. 19:33-45.

Farfán Sellares M. **2002**. Estudio de la Estructura genética de poblaciones de *Vibrio cholerae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.

Faruque, S. M., Naser I. B. Islam M. J., Faruque A. S. G., Gosh A. N., Nair G. B. Sack D. A., Mekalanos J. J. **2005**. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 102:1702-1707.

Faruque S. M., Tam V. C., Chowdhury N., Diraphat P., Dziejman M., Heidelberg J. F., Clements J. D., Mekalanos J. J., Nair B., **2007**. Genomic Analysis of the Mozambique strains of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*: 104: 5151-5156.

Faruque, S. M., D. A. Sack, R. B. Sack, R. R. Colwell, Y. Takeda, and G. B. Nair. **2003**. Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA* 100:1304–1309

García Reyes R. M., Sánchez Sánchez V. **2001**. Cuantificación de *Vibrio cholerae* en moluscos bivalvos expedidos en la central de pescados y mariscos La Nueva Viga durante los años 1996-1998. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores. UNAM. México.

Gómez Pliego R. 2000. Determinación de *Vibrio cholerae* O1 en hortalizas y en el agua utilizada para su riego en un ejido con restricciones de cultivo. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. México.

Hammer B. K., Bassier B. L., 2003. Quorum Sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. 50: 101-114.

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

Isacc M. A., Lezama D. C., Eslava C. A., Navarro O. A., Cravioto Q. 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*. 30: 17-22.

Islam M. S., Talukdr K. A., Khan N., Mahmud Z., Rahman M., Nair G., Siddique A., Yunus M., Sack D., Sack R., Huq A., Colwell R. 2004. Variation of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the Acuatic Environment of Bangladesh and its correlation with the Clinical strains. *Microbiology Immunology*. 48:773-777.

Joelsson A., Kan Biao., Zhu J. 2007. Quorum Sensing Enhances the stress Response in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 3742-3746.

Kaper James B., Glenn J., Levine M. M., 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*. 8: 48-86.

Keasler Stacye P.; Hall Robert H. 1993. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. 341:1661.

Keymer D. P., Lam L. H., Boehm A. B. 2009. Biogeographic Patterns in Genomic Diversity among a targe Collection of *Vibrio cholerae* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 1658-1666.

Keymer D.P.,M. C. Miller, G. K. Schoolnik, and A. B. Boehm, 2007. Genomic and Phenotypic Diversity of Coastal *Vibrio cholerae* Strains Is Linked to Environmental Factors. *Applied and Environmental. Microbiology*; 3:3705–3714

Liang Weili; Silva Anisia; Benitez Jorge. 2007. The cyclic AMP Receptor Protein Modulates Colonial Morphology in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:7482-7487

Lipp E. K., Huq A., Colwell R.R., **2002**. Effects Global Climate on Infectious Disease: The Cholera Model. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 757-770.

Luna Fuentes K.; **2006**. “Aislamiento y caracterización serológica de *Vibrio cholerae*, aislado de la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella y de Raíz de Lirio en los canales de Xochimilco” Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.

Manual Para la Vigilancia Epidemiológica del Cólera en México. Programa nacional de Prevención y control del cólera 2001 3ª. Ed. 2001 SSA. México.

Marshall S., Clark C. G., Wang G., Mulvey M., Kelly M. T., Jonhson W. M. **1999**. Comparison of molecular methods typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of clinical Microbiology*. 37:2473-2478.

Medrano Martínez A. **2001**. Control de la expresión y actividad de los reguladores de virulencia ToxR y ToxT de *Vibrio cholerae* El Tor. Instituto de Biotecnología. UNAM. México

Nair G. B., Faruque M. S., Bhuryan N. A., Kamruzzaman M. **2002**. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with Attributes of the Classical Biotpe from Hospitalized Patiens with Acute Diarrhea in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:3296-3299.

Prescott Lansing M., Herley John P., Klein Donald A. **2002**. *Microbiología*. 5a. Ed. McGraw Hill. España. 525-557.

Pourshafie M., Grimont F., Kohestani S., Grimont P. A. D. **2002**. A molecular and phenotypic study of *Vibrio cholerae* in Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 51:392-398.

Ramirez García P., Cortés M. J., Sánchez Ch. J., Carlos H. G. **1995**. Nicho ecológico de *Vibrio cholerae* en el ambiente acuático vs un estudio ambiental. IMTA. México. 117pp.

Ramírez Pérez M. **2003**. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio sp.* en muestras de agua, ostión y sedimento de la laguna de Mecoaacán, Tabasco, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Rivera I. G.; Chowdhury M. A R.; Hug A.; Jacobs D.; Martins M. T.; Colwell Rita R. **1995**. Enterbacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR To Generate Fingerprints of Genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and Non-O1 Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:2898-2904.

Safa Ashrafus; Bhuiyan N.; Alam M.; Sack D.; Nair B. **2005**. Genomic Relatedness of the New Matlab Variants of *Vibrio cholerae* O1 to the Classical and El Tor Biotypes as Determinated by PFGE. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:1401-1404.

Sánchez Cruz C. 2001. Variación y sustitución antigénica de *Vibrio cholerae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México

Sharples Gary J.; Lloyd Robert G. 1990. A novel repeat DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*. 18:6503-6508.

Smith Anthony M.; Sooka Arvinda; Ismail Husna; Nadan Sandrama; Crisp Noreen; Weenink Eunice; Keddy Karen H.; 2009. Analysis of *Vibrio cholerae* isolates from the Northern Cape province of South Africa *Journal of Clinical Microbiology*. 58:151-154.

Solís Sánchez A. 2005. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* de los canales de Xochimilco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM., México.

Thompson Cristiane C.; Thompson Fabiano L.; Vicente Ana C. 2008. Identification of *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58:617-621.

Thompson F. L., Iida T., Swings J. 2004. Biodiversity of Vibrios *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 403-431.

Tripathi S.A., Taylor R. K., 2007. Membrane Association and Multimerization of TcpT, the cognate ATPase Ortholog of the *Vibrio cholerae* Toxin- Coregulated-Pilus Biogenesis Apparatus. *American Society for Microbiology*. 189: 4401-4409.

Udden S. M., Zahid S. H., Biswas K., Ahmad Q. S., Cravioto A., Nair B. G., Makalanos J. J., Faruque S. M. 2008. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor Strains aided by litic phages and chitin-induced competence. *Proceeding of the Academy of Sciences*. 105: 11951-11956.

Vázquez-González R. 2008 “Del Ganges a México” El Cólera morbus de 1850 en Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Filosofía y letras Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Versalovic James; Koeuth Thearith; Lupski R.; James. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19:6823-6831.

Wong-Hin-Chung; Chih-Hueh Lin. 2001. Evaluation of Typing of *Vibrio parahemolyticus* by Three PCR Methods using specific Primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:4233-4240

Zo Y. G.; Rivera I.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* in cholera endemic areas of Bangladesh. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. USA. 99:12409-12414.

8.- ANEXOS

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
TCBS	Tioglicolato, Citrato, Bilis, Sacarosa
TSA	Tripticasa Soya Agar
mL	Mililitros
rpm	Revoluciones por Minuto
µL	Microlitros
T0	Tiempo Cero
nm	Nanómetros
grs.	Gramos
g	Fuerza Centrifuga relativa
TE	Tris-EDTA
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Sequences
DNA	Acido Desoxiribonucleico
TBE	Tris Borato EDTA
UV	Ultravioleta
PCR	Polymerase Chain Reaction
pM	Picomoles
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
kb	Kilobases
pb	Pares de Bases

Medios de Cultivo**Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa (TCBS)**

Extracto de Levadura.....	5.0g
Peptona Proteasa.....	10.0g
Citrato de Sodio.....	10.0g
Bacto Oxgall.....	10.0g
Sacarosa.....	8.0g
Cloruro de Sodio.....	20.0g
Citrato Férrico.....	10.0g
Azul de Bromotimol.....	0.04g
Azul de Timol.....	0.04g
Agar.....	15.0g
Agua Destilada.....	1000mL

Preparación

Resuspender 98.0grs. del medio deshidratado en 1000mL de agua destilada y dejar hidratar durante 15 minutos, calentar con agitación constante hasta su completa disolución sin dejar que alcance la ebullición. Distribuir sin esterilizar en cajas petri estériles.

Agar Sangre***Preparación***

Resuspender 40grs. de Base agar sangre en 1000mL de agua destilada, calentar hasta disolver el medio manteniéndolo en agitación, esterilizar y dejar enfriar hasta 50°C para agregar la sangre en condiciones de esterilidad, mezclar y distribuir en cajas petri estériles.

Agar *Trypticase Soya* (TSA)

Resuspender 40grs. de agar tripticasa soya en 1000mL de agua destilada, calentar hasta disolver el medio manteniéndolo en agitación, esterilizar y dejar enfriar hasta 50°C para distribuir en cajas petri estériles.

Preparación de Soluciones y Reactivos**Buffer de Carga (25mL)**

Solución de Sacarosa al 20%	20mL
EDTA 0.5M	5mL
Azul de Bromofenol	0.0125g
Xilencianol	0.0125g

Solución de Acrilamida-Bis-Acrilamida (100mL)

Acrilamida	29g
Bis-Acrilamida	1g
Aforar con Agua a 100mL	

Persulfato de Amonio

Persulfato de amonio	35mg
Agua	350µg