



APROBACION DE TEMA DE TESIS

EDUARDO VILLEGAS TOBIÁS
PRESENTE:

Por este conducto me permito informar a USTED que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 19 DE MARZO DEL 2002, tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: **"ANÁLISIS DEL POTENCIAL TOXIGÉNICO DE AISLADOS AMBIENTALES DE Vibrio Cholerae no 01"**, mismo que será asesorado por DR. ROBERO QUEZADA CALVILLO, para la presentación de su examen profesional de **Químico Farmacobiólogo**.

Sin más por el momento queda de usted.

Atentamente



ING. ROGELIO A. COLUNGA REYNA
CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARIO DE LA FACULTAD

San Luis Potosí, S.L.P. 21 de marzo del 2002.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

“Análisis del potencial toxigénico de aislados ambientales de
Vibrio cholerae no O1”

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

Eduardo Villegas Tobías

ASESORADO POR

Dr. Roberto Quezada Calvillo

San Luis Potosí, S.L.P.

Febrero 2004

ÍNDICE

	Paginas
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Pandemias del cólera	2
1.2. Fisiopatología	4
1.2.1. Estructura y hábitat	5
1.3. Enfermedad del cólera	5
1.4. Enterotoxina	6
1.5. Tipos antigenicos	7
1.6. Inmunidad	7
1.7. Diagnostico	8
1.8. Tratamiento	8
1.9. Factores de virulencia de <i>Vibrio cholerae</i>	8
1.9.1. Isla de patogenicidad	9
1.9.2. Elemento genético CTX	10
1.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVO	16
4. MATERIALES Y METODOS	17
4.1. Aislados bacterianos	17
4.2. Obtención de DNA de cepas de <i>V. cholerae</i>	17
4.2.1. Extracción de DNA	17
4.2.2. Cuantificación de DNA	21
4.2.3. Obtención de DNA por ebullición	21
4.3. Estandarización de la técnica de PCR	22
4.4. Determinación del gen de la toxina del cólera	23
4.4.1. Reacción de amplificación	23
4.5. Análisis de los productos de amplificación	24
4.5.1. Preparación del gel	24
4.5.2. Preparación de las muestras	26
4.5.3. Condiciones de corrida	26
4.5.4. Documentación y análisis	26

5. RESULTADOS	27
5.1. Reacción de PCR	27
5.2. Electroforesis	27
5.3. Análisis de los productos de reacción	28
5.3.1. DNA puro	28
5.3.2. DNA hervido	30
5.4. Gen <i>ctxA</i> en cepas no 01 de <i>V. cholerae</i>	30
6. DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIONES	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN.

El cólera es una enfermedad grave diarreica, causada por la bacteria *Vibrio cholerae* de los serotipos O1 y O139, los cuales han causado siete grandes pandemias en el mundo. Los cerca de 200 serotipos de *V. cholerae*, utilizan como reservorios tanto cuerpos de agua marina como aguas blancas y aguas negras, donde pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo constituyendo focos potenciales de infección, además de propiciar la aparición de variantes genéticas por transmisión y recombinación de factores genéticos de patogenicidad y virulencia.

Durante la última pandemia se vio afectado el estado de San Luis Potosí con 486 casos reportados de 1992 al 2000, con una incidencia de la enfermedad de tipo intermitente que sugirió la posible reactivación de cepas locales y la generación de nuevas cepas toxigenicas en la localidad. Esto podría ocurrir mediante la transmisión horizontal del bacteriófago CTX ϕ , portador de los genes *ctxAB* que codifican a la toxina del cólera, a cepas de serotipos diferentes de O1 y O139 (no-O1/O139) originalmente no toxigenicas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método eficaz para la detección de genes o secuencias de nucleótidos de interés. Mediante el uso de iniciadores específicos para el gen que codifica para la toxina del cólera, la PCR resulta un método apropiado para determinar el potencial toxigenico de las cepas ambientales de *V. cholerae* no O1/O139.

Una vez que se estandarizaron las condiciones apropiadas para llevar a cabo la reacción de PCR, se analizaron 71 cepas de *V. cholerae* no O1/O139 y dos cepas toxigenicas de *V. cholerae* O1, que sirvieron como controles positivos de nuestro trabajo mediante el análisis con los pares de iniciadores FDA1/2 y CTX1/2, que reconocen diferentes regiones del gen *ctxA*, se obtuvieron productos de amplificación de las cepas de *V. cholerae* O1 control. Además con los iniciadores FDA1/2 se obtuvieron productos de amplificación de dos cepas de *V. cholerae* no O1, las cuales parecen presentar una deleción en el gen *ctxA* ya que se obtuvo producto de amplificación muy escaso con el juego de iniciadores CTX1/2.

En vista de los resultados obtenidos se puede decir que la técnica de PCR es una herramienta muy eficaz y precisa que complementa los métodos tradicionales de microbiología. La detección de solo dos cepas de *V. cholerae* no-O1/O139 de origen ambiental con genes alterados de *ctxA*, sugiere que es poco probable la aparición de cepas locales de *V. cholerae* patógeno de serotipos no-O1/O139 conteniendo genes *ctxAB* íntegros.

1. - INTRODUCCIÓN

Al comienzo del tercer milenio el cólera continúa siendo un problema de salud para muchos países en el mundo, entre los cuales se encuentra México. La alta tasa de incidencia registrada en el último decenio del siglo pasado, ha despertado inquietud en la comunidad científica, debido a que el aumento de la incidencia de ésta enfermedad podría generar una crisis global. Este problema fue atribuido entre otros, a cambios climatológicos originados por el fenómeno “El Niño”, quien creó condiciones propicias para que se desarrollaran brotes de la enfermedad en todo el mundo, particularmente en países en vías de desarrollo, los que como México, tienen una pobre infraestructura de los servicios de salud, condiciones que hacen transitar décadas completas antes de lograr un control y erradicación de la enfermedad en la mayoría de las zonas afectadas (Aranda C. N. 2001).

El genero *Vibrio* incluye más de 30 especies, cuyos vibriones se encuentran comúnmente en las aguas superficiales de todo el mundo y sin embargo, solamente algunas especies son patógenas para el ser humano. Las dos especies mas conocidas son *Vibrio parahaemolyticus* y *V. cholerae* quienes producen diferentes manifestaciones diarreicas ya que *V. parahaemolyticus* es un microorganismo invasor que ataca principalmente al colon, mientras que *V. cholerae* produce varias endotoxinas que atacan al intestino delgado causando enfermedad diarreica. Dentro de *V. cholerae* existen diferentes serotipos siendo *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* O139 los principales causantes de la enfermedad epidémica de cólera (Mandell y col 1991).

1.1. - Pandemias de cólera

De acuerdo a registros históricos, el cólera del griego (chole, bilis) ha causado siete pandemias en diversas partes del mundo, especialmente en Asia, Oriente Medio y África. De hecho, la última de ellas afecto también al continente Americano y dentro de los países afectados se encuentra México.

La primera descripción de una enfermedad diarreica deshidratante con vómito fatal para el hombre, puede reconocerse en el escrito de Susruta. Sin embargo, gente como Hipócrates, Galeno, y Wang-shooho nunca llegaron a una conclusión certera de cuando fue descrita por primera vez la enfermedad de cólera en su forma epidémica. Se tienen descripciones claras de epidemias en el subcontinente Indio a fines del siglo XV, cuando exploradores portugueses comenzaron a relatar sus experiencias en la India (Mandell y col 1991).

En 1817 el cólera desato con una fuerte epidemia en la región del delta en río de Ganges, lo que provoco una alta incidencia de mortalidad. A lo largo de los siguientes cinco años la enfermedad se extendió por gran parte de Asia y Medio Oriente. Para el año de 1829 inició una segunda ola de infección que alcanzó a Europa y llegó a América en el año de 1832. En estos años en la ciudad de Nueva York se observo una proliferación de la enfermedad atacando principalmente a la gente de escasos recursos, debido a la estrecha relación que guarda este microorganismo con las condiciones socioeconómicas de esta población; en esta época la enfermedad también alcanzó a América Latina. A partir del año 1817 hasta comienzos del siglo XX, se presentaron a lo largo de todo el mundo seis grandes pandemias de cólera (Murray P. R. y col 1995).

En el año de 1960, el cólera se localizó solamente en el área del sur de Asia, apareciendo brotes de la enfermedad con gran regularidad en esta región. Sin embargo, en el año de 1961 en Filipinas se extendió con gran magnitud un brote de cólera hemolítico causado por el biotipo el “Tor” que fue descubierto en 1905 por Gotschlich en cadáveres de peregrinos que regresaban de la Meca en el campo de cuarentena el Tor, de los cuales se aislaron cepas que aglutinaban con el suero clásico de serotipificación, pero estas a diferencia de las cepas clásicas, desarrollaban hemolisinas. Sin embargo, no fue hasta el brote en Filipinas que se le considero como agente causal de cólera epidémico grave en el humano. Desde entonces este biotipo se ha extendido por Asia, Medio Oriente, África y en años mas recientes por una parte de Europa. A partir de Enero de 1991, el cólera apareció

en forma explosiva en el Perú extendiéndose rápidamente por América Latina (Murray P. R. y col 1995).

La aparición del biotipo el Tor a finales de los años 60's en la región del delta de Ganges, considerado como tierra central de cólera del biotipo el Tor, causo el reemplazo del clásico. Para el año de 1982 en la ciudad de Bangladesh reapareció una nueva cepa de cólera biotipo clásico más agresiva y resistente que la anterior, desplazando a su vez de forma rápida a la cepa de cólera biotipo el Tor (Murray P. R. y col 1995).

A fines del año de 1992 en la India se presentó un brote de una enfermedad epidémica con características similares a las del cólera que comenzó en la ciudad de Bangladesh. El microorganismo causal de la enfermedad fue reportado como *V. cholerae* O139 Bengala. Esta resultó ser una variante genética de la cepa pandémica el Tor con un cambio en su estructura antigénica, adquiriendo de esta manera una mayor resistencia (Murray P. R. y col 1995).

1.2. –Fisiopatología.

V. cholerae no es un microorganismo invasor, por lo que nunca ingresa realmente a los tejidos del organismo. Este patógeno es ingerido y pasa a través del medio ácido del estómago hasta alcanzar y colonizar un medio apropiado proporcionado por el intestino delgado. Para lograr esto el microorganismo posee factores de virulencia como la motilidad, quimiotaxis, factores de adherencia, así como la producción de varias toxinas, entre las que sobresale la toxina del cólera. Una vez establecido en el intestino delgado el microorganismo, secreta la toxina del cólera la cuál se une a sus receptores conteniendo gangliosidos GM1. Se cree que la fuente principal de secreciones intestinales son las células de las criptas del intestino delgado aunque es muy probable que todos los niveles del intestino se encuentren afectados por la toxina del cólera (Stuart W. T. y col 1999).

1.2.1-Estructura y Hábitat.

La bacteria de *V. cholerae* fue descrita en 1854 por Pacine y confirmada en 1883 por Roberth Kotch a quien se atribuye su descubrimiento, refiriéndose a ella como un bacilo en forma de “coma”. *V. cholerae* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Vibrionaceae descrita por Veron en 1965, que incluye bacilos móviles por flagelos polares, cortos de 1.5-3 μm de largo por 0.5 μm de ancho (Giono y col 1991). Aunque existen muchos serogrupos de *V. cholerae* solo los serotipos O1 y O139 se ha asociado con epidemias y pandemias (Murray P. R. y col 1995).

El hábitat principal de *V. cholerae* son los ecosistemas acuáticos, teniendo predilección por los ambientes marinos, asociado con mariscos y plancton. Esta bacteria logra sobrevivir desde días hasta meses en medios acuáticos. El biotipo Tor sobrevive por períodos mas prolongados tanto en agua como en el huésped, mientras *V. cholerae* O139 parece haber mejorado su capacidad de sobrevivencia por periodos de tiempo más largos, lo que aumenta su transmicibilidad. *V. cholerae* también puede permanecer en forma viable e infectiva en aguas de consumo humano, aguas negras y alimentos; sin embargo no supera la desecación y resiste muy poco en condiciones de acidez (Mandell y col 1991, Chávez y col 2000, Giono y col 1991).

1.3. - Enfermedad del cólera.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda que se caracteriza por vomito, calambres musculares, sed y diarreas intensas afebriles con múltiples evacuaciones, lo que provoca la perdida masiva de líquidos (entre 10 y 15 litros) y electrolitos. En los casos muy severos, puede ocasionar la muerte del paciente a pocas horas de haber iniciado los síntomas, debido a deshidratación, colapso muscular y choque hipovolémico. Todos los

síntomas de la enfermedad del cólera derivan de la rápida depleción de agua y sales de los espacios intra vasculares y extracelulares del organismo. Sin embargo, generalmente cursa con cuadros diarreicos leves auto-limitantes, que pueden durar hasta 10 días. En contraste, si la enfermedad sigue su evolución natural de una forma severa sin aplicarse el tratamiento adecuado, la mortalidad llega a ser del 50%; de lo contrario esta no rebasa el 1% (Mandell y col 1991).

1.4. –Enterotoxina.

La actividad enterotóxica de un filtrado libre de células de cultivo de *V. cholerae* fue demostrada por primera vez por De y Chatterjee en 1953 utilizando el intestino ligado de conejos, y en 1955 por Dutta y Habbu quienes usaron conejos lactantes. En el año de 1959 se realizaron los primeros estudios comparativos de la capacidad de diferentes cepas de *V. cholerae* para producir la toxina colérica. Diez años más tarde se logró llevar a cabo su purificación y preparación así como la identificación de sus mecanismos de patogenia, demostrándose la inducción de la secreción activa de cloruro en el intestino delgado, que simula y compite con los estímulos que aumentan el nivel de la AMP cíclica. Poco después se demostró que este mecanismo participa en la patogenia de los humanos. El efecto pudo mostrarse en tejido intacto, dependiendo de un receptor monosil gangliosido (GM₁). Se ha estudiado perfectamente la estructura y función de esta toxina, la cual consta de cinco subunidades de fijación dispuestas en forma circular llamadas subunidad (B) de 11500 daltons cada una; además contiene una subunidad (A₁) de 23000 a 24000 daltons y una pieza (A₂) de 5000-6000 daltons la cual sirve de puente entre la subunidad A₁ y las cinco subunidades B. Además de la importancia que tiene esta enzima en la enfermedad que origina, esta se ha utilizado para el estudio de la adenilato ciclasa y el sistema de los nucleótidos cíclicos (Stuart W. T. y col 1999).

1.5. -Tipos Antigénicos.

Se han preparado antisueros para los antígenos flagelares (H) pero estos son comunes a muchos vibriones, lo que provoca que este tipo de antisuero no sirva para distinguir entre cepas causales de la enfermedad y cepas no patógenas. La estructura de *V. cholerae* se puede considerar análoga a otras bacterias de la familia de las enterobacteriaceae; sin embargo, las cepas toxigénicas epidémicas y pandémicas se pueden distinguir por los antígenos somáticos (O) (Murray P. R. y col 1995).

1.6. – Inmunidad.

Las infecciones recurrentes en el cólera son raras y en zonas endémicas la incidencia de la enfermedad disminuye rápidamente con la edad, lo que indica el desarrollo de la inmunidad protectora efectiva. Debido a que el cólera es una enfermedad que se instala en la superficie de las mucosas, la inmunidad está más relacionada con las defensas inmunes localizadas. Estudios experimentales han demostrado que los anticuerpos locales, particularmente IgA secretora, poseen un potencial protector más alto. Por otro lado, después de la infección natural por *V. cholera* se pueden detectar anticuerpos circulantes contra varios antígenos, entre los que se encuentran los somáticos (O), los flagelares (H) y anticuerpos contra la toxina del cólera. A pesar de la producción de anticuerpos séricos, estos no son eficaces debido a que los anticuerpos IgG e IgM se filtran muy poco hacia la luz intestinal. No obstante los títulos de IgG e IgM séricos se utilizan como marcadores inmunológicos de exposición o de inmunización parenteral. Se cree que los anticuerpos llevan a cabo su trabajo en la superficie del intestino al limitar los efectos de la toxina del cólera y el número de vibriones, inhibiendo su fijación al epitelio intestinal (Mandell y col 1991).

1.7. – Diagnóstico.

El diagnóstico de laboratorio es de gran importancia debido a la incidencia epidemiológica de la enfermedad sobre todo debe conocerse el tipo de *V. cholerae*, para ello es necesario realizar cultivos en medios selectivos para cólera, así como realizar pruebas de aglutinación buscando *V. cholerae* de los serotipos O1 ó O139 que son los más frecuentemente asociados con brotes epidémicos (Zinsser y col 1994).

1.8. - Tratamiento.

Se considera relativamente sencillo el tratamiento para el cólera debido a que este se basa en la reposición de líquidos y sales perdidas por el paciente a la brevedad posible, estos pueden ser administrados por vía oral o por vía parenteral dependiendo la gravedad que presente el paciente. Se debe de administrar agua con una mezcla de electrolitos así como glucosa que sirva de vehículo para que el líquido entre rápidamente en las células. El uso de antibióticos acorta el tiempo de la infección y por lo tanto el índice de deshidratación. Los antibióticos de elección son las tetraciclinas y sus derivados, utilizándose 250 mg cada 6 horas durante 3 a 5 días. En el caso de la paciente se encuentre embarazada, es preferible utilizar ampicilina a razón de 250 mg cada 6 horas durante 5 días. Otros agentes antimicrobianos eficaces pueden ser el cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, furazolidona y doxiciclina (Mandell y col 1991).

1.9. - Factores de virulencia de *V. cholerae*.

Para que las cepas de *V. cholerae* manifiesten la virulencia pandémica que las caracteriza, es necesario que posean tres factores expresados coordinadamente: la toxina del cólera (TC), la cuál es la responsable de la diarrea masiva, el pelo corregulado con la toxina (TCP) que es un pelo tipo IV responsable de la colonización intestinal, además de servir como receptor del bacteriófago filamentoso temperado CTX ϕ , el cuál contiene al gen

estructural de TC; y el elemento regulatorio ToxR que codifica a una proteína transmembranal que es ensamblada y estabilizada en forma dimerica por la proteína ToxS en respuesta a factores ambientales. La ToxR dimerica incrementa la transcripción de los genes que codifican a la toxina del cólera *ctxAB* así como a las proteínas que forman a TCP (Karaolis D. K. 1998, Karaolis D. K. 1999, Faruque y col 1998, Waldor y col 1996, Chávez 2000).

Recientemente se ha demostrado que la producción de *ctxAB* depende tanto del fago lisogenico CTX ϕ como del fago VPI ϕ este último responsable de la producción de TCP. Los genomas de ambos fagos consisten en DNA de cadena positiva que pueden integrarse como elementos genéticos de doble cadena al cromosoma 1 de *V. cholerae*. En el fago CTX ϕ se encuentran asociados un grupo compacto de genes determinantes de factores secundarios de patogenicidad, así como genes estructurales de proteasas, quimiotractantes, toxinas accesorias como ZOT y la enterotoxina accesorio del cólera (ACE), además de otros factores de adherencia celular (Karaolis y col 1998, Faruque y col 1998).

1.9.1. - Isla de patogenicidad.

El elemento genético de VPI contiene el grupo de genes de TCP, el cuál esta organizado en una región que contiene 15 genes (*tcpABCDEFGHIJNQRST*). El elemento VPI también contiene al gen *toxT* que se encuentra asociado a la cascada regulatoria ToxR, y en sus extremos se encuentran secuencias *Int* relacionadas con la recombinación sitio-especifica: además, en uno de los extremos se encuentran también una secuencia de 20 pb que constituye el sitio de integración “*VPIatt*” de la isla en el cromosoma bacteriano este segmento lo podemos observar en la figura 1 (Karaolis y col 1998, Faruque y col 1998).

1.9.2. - Elemento genético CTX.

El elemento genético CTX es generado a partir del fago lisogenico CTX ϕ que esta compuesto por una región central o “core” de 4.5 Kb. Este contiene seis genes que incluyen *ctxAB* que codifican las subunidades A y B de la toxina del cólera; el gen *zot* que codifica la toxina de la zónula occludens (zonula occludens toxin) que incrementa la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado; el gen *ace* que codifica la enterotoxina colérica accesoria la cuál se ha demostrado que es la culpable de inducir la acumulación de fluido en íleon ligado de conejo; el gen *cep* que codifica una pilina; y el gen putativo *orfU* que podemos observar en la figura 2.

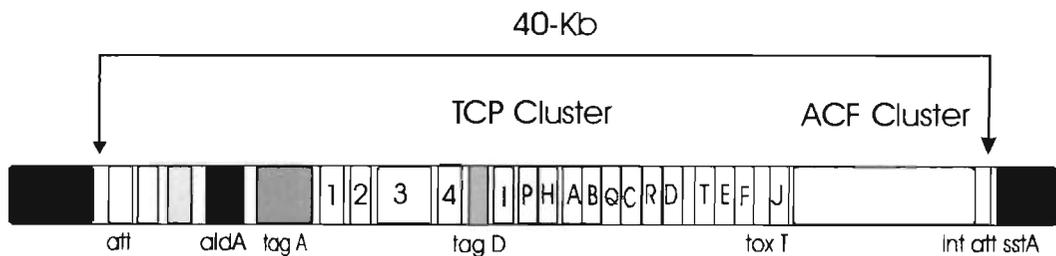


Fig. 1. – Esquema del elemento genético VPI en 40 Kpb. (Faruque y col 1998)

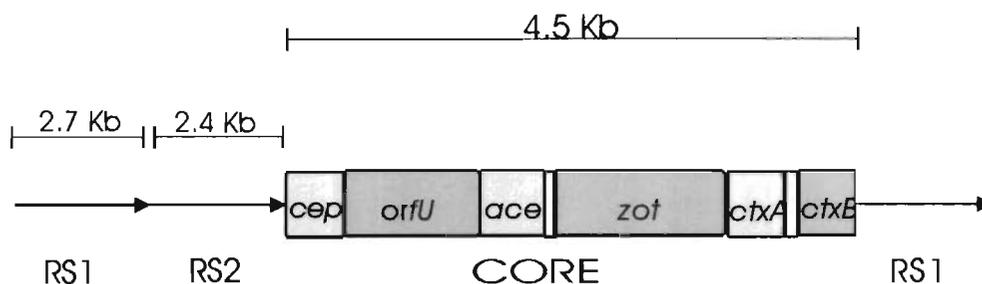


Fig. 2. – Segmento del gen *ctxA* y gen *ctxB* asociados a los genes “*ace*” y “*zot*” formando el elemento genético CTX (Faruque y col 1998).

Además del core, el elemento genético de CTX se encuentra flanqueado por una o más copias de las secuencias repetidas RS1 (2.7 Kb) y el RS2 (2.4 Kb) que codifican proteínas que determinan la expresión del sistema de recombinación sitio-específico para la integración del CTX al cromosoma 1 de cepas receptoras de *V. cholerae* en una secuencia particular de 18 pb llamada sitio attRS1 (figura 2).

La región central del elemento genético CTX y en particular *zot* y *orfU* son cruciales en la morfogénesis del fago (Waldor y Mekalanos 1996, Faruque y col 1998).

1.9. - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En los últimos años la PCR ha sido una poderosa herramienta indispensable para los laboratorios de biología molecular y para la ingeniería genética. La PCR ayuda a incrementar la cantidad de DNA presente en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra integra original. Se puede partir de homogenizados, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos de

DNA obtenidas con enzimas de restricción, muestras obtenidas de la extensión y aislamiento de DNA etc. Debido a estas características, en especial la capacidad de amplificación, la PCR es un método muy adecuado y muy utilizado en la preparación de ácidos nucleicos en una cantidad que supera por mucho a la muestra original, tanto como método de clonación celular como para la detección de secuencias específicas de nucleótidos. Las aplicaciones de la PCR son muy numerosas y variadas, como ejemplos pueden citarse: clonación celular de fragmentos de DNA, detección de secuencias sin purificación previa, establecimiento de polimorfismo de secuencias, secuenciación de ácidos nucleicos, rastreo de mutaciones, diagnóstico de enfermedades genéticas, prenatales o no, determinación de secuencias específicas de DNA relacionadas con situaciones patológicas definidas, resolución de problemas forenses o arqueológicos, estudios evolutivos, detección de microorganismos infecciosos, detección de células tumorales, amplificación de DNA para su posterior clonación etc. (Sambrook J. Y col 1989).

La PCR se basa en tres procesos que se llevan a cabo por ciclos y cada ciclo consta de la siguiente secuencia:

1. Desnaturalización del DNA para dar cadenas sencillas. Esta etapa se lleva a cabo aplicando calentamiento para la separación de las dos cadenas de DNA mediante la incubación breve a una temperatura entre 68 y 97 °C, que debe de ser superior a la de fusión de la región de DNA que se quiere amplificar.
2. Hibridación de las cadenas sencillas con un oligonucleotido, también denominada etapa de templado. Enfriamiento rápido por debajo de la T_m (temperatura ideal de alineamiento del cebador) de forma que se permite la hibridación de las cadenas sencillas del DNA de interés con los oligonucleotidos cebadores, generalmente se usan temperaturas de 37 a 65 °C comprendido entre 10 y 120 segundos.
3. Replicación de la cadena sencilla por una DNA polimerasa a partir del oligonucleotido anterior utilizado como cebador también denominada elongación, extensión del cebador, o polimerización. Esta etapa consiste en una amplificación propiamente dicha

(72-75 °C, 1-3 min.) en la que la DNA polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde las hebras originales de la replicación. Transcurre en la dirección 5' a 3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato las cuatro dNTPs, hasta generar fragmentos amplificadores de DNA de entre 50 y 1000 pb o hasta que se comience una nueva desnaturalización.

Además de las tres etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa la cual consiste en una elevada temperatura que cumple la función de inactivar a proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurarse de que se lleve a cabo la desnaturalización completa del DNA de partida. Una etapa final que consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se complete todos los fragmentos.

Para la realización práctica de la reacción se requieren elementos indispensables involucrados en una mezcla de reacción que son:

1. Los cuatro dNTPs en exceso que sirven como sustrato para la síntesis de múltiples copias de DNA. Estos deben ir acompañados de magnesio para que puedan ser reconocidos por la polimerasa.
2. Oligonucleotidos de cadena sencilla de 18 a 30 pb, conteniendo secuencias complementarias a cada uno los dos extremos 3' de la región blanco. La elongación adecuada de los oligonucleotidos proporciona la alta especificidad de las reacciones de PCR.
3. DNA polimerasa termoestable, es decir que se conserve enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas, lo que permite que la enzima continúe a lo largo de los ciclos de la reacción en una forma activa (Sambrook J. Y col 1989).

2. – JUSTIFICACIÓN.

Durante los años de 1992 a 2000 se observó un importante resurgimiento del cólera en México. El estado de San Luis Potosí no escapó y se catalogó como un estado con incidencia intermedia de cólera (secretaría de salud 1998). Debido a que las cepas de *V. cholerae* no O1/no O139 solo se han relacionado con enfermedades diarreicas ocasionales, no se ha considerado la importancia de una amenaza significativa para la población (Chávez y col 2000). Recientemente se ha propuesto la posible generación de nuevas cepas toxigenicas de *V. cholerae* en base a que los genes *ctxA* y *tcpA*, que son codificados por los bacteriófagos lisogénicos CTX ϕ y VPI ϕ , pueden transferirse e integrarse en sitios específicos en el cromosoma de bacterias receptoras no virulentas y de esta manera transformarse en cepas virulentas como se observa en la figura 3.

La capacidad de los elementos que codifican para CT y VPI de ser transmitidos de forma horizontal por los fagos lisogénicos CTX ϕ y VPI ϕ entre las cepas de *V. cholerae*, pone de manifiesto la importancia de evaluar el potencial para el surgimiento de nuevas cepas toxigenicas entre los aislados ambientales de *V. cholerae* no O1/ no O139. Estas cepas podrían llegar a ser consideradas con un gran potencial epidémico o constituir un reservorio y fuente de diseminación de los genes de patogenicidad o virulencia de *V. cholerae* (Waldor y Mekalanos 1996, Faruque y col 1998, Karaolis y col 1998).

El método de elección para determinar la presencia de los genes que codifican para la toxina del cólera es la PCR, debido a su alta especificidad, a la poca cantidad de DNA blanco que se necesita, a la gran confiabilidad que ofrece este método y a la relativa facilidad para llevarse a cabo. Esta técnica se puede realizar aun sin tener la muestra con un alto grado de pureza, lo que permite tener un resultado rápido y detallado de la muestra en estudio y que, con métodos microbiológicos tradicionales es mas lento.

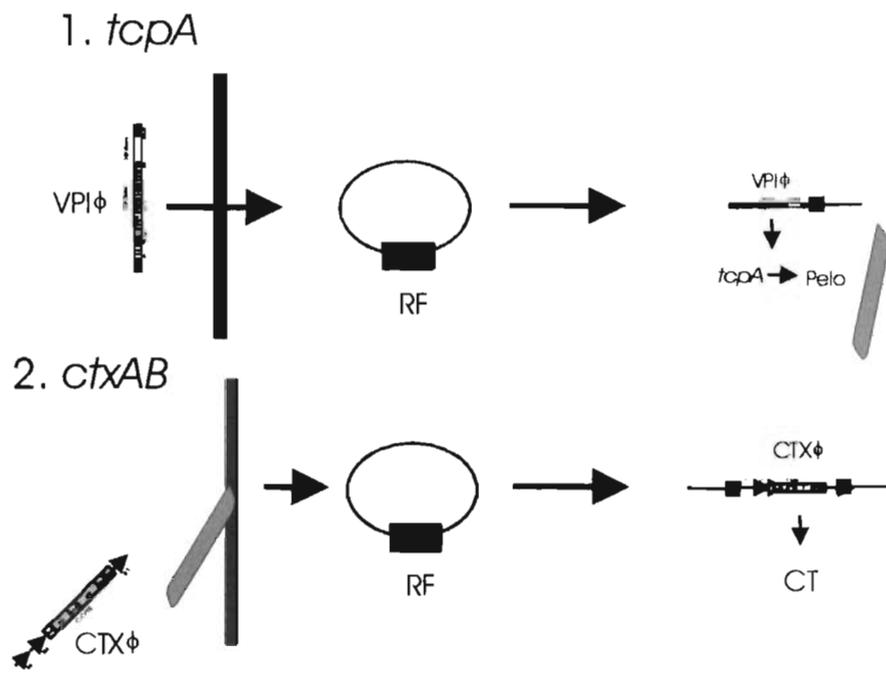


Fig. 3. - Hipótesis secuencial de la obtención de la patogenicidad de una cepa de *V. cholerae* no O1, en donde en primer termino se muestra la transición del elemento VPIφ y una vez que este es adquirido la posterior transmisión del CTXφ. (Faruque y col 1998).

3. – OBJETIVO.

Determinar la presencia de los genes de *ctxA* en aislados ambientales de *V. cholerae* no O1 en el estado de San Luis Potosí, para evaluar su potencial toxigenico.

4. - MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1-Aislados bacterianos.

En este trabajo se analizaron (71) cepas diferentes de *V. cholerae* no O1 pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Las cepas fueron obtenidas tanto por el personal del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí como por el personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública a partir de pescados, mariscos, aguas blancas y aguas negras de diferentes partes del estado, además de un aislado proveniente de humano (Tabla 1). Como controles positivos de la presencia de genes de *ctxA* se utilizaron dos cepas de *V. cholerae* O1, aisladas también en el estado de San Luis Potosí por la secretaria de salud. Las muestras fueron preservadas en medio MP-NaCl (Peptona de caseína, agar, extracto de levadura y cloruro de sodio) a temperatura ambiente. Para el análisis, primero se reactivaron en un medio de TCBS (Tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa) realizando de esta manera copias de trabajo, posteriormente se colocaron en agua peptonada alcalina (pH 9) y se incubaron para obtener una cantidad adecuada de células para la extracción de DNA y su análisis por PCR.

4.2. - Obtención de DNA de cepas *V. cholerae*.

4.2.1. - Extracción de DNA.

Para la obtención del DNA, las bacterias fueron incubadas en 4 mL de medio de agua peptonada alcalina (APA) durante 24 horas a 37 °C en una estufa bacteriológica. Al término de la incubación la concentración bacteriana fue medida con el nefelómetro de Mcfarland y ajustada a 1×10^6 células por mL. Las bacterias fueron lavadas tres veces con

solución PBS 1X (0.14 M de NaCl, 2 mM de KCl (SIGMA P-4504), 10 mM de Na₂HPO₄ (SIGMA S-7907) y 1 mM de KH₂PO₄ (Fermont-35862)] por centrifugación a 1800 xg por 10 minutos (IEC-centra-NH). El botón celular obtenido fue lavado 2 veces y resuspendido en 1 mL de PBS 1X, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, centrifugado a 15000 xg (Centrífuga IEC-MicromaxRF) por 15 minutos. El botón celular obtenido se resuspendió con 400 µL de amortiguador de lisis [10 mM de EDTA (SIGMA E-5134), 50 mM de Tris-HCl (SIGMA T-8524), 0.5 % de SDS (SIGMA L-4509)]. y 2 µL de solución de proteinasa K (SIGMA P-2308). La mezcla se incubó durante 90 minutos con agitación a 20 rpm (Incubador ThermoMixer Labnet-Vortemp SGEVC).

Al término de la incubación se agregó un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo-álcool isoamílico 24:25:1 (SIGMA P-2069), la solución se homogenizó utilizando un vortex (Thermolyne Type 16700 Mixer Maxi-Mix 1) y se centrifugó a 8000 xg por 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa a partir de la cual se realizó una segunda extracción utilizando fenol-cloroformo-álcool isoamílico 24:25:1 siguiendo el proceso anterior. Al término de este, se recuperó la fase acuosa, se colocó en un tubo limpio y se agregó un volumen igual de una mezcla de cloroformo-álcool isoamílico 24:1 (SIGMA C-0549) y se homogenizó por agitación en vortex. La mezcla se centrifugó a 8000 xg durante 15 minutos. Al término de la centrifugación se recuperó nuevamente la fase acuosa, se transfirió a un tubo limpio y se precipitó el DNA agregando lentamente 800 µL de alcohol etílico absoluto (PQM 06061) e incubación a -20 °C por 24 horas. La mezcla se centrifugó a 14000 xg por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla conteniendo el DNA se lavó dos veces con una solución de alcohol al 70% por centrifugación a 15000 xg durante 15 minutos. El botón de DNA fue recuperado eliminando los restos de etanol mediante centrifugación en un evaporador (DNA Speed VAC ADN110 Svant). El DNA obtenido se resuspendió en 25 µL de TE (10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA pH 8.0). y se almacenó a temperatura de -20 °C hasta ser utilizado en las reacciones de amplificación.

Tabla. 1. - Tabla de las bacterias de *Vibrio cholerae* utilizadas. Así como su procedencia

#	CLAVE	TIPO	Municipio	Código de análisis
1	1 010222 321	Agua Negra	Saucito canal	H01
2	3 010126 148	Agua Negra	Ahualulco	H03
3	1 010213 158	Agua Negra	Pozos	H04
4	1 010118 075	Agua Negra	Bocas	H05
5	1 010223 317	Agua Negra	S.L.P.	H07
6	1 010126 143	Agua Negra	S.L.P	H09
7	3 010122 091	Agua Negra	Villa Hidalgo	H10
8	1 010208 101	Fil. Cazón	N.D.	H11
9	2 010316 267	Fil. Pescado	N.D	H12
10	1 010307 066	Fil. mojarra	S.L.P.	H13
11	1 010307 112	Pulpo C.	S.L.P	H14
12	2 010316 259	Fil. pescado	N.D.	H15
13	2 010309 150	Mojarra	N.D.	H16
14	3 010308 127	Marisco	Villa de Reyes	H17
15	1 010323 315	Fil. Mero	N.D	H18
16	4 010301 007	Agua Blanca	Río Verde	H19
17	3 010308 123	Agua Negra	Villa de Reyes	H20
18	1 010316 246	Ostión C	N.D.	H22
19	1 010418 342	Ostión C	N.D.	H25
20	1 010517 070	Agua Negra	Escalerillas	H27
21	1 010417 298	Agua Negra	Soledad de G. S.	H30
22	1 010404 100	Pulpo C.	N.D.	H31
23	1 010404 052	Fil. Plateado	N.D.	H33
24	1 010417 131	Agua Negra	Pozos	H34
25	1 010203 011		N.D.	H37
26	1 010509 035	Fil. Mojarra	N.D.	H38
27	1 010417 294	Agua Negra	Soledad de G. S	H39
28	1 010404 089	Fil Mojarra	N.D.	H40
29	1 010417 283	Agua Negra	Soledad de G. S.	H41
30	1 010509 016	Fil. Mojarra	N.D.	H42
31	5 010820 057	Mojarra	N.D.	H43
32	5 011024 014	Agua Negra	Tamasopo	H52
33	5 010904 001	Agua Negra	El Naranjo	H53
34	5 011024 015	Agua Negra	Tamasopo	H54
35	5 010424 248	Fil. Carpa	Cd. Valles	H55
36	1 010517 074	Agua Negra	Pozos	H56
37	3 010417 307	Agua Negra	Salinas	H57
38	5 010815 024	Agua Negra	Cd. Valles	H58
39	1 010404 085	Mojarra	N.D.	H59
40	3 010424 386	Fil. Mojarra	N.D.	H60
41	1 010307 085	Fil. Mojarra	S.L.P.	H61
42	5 011026 017	Agua Negra	Aquismon	H62

43	3 010514 050	Agua Negra	Salinas	H63
44	3 010423 374	Camarón	Tierra Nueva	H64
45	7 011106 001	Agua Blanca	Soledad de G. S.	H65
46	1 010126 080	Agua Negra	Bocas	H66
47	7 020307 007	Fil. Mero	S.L.P.	H67
48	5 010904 008	Agua Negra	El Naranjo	H68
49	5 010904 017	Agua Negra	El Naranjo	H69
50	7 011008 001	Agua Blanca	S.L.P.	H70
51	5 010815 033	Agua Negra	Cd. Valles	H71
52	7 020321 023	Agua Blanca	Soledad de G. S.	H72
53	1 010417 182	Agua Negra	Soledad de G. S.	H73
54	7 020301 006	Jaiba	S.L.P.	H74
55	5 010426 254	Jaiba	Tanquean	H75
56	7 011106 002	Agua Blanca	S.L.P.	H76
57	5 010504 001	Agua Negra	Ebano	H77
58	7 011107 001	Agua Blanca	Soledad de G. S.	H78
59	5 010904 021	Agua Blanca	Tamasopo	H79
60	7 011119 001	Agua Blanca	Soledad de G. S.	H80
61	5 010820 058	Bagre	N.D.	H81
62	5 010815 029	Agua Negra	Cd. Valles	H82
63	7 020319 026	Agua Blanca	Soledad de G. S.	H83
64	7 020301 006	Jaiba	S.L.P.	H84
65	6 020319 095	Agua Blanca	Tamazunchale	H85
66	7 020319 030	Agua Blanca	Soledad de G. S.	H86
67	6 020319 082	Agua Blanca	Tamazunchale	H89
68	6 020319 086	Agua Blanca	Tamazunchale	H90
69	6 020319 081	Agua Blanca	Tamazunchale	H91
70	6 020319 088	Agua Blanca	Tamazunchale	H92
71	7 020322 036	Fil. Mero	S.L.P.	H93
O1	0-010101-001/1	01-clínica	S.L.P.	H+1
O1	0-010101-002	01-clínica	S.L.P.	H+2

- N.D. no determinado

4.2.2. - Cuantificación de DNA.

La cuantificación del DNA se realizó con soluciones diluidas en agua destilada estéril 1:100 en un espectrofotómetro (Spectronic-GENESIS 8), midiendo la absorción a una longitud de onda de 260 nm. La concentración de DNA se calculo usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de DNA} = (A_{260 \text{ nm}}) (\text{dilución de la muestra}) (50 \mu\text{g/mL}).$$

$A_{260 \text{ nm}}$ = la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro a 260 nm.

Dilución de la muestra = factor de dilución utilizado

50 $\mu\text{g/mL}$ = cantidad de DNA presente en la muestra por unidad de absorbancia.

La pureza del DNA obtenido se determinó por índice de absorbancia definido como la razón de la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm, que nos proporciona un estimado de la cantidad de proteína presente en la muestra con respecto a la cantidad de DNA. Este índice debe variar entre 1.8 y 2.0 para poder utilizarse en reacciones de amplificación (Sambrook y col 1989).

4.2.3. - Obtención de DNA por ebullición.

A la par de la extracción fenólica de DNA, se obtuvo el sobrenadante de bacterias sometidas a ebullición con la finalidad de reducir el tiempo de preparación de las muestras para ser llevadas a la reacción de amplificación. Las bacterias fueron incubadas en 4 mL de APA, durante 24 horas a una temperatura de 37 °C, al termino de la incubación la concentración bacteriana se midió por nefelometría, y se ajustó 1×10^6 bacterias por mL. Las bacterias se lavaron tres veces por centrifugación (IEC centra HN) a 1800 xg por 10 minutos con PBS 1X y se resuspendieron posteriormente en 1 mL de PBS 1X

transfiriéndolas a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y se lavaron por centrifugación (IEC-MicromaxRF) a 15000 xg por 15 minutos, descartándose el sobrenadante. La pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril y se ajustó la concentración final a 1×10^9 bacterias por mL. Las bacterias fueron nuevamente centrifugadas (IEC-MicromaxRF) a 10000 xg por 5 min. A temperatura ambiente, la pastilla fue resuspendida en 250 μ L de agua desionizada estéril y sometida a ebullición en un incubador (Incubator Thermo Mixer Labnet SGEVC) a 100 °C durante 10 minutos. Al término de la ebullición la mezcla se centrifugó a 14000 xg (IEC-MicromaxRF) por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y este se almacenó hasta su uso en la reacción de PCR (Chávez L. 2000, FDA. 2001).

4.3. - Estandarización de la técnica de PCR.

La identificación de la toxina del cólera en los diferentes aislados de *V. cholerae* se realizó tomando como DNA blanco tanto DNA purificado como el DNA obtenido por ebullición de bacterias de *V. cholerae* para realizar una comparación entre ellos. Además se utilizaron dos pares distintos de iniciadores que se enlistan en la tabla 2.

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas para la detección de los genes *ctxA* mediante la técnica de PCR, se realizaron ensayos donde se modificaron las variables de temperatura de alineamiento, concentraciones de diferentes soluciones involucradas en la reacción, temperatura de desnaturalización, tiempo de alineamiento y extensión. Las diferentes condiciones enlistan en la tabla 3.

4.4. - Determinación del gen de la toxina del cólera.

4.4.1. - Reacción de amplificación.

Para realizar la reacción de PCR se utilizaron como iniciadores los oligonucleotidos indicados en la tabla 2, específicos para la amplificación del gen que codifica para la subunidad A de la toxina del cólera:

Para el par de iniciadores CT1 Y CT2 La reacción se llevó a cabo utilizando la siguiente mezcla de reacción: 1 μL de muestra conteniendo DNA blanco puro (25 ng/ μL), 2.5 μL de amortiguador de reacción 10X (1 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 mM de KCl, gelatina 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2.5 μL de cada uno de los dos iniciadores (5 μM), 1.3 μL de MgCl_2 (BUEA-250) 30 mM), 2.5 μL de una mezcla de los cuatro dNTPs (SIGMA D-7295, 2 mM), 2 μL de Taq Polimerasa (Promega, 5 U/ μL) y 12.5 μL de agua desionizada estéril para ajustar la mezcla de reacción a un volumen final de 25 μL . Para las muestras de hervidas se utilizaron 2.5 μL de muestra conteniendo DNA blanco, por lo cual se realizo un ajuste en el volumen de agua desionizada estéril a 11 μL . La reacción se llevo a cabo en un termociclador (Progen, Techne) y las condiciones de reacción se muestran en la tabla 4 (Chávez L. 2000, Shirai y col 1991).

De los iniciadores FDA1 y FDA2, se utilizaron 2.5 μL a una concentración de (5 μM), también se realizo una mezcla de reacción de 25 μL con las mismas concentraciones y cantidades de los reactivos utilizados en la reacción con los iniciadores CT1 y CT2. La reacción se llevo a cabo en el mismo termociclador con las condiciones de reacción citadas en la tabla 4 (BAM. FDA, 2001).

4.5. - Análisis de los productos de amplificación.

4.5.1. - Preparación del gel.

La detección de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en geles submarinos de agarosa en una cámara de electroforesis (E-C) de 8.5 X 6.5 X 0.5. Se varió la concentración de los geles de agarosa de la siguiente manera 0.5,1.0,1.3,1.5% de agarosa en 40 mL de amortiguador TBE 0.5 X (45 mM de Trizma base (45 Mm) de Ácido Bórico (SIGMA B-6768), y 10 mM de EDTA, pH 8), con una concentración final de Bromuro de Etidio (SIGMA E-7637) 0.5 µg/mL como revelador. Como amortiguador de corrida se utilizaron 300 mL de TBE 0.5X.

Tabla. 2. - Tabla de las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	No. de bases	Tm.(°C)	Referencia:
CT1	CTCAGACGGCATTGTTAGGCACG	24	64.42	Chávez L. 2000
CT2	TCTATCTCTGTAGCCCCTACT	24	59.3	Chávez L. 2000
FDA1	TGAAATAAAGCAGTCAGGTG	20	53.2	BAM. FDA. 2000
FDA2	GGTATTCTGCACACAAATCAG	21	55.92	BAM. FDA. 2000

Tabla. 3. - Tabla de las variaciones en los parámetros de las reacciones de amplificación del gen *ctxAB*.

Parámetro	Concentraciones de ADN puro	Concentraciones de muestras bacterianas hervidas
Muestra de ADN	25 ng, 50 ng, 100 ng.	2 µL, 2.5 µL, 5 µL, 10 µL
Iniciadores	2.5 µL (0.1 nM), 2.5 µL (5 µM)	2.5 µL (0.1 nM), 2.5 µL (5 µM)
Polimerasa	0.5 y 1 U	0.5 y 1 U
MgCl ₂ (30 mM)	1.5 µL y 1.3 µL	1.5 µL y 1.3 µL
Temperatura CT	57 °C ± 10 °C	57 °C ± 10 °C
Temperatura FDA	55 °C ± 10 °C	55 °C ± 10 °C
Agua desionizada/estéril	12.5 µL	11.0 µL

Tabla 4: Condiciones de reacciones de amplificación

Fase		CTX1/CTX2			FDA1/FDA2		
		Nº de ciclos	Tiempo	Temperatura	Nº de ciclos	Tiempo	Temperatura
Inicio	Desnaturalización	1	3 min.	94° C	1	4 min.	94° C
	Hibridación		1 min.	57° C			
	Elongación		1 min.	72° C			
Amplificación	Desnaturalización	35	1 min.	94° C	30	1 min.	94° C
	Hibridación		1.5 min.	57° C		1 min.	55° C
	Elongación		1 min.	72° C		1 min.	72° C
Extensión	Elongación final	1	10 min.	72° C	1	10 min.	72° C

4.5.2. - Preparación de las muestras.

Se colocaron por separado 13 μL de cada producto de amplificación y se agrego a cada uno de ellos 2 μL de amortiguador de carga (0.25% de azul de bromofenol (SIGMA B-5525) y 30 % de glicerol (SIGMA G-5516). Por cada gel se agrego 1 μL de marcador de peso molecular de múltiplos de 100 pb en el rango de 100-1200 pb (GIBCO-BRL) con 7 μL de agua desionizada estéril y 2 μL de amortiguador de carga.

4.5.3. - Condiciones de corrida.

Las condiciones de corrida se variaron en cuanto al voltaje utilizado de 90, 95 y 100 volts (fuente de poder E-C), así como también al tiempo de corrida que fueron de 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.45 y 1.5 horas, a 500 mA.

4.5.4. - Documentación y análisis.

Al termino de la corrida el gel fue retirado de la cámara de electroforesis y observado a través del transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc 2000 BIORAD). Los resultados fueron documentados y analizados mediante el uso del paquete computacional de Quantity One de BIORAD.

5. - RESULTADOS.

5.1. - Reacción de PCR.

En base a las modificaciones experimentales de las condiciones de reacción para los dos oligonucleotidos como son la temperatura de alineamiento, el numero de ciclos y las concentraciones de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción, se determinaron las condiciones óptimas para la amplificación del gen que codifica para la toxina del cólera, Los parámetros de las reacciones de amplificación se representan en la tabla 4 y las condiciones optimas de la mezcla de reacción se observan en la tabla 5.

5.2. - Electroforesis.

Los productos de las reacciones de PCR se revelaron en geles al 1.5% de agarosa, con una concentración final de bromuro de etidio de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en 300 mL de amortiguador de corrida TBE 0.5X, bajo las siguientes condiciones de corrida: a 100 volts, 500 mA por 1.5 horas a temperatura ambiente. El gel se cargo con 13 μL de cada producto de reacción y 2 μL de amortiguador de carga, utilizando un marcador de peso molecular de múltiplos de 100 pb.

5.3. - Análisis de los productos de reacción.

5.3.1. - DNA puro.

En la figura 4, se observan los resultados obtenidos con muestras de DNA purificado por extracción fenólica. Después de realizar la electroforesis de los productos de la reacción de PCR, estos se analizaron en el programa Quatity One que permitió definir las bandas características de los productos de amplificación para las cepas control de serótipo 01, utilizadas como positivas, las cuales para los productos de amplificación con los iniciadores FDA1/FDA2 se espera obtener bandas de 777 pares de bases (pb) y para las muestras amplificadas con los iniciadores CT1/CT2 de 302 pb.

Tabla. 5. -Tabla de las concentraciones óptimas para realizar la reacción de amplificación del gen de la toxina del cólera.

Parámetro	Condiciones utilizadas DNA puro	Condiciones utilizadas en bacterias hervidas
DNA	25 ng	2.5 µL
Oligonucleotidos	2.5 µL (5 µM)	2.5 µL (5 µM)
Polimerasa	0.2 µL (5 U/µl)	0.2 µL (5 U/µl)
MgCl ₂	1.3 µL (30 mM)	1.3 µL (30 Mm)
Tm CT	57 °C	57 °C
Tm FDA	55 °C	55 °C

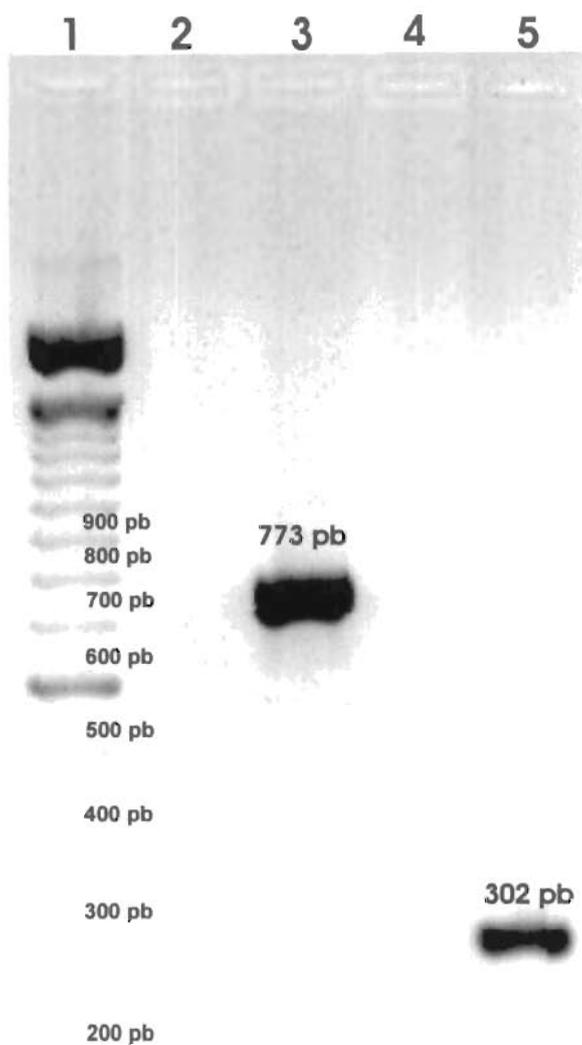


Fig. 4 Análisis electroforetico de los productos de amplificación del gen *ctxA* en muestras de DNA con los pares de iniciadores CTX y FDA. Carril 1 marcador de peso molécula de múltiplos de 100 pb, en los carriles dos y tres: Productos de amplificación con los iniciadores FDA1 y 2; carril dos: cepa 04 control negativo para la reacción; carril tres: cepa +1 de *V. cholerae* 01; carriles cuatro y cinco: productos de amplificación con los iniciadores CTX1 y 2; carril cuatro: control negativo para la reacción; carril cinco: cepa +1 de *V. cholerae* 01.

5.3.2 – DNA hervido.

El análisis de muestras de DNA de cepas de cólera preparado por ebullición, resulto un método más sencillo, rápido y barato para liberar el DNA y de esta manera llevar acabo la reacción de amplificación utilizando los oligonucleotidos correspondientes. En la figura 5 se observa la comparación entre una reacción de amplificación de DNA purificado y de DNA obtenido por ebullición de las cepas. Este análisis provee un punto de comparación entre los dos métodos que nos permitió elegir el más eficiente para llevar acabo el estudio de todas las demás cepas. Se eligió el método de obtención de DNA de cepas de *V. cholerae* por ebullición, ya que es mucho más rápido, mas barato y da los mismos resultados en la reacción de PCR que con el DNA purificado por extracción fenólica.

5.4. - Gen ctxA en cepas no O1 de *V. cholerae*.

De las 71 cepas de *V. cholera* no O1 analizadas, sólo se encontró que dos cepas ambientales no O1 (H64 y H18) presentaron bandas producto de amplificación del gen *ctxA* utilizando el par de iniciadores FDA1/FDA2 exclusivamente (figura 6). Además una de estas cepas presentó varias bandas leves de amplificación. La cepa H64 mostró una banda de amplificación de aproximadamente 721 pb , mientras que la cepa H18 mostró una banda de aproximadamente 718 pb (figura 6).

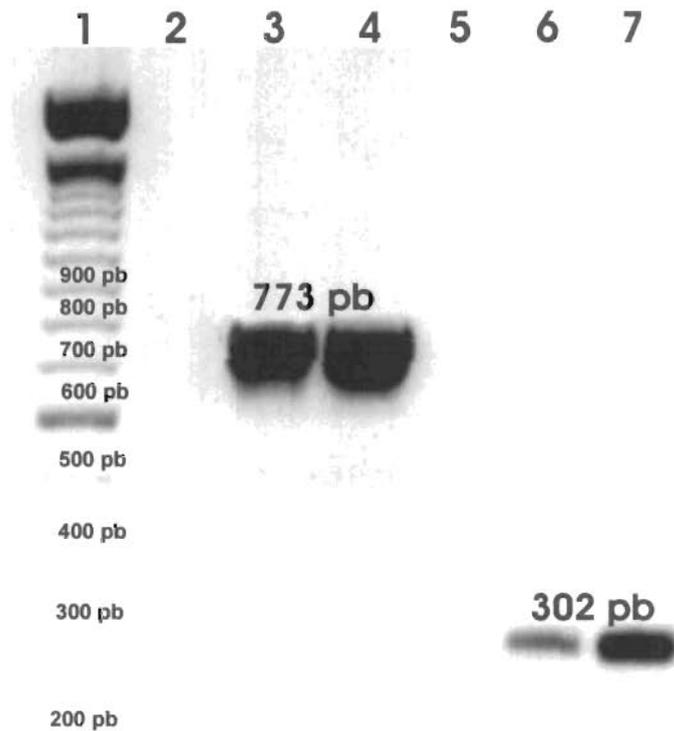


Fig. 5. - Análisis del gen *ctxA* por PCR en muestras de DNA bacteriano obtenido por ebullición de las bacterias o por extracción fenólica. Carril: uno; marcador de peso molecular de múltiplos de 100 pb; carriles dos a cuatro: productos de amplificación con los oligonucleotidos de FDA1 y 2; carriles cinco a siete: productos de amplificación con los oligonucleotidos CTX1 y 2; carril dos y cinco: productos de amplificación de DNA obtenido por ebullición de la cepa negativa H05 de *V. cholerae* no 01; carriles tres y seis: producto de amplificación del DNA obtenido por purificación fenolica de la cepa de *V. cholerae* 01; en el carril cuatro y siete observamos un producto de amplificación para el DNA obtenido por ebullición de la misma cepa de *V. cholerae* 01 utilizada en el carril tres y seis.

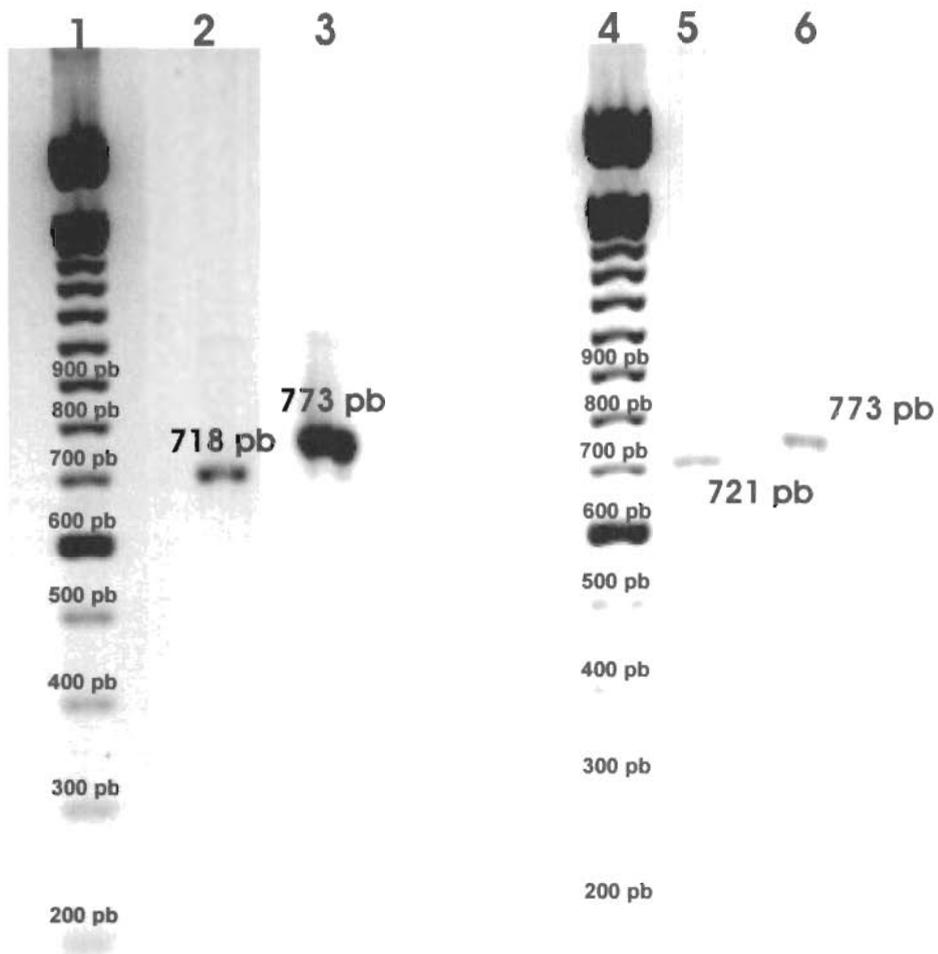


Fig. 6. - Análisis de muestras de *V. cholerae* no O1 por PCR con iniciadores FDA1/2. Carril 1 y 4: marcador de peso molecular de múltiplos de 100 pb. Carril 2: banda de alrededor de 718 pb producto de la amplificación de la cepa H18. Carril 3; producto de la amplificación del control positivo de 773 pb. Carril 5; banda de 721 pb producto de amplificación de la cepa H64. Carril 6; banda de producto de amplificación del positivo control de 773 pb.

6. – DISCUSIÓN.

En este trabajo fueron analizadas un total de 71 cepas de *V. cholerae* no O1 de aislados ambientales, estas cepas provienen de aguas negras, aguas blancas, pescados y mariscos, aisladas en diferentes zonas del estado de San Luis Potosí. Se ajusto un ensayo de PCR para amplificar un segmento del gen que codifica la subunidad-A de la toxina del cólera (ctxA). Se utilizaron dos pares de diferentes iniciadores: FDA1/FDA2 y CTX1/CTX2. Además de utilizar cepas de *Vibrio cholerae* O1 como control positivo del ensayo.

Aunque esta técnica ha sido usada con anterioridad por otros investigadores, los procedimientos no pueden ser llevados a cabo tal como son descritos, debido a variaciones inherentes a los sistemas experimentales que impiden obtener los resultados esperados. Por ello, es imprescindible realizar las adecuaciones de los procedimientos para obtener resultados satisfactorios para los objetivos de este trabajo.

Las técnicas de PCR requieren mantener un estricto control de variables tales como las concentración de DNA blanco, oligonucleotidos, cofactores ($MgCl_2$), dNTPs, enzima DNA polimerasa, temperatura de alineamiento de los oligonucleotidos, el número y tiempo de los diferentes ciclos realizados etc. Todo lo anterior con la finalidad de obtener una buena reproducibilidad de las amplificaciones realizadas así como confiabilidad en los resultados obtenidos en el presente trabajo. Igualmente, es importante contar con un método de análisis electroforetico de los productos de amplificación que permita identificarlos inequívocamente. Por ello, también es de suma importancia optimizar las condiciones de este procedimiento, tales como las concentraciones del gel de agarosa, del amortiguador de corrida, la concentración del Bromuro de Etidio utilizado para teñir el gel, igualmente el tiempo de la corrida electroforetica.

Al igual que fue importante establecer las condiciones de las técnicas realizadas también fue necesario determinar la forma mas adecuada para obtener el DNA blanco. En el presente estudio se obtuvo por ebullición de las bacterias debido a que este método no presentó variantes en los resultados, tomando como referencia los resultados de las cepas purificadas con la extracción fenólica del DNA, además resulto ser un método mas barato y rápido.

Al realizar el análisis por PCR con los iniciadores FDA1/FDA2 se encontraron bandas de amplificación de alrededor de 773 pb las cuales corresponden a los controles positivos utilizados que son de una cepa de *V. cholerae* O1; además que las cepas H64 (camarón) y H18 (filete de mero), mostraron bandas de amplificación; la primera de aproximadamente 721 pb y la otra de aproximadamente 718 pb. Por otro lado al utilizar los iniciadores CTX1/CTX2 las cepas control positivo de *V. cholerae* O1 presentan una banda de amplificación de 302 pb. Sin embargo, en las cepas H64 y H18 se pudo observar bandas muy tenues de amplificación de alrededor de 250 pb; de esta última solo se hace mención ya que su baja intensidad no permitió observar una prueba documental de su presencia (Chávez L, 2000, BAM, FDA. 2001). Los resultados sugieren que tanto las cepa H64 como la H18 contienen genes *ctxA* alterados probablemente por una delección que involucra a las regiones de reconocimiento por los iniciadores CTX1/2. Debido a la alta especificidad que presenta la técnica de PCR, se considera que el producto de amplificación corresponde a un segmento del gen de *ctxA*, siendo poco probable que corresponda a otro gen homologo.

La presencia de estas delecciones en parte pueden deberse a las condiciones de vida permisiva del medio ambiente del que provienen estas cepas, ya que ambas derivan de reservorios marinos, donde, por un lado no se encuentran las condiciones propicias para llevar a cabo la expresión de la toxina del cólera y por otro lado, la producción de esta toxina no es un factor determinante para la proliferación o sobrevivencia de los organismos. Estos dos factores permiten que de alguna manera se pierda la capacidad de producirla. En base a esto y dada la baja proporción de cepas mostrando secuencias del gen *ctxA*, se puede

considerar como mínima o muy baja la probabilidad de que surga un brote de nuevas cepas con capacidades toxigenicas en nuestro medio, a menos que se reintrodujera de manera importante cepas con genes ctx íntegros con la capacidad de producción de la toxina del cólera (Waldor y Mekalanos 1996, Faruque y col 1998, Karaolis y col 1998).

7. – CONCLUSIONES.

1. Una vez que se establecen las condiciones del método de detección del gen que codifica para la toxina del cólera por PCR, la técnica es mucho más rápida y brinda mayor grado de confiabilidad, y que junto con los métodos tradicionales de microbiología podría ser de gran utilidad para esta detección temprana de la misma con fines epidemiológicos.
2. Dos de las cepas estudiadas presentan un gen alterado que codifica para la toxina del cólera y que estas cepas pertenecen a mariscos y pescados lo cual sugiere la existencia de un reservorio con estos genes de ctxA.
3. Es poco probable la aparición de brotes epidémicos de cólera causados por cepas locales, ya que no se encontraron genes íntegros que codifican la toxina del cólera.

8. – BIBLIOGRAFÍA.

1. Aranda Cicerol Nancy Alimentando al mundo, envenenando al planeta: eutrofización y calidad del agua. Avance y perspectiva vol. 20 pag. **293-303**, 2001
2. Bacteriological Analytical Manual online. Detection of enterotoxigenic *Vibrio cholerae* in foods the polymerase chain reaction chapter 28. 2001. www.FDA.com
3. Chávez L. Genes de patogenicidad y sitios de integración de los bacteriofagos CTX ϕ y VPI ϕ en aislados mexicanos de *Vibrio cholerae* no-01/ no 0139. Tesis de maestría CICATA-IPN, 2000.
4. Faruque S.M., Asadulghani, Shara M.N., Abud A.R.M., Albert M.J., Nasirul K.M., Mekalanos J.J. Analysis of Clinical AND Strains of Nontoxigenic *Vibrio cholerae* for Susceptibility to CTX ϕ : Molecular Basis for Origination of New Strains with Epidemic Potential. Infect. Immun. **66**:5819-5825, (1998)
5. Ghosh C., Nany R.K., Dasgupta S.K., Nair B., Hall R.H., Ghose A.C. A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element ToxR and other virulence factors in non-01/non-0139 *Vibrio cholerae*. Microbial Pathogenesis **22**:199-208, (1997).
6. Giono C. S., Gutierrez C. Z., Hino Jusa Ahumada Asela Mariana, Laboratorio de Bacteriología Enterica. Departamento de bacteriología. "Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1" Publicación técnica del INDRE -10. Secretaria de Salud, Subsecretaria de organización y desarrollo. Referencia Epidemiologica "Dr. Manuel Martínez Baez México. **1991** pag-2-28.

14. Shiral H., Nishibuchi M., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Pal S.C., Takeda Y. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiology. **29**:2517-2521, (1991).

15. Stuart T., Walker. Microbiología Primera edición, McGraw-Hill interamericana, **1999**, pag. 278-284.

16. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science **272**:1910-1914, (1995).

17. Zinsser Microbiología 20ª edición, Editorial Panamericana **1994** pag. 772-784 cap. 36

