



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
Facultat de Farmàcia

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Vibrio cholerae*

Maribel Farfán Sellarés

2002



Divisió de Ciències de la Salut
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
Facultat de Farmàcia

Programa de Doctorado Microbiología Aplicada
Bienio 1996-1998

**ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES
DE *Vibrio cholerae***

Memoria presentada por Maribel Farfán Sellarés
para optar al grado de Doctora en Farmacia.

Barcelona, 15 de Julio del 2002

VºBº Directores de Tesis

Dr. J. Gaspar Lorén Egea

Dra. Carme Fusté i Munné



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
Laboratori de Microbiologia

Facultat de Farmàcia
Av. Joan XXIII, s/n
08028 BARCELONA

Tel. 34.93 402 44 97
Fax 34.93 402 44 98

Dr. JOSÉ GASPAR LORÉN EGEA, Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Barcelona, y Dra. CARME FUSTÉ I MUNNÉ, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que Maribel Farfán Sellarés ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de tesis que lleva por título: "Estudio de la estructura genética de poblaciones de *Vibrio cholerae*".

Consideramos que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado, y para ser defendido ante el correspondiente tribunal con objeto de optar al grado de doctora en Farmacia.

Barcelona, 15 de Julio del 2002

Dr. J. Gaspar Lorén Egea

Dra. Carme Fusté i Munné

A mis padres

A Neus y Javi

Por su gran apoyo y cariño en todo momento

*"Nuestro conocimiento es una
pequeña isla en el enorme
océano del desconocimiento."*

Isaac Bashevis Singer

*"Aquel momento que flota
nos toca con su misterio.
Tendremos siempre el presente
roto por aquel momento."*

*Toca la vida sus palmas
y tañe sus instrumentos.
Acaso encienda su música
sólo para que olvidemos.*

*Pero hay cosas que no mueren
y otras que nunca vivieron.
Y las hay que llenan todo
nuestro universo.*

*Y no es posible librarse
de su recuerdo."*

José Hierro

ÍNDICE

ÍNDICE	6
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Genética de poblaciones bacterianas patógenas	12
1.2 Fundamentos de la genética de poblaciones bacterianas	14
1.2.1 Evolución de los estudios de genética de poblaciones	16
1.2.2 La genética de poblaciones en bacterias	20
1.2.3 La recombinación en poblaciones bacterianas	21
1.2.4 Análisis de la variabilidad	25
1.3 <i>Vibrio cholerae</i> y el cólera	28
1.3.1 La bacteria	29
1.3.2 La enfermedad	35
1.3.3 La epidemiología del cólera	37
2. OBJETIVOS	42
3. ELECTROFORESIS DE ALOENZIMAS MULTILOCUS (MLEE)	44
3.1 Material y métodos	45
3.1.1 Cepas bacterianas utilizadas	45
3.1.2 Soluciones y tampones	50
3.1.2.1 Ringer 1/4	50
3.1.2.2 Tampón TE-NADP	50
3.1.2.3 Solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%	51
3.1.2.4 Tampones Tris/HCl	51
3.1.2.5 Solución de azul de bromofenol	52
3.1.2.6 Tris / glicina 0,19M	53
3.1.2.7 Tampón fosfato pH 7,0	53
3.1.2.8 Solución de secado de geles	54
3.1.3 Medios de cultivo	54
3.1.3.1 Medios sólidos	54
3.1.3.1.1 Medio TCBS	54
3.1.3.1.2 Medio TSA	55
3.1.3.1.3 Agar Mueller-Hinton	56
3.1.3.2 Medios líquidos	56
3.1.3.2.1 Agua de peptona alcalina	56
3.1.3.2.2 Caldo TSB	57
3.1.3.2.3 Caldo rojo de metilo/Voges-Proskauer	57

3.1.4 Conservación cepas	58
3.1.4.1 Conservación a temperatura ambiente	58
3.1.4.2 Conservación por congelación	58
3.1.5 Recuperación de cepas congeladas	58
3.1.6 Diferenciación de biotipos del serogrupo O1	59
3.1.6.1 Hemólisis de hematíes de cordero	60
3.1.6.2 Voges-Proskauer	60
3.1.6.3 Sensibilidad a la polimixina B	61
3.1.7 Preparación de las muestras	62
3.1.8 Determinación de la concentración de proteína	64
3.1.9 Preparación de geles	64
3.1.10 Desarrollo de la electroforesis	66
3.1.11 Enzimas estudiadas	68
3.1.12 Tinción de los geles	71
3.1.12.1 Malato deshidrogenasa (MDH)	72
3.1.12.2 Enzima málico (ME)	72
3.1.12.3 Isocitrato deshidrogenasa (IDH)	73
3.1.12.4 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG)	73
3.1.12.5 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P)	73
3.1.12.6 Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GP1)	74
3.1.12.7 Xantina deshidrogenasa (XDH)	74
3.1.12.8 Alanina deshidrogenasa (ALD)	74
3.1.12.9 Aspartato deshidrogenasa (ASD)	74
3.1.12.10 Catecol-2,3-oxigenasa (C23O)	75
3.1.12.11 Nucleósido fosforilasa (NSP)	75
3.1.12.12 Esterasas (EST)	76
3.1.12.13 Leucina aminopeptidasa (LAP)	76
3.1.12.14 Fumarasa (FUM)	76
3.1.12.15 Fosfoglucoisomerasa (PGI)	77
3.1.13 Lectura de los geles	77
3.1.14 Conservación de los geles revelados	77
3.1.15 Tratamiento de los datos	78
3.1.16 Análisis estadístico	79
3.1.16.1 Frecuencias de los alelos en cada uno de los loci	79
3.1.16.2 Diversidad génica por locus	79
3.1.16.3 Diversidad génica media	79
3.1.16.4 Diversidad genotípica	80
3.1.16.5 Índice de asociación	80

3.1.16.6 Construcción de dendrogramas	81
3.1.16.7 Construcción de cladogramas	82
3.2 Resultados	83
3.2.1 Biotipado de cepas del serogrupo O1	83
3.2.2 Concentración proteica de los extractos crudos	84
3.2.3 Tipos electroforéticos ó ETs	86
3.2.4 Variabilidad alélica por locus	89
3.2.5 Diversidad génica	94
3.2.6 Representación gráfica de los resultados de MLEE	96
3.2.7 Análisis del desequilibrio de ligamiento	102
3.2.8 Relación genética entre O1 <i>El Tor</i> y O139	104
3.2.9 Distancias genéticas dentro de subpoblaciones	105
3.3 Discusión	107
4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST)	115
4.1 Material y métodos	116
4.1.1 Cepas bacterianas utilizadas	116
4.1.2 Soluciones y tampones	117
4.1.2.1 Tampón Tris-borato-EDTA	117
4.1.2.2 Tampón de muestras	118
4.1.3 Genes estudiados	119
4.1.4 Extracción del DNA cromosómico	121
4.1.5 Diseño de cebadores	121
4.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	125
4.1.7 Electroforesis del DNA amplificado en geles de agarosa	126
4.1.8 Purificación del DNA en columnas	128
4.1.9 Cuantificación del DNA	128
4.1.10 Secuenciación	129
4.1.11 Análisis de las secuencias	132
4.1.12 Tratamiento estadístico	132
4.1.12.1 Diversidad alélica por locus	132
4.1.12.2 Diversidad alélica media	132
4.1.12.3 Índice de asociación	133
4.1.12.4 Índice de asociación estandarizado	133
4.1.12.5 Diversidad nucleotídica	133

4.1.12.6 Relación d_N/d_S	134
4.1.12.7 Test de Sawyer	134
4.1.13 Representación gráfica	135
4.1.13.1 Dendrograma	135
4.1.13.2 Árboles génicos	135
4.1.13.3 Diagramas de descomposición de particiones	135
4.2 Resultados	137
4.2.1 Obtención de las secuencias	137
4.2.2 Análisis de las secuencias	138
4.2.3 Secuencias Tipo ó STs	143
4.2.4 Variabilidad alélica	146
4.2.5 Análisis del desequilibrio de ligamiento	147
4.2.6 Test de Sawyer	147
4.2.7 Otras representaciones gráficas	148
4.2.7.1 Árboles génicos	148
4.2.7.2 Diagramas de descomposición de particiones	150
4.2.8 Comparación de resultados MLST y MLEE	152
4.3 Discusión	157
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	164
6. ARTÍCULOS PUBLICADOS	169
7. BIBLIOGRAFÍA	171
8. ANEXO	183
8.1 Abreviaturas y símbolos	184
8.2 Índice de tablas	188
8.3 Índice de figuras	190

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Genética de poblaciones bacterianas patógenas

Los estudios de genética de poblaciones bacterianas se han incrementado en las dos últimas décadas para investigar, sobretodo, bacterias de interés clínico. En los últimos años se ha observado un aumento notable en la aparición de nuevas enfermedades infecciosas y en la reemergencia de otras que se consideraban ya controladas (Musser, 1996). La situación actual es preocupante porque muchos de estos nuevos agentes patógenos causan enfermedades graves. Igualmente, la reemergencia de enfermedades ya conocidas durante siglos en cualquier parte del mundo, como el cólera, el dengue, la fiebre amarilla o la peste, para las cuales se disponen actualmente de medicación adecuada, y en algunos casos incluso de vacunas altamente eficaces, pone de manifiesto cambios en la epidemiología de estas enfermedades. En muchas de estas infecciones, la farmacorresistencia se está convirtiendo en uno de los obstáculos principales para su control, con la aparición de cepas multirresistentes a los antimicrobianos comúnmente utilizados.

¿Cuáles son las claves para el éxito de estas bacterias patógenas? Para poder responder a esta pregunta se están realizando toda una serie de estudios encaminados a explicar los mecanismos por los cuales el microorganismo causa la enfermedad, es decir, elucidar su patogénesis. Pero todavía quedan cuestiones importantes sobre la evolución de la patogénesis de estas bacterias que siguen siendo una incógnita: ¿cuáles son los factores que determinan la emergencia de un nuevo patógeno?, ¿cuándo se desarrollan determinados clones patógenos?, ¿por qué cepas no patógenas presentan genes asociados a la virulencia?.

Los estudios de genética de poblaciones pueden contribuir a este conocimiento, proporcionando información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en las poblaciones naturales. La cantidad de variación genética de una población es un parámetro fundamental, porque determina el potencial evolutivo de la misma. Los cortísimos tiempos de generación de la mayoría de las bacterias y los enormes tamaños de sus poblaciones, hacen que los cambios evolutivos sean muy rápidos. La dinámica de aparición y selección de mutantes o la importancia relativa de la mutación y de la recombinación en estas poblaciones, son efectos esenciales para comprender los cambios epidemiológicos que se producen en ellas.

Para poder intentar un control de estas enfermedades, es necesario conocer ampliamente la biología y ecología del patógeno causante, así como comprender su epidemiología. Durante mucho tiempo, epidemiólogos y científicos que han estudiado la patogénesis de las bacterias se han mostrado escépticos acerca de la relevancia de la biología evolutiva y la genética de poblaciones en sus disciplinas. Pero esto está cambiando, se está empezando a reconocer la importancia del conocimiento de la estructura poblacional de las bacterias patógenas para el estudio de la resistencia antimicrobiana, para conocer las interacciones entre microorganismos patógenos y el sistema inmune, para la identificación de antígenos candidatos para preparar vacunas, y para realizar programas de vacunación efectivos.

Los estudios de genética de poblaciones son también útiles para caracterizar las cepas de las bacterias patógenas, aspecto central de la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Es importante comprender las relaciones genéticas existentes entre cepas patógenas, causantes de la enfermedad, y cepas no patógenas, que no producen sintomatología, de una misma especie bacteriana. La comparación de estas dos poblaciones nos puede ayudar a explicar los orígenes de las cepas patógenas e identificar las diferencias genéticas entre ambas.

En estos estudios de genética de poblaciones se ha visto que, por lo general, existe una aparente asociación entre unos determinados clones de la bacteria, que se encuentran en pequeña proporción, y el desarrollo de la enfermedad. Consecuentemente, nos indica que existe menos diversidad en las cepas patógenas que en las de vida libre. Estas observaciones han sugerido que la mayoría de las bacterias presentan una estructura poblacional clonal, aunque esto no es del todo cierto. El aumento del número de bacterias estudiadas, unido a la aplicación de técnicas moleculares, ha mostrado que el papel de la recombinación genética no es igual en todas las especies, y que en algunos casos puede llegar a romper la estructura clonal de la población.

La transferencia horizontal de genes tiene una gran relevancia en la epidemiología de bacterias patógenas. Aunque la presencia de recombinación genética en las poblaciones bacterianas se conoce desde hace mucho tiempo, todavía existe una gran incerteza de su papel en las poblaciones naturales. Se ha observado una marcada diferencia en el grado de recombinación entre cepas patógenas y no patógenas, pero las razones que lo expliquen aún se desconocen. La adquisición de material extracromosómico tiene importantes consecuencias en la evolución de las bacterias, tanto a corto plazo, por la distribución horizontal de genes de resistencia, como a largo plazo, por la adquisición de nuevos

determinantes de virulencia o propiedades metabólicas que puedan producir un cambio importante en la patogenicidad o que afecte al hábitat ecológico donde residen.

Por tanto, la variación genotípica en las poblaciones de los microorganismos patógenos plantea importantes dificultades al control de las enfermedades infecciosas: la emergencia de nuevas cepas patógenas, la aparición constante de poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos o las dificultades asociadas a la obtención de vacunas contra microorganismos antigénicamente diversos o cambiantes, sólo constituyen una muestra de la importancia práctica del conocimiento de los procesos microevolutivos que operan en las poblaciones de bacterias. No obstante, es importante señalar, que la genética de poblaciones bacterianas constituye una disciplina separada y distinta de la epidemiología de la enfermedades producidas por bacterias. Aunque coincidan algunas técnicas en ambas disciplinas, tanto los métodos utilizados, especialmente los de análisis e interpretación de los datos, como los esquemas conceptuales son distintos.

1.2 Fundamentos de la genética de poblaciones bacterianas

La genética de poblaciones estudia la variabilidad genética de las poblaciones naturales. Al cambiar la composición genética de las poblaciones se produce el proceso evolutivo de la especie. El trabajo del genetista poblacional es describir, tanto cualitativa como cuantitativamente, la variación genética dentro de la población estudiada. Por ello, estos estudios intentan explicar cuáles son los mecanismos por los cuales evoluciona una especie, y tratan de responder a cuestiones específicas sobre la historia particular de esa especie y de sus poblaciones.

Dentro de una determinada especie no existe una absoluta homogeneidad genética, sino que distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar ligeras diferencias genéticas. Para la genética de poblaciones el proceso evolutivo consiste en cambios en la constitución genética de las distintas poblaciones de una especie.

Estos cambios en la composición genética de las poblaciones son debidos a distintos mecanismos que afectan a las frecuencias génicas de la población. Los procesos de mutación, recombinación, migración, deriva genética y selección natural influyen en la naturaleza y velocidad de estos cambios evolutivos.

→ La *mutación* es el proceso fundamental que impulsa todo cambio evolutivo. No obstante, debido a que las tasas de mutación son muy bajas, la presión de mutación por sí sola produce cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones muy lentos.

→ La *recombinación* implica en el caso de los microorganismos el reemplazamiento de una región pequeña del cromosoma con la correspondiente región de otro individuo de la misma especie; o en algunos casos, incluso de otra especie muy relacionada genéticamente.

→ La *migración* o flujo génico de una población a otra de la misma especie puede cambiar la composición genética de una población local, si es el caso que las frecuencias génicas de las dos poblaciones son distintas.

→ La *deriva genética* al azar se basa en que las frecuencias génicas de una población pueden cambiar por razones puramente aleatorias. Dado que todas las poblaciones son finitas, las frecuencias génicas cambian de una generación a otra debido a errores de muestreo. Cuanto más pequeña es la población, mayor es el efecto de la deriva genética al azar sobre las frecuencias génicas.

→ La *selección natural* controla los caracteres que se desvían de la media de la población, seleccionando aquellos organismos con una mayor eficacia biológica. La selección tiende a mantener un nivel óptimo asegurando los logros conseguidos durante generaciones y eliminando los individuos divergentes.

Las variantes genéticas generadas por los procesos de mutación, recombinación, migración y deriva genética pueden aumentar o disminuir de frecuencia independientemente de si son o no cambios adaptativos útiles a sus portadores. En cambio, la selección natural es el único proceso evolutivo que es direccional respecto a la adaptación. La naturaleza adaptativa de los organismos, tanto en su fisiología como comportamiento, es debida a la selección natural.

Las relaciones entre estas fuerzas son complejas y pueden diferir entre diferentes especies y entre diferentes regiones de un genoma. A partir de la variabilidad genética detectada en las poblaciones como resultado de estas fuerzas, los estudios de genética de poblaciones establecen modelos para explicar la estructura poblacional y la evolución de estas poblaciones.

1.2.1 EVOLUCIÓN DE LOS ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES

La teoría de la evolución por selección natural sostiene que la evolución es consecuencia de la interacción entre variación genética y selección. Según el Teorema Fundamental de la Selección Natural de Fisher (Fisher, 1930), la tasa de evolución está limitada por la cantidad de variabilidad genética existente en la población. Experimentalmente, Ayala (1965) pudo demostrar que existe una relación directa entre variabilidad genética y tasa de evolución: cuanto mayor es la variabilidad genética que existe en la población mayor es su tasa de evolución. Por ello, la caracterización de la variabilidad genética (su origen, cuantificación, mantenimiento e importancia evolutiva) es un objetivo importante en la genética de poblaciones.

Desde los inicios de la genética de poblaciones se ha constatado la existencia de una gran cantidad de variación genética en las poblaciones naturales. En un principio, esta variabilidad genética se observó, principalmente, estudiando caracteres morfológicos (variabilidad de forma, tamaño, etc.) y citológicos (polimorfismos por inversiones, translocaciones, etc.). Las primeras aproximaciones experimentales llegaron con los trabajos de selección de mutantes, que confirmaban esta presencia de variación genética en las poblaciones. Sin embargo, mediante este tipo de experimentos no era posible cuantificar de una manera precisa la cantidad de variabilidad genética existente. Se observaban los distintos fenotipos pero no se podía saber cuales eran las frecuencias génicas de cada uno de ellos. Otra importante limitación de estos estudios era el desconocimiento de la importancia relativa de los loci invariantes, ya que únicamente se detectaban los loci polimórficos, los que presentaban variación genética. Al no conocerse la relación de loci polimórficos respecto de monomórficos era imposible una cuantificación correcta de la variabilidad genética.

Paralelamente al trabajo realizado experimentalmente, los genetistas de poblaciones teóricos iban desarrollando con gran rapidez la teoría matemática de la genética de poblaciones. Sin embargo, existió poca interacción en el trabajo de ambos grupos. Mientras los teóricos trabajaban con el concepto de frecuencia génica, los estudios experimentales se centraban en los cambios detectados fenotípicamente.

En organismos eucariotas se formularon dos teorías sobre la estructura genética de poblaciones:

→ La *hipótesis clásica*, propuesta por Herman Muller, postulaba que cada individuo

sería homocigoto en casi todos los loci para el alelo normal, presentando en muy pocos el alelo mutante en heterocigosis; esto sería debido a que el alelo mutante, normalmente deletéreo, sería eliminado rápidamente de las poblaciones por selección negativa. En este caso, el principal papel de la selección natural consistiría en la eliminación de los alelos deletéreos. Una consecuencia de esta hipótesis es que existiría poca variabilidad genética intrapoblacional, la mayor parte de la variación genética de una especie sería interpoblacional.

→ La *hipótesis equilibrada*, propuesta por Theodosius Dobzhansky, proponía por el contrario que los individuos serían heterocigotos para casi todos los loci y que estos polimorfismos se mantendrían por selección positiva. Como consecuencia, la variación genética intrapoblacional sería muy grande.

El origen de estas dos hipótesis proviene en gran medida del enfoque experimental empleado por sus autores. Así, Muller trabajaba en el laboratorio con mutantes de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) con un efecto generalmente deletéreo, y en 1927 demostró que las radiaciones ionizantes eran capaces de producir alteraciones genéticas, y desarrolló técnicas cuantitativas para medir en este organismo la proporción de mutaciones inducidas. En cambio, Dobzhansky al estudiar directamente las poblaciones naturales de *Drosophila* había observado una enorme cantidad de variabilidad morfológica, publicando los fundamentos de su teoría en el libro "Genética y el origen de las especies" (1937).

El gran cambio en el estudio de la variabilidad genética se produce en 1966 con la introducción de la técnica electroforética (Hubby y Lewontin, 1966; Lewontin y Hubby, 1966; Harris, 1966). La electroforesis de proteínas es una técnica potente, rápida y sencilla, que permite obtener estimaciones de las frecuencias génicas y de la variabilidad genética existente en las poblaciones. La aplicación de esta técnica conllevó al desarrollo de la metodología de la electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE), que rápidamente se utilizó de forma estandarizada en los estudios de genética de poblaciones.

Con la técnica MLEE se estudia el polimorfismo de los productos génicos, es decir, se detecta la variabilidad a nivel proteico. Esta técnica detecta las variaciones en la secuencia de aminoácidos que afectan a la movilidad electroforética de enzimas metabólicas ("housekeeping genes"). Se basa en someter a electroforesis, en condiciones no desnaturizantes, los extractos crudos citoplasmáticos de los individuos a estudio, y seguidamente, teñir los geles para detectar la actividad enzimática de una única proteína.

La carga neta de una proteína está en relación directa con la secuencia de aminoácidos, y por tanto, también con la secuencia de bases del correspondiente gen estructural. Las diferentes movilidades electroforéticas obtenidas para una misma enzima se interpretan como formas aloenzimáticas, es decir, como productos génicos de un alelo diferente del gen estructural que codifica para esta enzima.

Las isoenzimas son proteínas que tienen una misma función enzimática pero que presentan pequeñas modificaciones en su secuencia de aminoácidos, por lo tanto, varía su carga neta. Esta multiplicidad enzimática puede ser debida a diversas causas, tanto genéticas, como resultado de variaciones en la secuencia de nucleótidos del gen o genes responsables de su síntesis, como post-transcripcionales, como consecuencia de las modificaciones una vez sintetizada la enzima. Pero estas modificaciones post-transcripcionales se pueden considerar como una fuente baja de error de este método, ya que la frecuencia con que se presenta este fenómeno es muy baja, y por tanto, no se cree que pueda generar ninguna modificación importante en los resultados finales. Se ha comprobado que la electroforesis de isoenzimas puede detectar sobre un 90% de las sustituciones de aminoácidos (Ramshaw y col., 1979; McLellan, 1984). Por tanto, este método asume que la mayoría de enzimas son producto de un gen, y que la variabilidad a nivel proteico es un fiel reflejo de la variabilidad génica.

En los estudios de genética de poblaciones, la técnica de MLEE se aplica a enzimas metabólicas, porque los genes que codifican estas enzimas están sometidos a una fuerte selección estabilizadora y, por consiguiente, la variación detectada es selectivamente neutra. En cambio, no es adecuado aplicarlo a productos génicos codificados por genes sometidos a selección diversificadora, porque la velocidad de cambio de estos loci, ya sea originada por mutación, recombinación o ambas, no reflejaría la divergencia del genoma entero.

La electroforesis de isoenzimas es una herramienta muy útil para el estudio de la diversidad genética y estructural de poblaciones naturales. Se empezó a utilizar a partir de la década de los 60, sobretodo en poblaciones de eucariotas, sin embargo su aplicación en procariotas no llega hasta principios de los 80. En los años 60, esta técnica daba aportaciones nuevas a la taxonomía de los eucariotas, y a la variación genética entre poblaciones y entre individuos, siendo así una importante fuente de información para las hipótesis evolutivas. A nivel de procariotas se limitaba su uso a la identificación de cepas bacterianas a nivel de especie (Lund, 1965; Robinson, 1966; William y Bowden, 1968). Con el tiempo, la técnica de MLEE se consolidó como un método estándar en la genética

de poblaciones de eucariotas, tomando, en muchas ocasiones, a *Drosophila* spp. como modelo de valor universal.

En cambio, se retrasó la aplicación de la técnica de MLEE en las bacterias, no por falta de una metodología adecuada, sino por la inexperiencia de los genetistas poblacionales para trabajar con técnicas propias de la microbiología (medios y condiciones de cultivo, procesos de esterilización, protocolos de identificación bacteriana, etc.). En 1967, Bowman y col., a través de su trabajo con distintas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, demostró claramente el poder de la técnica para revelar variaciones genéticas dentro de una especie y entre especies. Pero, aún seguía considerándose esta técnica sólo como un método de tipado para caracterizar cepas, ya que habían muchos problemas planteados a los que no se les daba solución. Formalmente, la genética de poblaciones bacterianas se inicia con el trabajo de Milkman (1973), al analizar la variación alélica para 5 enzimas metabólicas de una población de 800 cepas de *Escherichia coli*. Este trabajo pionero fue prolongado por Selander y Levin en una serie de estudios con *Escherichia coli* y *Shigella* spp., que implicaban varios miles de aislados (Levin, 1981; Whittam y col., 1983; Ochman y col., 1983). Desde entonces se han publicado numerosos estudios de aplicación de la técnica de MLEE para determinar la estructura poblacional de especies bacterianas.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la electroforesis de isoenzimas multilocus era la técnica de elección para los estudios de genética de poblaciones, pero con el auge de las técnicas moleculares, así como la práctica de forma rutinaria de técnicas automáticas de secuenciación, se han desarrollado otros métodos eficaces que estudian directamente la variabilidad a nivel génico.

Además de las limitaciones ya mencionadas, el mayor problema de la técnica de MLEE y de otros métodos de análisis, es que los resultados obtenidos en distintos laboratorios no eran comparables, ya fuese por variaciones en la metodología y equipos empleados, o por un cierto grado de subjetividad que cada laboratorio adoptaba de forma arbitraria en la lectura de los distintos alelos en los geles de electroforesis. Para tratar de solventar estos problemas, Maiden y col. (1998) propusieron adaptar los conceptos y las bases de la técnica de MLEE a una nueva metodología que denominaron tipado de secuencias multilocus (MLST). La técnica de MLST se basa en secuenciar fragmentos internos de 450- 500 pb de varios genes metabólicos para cada una de las cepas estudiadas. La longitud del fragmento de DNA se escoge de modo que permita la secuenciación de las dos cadenas de DNA usando un par de cebadores, y por otra parte, suministra la suficiente variación génica para permitir la identificación de un número adecuado de alelos en la población analizada. Se compara

para cada loci todos los fragmentos secuenciados para el conjunto de la población, y cada secuencia distinta, aunque difiera en un único nucleótido, se considera un alelo distinto.

Este método presenta mayores ventajas sobre MLEE, ya que detecta mayor variación, lo que permite una mayor discriminación analizando tan sólo la mitad de los loci que se estudian con MLEE, y las secuencias obtenidas pueden ser comparadas de manera fiable entre laboratorios. Además, los datos obtenidos pueden almacenarse en bases de datos que puedan ser consultadas vía Internet, para obtener información de gran valor en el análisis de la epidemiología global de una determinada especie.

1.2.2 LA GENÉTICA DE POBLACIONES EN BACTERIAS

La aplicación de los estudios de genética de poblaciones en las bacterias debe situarse en un tiempo relativamente reciente, a partir de la década de los años 80. Estos estudios fueron iniciados por genetistas de poblaciones interesados en las bacterias, como Milkman y Selander, en vez de genetistas bacterianos o microbiólogos interesados en genética de poblaciones. Este interés por el mundo bacteriano se debió a que las bacterias constituían un grupo atractivo de organismos al tener cortos tiempos de generación, tratarse de individuos haploides, y por tener la capacidad de adquirir elementos genéticos accesorios (Musser, 1996).

La principal diferencia entre la genética de poblaciones en organismos eucariotas, que es donde ha tenido mayor extensión, y en procariotas, reside en el modo de reproducción. En las bacterias, la reproducción y el intercambio de genes son realizados por mecanismos distintos e independientes, por ello, decimos que su reproducción es asexual. En cambio, en los organismos superiores estos mecanismos están unidos en un mismo proceso citológico, presentando una reproducción sexual. Por ello, las leyes que gobiernan la genética de poblaciones en bacterias son, aparentemente, menos complejas que la de los organismos sexuales.

Al abordar el estudio de la genética de poblaciones en bacterias debemos considerar otras características de estas poblaciones que también difieren de las poblaciones eucariotas, y que condicionan, obviamente, su proceso evolutivo. Existen tres mecanismos básicos de intercambio génico en los procariotas: la transformación, la conjugación y la transducción. La importancia de estos tres mecanismos de intercambio genético varía entre los distintos procariotas, y no es un proceso obligado en cada generación. En principio, este

intercambio génico no es frecuente en bacterias, ya que se ha observado que la recombinación es rara en la mayoría de las poblaciones naturales. El tamaño de los fragmentos génicos intercambiados es pequeño, comparado con los eucariotas, y varía según el mecanismo implicado. La recombinación en bacterias puede producirse entre cepas de una misma especie (intraespecie) o incluso, entre cepas de especies genéticamente relacionadas (interespecie).

Estas diferencias en el tipo de intercambio genético proporcionan patrones de evolución distintos para procariotas y eucariotas, por lo que algunos de los hechos que se consideran dogmas para el intercambio genético en eucariotas, no son aplicables para las bacterias. Uno de estos dogmas es que la selección natural tiene un efecto limitado sobre la diversidad genética de una especie animal o vegetal. En cambio, en el caso de las bacterias la selección natural tiene un papel muy importante porque elimina diversidad en las poblaciones, al seleccionar aquellas cepas mejor adaptadas. Por ejemplo, la aparición de un mutante que confiere cierta ventaja ecológica sobre el resto de individuos de la población, provoca un mayor incremento de este clon en la población, eliminando por selección periódica aquellos individuos menos adaptados, de este modo disminuye la diversidad en la población. Por lo tanto, si en cualquier especie bacteriana escogemos una población sometida a una fuerte presión selectiva, estaremos seleccionando poblaciones clonales. Esto es lo que sucede al analizar solamente poblaciones de cepas virulentas. Las especies bacterianas patógenas están constituidas por una base amplia de cepas no patógenas en las que predominan un grupo de cepas responsables de la enfermedad. En este caso, se han de analizar tanto poblaciones de cepas patógenas como de no patógenas, para determinar la correcta estructura poblacional de la especie bacteriana. Por el contrario, en aquellas poblaciones que presentan con frecuencia fenómenos de recombinación, estos intercambios genéticos son transferidos rápidamente a distintos fondos genéticos, y la diversidad en la población se mantiene.

1.2.3 LA RECOMBINACIÓN EN POBLACIONES BACTERIANAS

¿Por qué las bacterias recombinan? Es importante conocer el papel de la recombinación genética en las poblaciones bacterianas, ya que la transferencia horizontal de genes tiene una gran relevancia para la epidemiología de las bacterias patógenas. Fue en 1947, cuando Tatum y Ledeborg descubrieron por primera vez la recombinación genética en el laboratorio utilizando distintas cepas de *Escherichia coli* K12. Aunque la presencia de recombinación en las bacterias fue demostrada experimentalmente hace más de 50 años, aún no se conoce bien su papel en las poblaciones naturales.

Nuestro conocimiento de la importancia real de estos mecanismos de recombinación en las poblaciones naturales bacterianas es muy escaso. En un principio, la elucidación experimental de los mecanismos implicados (conjugación, transformación y transducción) conllevó a una falsa idea de suponer que el intercambio genético a nivel de procariotas podía alcanzar niveles muy elevados. Sin embargo, no se puede extrapolar los resultados obtenidos en el laboratorio a lo que sucede en realidad en la naturaleza. Se ha de tener en cuenta, que muchos de estos mecanismos de transferencia génica en procariotas se han desarrollado a nivel de laboratorio bajo condiciones muy restrictivas. En cambio, en condiciones naturales las bacterias conservan un elevado índice de estabilidad genética, con lo cual, la probabilidad de que estos mecanismos sean extensamente operativos en condiciones naturales es muy baja.

Aunque la disponibilidad y eficiencia de esos mecanismos de intercambio genético podrían ser el principal factor en la determinación de la frecuencia de recombinación dentro de una población, las consecuencias biológicas de esos eventos dependen de factores ecológicos. Por ejemplo, distintas cepas de una misma especie pueden estar presentes en el mismo nicho para intercambio genético, para tener cualquier oportunidad de conducir a una variación genética. Por lo tanto, la frecuencia de recombinación depende de multitud de factores biológicos y ecológicos que son muy difíciles de identificar, porque pueden variar tanto entre diferentes especies como dentro de distintas subpoblaciones de una misma especie. Distintos estudios experimentales (Levin, 1981; Milkman y Bridges, 1990), han demostrado que el intercambio genético en procariotas se produce con una frecuencia muy baja, al menos en las condiciones estudiadas, y que es comparable o menor que la frecuencia de mutación.

El conocimiento de la naturaleza y la frecuencia de recombinación es importante para determinar la estructura genética de las poblaciones bacterianas. Si no existiera la recombinación cromosómica en las bacterias, las poblaciones bacterianas tendrían una estructura clonal. La variación genética en la población vendría dada, fundamentalmente, por la mutación. Esto implicaría que las poblaciones naturales de bacterias serían mezclas de líneas evolutivas más o menos independientes. Como consecuencia, los distintos alelos en los loci estudiados, no estarían asociados al azar sino que serían más frecuentes determinadas combinaciones de alelos. Esto sería efecto de los cambios en las frecuencias génicas de determinados loci como resultado de la acción de la selección sobre otro locus distinto. En estas circunstancias, hablamos de que existe un **desequilibrio de ligamiento**.

Por otro lado, si la recombinación cromosómica fuera muy frecuente, no cabría esperar

asociación entre alelos, ya que las distintas combinaciones serían deshechas por la acción de la recombinación. En estas circunstancias, se habla de que los alelos se hallan en **equilibrio de ligamiento**.

Aunque en el caso de las bacterias el intercambio genético es raro, su frecuencia es suficiente para crear y romper asociaciones de alelos en distintos loci. Según Maynard-Smith (1993), si la tasa de recombinación es de tan sólo diez veces superior a la de mutación, la recombinación rompe de manera efectiva todas las asociaciones preexistentes de alelos en los distintos loci. Además la recombinación fomenta la evolución adaptativa proporcionando determinadas combinaciones adaptativas de alelos que pueden ser intercambiadas entre distintas especies bacterianas, como resistencia a antibióticos, casetes de virulencia, fijación de nitrógeno, etc. Como el intercambio es poco frecuente, queda garantizada la integridad de su conjunto de adaptaciones a pesar de la variabilidad que se introduce por recombinación.

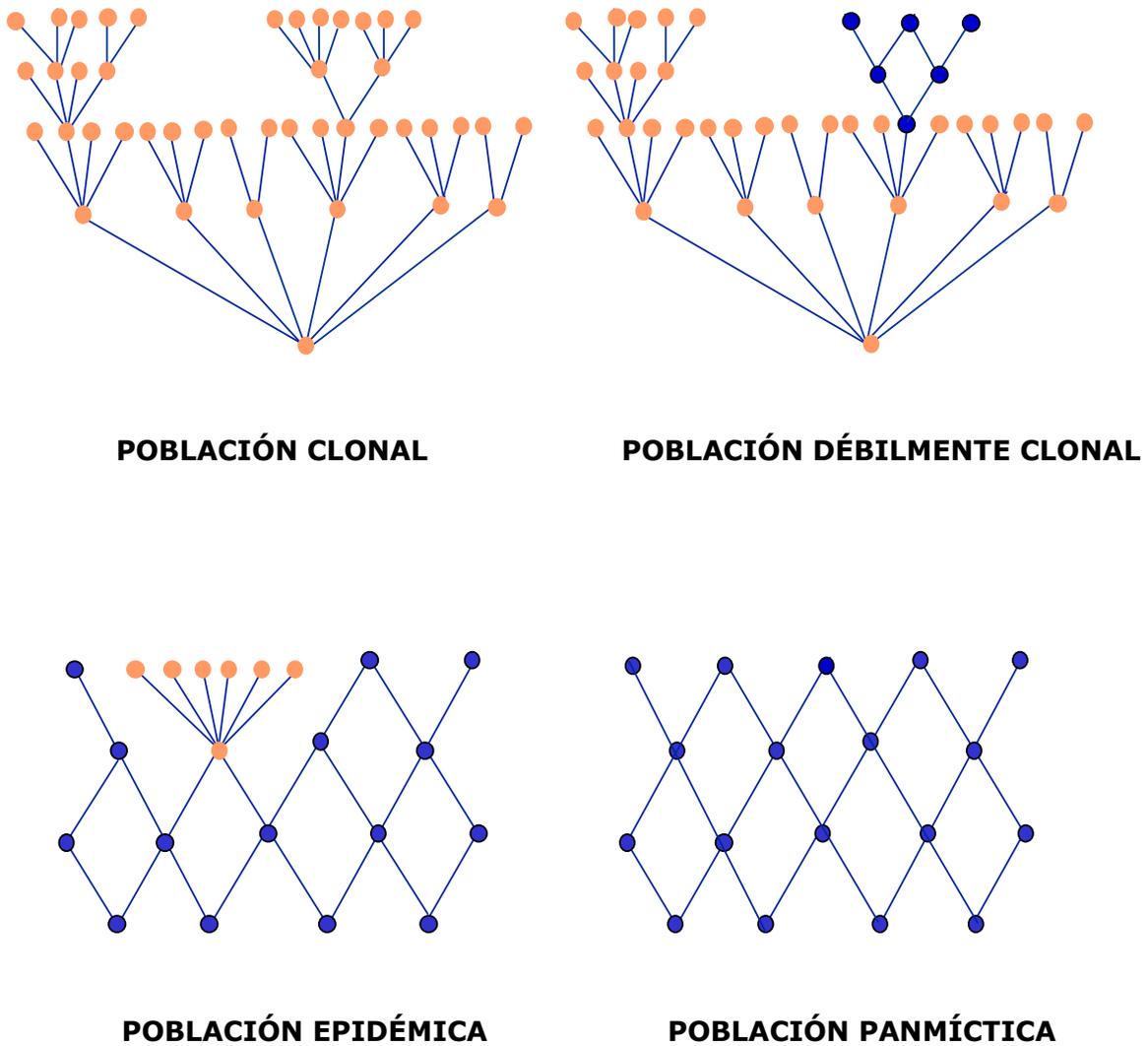
Con la aplicación del método de MLEE a numerosas especies bacterianas, se ha visto que en la mayoría de ellas, se encuentran determinadas combinaciones de alelos que se repiten con una frecuencia mayor de la que debería esperarse. Esto es debido a que la recombinación genética, aunque esté presente en la población, no es suficiente para romper las asociaciones entre alelos, y presentan desequilibrio de ligamiento. Estas características, han llevado a la mayoría de autores a postular que las poblaciones bacterianas tendrían una estructura clonal. Sin embargo, en algunas especies bacterianas, como *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori*, la recombinación ha originado asociaciones al azar de alelos, con lo cual estas poblaciones estarían en equilibrio de ligamiento.

Analizando los resultados con distintas poblaciones bacterianas, Maynard-Smith y col. (1993) determinaron la existencia de distintos modelos de población, según su estructura genética, entre las bacterias. Se caracterizarían por dos extremos bien determinados, el de clonalidad, correspondiente a la presencia de desequilibrio de ligamiento, y el de panmixia, correspondiente al equilibrio de ligamiento, y distintas situaciones intermedias. La figura 1.1 muestra cuatro tipos de poblaciones distintos.

Como se ha visto, las estructuras de poblaciones bacterianas son complejas y frecuentemente controvertidas. Sobretodo, debido a la incerteza acerca de la frecuencia y el impacto de recombinación en las bacterias. La existencia de clones dentro de la población y de desequilibrio de ligamiento entre los alelos de los diferentes loci, es frecuentemente citado como evidencia de bajas tasas de recombinación. Pero este planteamiento está

cambiando con los resultados obtenidos a partir de las secuencias de nucleótidos. Se ha visto que la recombinación es común en genes metabólicos implicados en vías centrales ("housekeeping genes") de algunas bacterias, y que los niveles observados de desequilibrio de ligamiento entre alelos pueden ser debidos algunas veces a una estructuración ecológica o geográfica de la población o a una incorrecta elección de la muestra por no ser representativa de la población, en vez de a una baja tasa de recombinación.

Figura 1.1 Distintos modelos de estructuras de poblaciones.



1.2.4 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD

En bacteriología, los métodos clásicos de tipado (serotipado, biotipado, fagotipado, tipado de fimbrias, etc.) frecuentemente han sido utilizados en los estudios taxonómicos y epidemiológicos. Pero todos estos métodos sólo detectan variaciones fenotípicas, las cuales son muy difíciles de relacionar con las variaciones alélicas, y tampoco suministran información sobre la frecuencia de los alelos y los distintos genotipos detectados en la población. Por tanto, estas técnicas no sirven para el estudio de la genética de poblaciones.

Otras técnicas como la hibridación DNA-DNA y la hibridación DNA-RNA son de gran utilidad para establecer especies y la relación que existe entre especies próximas, pero no sirven para conocer la variación genética dentro de una especie, su utilidad queda limitada a la comparación de especies genéticamente próximas.

Sin embargo, para el conocimiento de la estructura poblacional es necesario la medida del grado de variabilidad genética que existe entre las distintas cepas de una población bacteriana. En los estudios de genética de poblaciones bacterianas se han utilizado dos tipos de aproximaciones para detectar esta variación genética:

→ *Variación a corto plazo:*

En este caso, se analizan y comparan loci individuales o regiones del genoma que son altamente variables en la población. Se utilizan métodos como el ribotipado, el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis en campo pulsante (PFGE) y el análisis de productos de PCR utilizando elementos repetitivos o arbitrarios como cebadores.

La variación que se mide con estos métodos es la que evoluciona más rápidamente, y por tanto, los resultados obtenidos son útiles para conocer la epidemiología a corto plazo, pero no sirven para estimar la epidemiología a nivel global.

Algunas de estas técnicas, como el ribotipado o el PFGE, pueden ser útiles en determinadas situaciones, para resolver la variación entre cepas que no se pueden diferenciar con la técnica MLEE. Por ejemplo, en el caso de las bacterias patógenas, el PFGE permite el estudio de brotes individuales de una enfermedad, porque identifica la microvariación necesaria para diferenciar cepas circulando dentro de un área geográfica. Sin embargo, esta técnica es demasiado discriminatoria para la epidemiología a largo plazo, porque no indica si las cepas responsables de la patogénesis son miembros de un mismo linaje clonal globalmente distribuido.

Utilizando un símil fácilmente comprensible, estas técnicas que detectan la variación a corto plazo “no ven el bosque por culpa de los árboles”.

→ *Variación a largo plazo:*

Esta aproximación mide la variación que se acumula lentamente en la población, debido probablemente a que sea selectivamente neutra. Este tipo de análisis es el que se ha realizado, de forma tradicional, aplicando la técnica de electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE). Es el método más apropiado para la epidemiología a largo plazo, ya que ha contribuido a un mejor conocimiento de la estructura poblacional y la epidemiología de muchos grupos de bacterias, identificando en el caso particular de bacterias patógenas, clones y complejos clonales especialmente asociados con el desarrollo de la enfermedad que son de distribución global.

En la tabla 1.1 se muestra una lista de especies bacterianas que han utilizado la técnica de MLEE para estudiar su estructura poblacional.

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, han aparecido nuevas metodologías, como el tipado de secuencias multilocus (MLST), que analizan la variabilidad génica mediante secuenciación del DNA, detectando la variación en las mismas secuencias nucleotídicas de los genes. Es una técnica muy reciente, y en la tabla 1.2 se muestran las especies bacterianas estudiadas y las que están en proceso de desarrollo.

Tabla 1.2 Especies bacterianas analizadas con la técnica de MLST.

Especie bacteriana	Referencias
<i>Campylobacter jejuni</i>	Dingle y col., 2001; Suerbaum y col., 2001
<i>Neisseria meningitidis</i>	Feil y col., 1999; Holmes y col., 1999; Tzanakaki y col., 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	Enright y col., 2000; Day y col., 2001
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Enright y Spratt, 1998; Shi y col., 1998; Zhou y col., 2000; Enright y col., 2000
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Enright y col., 2001
<i>Vibrio cholerae</i>	Farfán y col., 2002
En desarrollo	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Página web: www.mlst.net
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	

Tabla 1.1 Especies bacterianas analizadas con la técnica de MLEE.

Especie bacteriana	Referencias
<i>Bacillus subtilis</i>	Istock y col., 1992
<i>Bacteroides fragilis</i>	Gutacker y col., 2000
<i>Bordetella</i> spp.	Musser y col., 1986
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Boerlin y col., 1992
<i>Brucella</i> spp.	Gandara y col., 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wise y col., 1995
<i>Campylobacter jejuni</i>	Nachamkin y col., 2001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Bertout y col., 1999
<i>Enterococcus faecalis</i>	Tomayko y col., 1995
<i>Escherichia coli</i>	Milkman y col., 1973; Caugant y col., 1981; Whittam y col., 1983; Ochman y col., 1983; Achtman y col., 1986; Whittam y col., 1988; Pupo y col., 1997; Souza y col., 1999
<i>Haemophilus influenzae</i>	Brenner y col., 1988; Musser y col., 1990; Fusté y col., 1996
<i>Helicobacter pylori</i>	Go y col., 1996
<i>Legionella pneumophila</i>	Selander y col., 1985
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bibb y col., 1990
<i>Mycobacterium</i> spp.	Wasen y col., 1991; Ohman y col., 1995
<i>Mycoplasma</i> spp.	O'Brien y col., 1981
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	O'Rourke y col., 1993
<i>Neisseria meningitidis</i>	Caugant y col., 1986; Campos y col., 1992; Sáez-Nieto y col., 1992; Reeves y col., 1995; Tzanakaki y col., 2001
<i>Pasteurella trehalosi</i>	Davies y col., 1997
<i>Proteus</i> spp.	Kappos y col., 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Martin y col., 1999; Lomholt y col., 2001
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sikorski y col., 1999; Rius y col., 2001
<i>Rhizobium</i> spp.	Eardly y col., 1990; Leung y col., 1994
<i>Salmonella</i> spp.	Selander y col., 1990
<i>Serratia marcescens</i>	Gargallo y col., 1987
<i>Shigella</i> spp.	Ochman y col., 1983
<i>Staphylococcus aureus</i>	Musser y col., 1990
<i>Streptococcus mitis</i>	Hohwy y col., 2001
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Munoz y col., 1992; Sibold y col., 1992
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Musser y col., 1991
<i>Vibrio cholerae</i>	Desmarchelier y col., 1988; Salles y Momen, 1991; Wachsmuth y col., 1993; Evins y col., 1995; Beltrán y col., 1999; Farfán y col., 2000
<i>Yersinia</i> spp.	Schill y col., 1984; Goulet y Picard, 1984; Dolina y col., 1993

1.3 *Vibrio cholerae* y el cólera

Las enfermedades infecciosas agudas son todavía un importante problema de salud pública a nivel mundial. Son responsables de una cuarta parte de las muertes que se producen en el mundo (Fig. 1.2). La mayor parte de estas muertes se producen en los países subdesarrollados, sobretudo en las áreas con mayor grado de exclusión social, deterioro ambiental y pobreza. La malnutrición, la falta de medicamentos y vacunas, y la inadecuada infraestructura sanitaria contribuyen a su rápida propagación.

Figura 1.2 Principales causas de muerte a nivel mundial.



Nota: Las defunciones por cáncer y por enfermedades cardiovasculares, respiratorias y digestivas pueden deberse también a infecciones, y aumentar todavía más el porcentaje de defunciones producidas por enfermedades infecciosas.

Fuente: OMS, 1999.

La distribución de estas enfermedades en el mundo está variando continuamente, debido a cambios que se producen en el patógeno, en el ambiente y en la población huésped. El incremento de la resistencia a los antimicrobianos, el sobrecalentamiento del planeta, la globalización de los mercados y las migraciones de población son los principales factores que intervienen en el desarrollo y proliferación de este grupo de enfermedades.

Dentro de este grupo de enfermedades infecciosas se encuentra el cólera, que presenta una mayor incidencia en países subdesarrollados de clima tropical, llegando a adquirir características epidémicas.

1.3.1 LA BACTERIA

El cólera ha tenido un papel importante en el desarrollo de la bacteriología moderna. En 1884 el científico alemán Robert Koch aisló la bacteria causante del cólera cuando trabajaba con enfermos coléricos en Egipto. La bacteria presentaba una morfología bacilar curvada, por lo que la denominó *Vibrio comma*. Este descubrimiento de Koch fue posible gracias a la utilización de instrumentos como el microscopio y el cultivo de heces en placas.

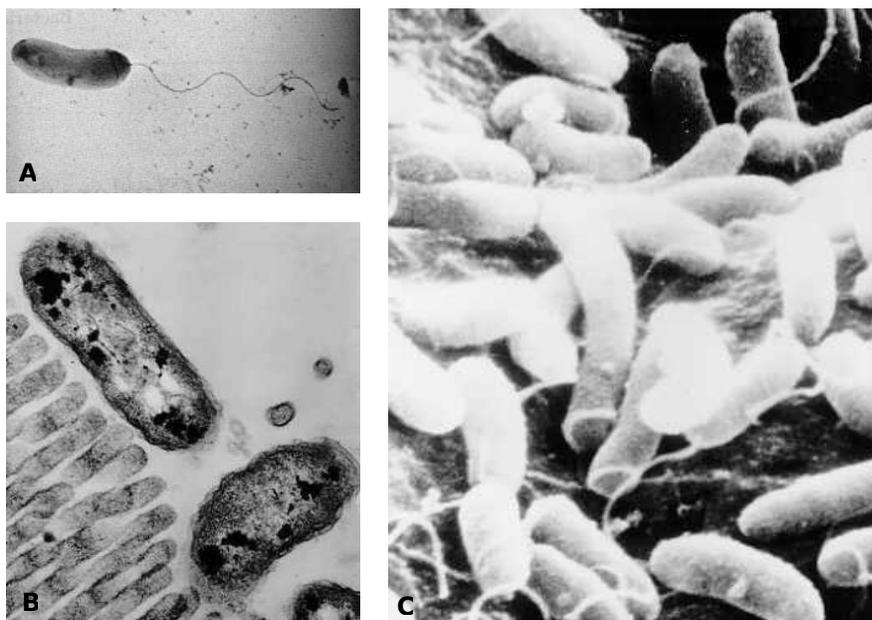
La teoría de Koch también tuvo sus detractores, uno de ellos fue el profesor alemán Max von Pettenkofer, quien hizo alarde de heroísmo científico cuando quiso demostrar lo erróneo de esa teoría con un experimento hecho sobre sí mismo. En 1885, para horror de Robert Koch y de una audiencia de científicos y estudiantes de medicina en Berlín, Pettenkofer deglutió un caldo de cultivo de esta bacteria procedente de un enfermo colérico para probar que no era la causa del cólera. Primero bebió una solución de bicarbonato de sodio para neutralizar el pH ácido gástrico, ya que esta bacteria es muy sensible al ácido clorhídrico, y acto seguido, ingirió el caldo de cultivo. Pero no contrajo la enfermedad porque padecía de hiperclorhidria. Así se demostró que no bastaba la presencia de las bacterias dentro del cuerpo humano para que se produjese la enfermedad, sino que también era importante el estado del huésped.

En la actualidad, *Vibrio cholerae* es una bacteria que está bien caracterizada bioquímicamente, y se clasifica en serogrupos en función de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) (Baumann y col., 1984). De los cerca de 200 serogrupos identificados hasta el momento, solamente dos de ellos, O1 y O139, se reconocen como los únicos responsables de las epidemias de cólera. A su vez, el grupo de cepas del serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos: *clásico* y *El Tor*, y en cada uno de ellos se distinguen tres serotipos distintos: Inaba, Ogawa e Hikojima. El resto de serogrupos se les denomina comúnmente como no-O1/no-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones extraintestinales. Aunque, de forma ocasional, se pueden encontrar cepas no-O1/no-O139 que produzcan la toxina colérica u otros factores de virulencia, pero sin causar ningún brote epidémico (Kaper y col., 1995).

V. cholerae presenta un ciclo de vida libre, formando parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos, tanto de aguas saladas como dulces, en la que a menudo se encuentra asociada como comensal a diversos organismos acuáticos. Se ha descrito que puede adherirse a la quitina de los caparazones de algunos crustáceos y puede colonizar las superficies de algas, fitoplancton, copépodos y raíces de plantas acuáticas (Colwell y Huq, 1994; Faruque y col., 1998). En estos hábitats son aisladas con mayor frecuencia las cepas no-O1/no-O139. Sin embargo, la adquisición de factores de virulencia por parte de algunas de estas cepas las capacita para colonizar la mucosa del intestino delgado humano, en donde persisten, se multiplican y producen la toxina causante del cólera (Kaper y col., 1995).

Figura 1.3 Diferentes estilos de vida de *V. cholerae*.

(Fotografías de microscopía electrónica de barrido y de transmisión del trabajo de Nelson y col. (1976), A: la bacteria presenta forma de coma y un flagelo polar, y habita normalmente ambientes acuáticos; B y C: vibrios adheridos a la superficie de la mucosa intestinal).

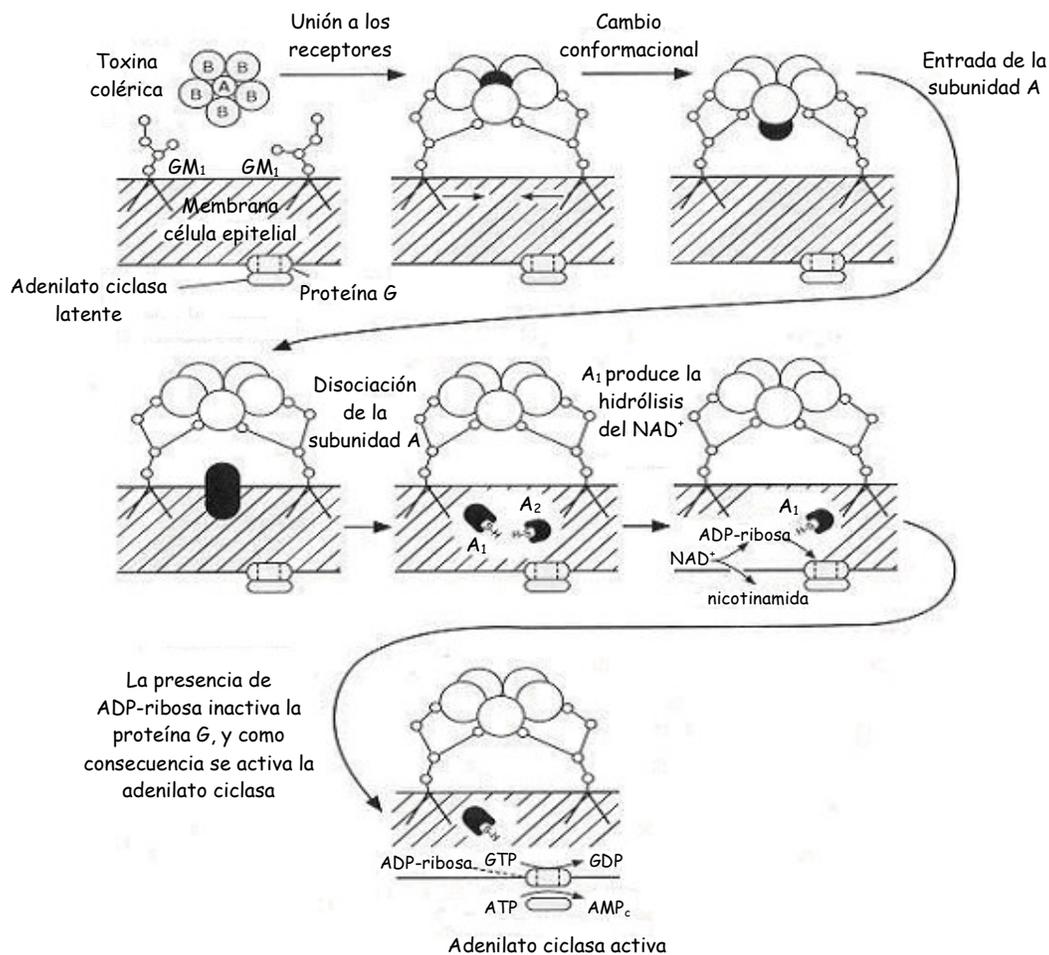


La supervivencia y multiplicación de la bacteria en el hábitat intestinal está facilitada por la presencia de una serie de factores: el *flagelo*, que permite a la bacteria moverse por la mucosa intestinal; y los *pili*, que facilitan la adherencia a las células epiteliales. Además, produce una potente *enterotoxina* (CT), causante de los distintos síntomas clínicos de la

enfermedad, y varias *enzimas* que actúan a nivel de la mucosa intestinal (neuraminidasas, mucinasas y proteasas), ayudando a esta colonización.

La estructura de la toxina colérica (CT) y su mecanismo de acción están perfectamente establecidos (Fig. 1.4). Esta toxina termolábil está compuesta por una subunidad A, formada por el dímero A_1 y A_2 , y 5 subunidades B. Todas estas subunidades están codificadas por el operón *ctxAB*. Las subunidades B tienen una alta afinidad por los receptores gangliósidos GM_1 de las células epiteliales, pero por sí solos no causan una alteración en la permeabilidad de la membrana celular. La acción tóxica es debida a la cadena polipeptídica A_1 , que penetra dentro de la célula y activa la enzima adenilato ciclasa, causando la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Este aumento de los niveles de AMPc produce la pérdida de iones y agua a la luz intestinal.

Figura 1.4 Estructura y mecanismo de acción de la toxina colérica (CT).



El hombre es el único huésped conocido de *V. cholerae*, aunque se postula de la existencia de reservorios ambientales, aún no identificados, donde los vibriones permanecerían en estado latente (vivos pero no cultivables). También se ha postulado que los cambios climáticos, como el fenómeno del Niño, influirían en la aparición de nuevos brotes de cólera. Estos cambios marcarían el inicio de una serie de eventos concatenados, como el incremento de la temperatura del agua, de la concentración de nutrientes y de la población de plancton, que se han asociado con el aumento del número de casos de cólera (Colwell, 1996).

Con ayuda de las técnicas moleculares, junto con la reciente secuenciación completa de los dos cromosomas circulares que presenta esta bacteria (Heideberg y col., 2000), se ha podido determinar que la patogénesis de *V. cholerae* es un proceso complejo. Estos estudios han revelado que las cepas patógenas, además de tener los genes que codifican para la CT, también presentan los genes que codifican para un factor de colonización llamado TCP (toxin co-regulated pilus) y los de una proteína reguladora ToxR, la cual coregula la expresión de la CT y de TCP (Herrington y col., 1988). Estos genes se hallan dentro de elementos genéticos mayores, repartidos en el cromosoma I (mayor) de la bacteria, que se adquieren horizontalmente mediante la infección de bacteriófagos.

El operón *ctxAB*, que codifica la toxina colérica, forma parte del genoma de un bacteriófago filamentoso llamado CTXØ, de 6,9 kb, que se encuentra lisogenizado en la bacteria (Waldor y col., 1996). Este genoma fágico está compuesto por dos dominios funcionalmente distintos, la región central ó "core" y la región RS2. En la región central se encuentran, entre otros, los genes de la toxina colérica (*ctxAB*), los genes implicados en la morfogénesis del bacteriófago (*psh*, *cep*, *orfU* y *ace*), y un gen que codifica una proteína necesaria para el ensamblaje del virión (*zot*). Antes de conocer este origen fágico, algunos de estos genes se consideraban que codificaban otras toxinas relacionadas con la patogénesis del cólera, por ejemplo el *zot* (zonula occludens toxin) aumentaba la permeabilidad de la mucosa intestinal y el *ace* (accessory cholera enterotoxin) era capaz de inducir la acumulación de líquidos. La región RS2 incluye los genes necesarios para la replicación (*rstA*), integración (*rstB*) y regulación (*rstR*) de CTXØ. Además, se ha visto que las cepas toxigénicas pueden llevar una o más copias del operón *ctxAB*.

En relación al TCP, éste actúa como receptor del bacteriófago CTXØ, y promueve la colonización del epitelio intestinal por parte de la bacteria. Los genes que codifican el factor TCP están dentro de una isla de patogenicidad VPI (Vibrio Pathogenicity Island), de 40 kb,

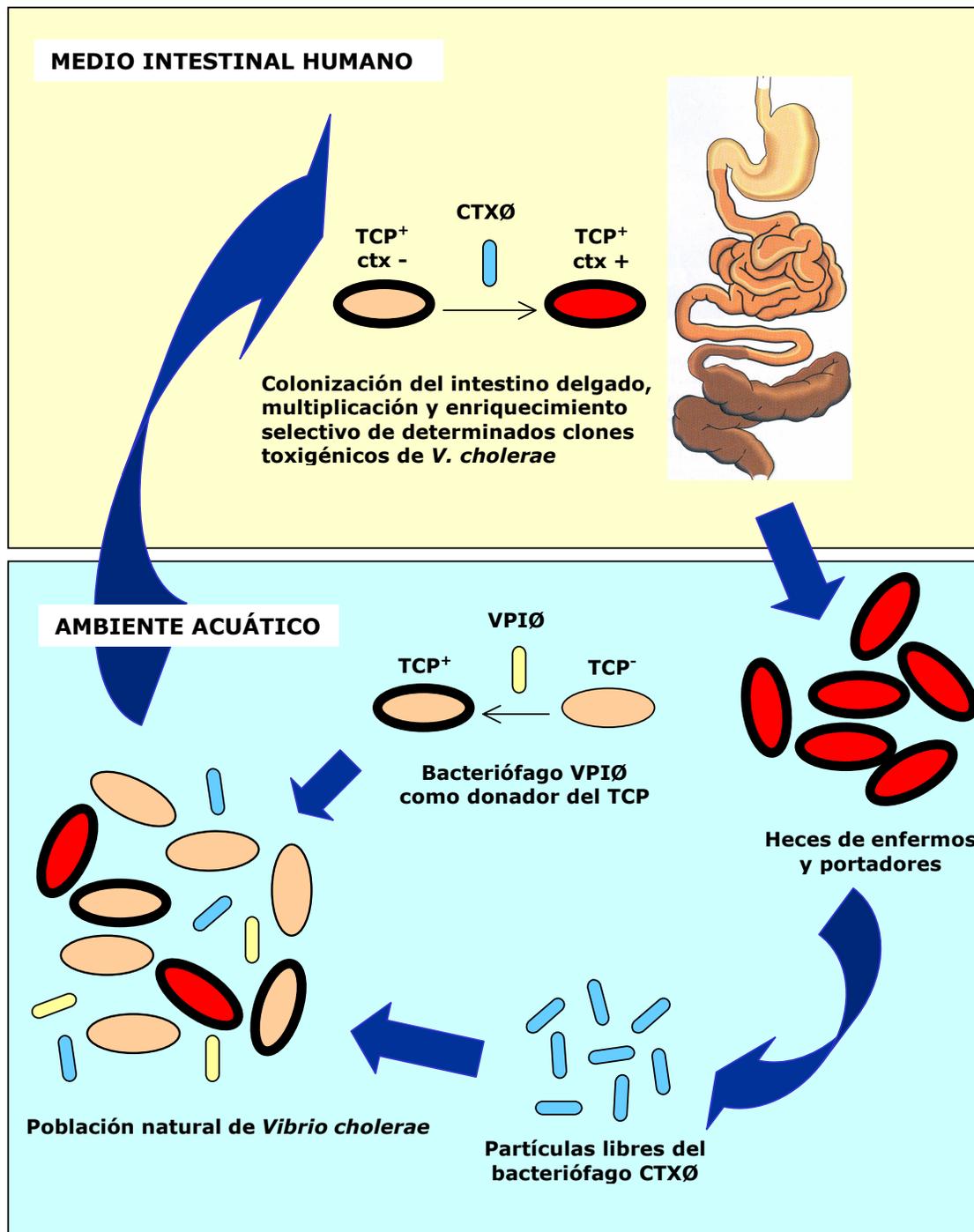
que también es transferida por otro bacteriófago filamentoso denominado VPIØ (Karaolis y col., 1998).

La hipótesis actual que se está configurando para explicar la emergencia de nuevos clones epidémicos de *V. cholerae* sería una secuencia de sucesos concatenados en el medio acuático y en el intestino humano, en los que participarían los bacteriófagos CTXØ y VPIØ, sobre una población de *V. cholerae* capaz de sobrevivir a las defensas inmunitarias del ser humano (Fig. 1.5). Se ha demostrado que a partir de cepas toxigénicas de los serogrupos O1 y O139, se pueden inducir la síntesis de nuevas partículas del bacteriófago CTXØ. Este proceso tiene lugar en ambientes naturales acuáticos, aunque los factores ambientales inductores no se han identificado. También en este medio se produce la transducción por parte del bacteriófago VPIØ de la isla de patogenicidad VPI, que incluye el factor TCP necesario para la posterior infección por parte del bacteriófago CTXØ. Pero la transformación de cepas no patógenas a patógenas sólo puede tener lugar dentro de su huésped, el hombre. Para ello, debe ingerirse un número elevado de bacterias para superar la barrera gástrica, y al llegar a su hábitat, el intestino delgado, el bacteriófago CTXØ infecta aquellas bacterias en las que reconoce su receptor, el TCP. En este proceso las bacterias adquieren el operón que codifica la toxina colérica, y se transforman en patógenas, iniciándose el proceso de colonización, multiplicación y producción de la CT. El ciclo se cierra cuando las heces de los enfermos y portadores, con un número elevado de bacterias toxigénicas, contaminan ambientes acuáticos naturales (Faruque y col., 1998).

La secuenciación del genoma de *V. cholerae* ha revelado la presencia de otras toxinas desconocidas, entre ellas destaca la toxina RTX, la cual es codificada por un elemento genético situado muy cerca del lugar de inserción del genoma CTXØ. Esta toxina rompe los filamentos de actina, que es una proteína implicada en la contracción del músculo (DiRita, 2000). Este efecto es inesperado para una toxina bacteriana, y aún queda por determinar que papel juega en la patogénesis del cólera.

También se han identificado productos génicos implicados tanto en las fases patógenas como no patógenas de *V. cholerae*. Por ejemplo, el PilD es una proteasa necesaria para la secreción de la toxina colérica (CT) y para el ensamblaje de un apéndice extracelular llamado hemaglutinina manosa-sensible (MSHA). Esta hemaglutinina no es un factor de virulencia pero está implicada en la formación de biofilms, característica que se ha observado recientemente en ambientes acuáticos, ya que facilitaría la supervivencia de la bacteria (Watnick y col., 1999).

Figura 1.5 Modelo propuesto de emergencia de nuevas cepas patógenas de *V. cholerae*.



Además de factores de potencial importancia para la patogenicidad de *V. cholerae*, se han identificado genes que codifican para proteínas metabólicas, transportadores, y proteínas de regulación cuya expresión ayuda a la adaptación de la bacteria a nichos fuera del intestino delgado humano. Por ejemplo, *V. cholerae* tiene unas proteínas quimiotácticas (MCPs, methyl-accepting chemotaxis proteins) que regulan su movilidad en el agua en respuesta a la presencia de aminoácidos, azúcares y oxígeno. La cepa K12 de *Escherichia coli* tiene sólo 5 MCPs, el patógeno *Campylobacter jejuni* presenta 10 MCPs, y sorprendentemente en *V. cholerae* se han identificado 43 MCPs distribuidos entre los dos cromosomas (DiRita, 2000). Este número tan elevado de MCPs puede ser debido al incremento de duplicaciones génicas, y por tanto existiría una redundancia en la función, o bien es posible que cada una de estas proteínas regule la movilidad en respuesta a distintas moléculas quimiotácticas.

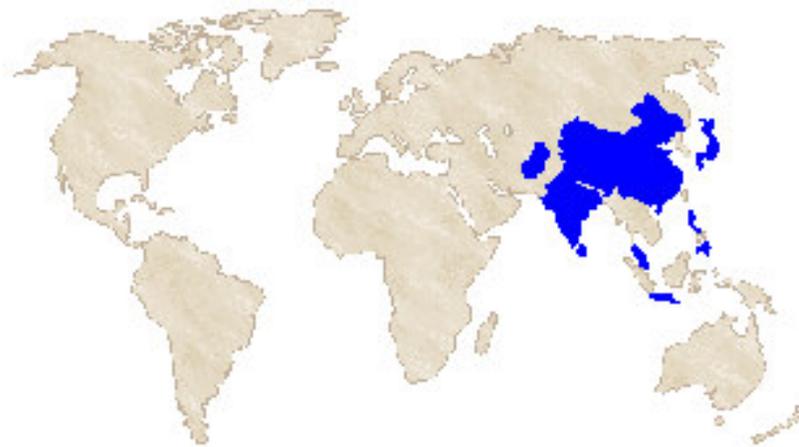
La era postgenómica de *V. cholerae* está empezando, aún nos queda mucha información por desvelar a partir del genoma secuenciado de *V. cholerae*. Aunque conocemos los principales factores implicados en la virulencia de esta bacteria, será importante identificar los genes y mecanismos implicados en la interacción bacteria-huésped durante la infección, así como en la interacción de la bacteria en los ambientes acuáticos naturales, tanto en estado libre como asociada a biofilms u otros organismos acuáticos.

1.3.2 LA ENFERMEDAD

El cólera es una enfermedad infecciosa aguda que se conoce desde hace mucho tiempo. Históricamente, parece muy probable que el cólera emergiera después del Neolítico, hace aproximadamente unos 10.000 años, cuando el desarrollo de la agricultura cambió el comportamiento humano hacia el sedentarismo, creándose los primeros poblados (Byun y col., 1999). Existen antecedentes escritos que hablan de ella en China, India y la Grecia clásica, por ejemplo es citada por Hipócrates, Galeno y en los escritos sánscritos (Colwell, 1996). Durante muchos siglos el cólera ha sido endémico de áreas del sudeste asiático, sobretodo en India y Bangladesh (Fig. 1.6), pero también puede aparecer en forma de epidemias que afecten a uno o más continentes.

Esta enfermedad se caracteriza por desarrollar bruscamente una intensa diarrea acuosa, habitualmente indolora y con vómitos ocasionales. Son heces muy líquidas con presencia de mucosidad pero sin sangre, adquiriendo un aspecto característico que comúnmente se les denomina "heces de agua de arroz".

Figura 1.6 Distribución de las áreas endémicas del cólera en el sudeste asiático.



Estas características clínicas hacen que en ocasiones sea casi imposible distinguirla de otras infecciones diarreicas. La mayoría de los afectados presenta un cuadro leve, aunque en algunos casos la deshidratación puede llegar a ser extrema y progresiva (puede exceder de 20 litros al día), ocasionando la muerte en cuestión de horas si no recibe un tratamiento adecuado rápidamente.

La forma de contagio es por ingestión de agua o alimentos contaminados con heces y/o vómitos de enfermos o portadores. Los estudios con voluntarios humanos han sido útiles para definir el porcentaje de bacterias que se debe ingerir para padecer la enfermedad. Se ha demostrado que la administración oral de 10^{11} bacterias a voluntarios sanos, rara vez produce signo alguno de infección, pero tras la neutralización del pH ácido del estómago con bicarbonato, se produce la enfermedad con 10^4 microorganismos. El bajo pH del estómago es un importante mecanismo de defensa inespecífico contra *V. cholerae*.

Tras un corto período de incubación que oscila entre unas horas y cinco días, la bacteria se localiza en el intestino delgado, coloniza la superficie de la mucosa epitelial, y secreta la toxina colérica, que es la responsable de la diarrea que ocasiona. La evolución del enfermo depende de la pérdida de agua y electrolitos, si es menor del 5% del peso corporal sólo provoca sed, si se sitúa entre el 5 y el 8% produce hipotensión postural, debilidad y taquicardia, y si supera el 10%, la situación es grave, aparece la piel arrugada, deterioro mental y shock hipovolémico, concluyendo con la muerte del enfermo si no es tratado rápidamente.

Como tratamiento frente al cólera, se necesita una reposición de líquidos y electrolitos. En la mayoría de los casos se administra una solución de sales de rehidratación oral, pero ante una deshidratación muy acusada, es necesaria la reposición intravenosa de los líquidos y solutos perdidos. Sólo en los casos graves está indicado el uso de antibióticos, siendo la tetraciclina el fármaco de elección. Pero está aumentando la resistencia a este medicamento, en cuyo caso se recomienda utilizar otros antibióticos como la doxiciclina, la eritromicina, el cloranfenicol y la furazolidina.

Dada su gravedad, el cólera es una enfermedad de declaración obligatoria universal. Todos los casos se han de notificar a los organismos sanitarios oficiales de cada país para que apliquen las medidas de control necesarias para evitar su propagación.

En cuanto a las medidas de prevención, éstas se basarían de forma general en la desinfección de la red de abastecimiento de agua, la adecuada eliminación de las heces, la mejora en el estado de nutrición de la población, y la correcta manipulación y conservación de alimentos que puedan consumirse crudos.

En ningún caso se recomienda la vacunación masiva de la población, dada la escasa eficacia de las vacunas clásicas parenterales, ya que proporcionan una protección muy corta (menos de 6 meses). Por eso, en 1973 la Asamblea Mundial de la Salud modificó el Reglamento Sanitario Internacional, de modo que no se exige a ningún viajero la vacunación contra el cólera. En la actualidad, las investigaciones más recientes están dirigidas al desarrollo de vacunas orales. Entre éstas, destacan dos por la mayor respuesta inmune obtenida, una con bacterias inactivadas con formol y calor, combinada con la subunidad B de la enterotoxina (BS-WC); y otra con bacterias atenuadas (CVD 103-HgR), en la que con ayuda de técnicas moleculares se ha eliminado el gen que codifica la subunidad A de la CT, manteniendo la subunidad B con capacidad de producir respuesta inmunitaria. Sin embargo, ninguna de estas vacunas orales ha logrado superar la protección conferida por la infección natural (uno o dos años) y específica para cada serogrupo/biotipo/serotipo. Por ello, el tema del desarrollo de vacunas contra el cólera continúa siendo una prioridad de investigación.

1.3.3 LA EPIDEMIOLOGÍA DEL CÓLERA

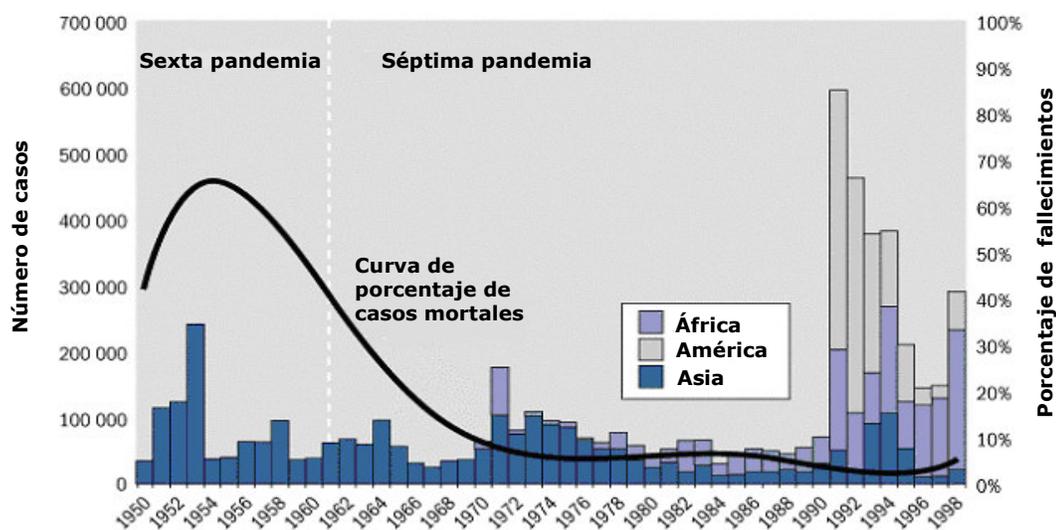
La epidemiología moderna comenzó con el trabajo realizado por John Snow, un físico inglés, sobre una epidemia de cólera acaecida en 1854 en Londres. Su laborioso estudio le

condujo a descubrir la forma de transmisión de la enfermedad, las aguas contaminadas de un pozo del cual se abastecieron los enfermos. Con su trabajo, Snow definió las características epidemiológicas del cólera y estableció las bases para su prevención y control.

Existe una cierta discrepancia entre los historiadores médicos sobre cuando el cólera se propagó fuera de Asia. Se considera que hasta el siglo XIX, las epidemias de cólera se producían en áreas endémicas del sudeste asiático. Pero, en 1817 se inicia la primera pandemia de cólera fuera de Asia, y desde entonces se han producido 7 pandemias por todo el mundo (1ª pandemia: 1817-1823; 2ª pandemia: 1829-1851; 3ª pandemia: 1852-1859; 4ª pandemia: 1863-1879; 5ª pandemia: 1881-1896; 6ª pandemia: 1899-1923; 7ª pandemia: 1961- actualidad) (Blake, 1994). La quinta y la sexta pandemia fueron causadas por cepas de *V. cholerae* O1 biotipo *clásico*, pero la naturaleza de las cepas que produjeron las 4 primeras pandemias se desconoce.

Hasta ese momento, todas las epidemias se habían iniciado en el continente asiático. Sin embargo, la séptima pandemia comenzó en Indonesia (Islas Célebes) en 1961, desde donde se propagó rápidamente al este de Asia, después en 1970 llegó a África, y en 1991 a América Latina, extendiéndose hasta Estados Unidos. El responsable es *V. cholerae* O1 biotipo *El Tor*, aislado por Gotschlich en cadáveres de peregrinos procedentes de La Meca muertos por la enfermedad, en una estación de cuarentena de la península del Sinaí Este (Blake, 1994).

Figura 1.7 Evolución del número de casos de cólera y de fallecimientos por esta enfermedad declarados a la OMS por continente entre los años 1950 y 1998 (Fuente: OMS, 2001).



En la actualidad, la séptima pandemia sigue su curso, y después de cuarenta años de haberse iniciado no muestra una tendencia al descenso. Presenta diferentes patrones epidemiológicos según la región que afecta. Mientras en determinados países, en su mayoría en vías de desarrollo, la enfermedad es endémica, en otros cursa en forma de brotes epidémicos esporádicos. Las tres áreas endémicas más importantes son: África, Asia y América del Sur y Central. En cambio, en los países desarrollados se detectan casos esporádicos, fundamentalmente importados de áreas endémicas o en las que existe un brote epidémico. Durante el año 2000 se declararon a la OMS un total de 137.071 casos de cólera y 4.908 muertes (WER 2001) (Tabla 1.3), siendo África el continente que notificó un porcentaje mayor de casos (87% del total).

Tabla 1.3 Casos de cólera y fallecimientos por esta enfermedad notificados a la OMS durante el año 2000 por continente (Fuente: OMS, 2001).

Continente – País/área	Casos	Muertos	Continente – País/área	Casos	Muertos
África			América		
Benin	468	11	Brasil	715	17
Burkina Faso	617	14	Canadá	5 (2i)	0
Burundi	1.021	16	Ecuador	27	1
Camerún	123	29	El Salvador	631 (1i)	2
Comores	3.297	91	Guatemala	612	6
Congo	9	2	Honduras	15	3
Rep. Democrática del Congo	14.995	941	México	5	0
Djibouti	1.828	32	Nicaragua	12	1
Ghana	3.331	74	Perú	934	6
Guinea	517	36	Estados Unidos	4 (4i)	0
Kenia	1.157	78	Venezuela	141	4
Liberia	365	10	Total	3.101	40
Madagascar	29.083	1.693	Asia		
Malawi	2.391	56	Afganistán	4.330	198
Mayotte	6	0	China	1.834	1
Mozambique	17.647	253	Hong Kong	12	1
Níger	211	38	India	3.807	18
Nigeria	2.799	43	Irán	345	3
Ruanda	1.235	8	Irak	532	4
Somalia	7.496	563	Japón	34 (32i)	0
Sudáfrica	19.667	68	Malasia	124	1
Swaziland	141	16	Omán	3	0
Togo	338	23	Filipinas	213	6
Uganda	1.595	107	Singapur	10	0
República Unida de Tanzania	4.637	156	Sri Lanka	2	0
Zambia	2.283	156	Total	11.246	232
Zimbawe	1.675	96	Oceanía		
Total	118.932	4.610	Europa		
Oceanía			Alemania	2 (2i)	0
Australia	1 (1i)	0	Reino Unido	33 (33i)	0
Guam	4 (1i)	0	Total	35	0
Islas Marshall	300	6	Total mundial	137.071	4.908
Estados Federales Micronesia	3.452	20			
Total	3.757	26			

Nota: i indica caso importado

En España, la década de los años 70 se caracterizó por la aparición de tres epidemias de cólera, que afectaron a Zaragoza, Barcelona, Valencia y Murcia (1971); Galicia (1975); Málaga y Barcelona (1979). En todas las ocasiones se trató de epidemias que afectaron a amplios territorios y con una incidencia entre 200 y 300 casos. Actualmente, sólo se detectan casos importados aislados.

La década de los 90 ha abierto un nuevo capítulo en la historia del cólera, con el aislamiento de un nuevo serogrupo toxigénico que según algunos autores podría ser el inicio de la octava pandemia. A finales de 1992, aparecieron epidemias de cólera en India y Bangladesh, causadas por una cepa que no se aglutinaba con los antisueros O1 y no-O1 disponibles hasta entonces. Esta nueva cepa, a la que se denominó O139 Bengal, se propagó rápidamente a los países vecinos y desplazó los casos de cólera originados por el serogrupo O1. El cuadro clínico que producía era idéntico al causado por las cepas O1. A partir de estudios moleculares, se ha demostrado que las cepas de *V. cholerae* O139 están muy relacionadas con las cepas O1 *El Tor* de la séptima pandemia, pero tienen varias características que las distinguen. Las cepas O139 tienen cápsula, mientras que las cepas O1 no. El lipopolisacárido (LPS) de O139 contiene colitosa (3,6-dideoxi-L-galactosa), azúcar que no está presente en el LPS de las cepas O1, ni tampoco en el LPS de otras especies de la familia *Vibrionaceae*. Al serogrupo O139 le faltan varios de los genes *rfb*, que son responsables de la síntesis y ensamblaje del antígeno O. Todo ello, ha contribuido que algunos autores postulen que este nuevo serogrupo O139 se originó a partir de una cepa O1 *El Tor* que adquirió DNA extracromosómico, el cual reemplazó los genes *rfb* que codificaban para el antígeno O1 (Bik y col., 1995; Popovic y col., 1995).

Después de la aparición explosiva en 1992, su presencia declinó paulatinamente hasta que en 1994, un nuevo clon de *V. cholerae* O1 *El Tor* reemplazó el serogrupo O139 en Calcuta. En 1996 reapareció en Calcuta un nuevo clon de *V. cholerae* O139, siendo el serogrupo dominante durante el período 1996-1997 (Faruque y col., 2000). Desde 1998 hasta la actualidad, *V. cholerae* O139 sigue confinado en el continente asiático, coexistiendo con cepas O1, pero todavía no se ha propagado a otros continentes.

También se ha comprobado un cambio en la estructura y organización del profago CTXØ en las cepas O139. Aquellas cepas aisladas en el primer período (1992-1993) tienen dos CTXØ conectados por un elemento RS1, mientras que las cepas O139 del segundo período (1996-1997) presentan tres CTXØ dispuestos en tandem. La mayoría de cepas O139 aisladas de Calcuta en 1998 tienen un solo CTXØ, mientras que las cepas O139

procedentes de otras partes de la India en el mismo año presentan la misma organización de CTXØ que el segundo período, o dos CTXØ ordenados en tándem (Basu y col., 2000).

La repentina aparición del serogrupo O139 en 1992, su rápida propagación por el sudeste asiático en 1993, seguido de un período de quiescencia durante los años 1994 y 1995, y su reemergencia y dominación durante los años 1996 y 1997, no se comprende todavía, pero son prueba de la impredecible epidemiología del cólera.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es el de determinar la estructura poblacional y la diversidad génica de poblaciones de *Vibrio cholerae*. Para ello, se pretende aplicar la técnica de electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE) a un conjunto heterogéneo de cepas de *V. cholerae*, y posteriormente, realizar la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLST) para caracterizar, concretamente, la población de *V. cholerae* del serogrupo O139, con la intención de poder corroborar los resultados obtenidos previamente con la técnica de MLEE para este serogrupo.

Por todo ello, el trabajo está estructurado en dos partes diferenciadas según la metodología empleada, y los objetivos marcados son los siguientes:

1. Determinar mediante la técnica de MLEE las relaciones genéticas existentes entre los distintos serogrupos de *V. cholerae*. Para ello, se estudiará una colección de 107 cepas de esta especie, procedentes de diversos países y fuentes de aislamiento.
2. Determinar la estructura genética de esta población de *V. cholerae* y estudiar la importancia relativa de la recombinación mediante el análisis del desequilibrio de ligamiento.
3. Estudiar una colección de 29 cepas del serogrupo O139 de *V. cholerae* para determinar la estructura genética poblacional de dicho serogrupo, analizando su posible clonalidad y origen. Para este estudio se utilizará la técnica de MLST.

3. ELECTROFORESIS DE ALDOLASAS MULTILOCUS (MLEE)

3.1 Material y métodos

3.1.1 CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

El estudio de MLEE se ha realizado con un total de 107 cepas de la especie *V. cholerae*, de las cuales 100 procedían de diferentes orígenes geográficos y 7 son de colección. El total de la muestra agrupa cepas toxigénicas y no toxigénicas de distintos serogrupos y biotipos de esta especie, que fueron aisladas de diversas fuentes, tanto ambientales como clínicas, y que proceden de diferentes países.

Las cepas fueron proporcionadas por R. Montilla (Dept. Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultad Farmacia, Universidad de Barcelona), G. B. Nair (National Institute of Cholera & Enteric Diseases, Calcutta, India), M. A. R. Chowdhury (Marine Laboratory, Department of Microbiology, University of Maryland, USA) y M. Talledo (Laboratorio Microbiología y Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú).

En el trabajo se incluyeron 7 cepas de colección, de las cuales seis (CECT 514, CECT 569, CECT 652, CECT 655, CECT 658, CECT 659) fueron suministradas por la "Colección Española de Cultivos Tipo" (<http://www.uv.es/cect>) y una cepa (ATCC 14035) procedente del "American Type Culture Collection" (<http://www.atcc.org>).

La siguiente tabla muestra las referencias y características más importantes de dichas cepas.

Tabla 3.1 Principales características de las cepas de *V. cholerae* utilizadas en el estudio de MLEE.

Cepa N°	Código referencia	Serogrupo/ Biotipo/ Serotipo	Fuente	Origen geográfico	Fecha aislamiento	Presencia ctxAB
1	TM35123-77	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1977	ctx -
2	TM34162-77	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1977	ctx -
3	TM52479-78	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1978	ctx -
4	TM9024-79	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1979	ctx -
5	TM23256-79	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1979	ctx -
6	TM19225-79	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1979	ctx -
7	GGPB10	No tipado	NC	Brasil	NC	NC
8	TM17015-82	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1982	ctx -
9	TM48733-82	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1982	ctx -
10	TM1187-83	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1983	ctx -
11	CT10738-92	No-O1/no-O139	Río	Brasil	1992	ctx -
12	CT10834-92	No-O1/no-O139	Río	Brasil	1992	ctx -
13	CT12009-92	No-O1/no-O139	A. residuales	Brasil	1992	ctx -
14	GGPB29	No tipado	NC	Brasil	NC	NC
15	GM30-90	No-O1/no-O139	Ostra	Brasil	1990	ctx -
16	GM31-90	No-O1/no-O139	Ostra	Brasil	1990	ctx -
17	GM33-90	No-O1/no-O139	Mejillón	Brasil	1990	ctx -
18	GM34-90	No-O1/no-O139	Mejillón	Brasil	1990	ctx -
19	GM35-90	No-O1/no-O139	Mejillón	Brasil	1990	ctx -
20	GM36-90	No-O1/no-O139	Mejillón	Brasil	1990	ctx -
21	GM37-90	No-O1/no-O139	Mejillón	Brasil	1990	ctx -
22	GM38-90	No-O1/no-O139	Mejillón	Brasil	1990	ctx -
23	CT7606-93	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1993	ctx +
24	CT9995-93	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1993	ctx +
25	TM11079-80	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1980	ctx -
26	GGPB44	No tipado	NC	Brasil	NC	NC
27	TM207832-78	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1978	ctx -
28	CT25016-91	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1991	ctx -
29	CT7021-94	O1 <i>El Tor</i>	Río	Brasil	1994	ctx +
30	TM16457-78	O1 <i>clásico</i>	A. residuales	Brasil	1978	ctx -
31	CT7649-94	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1994	ctx +
32	CTMARM12-92	O1 <i>El Tor</i>	Río	Brasil	1992	ctx +
33	CTMACMI1-92	O1 <i>El Tor</i>	A. residuales	Brasil	1992	ctx +
34	Mx121	No-O1/no-O139	Heces	México	NC	ctx +
35	Mx129	No-O1/no-O139	Heces	México	NC	ctx -
36	Mx134	No-O1/no-O139	Heces	México	NC	ctx -
37	Mx157	No-O1/no-O139	Heces	México	NC	ctx -
38	Mx158	No-O1/no-O139	Heces	México	NC	ctx -
39	Mx159	No-O1/no-O139	Heces	México	NC	ctx -

Cepa N°	Código referencia	Serogrupo/ Biotipo/ Serotipo	Fuente	Origen geográfico	Fecha aislamiento	Presencia ctxAB
40	AT01	O49	Clínica	India	1993	ctx +
41	CO391	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
42	CO407	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
43	CO484	O5	Ambiental	India	1993	ctx -
44	CO487	O1 <i>El Tor</i> Ogawa	Clínica	India	1993	ctx +
45	CO870	O1 <i>El Tor</i> Ogawa	Ambiental	India	1993	ctx -
46	SG24	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
47	1-7/31	O1 <i>El Tor</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
48	6-3/6	O1 <i>El Tor</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
49	NT330	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
50	CO402	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
51	CO414	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
52	NT642	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
53	BO1	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
54	2030 H	No-O1/no-O139	Ambiental	EEUU	NC	NC
55	NT329	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
56	25872	No-O1/no-O139	Ambiental	NC	NC	NC
57	BLO9	O1 <i>El Tor</i>	Clínica	Bangladesh	1993	ctx +
58	MDO90	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
59	SO29	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
60	CO406	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
61	VO6	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
62	BO2	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
63	CO404 NT656	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
64	SO30	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
65	CO417	O1 <i>El Tor</i>	Heces	India	1993	NC
66	3-6/2	No-O1/no-O139	Ambiental	EEUU	NC	NC
67	5-6/37	O1 <i>clásico</i>	Ambiental	Tanzania	NC	NC
68	1196/78	O1 <i>clásico</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
69	CO403	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
70	2076/29	No-O1/no-O139	Ambiental	NC	NC	NC
71	3-6/69	O1 <i>El Tor</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
72	MEX332	O1 <i>clásico</i>	Clínica	México	NC	ctx +
73	NM4392	O1 <i>El Tor</i>	Clínica	NC	NC	ctx +
74	329	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
75	34-1	No-O1/no-O139	Ambiental	NC	NC	NC
76	1-7/69	O1 <i>El Tor</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
77	MEX445	O1 <i>clásico</i>	Clínica	México	NC	ctx +
78	NM286	O1 <i>El Tor</i>	Clínica	India	NC	ctx +
79	653/36	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
80	25873	No-O1/no-O139	Ambiental	NC	NC	NC

Cepa Nº	Código referencia	Serogrupo/ Biotipo/ Serotipo	Fuente	Origen geográfico	Fecha aislamiento	Presencia ctxAB
81	CO396 NT646	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
82	3-6/3	No-O1/no-O139	Ambiental	EEUU	NC	NC
83	6-3/2	O1 <i>El Tor</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
84	6-3/50	No-O1/no-O139	Ambiental	EEUU	NC	NC
85	NPO388	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
86	CO416	O1 <i>El Tor</i>	Heces	India	1993	NC
87	NT648	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
88	NPO390	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
89	SO19	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
90	CO415	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
91	MOD084	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
92	NT638	O139	Clínica	India	1992/1993	ctx +
93	1074-78	O1 <i>clásico</i>	Ambiental	EEUU	NC	NC
94	BO4	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
95	CO418	O139	Heces	India	1992/1993	ctx +
96	ALVC-91-0803	O1 <i>El Tor</i> Inaba	Clínica	Perú	1991	ctx +
97	ALVC-91-1019	O1 <i>El Tor</i> Ogawa	Clínica	Perú	1991	ctx +
98	ALVC-92-0344	O1 <i>El Tor</i> Inaba	Clínica	Perú	1992	ctx +
99	ALVC-92-0534	O1 <i>El Tor</i> Hikojima	Clínica	Perú	1992	ctx +
100	ALVC-93-0024	O1 <i>El Tor</i> Ogawa	Clínica	Perú	1993	ctx +
101	CECT 514	O1 <i>clásico</i> Ogawa	Heces	Reino Unido	1949	ctx +
102	CECT 569	O1 <i>clásico</i> Inaba	Clínica	India	1948	ctx +
103	CECT 652	O1 <i>El Tor</i>	Clínica	NC	NC	ctx +
104	CECT 655	No-O1/no-O139	Aguas	Bangladesh	1989	NC
105	CECT 658	No-O1/no-O139	Aguas	Bangladesh	1989	NC
106	CECT 659	No-O1/no-O139	Aguas	Bangladesh	1989	NC
107	ATCC14035	O1 <i>clásico</i> Ogawa	Clínica	Reino Unido	NC	ctx +

Nota: A. residuales indica aguas residuales, y NC indica dato no conocido.

En las siguientes figuras se muestra la distribución de cepas de *V. cholerae* utilizadas en este estudio según su clasificación en serogrupos y biotipos (Fig. 3.1), su procedencia geográfica (Fig. 3.2) y su fuente de aislamiento (Fig. 3.3).

Figura 3.1 Serogrupos y biotipos de las cepas de *V. cholerae* estudiadas con la técnica MLEE.

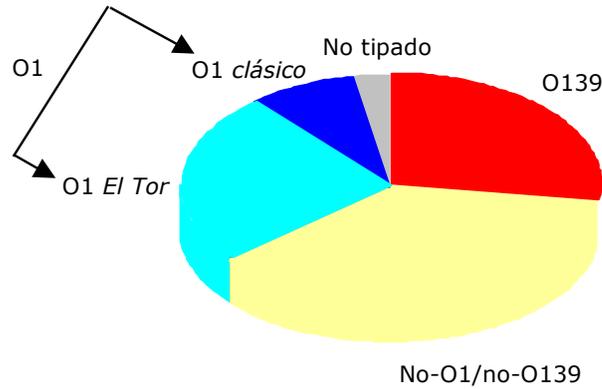


Figura 3.2 Origen geográfico de las cepas de *V. cholerae* estudiadas.

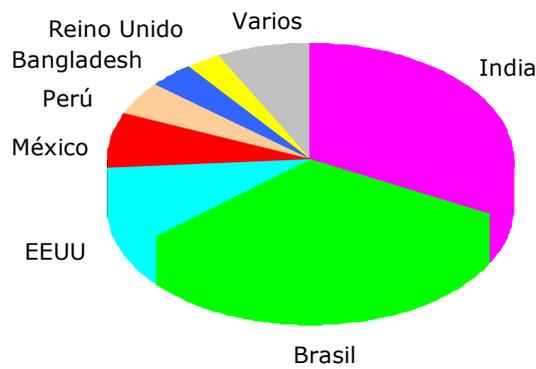
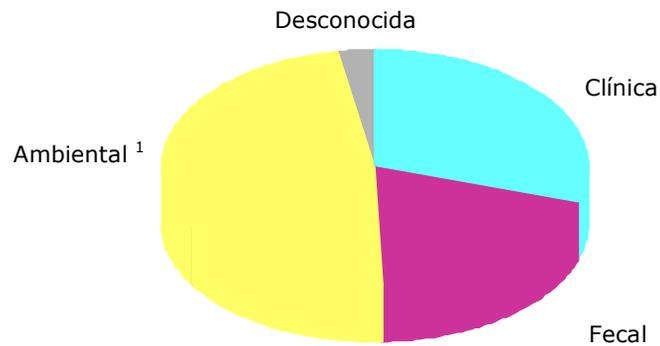


Figura 3.3 Fuente de aislamiento de las cepas de *V. cholerae* utilizadas en este estudio.



¹ Dentro del grupo ambiental se han incluido todas las cepas aisladas de fuentes ambientales, incluyendo aquellas que fueron obtenidas a partir de aguas, tanto residuales como naturales, y de moluscos.

3.1.2 SOLUCIONES Y TAMPONES

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

3.1.2.1 Ringer ¼

Esta solución isotónica se ha utilizado para realizar los lavados de células en la preparación de las muestras. Se prepara la solución disolviendo un comprimido (Oxoid BR52) en 500 ml de agua destilada. El pH de la solución es de 7,2. Se esteriliza al autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

4.1.2.2 Tampón TE- NADP

Esta solución tamponada (10mM Tris – 1mM EDTA – 0,5mM NADP, pH 6,8) se utilizó para preparar los extractos proteicos de cada una de las cepas estudiadas.

Composición:

Solución 1: Tris 0,5M	2 ml
Solución 2: EDTA 0,5M	0,2 ml
Agua destilada	csp. 100 ml

Esterilizar la mezcla en el autoclave a 121 °C durante 20 min.

NADP	0,039 mg
------	----------

Previamente, se prepararon 2 soluciones: una de Tris 0,5M (60,6 g Tris-(hidroximetil)-aminometano en 1 l de agua destilada; Fluka 93352) y otra de EDTA 0,5M (186,1 g de ácido etilendiaminatetracético en 1 l de agua destilada; Sigma ED2SS). Las dos soluciones se mezclaron en un matraz en la proporción indicada, y se enrasó hasta 100 ml con agua destilada.

La solución resultante se esterilizó en autoclave, y después se le añadió 0,039 mg de NADP (sal sódica de β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; Sigma N-3886), cantidad necesaria para obtener una molaridad de 0,5mM en la solución final. Se comprobó el pH de la solución, que debe ser de 6,8 y, si fue necesario, se ajustó con una solución de NaOH 0,1N. Se guardó en la nevera a 4 °C hasta su uso.

3.1.2.3 Solución de acrilamida / bisacrilamida al 30%

Esta solución se utilizó para la preparación de geles de poliacrilamida.

Composición:

Acrilamida PAGE	29,2 g
N-N'-metilen-bis-acrilamida	0,8 g
Agua destilada	csp. 100 ml

Se preparó pesando la cantidad necesaria de acrilamida (Acrilamida PAGE, Pharmacia 17-1302-02) y bisacrilamida (N-N'-metilen-bis-acrilamida, Pharmacia 17-1304-01), utilizando guantes y mascarilla como protección debido a su efecto tóxico. Se mezclaron los solutos en un vaso de precipitados con $\frac{3}{4}$ partes aproximadamente del agua destilada que se requiere. Se homogeneizó la mezcla manteniendo tapado el vaso de precipitados con papel de aluminio porque son productos muy sensibles a la luz.

La solución disuelta se filtró para eliminar las impurezas que pudiesen llevar los solutos. Una vez filtrado, se acabó de enrasar en un matraz aforado hasta volumen final con agua destilada. La solución se guardó protegida de la luz y a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

3.1.2.4 Tampones Tris / HCl

Se han utilizado tampones Tris / HCl de diferente molaridad y pH para preparar los geles de poliacrilamida (apartado 3.1.9), la solución de azul de bromofenol que se añade a la muestra para ver como transcurre el proceso de electroforesis (apartado 3.1.2.5), y como componente de diferentes tinciones enzimáticas específicas (apartado 3.1.12).

Se prepararon estos tampones pesando la cantidad necesaria de Tris (Tris-(hidroximetil)-aminometano; Fluka 93352) y mezclándolo en un vaso de precipitados con $\frac{3}{4}$ partes aproximadamente del agua destilada necesaria. Una vez disuelto se midió el pH de la solución resultante, y se ajustó con una solución de HCl 0,1N al pH requerido. Por último, se acabó de enrasar con agua destilada hasta volumen final. Todas estas soluciones se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Tabla 3.2 Uso y composición de tampones Tris / HCl de diferentes concentraciones y pH.

	Tampones	Composición
Preparación de geles	Tris / HCl 0,125M pH 6,8	15,1 g Tris en 1 l de agua destilada
	Tris / HCl 0,4M pH 8,8	48,5 g Tris en 1 l de agua destilada
	Tris / HCl 0,8M pH 8,8	96,9 g Tris en 1 l de agua destilada
Solución de azul de bromofenol	Tris / HCl 0,2M pH 8,8	24,2 g Tris en 1 l de agua destilada
Tinciones específicas	Tris / HCl 0,02M pH 7,0	2,4 g Tris en 1 l de agua destilada
	Tris / HCl 0,2M pH 8,8	24,2 g Tris en 1 l de agua destilada
	Tris / HCl 0,5M pH 7,1	60,6 g Tris en 1 l de agua destilada

3.1.2.5 Solución de azul de bromofenol

Esta solución se utilizó para preparar las muestras que van a ser sometidas a electroforesis en los geles de poliacrilamida. El glicerol, por su elevada densidad, ayuda a que las muestras depositadas en los pocillos de los geles verticales queden compactadas en la parte inferior, y el azul de bromofenol es un colorante que permite seguir el frente de las muestras durante todo el proceso de electroforesis y saber así cuando llegan al final del gel para detener la electroforesis.

Composición:

Glicerol	8 ml
Tris / HCl 0,2M pH 8,8	2 ml
Azul de bromofenol csp. 0,05%	aprox. 5 mg

Se preparó mezclando el glicerol y el tampón Tris / HCl 0,2M pH 8,8 (apartado 3.1.2.4) en un tubo de ensayo, y añadiendo seguidamente la cantidad necesaria de azul de bromofenol. La solución se homogeneizó y se mantuvo a 4 °C protegida de la luz.

3.1.2.6 Tris / glicina 0,19 M

Esta solución se utilizó como tampón de electroforesis, el cual permite el contacto directo de los electrodos con los geles de poliacrilamida. En nuestro caso se requirieron entre 1,5 y 2 litros de este tampón para cada cubeta de electroforesis.

Composición:

	x1	x5
Tris-(hidroximetil)-aminometano	3,0 g	15,1 g
Glicina	14,4 g	72,0 g
Agua destilada	csp. 1000 ml	csp. 1000 ml
pH final 8,3 – 8,7		

Se preparó mezclando en un vaso de precipitados los solutos (tris y glicina) con una parte del volumen del agua destilada necesaria y una vez disuelto, se enrasa con agua destilada hasta volumen final. Se ha de comprobar el pH final de la solución que ha de estar entre 8,3 y 8,7. Como el volumen requerido de este tampón puede ser bastante elevado se acostumbra a preparar cinco veces concentrado.

3.1.2.7 Tampón fosfato pH 7,0

Esta solución tamponada se utilizó para realizar algunas de las tinciones enzimáticas específicas (apartado 3.1.12). Para ello, fue necesario preparar previamente la solución 1 de Na_2HPO_4 0,2M (28,4 g de fosfato disódico en 1 l de agua destilada; Fluka 71642) y la solución 2 de NaH_2PO_4 0,2M (31,2 g de fosfato monosódico en 1 l de agua destilada; Panreac 141677).

Composición:

Solución 1: Na_2HPO_4 0,2 M	30,5 ml
Solución 2: NaH_2PO_4 0,2 M	19,5 ml
Agua destilada	csp. 100 ml
pH 7,0	

Se mezclaron en un vaso de precipitados 30,5 ml de solución Na_2HPO_4 0,2M y 19,5 ml de solución NaH_2PO_4 0,2M, y en un matraz aforado se enrasó hasta 100 ml con agua destilada.

Se ha de comprobar que el pH de la solución resultante es de 7,0. Por último, este tampón preparado se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se conservó a 4 °C hasta su uso.

3.1.2.8 Solución de secado de geles

Esta solución se utilizó para preparar los geles previo a su secado con aire caliente (apartado 3.1.14). Se sumerge el gel en una cubeta en contacto con 80-100 ml de esta solución, en agitación, durante 15-30 minutos antes de proceder a su secado.

Composición:

Glicerol	10-20 ml
Alcohol absoluto	50-60 ml
Agua destilada	csp. 500 ml

3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados en la técnica MLEE fueron los siguientes:

3.1.3.1 Medios sólidos

3.1.3.1.1 Agar de Tiosulfato - Citrato - Bilis y Sacarosa (TCBS)

Utilizado como medio selectivo y diferencial para la identificación de *Vibrio cholerae* y como comprobación rápida de los cultivos puros empleados (Adsa-Micro 1-190).

Medio especialmente recomendado para el aislamiento selectivo de especies del género *Vibrio* que provocan infecciones coléricas y disenterías, y para el análisis de alimentos sospechosos de ser portadores de los agentes etiológicos de estas infecciones.

Actualmente está aceptado como el medio más idóneo para el aislamiento diferencial de vibrios enteropatógenos, consiguiendo una fuerte inhibición de toda la flora acompañante. Su formulación permite un abundante crecimiento de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Las enterobacterias quedan fuertemente inhibidas por las elevadas concentraciones de citrato, tiosulfato, bilis y cloruro sódico.

Composición:

Peptona de caseína	5 g
Peptona de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
Citrato sódico	10 g
Tiosulfato sódico	10 g
Bilis bovina	5 g
Colato sódico	3 g
Sacarosa	20 g
Cloruro sódico	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de timol	0,04 g
Azul de bromotimol	0,04 g
Agar-agar	14 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 8,6 aprox.

El medio no se esteriliza en autoclave.

3.1.3.1.2 Agar de Triptona y Soja (TSA)

El TSA (Adsa-Micro 1-200) se ha utilizado como medio de cultivo no selectivo para la resiembra de cepas y la obtención de inóculos en la preparación de extractos proteicos citoplasmáticos utilizados en el estudio. Se caracteriza por ser un medio nutritivo empleado en la preparación de placas de cultivo.

Composición:

Triptona	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 7,3

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

3.1.3.1.3 Agar Mueller-Hinton

Este medio de cultivo (Scharlau 1-136) se utilizó para determinar la sensibilidad de cepas de *V. cholerae* al antibiótico polimixina B. Este ensayo se realizó para poder caracterizar el biotipo de las cepas pertenecientes al serogrupo O1 (apartado 3.1.6). Este medio está recomendado para el ensayo de sensibilidad de agentes antimicrobianos por el método de Kirby-Bauer (Bauer y col., 1966).

Composición:

Peptona	17,5 g
Sólidos de infusión de carne	4,0 g
Almidón	1,5 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 7,4

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

3.1.3.2 Medios líquidos

3.1.3.2.1 Agua de peptona alcalina

El agua de peptona alcalina (Cultimed 413794) se utilizó como medio de pre-enriquecimiento para recuperar inóculos procedentes de cultivos congelados. Este medio líquido se utiliza para el enriquecimiento de especies del género *Vibrio* a partir de una determinada muestra.

Composición:

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 9 (ajustar con solución NaOH 1 N)

Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

3.1.3.2.2 Caldo de Triptona y Soja (TSB)

El medio TSB (Cultimed 413820) se utilizó como medio líquido no selectivo para preparar cultivos. Se caracteriza por ser un medio nutritivo que se usa de forma rutinaria para el crecimiento bacteriano. Este medio también se ha utilizado para la conservación por congelación de todas las cepas de *V. cholerae* empleadas en este estudio (apartado 3.1.4.1).

Composición:

Peptona de caseína	17 g
Peptona de soja	3 g
Cloruro sódico	5 g
Glucosa	2,5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 7,3

Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

3.1.3.2.3 Caldo rojo de metilo - Voges Proskauer (MR-VP)

Medio de cultivo empleado para la realización de la prueba Voges-Proskauer (Cultimed 413786). Este ensayo se utilizó en la determinación del biotipo, *clásico* o *El Tor*, de cepas pertenecientes al serogrupo O1 (apartado 3.1.6).

Composición:

Peptona de carne	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato monopotásico	5 g
Agua destilada	csp. 1000 ml

pH final 6,9

Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

Se preparó el medio disolviendo la cantidad necesaria de cada uno de los componentes en 1 l de agua destilada. Se comprobó el pH de la solución resultante que ha de ser de 6,9. Después se distribuyó en tubos a razón de 5 ml, y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.1.4 CONSERVACIÓN CEPAS

Las cepas empleadas en este estudio se conservaron de dos maneras diferentes:

3.1.4.1 Conservación a temperatura ambiente

Para la conservación de las cepas se ha utilizado el medio TSA (apartado 3.1.3.1.2) en tubos de agar inclinado. Después de la siembra de los tubos y posterior incubación a 30 °C durante 24 h, los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente. Se trata de un medio nutritivo que facilita la conservación de las cepas durante un mes aproximadamente, procediendo periódicamente a su resiembra cada 30 días.

3.1.4.2 Conservación por congelación

Para una conservación a más largo plazo las cepas se mantuvieron congeladas en medio TSB (apartado 4.1.3.2.2) con un 20 % de glicerol, que actúa como crioprotector. Se prepararon los inóculos de cada una de las cepas a partir de cultivos recientes en fase exponencial. Para cada cepa se sembró una placa de TSA (apartado 3.1.3.1.2), se incubó a 30 °C durante 24 h y se obtuvo un crecimiento confluyente. Con ayuda del asa de Kolle estéril se resuspendió este inóculo en un tubo con 5 ml del medio antes mencionado estéril. Después se homogeneizó la mezcla y se repartió en 5 tubos eppendorf estériles, manteniéndolos congelados a – 40 °C.

Composición del medio utilizado para 100 ml:

TSB	80 ml
Glicerol	20 ml

Se esteriliza en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.1.5 RECUPERACIÓN DE CEPAS CONGELADAS

Las cepas estudiadas se mantuvieron congeladas a – 40 °C y su recuperación se realizó en 2 medios líquidos: TSB (apartado 3.1.3.2.2) y agua de peptona alcalina (apartado 3.1.3.2.1).

Se inocularon 100 µl de cada cepa a recuperar en matraces con 10 ml de medio, y se incubó a 35 °C, en agitación suave, durante 24 h. Seguidamente se sembraron, de cada matraz, dos placas de medio sólido por agotamiento en estría: TSA (apartado 3.1.3.1.2) y TCBS (apartado 3.1.3.1.1), y se incubaron en la estufa a 35 °C durante 24 h.

Se consideró que el inóculo era un cultivo puro, al visualizar en las placas un solo tipo de colonias de la misma morfología, y en particular en las placas de TCBS la aparición de colonias amarillas, que es característico de la especie *Vibrio cholerae* por fermentar la sacarosa. Se confirmó realizando una tinción de Gram y la prueba de la oxidasa. Una vez descartada una posible contaminación de la muestra, se procedió a preparar una réplica de cepas en medio TSA para facilitar su manejo en el laboratorio. Para ello, se sembró cada cepa en un tubo de TSA inclinado a partir de una colonia aislada en medio TSA, se incubó a 35 °C durante 24 h, y después se mantuvieron a temperatura ambiente, resemebrando cada 30 días.

3.1.6 DIFERENCIACIÓN DE BIOTIPOS DEL SEROGRUPO O1

Se han descrito dos biotipos dentro del serogrupo O1: *clásico* (o también denominado inicialmente *cholerae*) y *El Tor*. Los dos biotipos son responsables del cuadro clínico del cólera y son aglutinados por el antisuero O1, pero se pueden diferenciar fácilmente por una serie de pruebas que se indican en la siguiente tabla.

Tabla 3.3 Características diferenciales entre los biotipos *clásico* y *El Tor* del serogrupo O1 de *V. cholerae*.

Prueba	Biotipos del serogrupo O1	
	<i>clásico</i>	<i>El Tor</i>
Hemólisis (hematíes de cordero)	-	+
Voges-Proskauer	-	+
Hemaglutinación (hematíes de pollo)	-	+
Sensibilidad a polimixina B	+	-
Lisis por bacteriófago:		
Fago IV de Mukerjee (<i>clásico</i>)	+	-
Fago V de Basu-Mukerjee (<i>El Tor</i>)	-	+

Símbolos: +, indica que la mayoría de cepas (90 a 100%) dan positivo; -, indica que la mayoría de cepas dan la prueba negativa (90 a 100%).

No se disponía del biotipado de todas las cepas de *V. cholerae* del serogrupo O1 utilizadas en este estudio. Por ello, se creyó conveniente caracterizar el biotipo de estas cepas, porque podría ser muy útil en el posterior análisis de los datos obtenidos por MLEE.

Se realizaron las siguientes tres pruebas:

3.1.6.1 Hemólisis de hematíes de cordero

Se prepararon placas de medio nutritivo TSA (apartado 3.1.3.1.2) con un 5% v/v de sangre desfibrinada de cordero (5 ml sangre por 100 ml TSA, Biomérieux). Para ello se preparó el medio TSA, esterilizándose en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Finalizada la esterilización, el medio se colocó en un baño de agua termostatada a 45 °C. Una vez alcanzada esta temperatura en el medio TSA, se añadió el volumen necesario de sangre de cordero bajo una campana de flujo laminar, para mantener las condiciones estériles, se mezclaron y se procedió a preparar las placas.

En estas placas se sembraron aquellas cepas de las que queríamos determinar su biotipo, y después de incubar a 35 °C durante 24 h se procedió a su lectura. La presencia de halos transparentes alrededor de la colonia indicaba que se había producido hemólisis, y por tanto, la prueba era positiva. Se utilizaron controles con cepas bien caracterizadas, para comprobar que el medio se había preparado correctamente.

3.1.6.2 Voges-Proskauer

Se realizó la prueba de Voges-Proskauer utilizando el caldo de cultivo MR-VG (apartado 3.1.3.2.3). Se sembraron los tubos con 5 ml de caldo MR-VP con cultivos puros de las cepas a caracterizar, y se incubaron a 22 °C durante 48 h. La detección de los productos metabólicos formados (acetoína, 2,3-butanodiol) se llevó a cabo añadiendo el reactivo de Barritt (solución A). Como la reacción debe transcurrir en medio básico, se añadió hidróxido potásico al 40% (solución B).

Composición de reactivos:

- Solución A: α -naftol al 6% en etanol absoluto (6 g de α -naftol en 100 ml de etanol absoluto; Fluka 70442).
- Solución B: Hidróxido potásico al 40% (40 g de hidróxido potásico en 100 ml de agua destilada; Panreac 121515).

Para realizar la lectura se añadió a cada tubo incubado 3 ml del reactivo de Barritt o solución A y 1 ml de la solución B. En caso positivo, después de unos minutos, el medio vira a color rojo. Se realizaron también controles para comprobar los medios y reactivos empleados, se utilizó *Serratia marcescens* como control positivo y *Escherichia coli* como control negativo de la prueba.

3.1.6.3 Sensibilidad a la polimixina B

La susceptibilidad de las distintas cepas a la polimixina B se realizó según el método descrito por Kirby-Bauer (Bauer y col., 1966). Se prepararon suspensiones bacterianas de cada cepa a ensayar en solución salina (apartado 3.1.2.1). Se introdujo un escobillón estéril dentro de la suspensión y se sembró una placa de Mueller-Hinton (apartado 3.1.3.1.3) deslizando el escobillón por toda la superficie. Después de 5-10 min para que se absorba bien el inóculo sembrado, se deposita el disco de antibiótico (polimixina B 300U, Biomérieux 54522) en la superficie del agar con unas pinzas estériles. Se incubaron las placas a 35 °C durante 18-24 h, y se realizó la lectura midiendo el diámetro de los halos de inhibición completo de crecimiento que se produjeron alrededor de los discos, expresando el resultado en milímetros.

Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos se compararon con valores estandarizados en tablas, que tienen en cuenta el antibiótico ensayado y su concentración, e indican si el microorganismo es resistente, moderadamente resistente (intermedio), o sensible al antibiótico analizado.

Tabla 3.4 Interpretación del halo de inhibición de la polimixina B.

Antibiótico	Concentración disco	Diámetro del halo (en mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Polimixina B	300 U	8 o menos	9 -11	12 o más

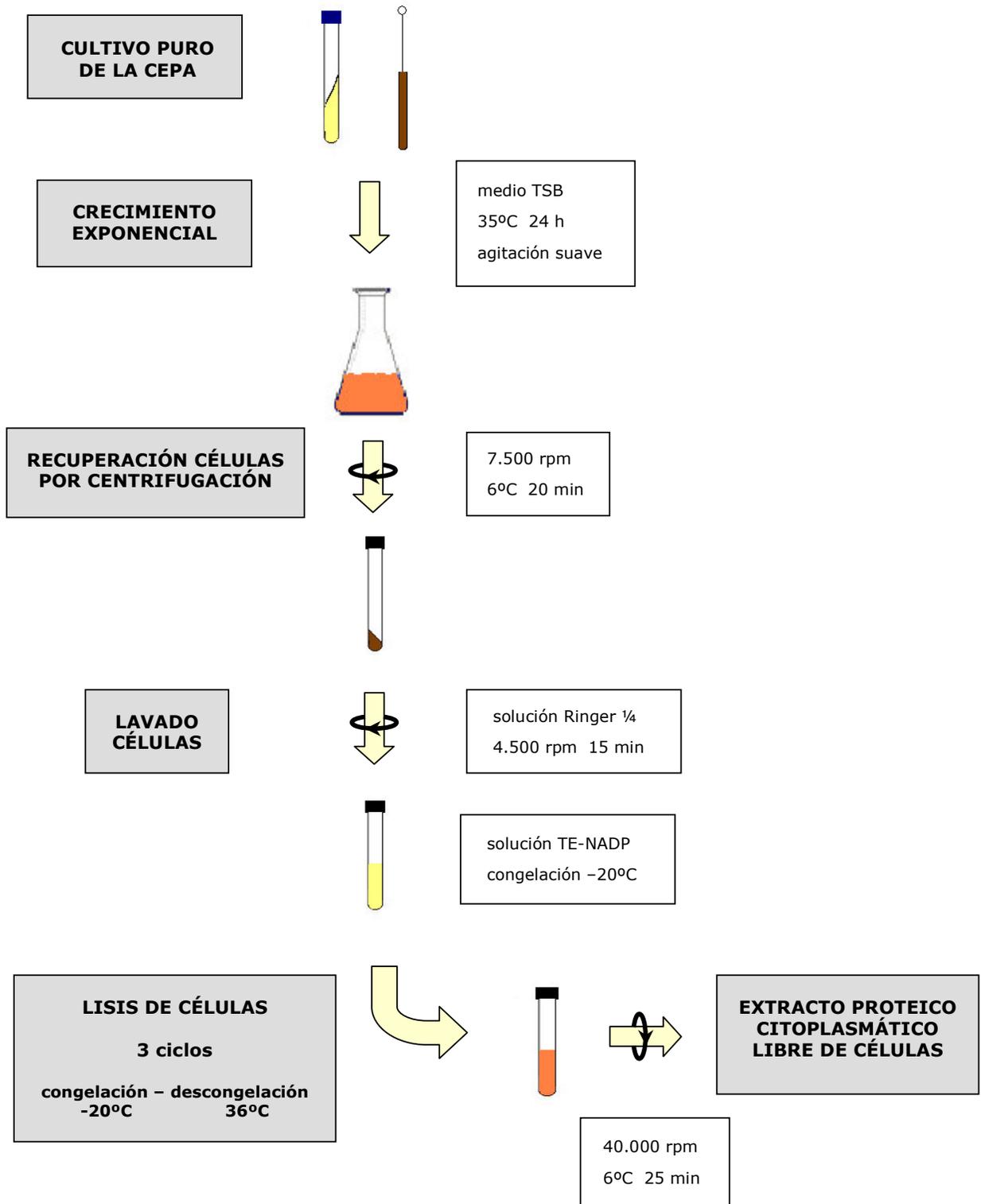
3.1.7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En la técnica de MLEE, se sometieron a electroforesis los extractos crudos obtenidos a partir de cultivos de cada una de las cepas a estudiar. Para preparar los extractos, se cultivaron las cepas en los medios y condiciones apropiados para su crecimiento hasta conseguir una población aproximada de 10^{11} bacterias. De esta forma obtuvimos una concentración suficiente de enzimas en los lisados.

Después de varias pruebas con medios de cultivos sólidos y líquidos, el método optimizado para obtener las muestras fue el siguiente: los extractos proteicos se prepararon inoculando cada una de las cepas a analizar en un matraz con 100 ml de TSB (apartado 3.1.3.2.2), incubándose a 35 °C en agitación constante durante 24 h. Seguidamente, el contenido del matraz se centrifugó (7.500 rpm, 15 min, 6 °C) para recuperar las células del medio. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y el sedimento restante se lavó repetidas veces con solución de Ringer ¼ estéril (apartado 3.1.2.1). A continuación, despreciamos los sobrenadantes y el sedimento se resuspendió en el tampón TE-NADP (apartado 3.1.2.2) y se congeló a una temperatura de - 20 °C.

Para lisar las células, se utilizó la técnica de congelación-descongelación repetida en 3 ciclos. Se congelaron a - 20 °C durante 12-24 h y se descongelaron en un baño de agua a 36 °C durante 5-10 min. La viscosidad que aparece en la solución resultante nos indicó que se había producido la lisis de las células. Después es necesario centrifugar (40.000 rpm, 25 min, 6 °C) para eliminar los restos celulares, que se depositan en la parte inferior, y obtener así los extractos proteicos que se encuentran en el sobrenadante resultante. Este sobrenadante se repartió en tubos eppendorf estériles que se guardaron a una temperatura de - 40 °C hasta su uso.

Figura 3.4 Esquema que muestra los pasos seguidos en la obtención de los extractos proteicos.



3.1.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Para valorar la concentración de proteína obtenida en los extractos proteicos preparados para cada una de las cepas se utilizó el método descrito por Lowry y col. (1951) empleando albúmina sérica bovina como patrón. Este método permite detectar concentraciones bajas de proteína, del orden de 20 a 200 μg / ml. Todas las diluciones, tanto de las muestras como de la curva patrón, se realizaron con agua destilada para evitar posibles interferencias debidas a componentes del tampón.

3.1.9 PREPARACIÓN DE GELES

Los geles utilizados en este estudio fueron geles de poliacrilamida verticales en condiciones no desnaturizantes, continuos o discontinuos en función del enzima a determinar. El tamaño de los geles fue de 16 x 20 cm y el grosor de 1 mm o de 1,5 mm, permitiendo cada uno de ellos el estudio de 15 ó 20 muestras según el peine utilizado.

Tabla 3.5 Composición de geles continuos (las cantidades que se indican son para la preparación de dos geles).

	Dureza 10%		Dureza 8%	
	1 mm grosor	1,5 mm grosor	1 mm grosor	1,5 mm grosor
Solución de acrilamida / bisacrilamida al 30% en agua	20 ml	26,4 ml	16 ml	21,2 ml
Tampón Tris / HCl 0,8M pH 8,8	30 ml	40,0 ml	30 ml	40,0 ml
Agua destilada	10 ml	13,6 ml	14 ml	18,8 ml
Solución de APS al 10%	300 μl	300 μl	300 μl	300 μl
TEMED	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl

En el caso de los geles discontinuos, éstos constaron de 2 partes bien diferenciadas por su distinto tamaño de poro: el gel separador (o "resolving") que es más denso, y en el cual se efectúa la separación de las proteínas en función de su peso molecular, y el gel compactador (o "stacking"), con una matriz más laxa, que tiene como misión una correcta entrada y ordenación de las proteínas en el gel separador. La diferente concentración de acrilamida en cada uno de los geles se expresa en tanto por ciento, indicando primero la del gel separador y después la del gel iniciador (p.ej. 10% / 8%).

Tabla 3.6 Composición de geles discontinuos (las cantidades que se indican son para la preparación de dos geles).

		Dureza 10% / 8%		Dureza 8% / 5%	
		1 mm grosor	1,5 mm grosor	1 mm grosor	1,5 mm grosor
Gel separador	Solución de acrilamida / bisacrilamida al 30% en agua	20 ml	28 ml	16 ml	22,4 ml
	Tampón Tris / HCl 0,4M pH 8,8	30 ml	42 ml	30 ml	42,0 ml
	Agua destilada	10 ml	14 ml	14 ml	19,6 ml
	Solución de APS al 10%	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl
	TEMED	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl
Gel iniciador	Solución de acrilamida / bisacrilamida al 30% en agua	5,3 ml	7,5 ml	3,3 ml	4,7 ml
	Tampón Tris / HCl 0,125M pH 6,8	10,0 ml	14,0 ml	10,0 ml	14,0 ml
	Agua destilada	4,7 ml	6,6 ml	6,7 ml	9,4 ml
	Solución de APS al 10%	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl
	TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Para preparar los geles, se mezclaron en un vaso de precipitados la cantidad necesaria de solución de acrilamida/bisacrilamida, tampón Tris/HCl y agua destilada, y se añadió carbón activo (Panreac 211238) durante 10 min para desionizar la solución resultante, ya que algunos iones pueden interferir en la polimerización del gel. Seguidamente, la solución se sometió a vacío durante 15 min, para eliminar la presencia de burbujas de oxígeno en la solución, debido a que el oxígeno también puede inhibir la polimerización de la acrilamida.

Una vez desgasificada la mezcla, se añadió la cantidad necesaria de solución de persulfato amónico (APS) al 10% (1 g de persulfato amónico en 10 ml; Pharmacia 17-1311-01) que es el iniciador de la reacción de polimerización del gel, y el TEMED (N,N,N',N',-tetrametiletilendiamina; Pharmacia 17-1312-01) que actúa como catalizador de esta reacción. Sin demora y con ayuda de una micropipeta, la solución se pasó al molde que se forma con los dos vidrios que actúan como soporte del gel. Después de 30-60 min, dependiendo de la dureza del gel, se produjo la polimerización, obteniendo el gel de poliacrilamida.

La dureza del gel podía variar según la enzima a ensayar. En los geles continuos se emplearon concentraciones de acrilamida del 10% o del 8%, y en los geles discontinuos la concentración fue del 10% ó 8% para el gel separador y del 8% ó 5% para el gel iniciador.

Tabla 3.7 Tipo y dureza del gel empleado según la enzima estudiada.

	Dureza del gel	Enzimas ¹
Gel continuo	10%	Malato deshidrogenasa (MDH) Enzima málico (ME) Isocitrato deshidrogenasa (IDH) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P) Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GP1) Aspartato deshidrogenasa (ASD) Leucina aminopeptidasa (LAP) Fumarasa (FUM)
	8%	Alanina deshidrogenasa (ALD)
Gel discontinuo	10% / 8%	6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG) Esterasas (EST) Fosfoglucoisomerasa (PGI)
	8% / 5%	Xantina deshidrogenasa (XDH) Catecol-2,3-oxigenasa (C23O) Nucleósido fosforilasa (NSP)

¹ ver apartado 3.1.11

3.1.10 DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS

El proceso de electroforesis vertical se realizó con un equipo PROTEAN II xi Cell (BIO-RAD) y una fuente Power Supply-EPS 600 (Pharmacia Biotech Electrophoresis). Se llevó a cabo en geles de poliacrilamida utilizando como tampón de recorrido Tris-glicina 0,19 M pH 8,3-8,6 (apartado 3.1.2.6) para todas las enzimas ensayadas.

Se trabajó con peines molde que permitían procesar 15 ó 20 muestras simultáneamente, y con dos tipos diferentes de grosor, 1 mm ó 1,5 mm, que influía en el volumen máximo de muestra posible a cargar en el pocillo, 100 μ l ó 150 μ l respectivamente.

Para cada enzima se optimizó la cantidad necesaria de muestra de extractos a someter a electroforesis, que podía oscilar entre 5 μ l y 80 μ l. Antes de cargar la muestra en el gel se le añadía un 10% de una solución de glicerol y azul de bromofenol (apartado 3.1.2.5).

Todo el proceso de electroforesis se realizó bajo refrigeración (7 °C) para prevenir la desnaturalización de las enzimas. Así mismo, antes de iniciar la electroforesis se sometieron los geles a un pre-recorrido sin muestras para que el persulfato amónico, compuesto utilizado en la polimerización de los geles, migre por delante de las muestras y evitar así que pueda desnaturalizarlas.

La electroforesis se realiza a una intensidad constante o a un voltaje constante, dependiendo de la concentración de acrilamida/bisacrilamida que lleve el gel y de la enzima ensayada. Se optimizaron dos tipos de condiciones de electroforesis, que se muestran en la siguiente tabla, que permitieron el análisis de MLEE de todas las enzimas del estudio.

Tabla 3.8 Condiciones optimizadas de electroforesis de corta y larga duración.

	Electroforesis corta duración	Electroforesis larga duración
Pre-recorrido	Intensidad constante 35 mA 30 min	Voltaje constante 100 V 30 min
Desarrollo electroforesis	Intensidad constante 20 mA 30 min	Voltaje constante 40-60 V final
	Intensidad constante 40 mA final	
Duración electroforesis	4 – 6 h	14–16 h

Durante la electroforesis de corta duración se aplica inicialmente una intensidad fija de 20 mA durante 30 min para compactar las muestras, y después se aumenta a 40 mA hasta el final del proceso, que puede durar entre 4-6 h. En cambio en la electroforesis de larga duración, se aplica un voltaje constante (40-60 V) durante todo el proceso de electroforesis, que dependerá de la dureza del gel y de la cantidad de muestra cargada.

Se da por finalizada la electroforesis cuando el frente de las muestras llega al final del gel. Todas las cepas se sometieron a electroforesis al menos dos veces para confirmar su actividad enzimática.

3.1.11 ENZIMAS ESTUDIADAS

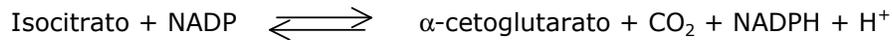
Se han analizado 15 enzimas implicadas en vías metabólicas centrales o en vías catabólicas de metabolitos importantes para la bacteria.

Tabla 3.9 Clasificación de las enzimas utilizadas en el estudio de MLEE.

Clase de enzima	EC nº ¹	Nombre de la enzima	Abreviatura
Grupo OXIDOREDUCTASAS	1.1.1.37	Malato deshidrogenasa	MDH
	1.1.1.40	Enzima málico	ME
	1.1.1.42	Isocitrato deshidrogenasa	IDH
	1.1.1.44	6-fosfogluconato deshidrogenasa	6PG
	1.1.1.49	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6P
	1.1.1.204	Xantina deshidrogenasa	XDH
	1.2.1.12	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa - NAD	GP1
	1.4.1.1	Alanina deshidrogenasa	ALD
	1.4.3.16	Aspartato deshidrogenasa	ASD
1.99.2.a	Catecol-2,3-oxigenasa	C23O	
Grupo TRANSFERASAS	2.4.2.1	Nucleósido fosforilasa	NSP
Grupo HIDROLASAS	3.1.1.1	Esterasas	EST
	3.4.11.1	Leucina aminopeptidasa	LAP
Grupo LIASAS	4.2.1.2	Fumarasa	FUM
Grupo ISOMERASAS	5.3.1.9	Fosfoglucoisomerasa	PGI

¹ El Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) describe cada tipo de enzima caracterizada y le proporciona un número de la EC (Comisión de la Enzima) (<http://us.expasy.org>).

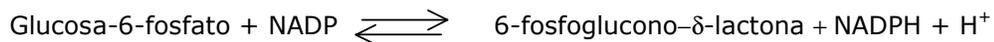
Las enzimas **malato deshidrogenasa**, **isocitrato deshidrogenasa** y **fumarasa** catalizan reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs.



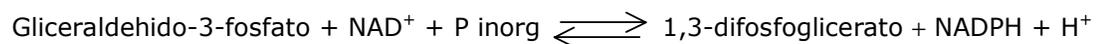
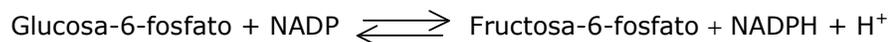
La **enzima málico** participa en la descarboxilación por oxidación del malato en piruvato con ayuda del cofactor NADP.



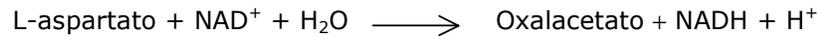
Las enzimas **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa** y **6-fosfogluconato deshidrogenasa** actúan en la vía oxidativa de las pentosas.



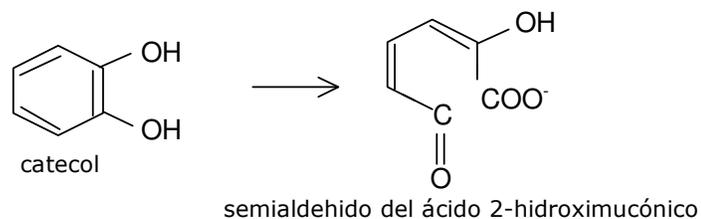
Las enzimas **fosfoglucoisomerasa** y **gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa** catalizan reacciones importantes en la vía oxidativa de las hexosas o glicólisis. *V. cholerae* cataboliza la glucosa por la vía constitutiva de Embden-Meyerhof.



Las enzimas **alanina deshidrogenasa** y **aspartato deshidrogenasa** participan en la desaminación de aminoácidos, utilizando como coenzima el NAD.



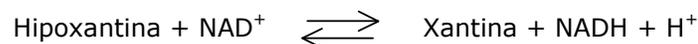
La enzima **catecol-2,3-oxigenasa** está implicada en el metabolismo de compuestos aromáticos (p.ej. triptófano, ácido benzoico, naftalenos, antracenos, fenoles, etc.). La vía central de oxidación de estos sustratos aromáticos tiene como principal intermediario el catecol. Esta enzima cataliza la oxidación del catecol al semialdehído del ácido 2-hidroxiácido, producto que en soluciones alcalinas produce un intenso color amarillo.



La enzima **leucina aminopeptidasa** pertenece al grupo de exopeptidasas que catalizan la escisión de aminoácidos del extremo amino terminal de proteínas. Se trata de una metaloproteasa que contiene zinc. Se sintetiza en *Vibrio* sp. en forma de proenzima, se escinde durante la etapa de maduración, y se secreta como enzima. Tiene preferencia por la hidrólisis del aminoácido leucina, aunque esta enzima presenta también actividad con otros sustratos aminoacídicos.

Las enzimas **esterasas** catalizan la hidrólisis de enlaces éster con una amplia variedad de sustratos.

La enzima **xantina deshidrogenasa** participa en la vía de degradación del AMP (adenosin monofosfato), convirtiendo el sustrato hipoxantina en xantina.



La enzima **nucleósido fosforilasa** interviene en la fosforilación del grupo nucleósido (base púrica o pirimidínica unida a un azúcar).



3.1.12 TINCIÓN DE LOS GELES

Las distintas actividades enzimáticas se pusieron de manifiesto en los geles por tinción específica para cada una de las enzimas. Los geles fueron teñidos basándose en modificaciones a la metodología descrita por Selander y col. (1986), excepto en el caso de la enzima catecol-2,3-oxigenasa, que se aplicó la tinción descrita por Rius y col. (2001).

Después del proceso de electroforesis, se procedió a la tinción específica del gel. El gel se sumerge en una solución tampón que contiene el/los sustrato/s y cofactores que requiere la enzima para presentar actividad y un colorante que revele la situación en donde la enzima ha reaccionado con el sustrato. Mediante esta tinción específica se puede ver con facilidad las zonas de actividad enzimática como bandas bien definidas.

Todas las tinciones se realizaron dentro de una estufa a 37 °C, en agitación suave y manteniendo condiciones de oscuridad, excepto dos enzimas, la catecol-2,3-oxigenasa (C230) y la nucleósido fosforilasa (NSP), que se realizaron las tinciones a temperatura ambiente, sin agitación y en presencia de luz.

En general, para detener la tinción se procede lavando el gel con agua destilada en abundancia que arrastre toda la solución de tinción hasta eliminarla. Después es necesario mantener el gel sumergido en agua destilada hasta su conservación definitiva por secado (apartado 3.1.14).

En la mayoría de los casos, los principales constituyentes de la tinción son el **sustrato** de la enzima disuelto en un **tampón**, el **coenzima** necesario (NAD o NADP), el **PMS** (metosulfato de fenazina) y el **MTT** (dimetiltiazol tetrazolio). Durante la tinción se produce la reducción del NAD a NADH ó del NADP a NADPH, liberándose un electrón que es captado por el PMS que actúa como aceptor de electrones. Esta reacción comporta la reducción del MTT que da un compuesto azul insoluble que precipita o se deposita en forma de banda definida donde se produce actividad enzimática.

Las soluciones de NAD y NADP se preparan al 1% (1 g de α -nicotinamida adenina dinucleotido o NAD en 100 ml de agua destilada, Boehringer Mannheim 127981; 1g de β -nicotinamida adenina dinucleotido fosfato o NADP en 100 ml de agua destilada, Sigma N-3886). La solución de PMS se prepara al 1% (1 g de metosulfato de fenazina en 100 ml de agua destilada; Sigma P-9625) y la de MTT al 1,25% (1,25 g de dimetiltiazol tetrazolio en 100 ml de agua destilada; Sigma M-2128). Todas estas soluciones se mantienen a 4 °C y protegidas de la luz.

A continuación se detalla la composición de las diferentes tinciones realizadas en el estudio de MLEE para determinar la actividad de las enzimas estudiadas. Las cantidades indicadas son para la tinción de un gel.

3.1.12.1 Malato deshidrogenasa (MDH)

L-ácido málico (Merck 381)	200 mg
Tris / HCl 0,5M pH 7,1	30 ml
Agua destilada	60 ml
NaCN 0,1M	10 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NAD	2 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

La solución de NaCN 0,1M se prepara disolviendo 4,9 g de cianuro sódico (Panreac 141652) en 1 l de agua destilada.

3.1.12.2 Enzima málico (ME)

L-ácido málico (Merck 381)	150 mg
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	100 ml
NaCN 0,1M	5 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NADP	1 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

La solución de NaCN 0,1M se prepara disolviendo 4,9 g de cianuro sódico (Panreac 141652) en 1 l de agua destilada.

3.1.12.3 Isocitrato deshidrogenasa (IDH)

D,L-Isocitrato trisódico (Sigma I-1252)	60 mg
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	100 ml
MgCl ₂ 0,1M	2 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NADP	1 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

La solución de MgCl₂ 0,1M se prepara disolviendo 20,3 g de cloruro magnésico (Fluka 63068) en 1 l de agua destilada.

3.1.12.4 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG)

Ácido-6-fosfogluconico, sal de bario (Sigma P-7627)	40 mg
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	60 ml
MgCl ₂ 0,1M	20 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NADP	1 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

La solución de MgCl₂ 0,1M se prepara disolviendo 20,3 g de cloruro magnésico (Fluka 63068) en 1 l de agua destilada.

3.1.12.5 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P)

D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma G-7250)	100 mg
Tris / HCl 0,5M pH 7,1	10 ml
Agua destilada	90 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NADP	1 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

3.1.12.6 Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa - NAD (GP1)

Fructosa-1,6-difosfato (Sigma F-0752)	100 mg
Aldolasa (Sigma A-6253)	10 U
Na ₂ HAsO ₄ · 7 H ₂ O	50 mg
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	80 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NAD	2 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

3.1.12.7 Xantina deshidrogenasa (XDH)

Hipoxantina (Sigma H-9377)	150 mg
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	100 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NAD	2 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

3.1.12.8 Alanina deshidrogenasa (ALD)

L-Alanina (Merck 1007)	100 mg
Tampón fosfato pH 7,0	100 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NAD	2 ml

La preparación del tampón fosfato está descrita en el apartado 3.1.2.7.

3.1.12.9 Aspartato deshidrogenasa (ASD)

L-ácido aspártico (Panreac 142034)	100 mg
Tampón fosfato pH 7,0	100 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NAD	2 ml

La preparación del tampón fosfato está descrita en el apartado 3.1.2.7.

3.1.12.10 Catecol-2,3-oxigenasa (C230)

Pirocatecol (Fluka 15880)	300 mg
Tris / HCl 0,02M pH 7,0	100 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

Para realizar la tinción se deposita el gel sobre uno de los soportes de vidrio y se cubre con papel de filtro impregnado con la solución de tinción. Se realiza la tinción dentro de una estufa a 37 °C, en agitación suave y en oscuridad. En la reacción que cataliza esta enzima se forma un compuesto de color amarillo, el semialdehído del ácido-2-hidroximucónico, que se visualiza directamente en el gel como una banda. Cuando empiezan a verse estas bandas en el gel, éste se saca de la estufa, se retira el papel de filtro y se decanta la solución de tinción que reste. Después se deja el gel a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno para que al favorecer la oxidación se vean mejor las bandas. Esta tinción fue descrita por Rius y col. (2001).

No se puede parar la tinción porque el producto formado (semialdehído del ácido-2-hidroximucónico) es soluble en agua, y la lectura del gel ha de realizarse en el momento.

3.1.12.11 Nucleósido fosforilasa (NSP)

Inosina (Sigma I-4125)	40 mg
Xantina oxidasa (Sigma X-4875)	300 µl
Tampón fosfato pH 7,0	80 ml
MTT	1 ml
PMS	1 ml

La preparación del tampón fosfato está descrita en el apartado 3.1.2.7.

La tinción se realizó mezclando 500 ml agar y 25 ml de tampón Tris / HCl 0,2M pH 8,0 y se llevó a ebullición. Cuando se alcanzó la temperatura de ebullición, se añadió la mezcla de tinción, se homogeneizó y se depositó encima del gel. Al enfriarse, se formó una capa semisólida sobre el gel en la cual aparecieron las bandas de actividad enzimática.

Esta tinción se realiza en presencia de luz, sin agitación y a temperatura ambiente. No se puede parar la tinción, y por tanto, la lectura del gel ha de realizarse en el momento.

3.1.12.12 Esterasas (EST)

α -naftil acetato (1% en acetona) (Sigma N-8505)	1,5 ml
Tampón fosfato pH 7,0	100 ml
Fast blue RR salt (Sigma F-0500)	25 ml

La preparación del tampón fosfato está descrita en el apartado 3.1.2.7.

3.1.12.13 Leucina aminopeptidasa (LAP)

L-leucina- β -naftilamida hidrocloreto (Sigma L-0376)	30 ml
KH_2PO_4 0,1M pH 5,5	100 ml
MgCl_2 0,1M	1 ml
Fast black K salt (Sigma F-7253)	30 mg

La solución KH_2PO_4 0,1M pH 5,5 se prepara mezclando 13,6 g de fosfato dipotásico (Fluka 60230) en 1 l de agua destilada, y ajustar el pH a 5,5 con una solución básica de NaOH 0,1N.

La solución de MgCl_2 0,1M se prepara disolviendo 20,3 g de cloruro magnésico (Fluka 63068) en 1 l de agua destilada.

Se han de mezclar bien todos los componentes de la tinción en un vaso de precipitados y la solución resultante se ha de filtrar antes de proceder a la tinción del gel.

3.1.12.14 Fumarasa (FUM)

Ácido fumárico (Sigma F-4633)	50 mg
Malato deshidrogenasa (Sigma M-7508)	23,5 μ l
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	100 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml
NAD	2 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

3.1.12.15 Fosfoglucoisomerasa (PGI)

Fructosa-6-fosfato (Sigma F-3627)	20 mg
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma G-8878)	6 U
NADP (Sigma N-3886)	12 mg
Tris / HCl 0,2M pH 8,0	100 ml
MgCl ₂ 0,1M	0,6 ml
MTT	1 ml
PMS	0,5 ml

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el apartado 3.1.2.4.

La solución de MgCl₂ 0,1M se prepara disolviendo 20,3 g de cloruro magnésico (Fluka 63068) en 1 l de agua destilada.

3.1.13 LECTURA DE LOS GELES

La lectura de los geles no requiere el uso de técnicas específicas, ya que las bandas que aparecen sobre el gel después de la tinción enzimática se aprecian visualmente con facilidad.

Las diferentes movilidades electroforéticas para una misma enzima se denominan electromorfos o formas aloenzimáticas, y se identifican con números enteros en orden decreciente de su migración anódica.

También se ha de tener en cuenta en la asignación de alelos el número de bandas que presenta cada cepa, numerando en primer lugar las de banda sencilla, después las de banda doble, triple, etc. En caso de ausencia de banda por falta de actividad enzimática se le asigna el alelo 0, pero en este caso nos aseguraremos que esta ausencia de actividad no sea debida a falta de muestra o una posible desnaturalización de la proteína.

3.1.14 CONSERVACIÓN DE LOS GELES REVELADOS

Los geles de poliacrilamida revelados se conservaron mediante secado con aire caliente, facilitando su manejo posterior así como su conservación por un largo período de tiempo. Este secado se llevó a cabo en un secador GelAir Drying System de BIO-RAD.

Los geles se sumergieron en una cubeta con una solución de secado en agitación suave durante 15-30 min. Se puede preparar esta solución (apartado 3.1.2.8) o utilizar una solución comercial (Gel drying solution, BIO-RAD 161-0752).

Para proceder al secado, los geles húmedos se colocaron con ayuda de unos soportes entre dos hojas de papel de celofan embebidas en agua destilada. Es importante eliminar cualquier burbuja de aire que pudiese quedar atrapada entre las dos láminas porque podría provocar la rotura del gel durante el secado. La temperatura de secado está optimizada para evitar la rotura de los geles y no se puede modificar, pero si se puede ajustar el tiempo de secado según el grosor o número de geles a secar. El secado duraba, por término medio, unas dos horas.

3.1.15 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

El punto clave de la técnica de MLEE es que, admitiendo que las modificaciones en la movilidad electroforética de una enzima corresponden a mutaciones en el gen que codifica la proteína, cada uno de los electromorfos identificados para una determinada enzima puede ser equiparado a un alelo en el correspondiente locus estructural. De este modo, los resultados obtenidos pueden ser directamente correlacionados con el genotipo.

Cada cepa se identifica por una combinación de electromorfos o alelos para las distintas enzimas ensayadas. Esta secuencia de números enteros, que representa la numeración del alelo correspondiente a cada locus analizado, constituye el **genotipo multilocus** de la cepa. De esta manera, tendremos tantos genotipos como cepas analicemos y tantos loci como enzimas utilicemos en el estudio. Los distintos genotipos identificados dentro de la población estudiada se designan como **tipos electroforéticos** (ETs). Asimismo, todas aquellas cepas que presenten movilidades electroforéticas iguales para todas las enzimas analizadas, es decir, que tienen el mismo genotipo multilocus, constituirán un mismo ET.

Estos datos son susceptibles de ser procesados por técnicas informáticas con la finalidad de establecer las relaciones existentes entre las diferentes cepas que forman el conjunto de la muestra.

3.1.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos por la técnica MLEE permitió poder calcular toda una serie de parámetros de interés en el estudio de la genética de poblaciones bacteriana.

3.1.16.1 Frecuencias de los alelos en cada uno de los loci (p_{ij})

Las frecuencias alélicas se calculan sobre el total de cepas analizadas o de tipos electroforéticos (ETs) distintos obtenidos. Supongamos que se analizan m loci para n cepas. Las frecuencias de los distintos alelos obtenidos para cada uno de los loci estudiados se expresará como p_{ij} , es decir, como la frecuencia del alelo i en el locus j . La frecuencia obtenida nos indica la probabilidad de tener el alelo i en el locus j en la muestra estudiada que suponemos representativa de la población que nos interesa.

3.1.16.2 Diversidad génica por locus (h_j)

La diversidad génica para cada uno de los loci ensayados fue calculada de acuerdo con Nei (1978), utilizando su factor de corrección para muestras pequeñas. Se define como la probabilidad de que dos cepas o ETs, elegidos al azar en la población estudiada, difieran (presenten alelos distintos) en un locus determinado j .

Se expresa como

$$h_j = \frac{(1 - \sum_i p_{ij}^2) \cdot n}{n - 1}$$

donde p_{ij} es la frecuencia del alelo i en el locus j , n es el número total de cepas o ETs, y $\frac{n}{n-1}$ es el factor de corrección que se aplica a muestras pequeñas.

3.1.16.3 Diversidad génica media (H)

La diversidad génica media es la media aritmética de h_j para los m loci ensayados, y se calcula como

$$H = \frac{\sum_j h_j}{m}$$

siendo m el número de loci (Maynard-Smith y col., 1993).

3.1.16.4 Diversidad genotípica (G)

La diversidad genotípica fue calculada como

$$G = 1 - \sum_j g_j^2$$

donde g_j es la frecuencia del genotipo j para toda la muestra estudiada (Maynard-Smith y col., 1993).

3.1.16.5 Índice de asociación (I_A)

Con los datos obtenidos por MLEE hemos determinado este estadístico como la distribución de no coincidencias alélicas entre todos los pares de cepas o ETs para los loci examinados. Conociendo los valores de p_{ij} , calculados a partir de los datos experimentales obtenidos, podemos estimar el valor esperado de la varianza en la distribución de no coincidencias (V_E) como

$$V_E = \sum_j h_j \cdot (1 - h_j)$$

en el supuesto de que no exista ningún tipo de asociación entre alelos (equilibrio de ligamiento).

Este valor teórico (V_E) se puede comparar con el valor observado de la varianza (V_O), obteniéndose una medida del grado de asociación entre alelos en los loci estudiados que se expresa como el índice de asociación, I_A (Brown y col., 1980; Maynard-Smith y col., 1993), y que permite poder estimar la presencia de desequilibrio de ligamiento en la muestra estudiada.

$$I_A = \frac{V_O}{V_E} - 1$$

Valores de I_A que difieren de cero significativamente, es decir $V_O \neq V_E$, indican la presencia de desequilibrio de ligamiento en la muestra analizada. En este caso, existe un cierto grado de asociación entre los alelos en los distintos loci estudiados, no están asociados al azar sino que son más frecuentes determinadas combinaciones de alelos. Además, el grado de recombinación en esta población no es suficiente para romper estas asociaciones alélicas, por lo que la población presenta una estructura clonal.

En cambio, si la muestra estudiada presenta un valor de I_A que no es significativamente distinto de cero, es decir $V_O = V_E$, los alelos se hallan en equilibrio de ligamiento. En este caso, la población analizada presenta una elevada tasa de recombinación que rompe cualquier posible asociación entre alelos en los distintos loci analizados.

Para determinar si V_O es significativamente diferente de V_E se realizó una simulación de Montecarlo en la que se generaron 10.000 muestreos al azar sobre la distribución de los alelos obtenidos experimentalmente, para eliminar cualquier efecto de asociación entre ellos. Aplicando un nivel de significación del 99,9% ($\alpha = 0,001$) se obtuvo un valor de P que nos permite rechazar la hipótesis nula (H_0) de asociación de alelos al azar. Si $P \leq 0,001$ se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa de desequilibrio de ligamiento. En cambio, si $P > 0,001$ no se puede descartar esta hipótesis nula.

3.1.16.6 Construcción de dendrogramas

La distancia genética entre pares de ETs se ha calculado como la proporción de loci en los que no existe coincidencia en los alelos. Con estas distancias se ha generado una matriz de coeficientes de distancias utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages), y con el programa PHYLIP (Felsenstein, 1993) se han construido dendrogramas para visualizar las relaciones existentes entre las distintas cepas estudiadas.

Para los dendrogramas generados se calculó el coeficiente de correlación cofenética (r_c), usando el programa NTSYS-pc, versión 1.80 (Rolf, 1993).

3.1.16.7 Construcción de cladogramas

También se construyeron cladogramas de subgrupos de poblaciones a partir de la colección de cepas de *V. cholerae* estudiada para estimar las relaciones genéticas existentes entre ellos. Para ello, se realizó el análisis filogenético usando la distancia genética de Nei (1972) y generando los cladogramas con el programa PHYLIP utilizando el método Neighbour-Joining.

La fiabilidad de los cladogramas se determinó mediante un análisis de "bootstrapping". Las frecuencias génicas fueron seleccionadas al azar para producir 100 réplicas de datos del mismo tamaño que el grupo de datos original. A partir de estas réplicas se generaron nuevas matrices usando la distancia de Nei, y después de aplicar el método Neighbour-Joining se construyeron los correspondientes cladogramas. A continuación se compararon los 100 cladogramas obtenidos usando el programa Consensus dentro del paquete informático PHYLIP. El grado de fiabilidad se muestra en los nodos de los cladogramas construidos con los valores de "bootstrap" obtenidos.

3.2 Resultados

3.2.1 BIOTIPADO DE CEPAS DEL SEROGRUPO O1

Se realizaron las pruebas de biotipado (apartado 3.1.6) a un total de 21 cepas de *V. cholerae* O1, de las cuales cuatro (CECT 514, CECT 569, 1-7/31, 1-7/69), que habían sido caracterizadas previamente, se utilizaron como controles.

Los resultados obtenidos en las 3 pruebas, para caracterizar o confirmar el biotipo de las cepas del serogrupo O1 de *V. cholerae* de nuestra colección, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 3.10 Resultados de las pruebas bioquímicas para el biotipado.

Cepa	Hemólisis sangre cordero	Voges- Proskauer	Sensibilidad polimixina B	Biotipo
CT7606-93	+	+	-	<i>El Tor</i>
CT9995-93	+	+	-	<i>El Tor</i>
TM11079-80	+	+	-	<i>El Tor</i>
TM207832-78	+	+	-	<i>El Tor</i>
CT25016-91	+	+	-	<i>El Tor</i>
CT7021-94	+	+	-	<i>El Tor</i>
TM16457-78	-	-	+	<i>clásico</i>
CT7649-94	+	+	-	<i>El Tor</i>
CTMARM12-92	+	+	-	<i>El Tor</i>
CTMACMI1-92	+	+	-	<i>El Tor</i>
CO417	+	+	-	<i>El Tor</i>
1196/78	-	-	+	<i>clásico</i>
ALVC-91-0803	+	+	-	<i>El Tor</i>
ALVC-92-0344	+	+	-	<i>El Tor</i>
ALVC-91-1019	+	+	-	<i>El Tor</i>
ALVC-92-0534	+	+	-	<i>El Tor</i>
ALVC-93-0024	+	+	-	<i>El Tor</i>
Controles				
CECT 514	-	-	+	<i>clásico</i>
CECT 569	-	-	+	<i>clásico</i>
1-7/31	+	+	-	<i>El Tor</i>
1-7/69	+	+	-	<i>El Tor</i>

3.2.2 CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Se obtuvieron los extractos citoplasmáticos de cada una de las cepas a estudio siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.7. Se realizaron arbitrariamente dos puntos de control para garantizar la obtención de una concentración mínima proteica en los extractos preparados que permita la detección de actividad enzimática con la técnica de MLEE.

En el primer punto de control se determinó la lectura espectrofotométrica del sedimento resuspendido en tampón TE-NADP a una longitud de onda de 600 nm, para comprobar que se obtuviese una cantidad mínima de células antes de lissarlas. El valor de la absorbancia debía estar dentro del intervalo 0,300-0,600.

El segundo punto de control se basó en calcular la concentración proteica de los extractos crudos obtenidos aplicando el método Lowry (apartado 3.1.8). Por comparación con la recta patrón realizada con diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina, se estimó la concentración proteica en mg/ml de cada una de las muestras. Se rechazaron los extractos con valores inferiores a 3 mg/ml. Los valores obtenidos oscilaron entre 5 y 28 mg/ml aproximadamente, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3.11 Concentración proteica de los extractos preparados, según el método Lowry, para todas las cepas de *V. cholerae* a estudio.

Nº cepa	Código referencia	mg / ml proteína total	Nº cepa	Código referencia	mg / ml proteína total
1	TM35123-77	21,7	16	GM31-90	24,3
2	TM34162-77	28,4	17	GM33-90	18,8
3	TM52479-78	28,5	18	GM34-90	21,9
4	TM9024-79	22,1	19	GM35-90	13,3
5	TM23256-79	20,2	20	GM36-90	19,9
6	TM19225-79	13,1	21	GM37-90	9,6
7	GGPB10	18,6	22	GM38-90	13,0
8	TM17015-82	15,3	23	CT7606-93	12,4
9	TM48733-82	11,6	24	CT9995-93	16,1
10	TM1187-83	21,8	25	TM11079-80	13,8
11	CT10738-92	21,8	26	GGPB44	18,2
12	CT10834-92	18,8	27	TM207832-78	9,8
13	CT12009-92	15,3	28	CT25016-91	14,9
14	GGPB29	16,1	29	CT7021-94	18,2
15	GM30-90	24,1	30	TM16457-78	13,6

Nº cepa	Código referencia	mg / ml proteína total	Nº cepa	Código referencia	mg / ml proteína total
31	CT7649-94	22,1	70	2076/29	16,7
32	CTMARM12-92	14,8	71	3-6/69	5,3
33	CTMACMI1-92	16,1	72	MEX332	11,0
34	MX121	22,2	73	NM4392	12,8
35	MX129	6,9	74	329	26,5
36	MX134	23,1	75	34-1	22,1
37	MX157	24,6	76	1-7/69	10,3
38	MX158	12,7	77	MEX445	11,6
39	MX159	7,1	78	NM286	16,8
40	AT01	15,5	79	653/36	12,4
41	CO391	26,6	80	25873	22,1
42	CO407	17,0	81	CO396 NT646	16,7
43	CO484	18,1	82	3-6/3	6,9
44	CO487	18,2	83	6-3/2	12,7
45	CO870	19,5	84	6-3/50	12,2
46	SG24	23,1	85	NPO388	6,2
47	1-7/31	12,1	86	CO416	7,9
48	6-3/6	12,1	87	NT648	5,1
49	NT330	16,9	88	NPO390	9,7
50	CO402	17,9	89	SO19	12,4
51	CO414	11,3	90	CO415	13,1
52	NT642	14,6	91	MOD084	5,6
53	BO1	11,4	92	NT638	9,2
54	2030 H	15,4	93	1074-78	9,1
55	NT329	25,8	94	BO4	25,2
56	25872	11,9	95	CO418	12,8
57	BLO9	20,3	96	ALVC-91-0803	9,5
58	MDO90	12,7	97	ALVC-91-1019	11,9
59	SO29	16,4	98	ALVC-92-0344	10,4
60	CO406	27,6	99	ALVC-92-0534	14,8
61	VO6	10,1	100	ALVC-93-0024	10,8
62	BO2	11,4	101	CECT 514	15,6
63	CO404 NT656	4,5	102	CECT 569	6,8
64	SO30	17,1	103	CECT 652	10,3
65	CO417	14,8	104	CECT 655	10,3
66	3-6/2	5,1	105	CECT 658	13,8
67	5-6/37	11,1	106	CECT 659	16,7
68	1196/78	14,3	107	ATCC 14035	8,2
69	CO403	23,8			

3.2.3 TIPOS ELECTROFORÉTICOS ó ETs

El estudio de aloenzimas multilocus se realizó con un total de 107 cepas de *V. cholerae*, analizándose la actividad enzimática de 15 enzimas metabólicas, que permitieron identificar 99 ETs distintos. En la siguiente tabla se muestran los perfiles alélicos obtenidos para todas las cepas analizadas, así como el ET que le corresponde a cada una. También se señala el número de cepas que presentan el mismo ET.

Tabla 3.12 Perfiles alélicos obtenidos para cada una de las cepas de *V. cholerae* analizadas.

ETs	Nº cepas	Referencia cepas	Alelos en cada locus														
			G6P	IDH	ALD	GP1	MDH	FUM	ASD	LAP	ME	EST	C230	NSP	XDH	PGI	6PG
1	1	TM35123-77	4	3	1	1	1	3	2	7	1	1	2	3	1	4	1
2	2	TM34162-77	4	3	1	2	1	3	2	4	1	1	2	3	1	4	1
		TM9024-79	4	3	1	2	1	3	2	4	1	1	2	3	1	4	1
3	1	TM52479-78	4	3	1	2	1	2	1	5	2	2	1	3	1	4	6
4	1	TM23256-79	3	3	1	1	1	2	1	5	2	2	1	3	1	2	1
5	1	TM19225-79	3	1	1	5	1	4	2	5	2	2	1	3	4	2	3
6	1	GGPB10	3	3	1	2	1	2	1	5	2	2	1	3	5	3	5
7	1	TM1705-82	3	3	1	2	1	5	2	5	2	2	2	3	1	3	1
8	3	TM48733-82	4	3	1	3	2	3	2	7	1	1	2	3	1	4	1
		TM11079-80	4	3	1	3	2	3	2	7	1	1	2	3	1	4	1
		CO484	4	3	1	3	2	3	2	7	1	1	2	3	1	4	1
9	1	TM1187-83	3	3	1	2	1	4	2	5	3	2	1	3	4	3	1
10	1	CT10738-92	3	3	1	2	1	6	2	5	3	2	1	3	4	3	3
11	1	CT10834-92	3	3	1	2	1	4	0	5	2	2	1	3	4	2	5
12	1	CT12009-92	3	4	1	2	3	4	3	2	5	2	2	3	1	3	1
13	1	GGPB29	3	3	1	1	1	5	2	5	3	2	1	3	1	2	1
14	1	GM30-90	3	2	1	2	3	3	3	3	4	2	3	3	1	3	3
15	1	GM31-90	4	3	1	1	1	3	2	7	3	1	2	3	1	4	1
16	1	GM33-90	3	3	1	1	1	2	1	5	2	2	1	3	1	2	5
17	1	GM34-90	3	3	1	2	1	2	1	5	2	2	1	3	1	2	1
18	1	GM35-90	4	3	1	2	1	3	2	1	3	1	2	3	1	4	1
19	1	GM36-90	4	1	1	2	1	3	2	7	3	1	2	3	4	4	1
20	1	GM37-90	3	3	1	2	1	5	2	5	3	2	1	3	1	3	1
21	1	GM38-90	2	3	1	2	1	4	2	1	3	2	3	3	1	4	1
22	1	CT7606-93	6	3	1	3	2	3	2	7	1	1	1	3	4	4	1
23	1	CT9995-93	4	3	1	1	1	3	2	7	3	1	1	3	4	4	1

ETs	Nº cepas	Referencia cepas	Alelos en cada locus														
			G6P	IDH	ALD	GP1	MDH	FUM	ASD	LAP	ME	EST	C230	NSP	XDH	PGI	6PG
24	1	GGPB44	4	2	1	1	1	3	2	7	1	1	2	3	1	4	1
25	2	TM207832-78	4	3	1	2	2	3	2	4	1	1	2	3	1	4	1
		ALVC-92-0344	4	3	1	2	2	3	2	4	1	1	2	3	1	4	1
26	1	CT25016-91	6	3	1	3	2	3	2	7	1	1	1	3	4	4	3
27	1	CT7021-94	6	3	1	2	2	3	2	3	1	1	2	3	4	4	1
28	1	TM16457-78	3	3	1	1	1	4	1	5	3	2	1	3	1	3	5
29	1	CT7649-94	4	3	1	2	2	3	2	7	1	1	2	3	1	4	1
30	1	CTMARM12-92	4	3	1	1	1	3	2	1	3	1	2	3	1	4	3
31	1	CTMACMI1-92	3	3	1	2	2	4	2	6	3	1	2	3	1	4	1
32	1	MX121	3	1	1	2	1	4	1	5	2	2	1	3	1	2	5
33	1	MX129	3	3	1	1	1	2	1	5	2	2	2	1	1	3	1
34	1	MX134	4	3	1	1	1	3	2	7	1	2	1	3	1	2	5
35	1	MX157	4	3	1	1	2	3	2	2	1	1	2	3	1	4	1
36	1	MX158	3	3	1	2	1	5	1	5	3	2	1	3	1	3	1
37	1	MX159	4	3	1	3	2	3	2	2	1	1	2	3	1	3	1
38	1	AT01	4	2	1	2	1	3	2	4	1	1	2	3	1	4	1
39	1	CO391	4	3	1	2	1	5	2	5	3	2	1	3	1	2	5
40	1	CO407	3	3	1	2	1	4	2	5	3	2	2	3	1	3	1
41	1	CO487	4	1	1	2	1	3	2	4	3	1	2	3	4	4	1
42	1	CO870	3	4	1	1	1	2	1	3	2	2	1	3	4	3	5
43	1	SG24	3	1	1	2	1	3	2	1	1	2	1	3	1	4	3
44	1	CECT514	6	3	1	2	2	7	2	2	3	1	1	3	6	4	2
45	1	CECT569	6	1	1	2	2	7	2	1	1	1	1	3	4	4	1
46	1	CECT652	6	3	1	2	2	7	2	2	3	1	2	3	1	4	1
47	1	CECT655	4	3	1	2	2	7	2	2	3	1	2	3	5	4	1
48	1	CECT658	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	2	3	4	4	1
49	1	CECT659	6	3	2	3	2	3	2	2	1	1	1	3	1	4	4
50	1	1-7/31	4	3	1	2	2	3	2	2	1	2	1	3	1	4	1
51	1	6-3/6	3	3	1	1	1	6	2	3	1	2	2	3	1	4	1
52	1	NT330	4	3	1	2	2	3	2	2	1	1	2	3	5	5	1
53	2	CO402	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	1	3	4	4	1
		SO30	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	1	3	4	4	1
54	1	CO414	6	3	2	3	2	3	2	2	1	1	1	3	1	4	3
55	1	NT642	6	3	1	3	2	4	2	2	3	1	2	3	1	4	1
56	1	BO1	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	1	3	1	4	1
57	1	ATCC14035	6	3	1	2	2	3	2	2	1	2	1	3	0	4	1
58	1	2030 H	1	3	1	2	1	3	2	3	3	2	1	3	4	1	5
59	1	NT329	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	1	3	1	4	4
60	2	25872	6	3	1	2	2	3	2	2	1	1	1	3	5	4	1
		CO406	6	3	1	2	2	3	2	2	1	1	1	3	5	4	1
61	1	BLO9	6	3	1	2	2	3	2	3	1	1	1	3	1	4	3

ETs	Nº cepas	Referencia cepas	Alelos en cada locus														
			G6P	IDH	ALD	GP1	MDH	FUM	ASD	LAP	ME	EST	C230	NSP	XDH	PGI	6PG
62	1	MDO90	4	3	1	1	2	3	2	3	1	1	1	3	1	4	1
63	1	SO29	6	3	1	4	2	3	2	2	1	1	1	3	4	4	1
64	1	VO6	4	3	1	3	2	3	2	2	1	1	1	3	0	4	1
65	1	BO2	4	3	1	1	2	6	2	3	1	1	1	3	4	4	1
66	1	CO404	6	1	1	3	2	3	2	4	1	1	0	1	1	5	2
67	1	CO417	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	1	3	5	4	1
68	1	3/06/02	4	2	1	1	1	3	2	5	1	1	1	3	1	4	1
69	1	5-6/37	4	2	1	2	2	3	2	3	1	1	1	3	1	4	3
70	1	1196/78	3	4	1	2	1	6	2	1	1	2	1	2	5	2	6
71	1	CO403	4	3	1	2	2	3	2	3	1	1	1	3	4	4	1
72	1	2076/29	3	2	2	2	1	4	2	3	1	2	2	3	1	3	1
73	1	3-6/69	4	2	1	2	1	3	2	3	1	2	0	3	1	5	2
74	1	MEX332	4	3	1	3	2	3	3	4	1	1	2	3	1	4	0
75	1	NM4392	3	3	1	2	1	5	2	4	1	2	2	3	1	3	0
76	1	329	4	3	1	2	2	3	2	3	1	1	2	3	1	4	1
77	1	34-1	4	1	2	2	3	3	3	1	4	2	1	3	2	4	2
78	1	1-7/69	3	3	1	2	1	6	2	3	1	2	1	3	1	2	4
79	1	MEX445	3	4	1	2	1	2	1	1	2	1	1	3	4	4	1
80	1	NM286	5	3	1	3	2	4	2	4	1	2	2	3	0	5	0
81	1	653/36	3	4	1	2	1	4	2	1	1	2	2	3	0	4	0
82	1	25873	4	3	1	1	2	3	2	3	1	1	1	3	4	4	4
83	1	CO396	6	3	1	2	2	3	2	1	1	2	1	3	1	4	3
84	1	3-6/3	3	3	1	2	1	4	2	7	1	2	2	3	1	4	1
85	1	6-3/2	3	2	1	2	1	4	2	3	1	2	2	3	1	4	1
86	1	6-3/50	3	3	1	2	3	3	3	4	4	2	2	3	0	4	1
87	1	NPO388	3	2	1	2	3	3	3	3	4	2	0	3	1	0	0
88	1	CO416	3	2	1	2	3	3	3	1	4	2	2	3	2	3	1
89	1	NT648	6	3	1	2	2	3	2	7	1	1	0	2	3	5	2
90	2	NPO390	6	3	1	3	2	3	2	3	1	1	1	3	1	4	1
		BO4	6	3	1	3	2	3	2	3	1	1	1	3	1	4	1
91	1	SO19	3	3	1	2	1	3	2	7	1	2	2	3	1	3	6
92	1	CO415	6	3	1	2	2	3	2	2	1	1	2	3	1	4	1
93	1	MOD084	6	3	1	2	2	3	2	3	1	1	2	3	0	4	1
94	1	NT638	6	3	1	3	2	3	2	2	1	1	2	3	1	4	1
95	1	1074-78	3	4	1	2	1	1	1	3	3	2	1	3	1	4	3
96	1	CO418	6	3	1	1	2	3	2	3	1	1	1	3	1	4	1
97	2	ALVC-91-0803	4	3	1	2	2	3	2	7	1	1	1	3	1	4	1
		ALVC-91-1019	4	3	1	2	2	3	2	7	1	1	1	3	1	4	1
98	1	ALVC-92-0534	6	3	1	3	2	3	2	1	1	1	2	3	1	4	1
99	1	ALVC-93-0024	4	3	1	1	2	3	2	4	1	1	2	3	1	4	1

Los tipos electroforéticos (ETs) 2, 8, 25, 53, 60, 90 y 97 presentaron más de una cepa con idéntico genotipo. Todos estos ETs estaban representados por dos cepas, excepto el ET 8 que incluía tres. Los 92 ETs restantes sólo estuvieron representados por una única cepa. En la siguiente tabla se puede observar las características generales de las cepas que se agrupaban en un mismo ET, indicando su serogrupo y/o biotipo, la fuente de aislamiento y el origen geográfico.

Tabla 3.13 Principales características de los grupos de cepas que presentaron idéntico genotipo multilocus.

ET	Nº cepas	Referencia cepas	Serogrupo/Biotipo	Fuente	Origen geográfico
2	2	TM34162-77 TM9024-79	No-O1/no-O139 No-O1/no-O139	Ambiental Ambiental	Brasil Brasil
8	3	TM48733-82 TM11079-80 CO484	No-O1/no-O139 O1 <i>El Tor</i> No-O1/no-O139	Ambiental Ambiental Ambiental	Brasil Brasil India
25	2	TM207832-78 ALVC-92-0344	O1 <i>El Tor</i> O1 <i>El Tor</i>	Ambiental Clínica	Brasil Perú
53	2	CO402 SO30	O139 O139	Fecal Clínica	India India
60	2	25872 CO406	No-O1/no-O139 O139	Ambiental Fecal	Desconocido India
90	2	NPO390 BO4	O139 O139	Clínica Fecal	India India
97	2	ALVC-91-0803 ALVC-91-1019	O1 <i>El Tor</i> O1 <i>El Tor</i>	Clínica Clínica	Perú Perú

3.2.4 VARIABILIDAD ALÉLICA POR LOCUS

Todos los loci estudiados fueron polimórficos, y el número de alelos por locus osciló entre 2, para las enzimas alanina deshidrogenasa y esterasa, y 7, para las enzimas fumarasa, leucina aminopeptidasa, xantina deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. El número medio de alelos por locus fue 4,8 (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Variabilidad alélica obtenida con la técnica MLEE para el conjunto de cepas de *V. cholerae* estudiadas.

Nº cepas = 107
Nº loci = 15
Nº ETs = 99
Nº total de alelos = 72
Nº mínimo de alelos / locus = 2 (ALD, EST)
Nº máximo de alelos / locus = 7 (FUM, LAP, XDH, 6PG)
Nº medio de alelos / locus = 4,8

Tabla 3.15 Distribución de los 72 alelos obtenidos en los 15 loci estudiados.

Locus	Alelos		
	Alelo mínimo	Alelo máximo	Nº total alelos / locus
G6P	1	6	6
IDH	1	4	4
ALD	1	2	2
GP1	1	5	5
MDH	1	3	3
FUM	1	7	7
ASD	0	3	4
LAP	1	7	7
ME	1	5	5
EST	1	2	2
C23O	0	3	4
NSP	1	3	3
XDH	0	6	7
PGI	0	5	6
6PG	0	6	7

Se observó un número pequeño de alelos nulos para el conjunto de ETs identificados (17), distribuidos en 5 de las 15 enzimas analizadas (ASD, C23O, XDH, PGI, 6PG).

En las siguientes páginas se muestran fotografías de geles de poliacrilamida teñidos específicamente para algunas de las enzimas estudiadas, observándose bandas de actividad enzimática bien definidas y diferentes electromorfos para un mismo locus.

Figura 3.5 Actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH)



Figura 3.6 Actividad del enzima málico (ME)

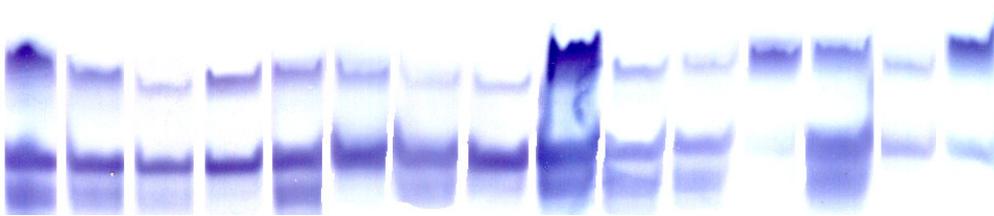


Figura 3.7 Actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH)



Figura 3.8 Actividad de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG)

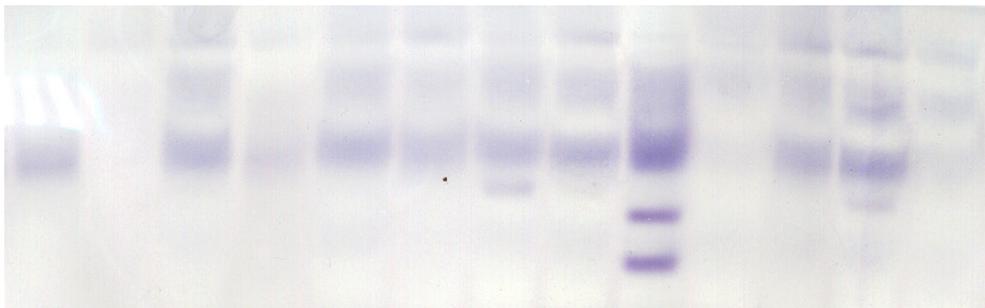


Figura 3.9 Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P)



Figura 3.10 Actividad de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GP1)



Figura 3.11 Actividad de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH)

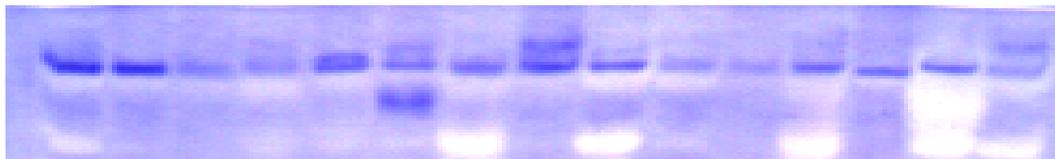


Figura 3.12 Actividad de la enzima alanina deshidrogenasa (ALD)



Figura 3.13 Actividad de la enzima aspartato deshidrogenasa (ASD)

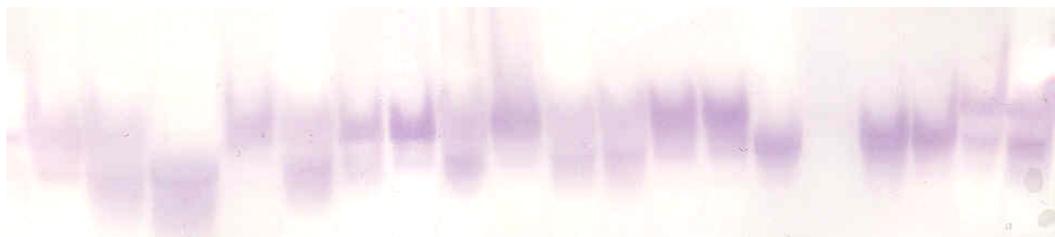


Figura 3.14 Actividad de la enzima catecol-2,3-oxigenasa (C23O)

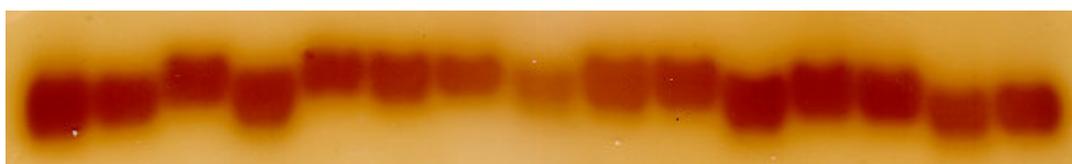


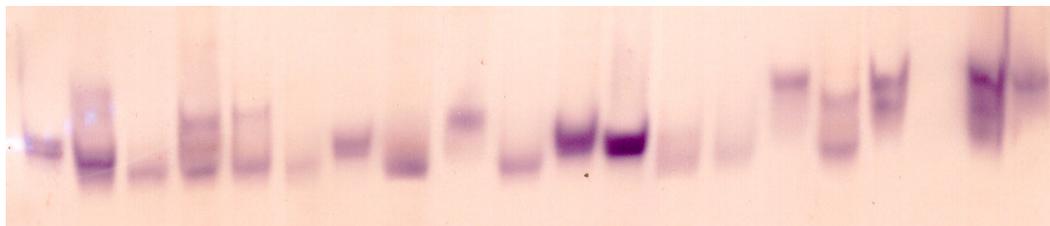
Figura 3.15 Actividad de la enzima nucleósido fosforilasa (NSP)

Se muestra un esquema de las bandas observadas ya que no se pudieron guardar los geles teñidos para este enzima por su característica tinción (apartado 3.1.12.11).



Figura 3.16 Actividad de las enzimas esterases (EST)



Figura 3.17 Actividad de la enzima leucina aminopeptidasa (LAP)**Figura 3.18** Actividad de la enzima fumarasa (FUM)**Figura 3.19** Actividad de la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI)

3.2.5 DIVERSIDAD GÉNICA

En la siguiente tabla se muestran los valores de diversidad génica por locus y diversidad génica media, considerando todas las cepas analizadas ó sólo los distintos ETs identificados. Los valores obtenidos son muy similares y por ello, a partir de ahora, se tomarán como referentes de la muestra estudiada los obtenidos considerando sólo los ETs identificados con la técnica MLEE.

Tabla 3.16 Diversidad génica por locus y diversidad génica media para la muestra estudiada.

Locus	Diversidad génica por locus (h)	
	ETs (99)	Cepas (107)
G6P	0,689	0,688
IDH	0,410	0,384
ALD	0,078	0,073
GP1	0,585	0,588
MDH	0,561	0,554
FUM	0,601	0,569
ASD	0,347	0,325
LAP	0,832	0,833
ME	0,584	0,556
EST	0,499	0,489
C230	0,558	0,554
NSP	0,079	0,073
XDH	0,552	0,543
PGI	0,543	0,514
6PG	0,585	0,553
	Diversidad génica media (H)	
	ETs (99)	Cepas (107)
	0,500	0,486

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos considerando sólo ETs, la diversidad génica por locus osciló entre 0,078 para los loci menos diversos (ALD y NSP) y 0,832 para el locus más diverso (LAP) (Tabla 3.16). También se calculó la diversidad génica media (H), al realizar la media aritmética de los valores de diversidad génica en todos los loci estudiados, y fue de 0,500.

En la tabla 3.17 se comparan los valores calculados de diversidad génica media para distintos grupos de cepas formados a partir de la muestra inicial.

Tabla 3.17 Comparación de valores de diversidad génica media entre diferentes subgrupos de la muestra estudiada.

	Nº de ETs	Nº de alelos medio por locus	Diversidad génica media (H)
Total 107 cepas	99	4,80	0,500
Dendrograma			
División I	59	3,47	0,347
División II	34	3,73	0,435
División III	6	2,33	0,404
Serogrupo / Biotipo			
O1	35	4,00	0,490
O1 <i>El Tor</i>	24	3,60	0,448
O1 <i>clásico</i>	9	3,33	0,572
No-O1/no-O139	37	4,00	0,515
O139	26	3,53	0,396
Origen geográfico			
América ¹	54	4,26	0,494
Brasil	31	3,53	0,486
EEUU/México	20	3,86	0,514
India	32	4,06	0,463
Fuente de aislamiento			
Ambiental	47	4,33	0,516
Fecal	22	3,53	0,475
Clínica	31	3,67	0,417

¹ Considerando de forma conjunta cepas procedentes de Brasil, México, Perú y EEUU.

3.2.6 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS DE MLEE

A partir de los perfiles alélicos obtenidos aplicando la técnica MLEE (Tabla 3.12), y por comparación entre parejas de ETs de la coincidencia o no coincidencia de alelos en cada uno de los locus, se construyó una matriz de coeficientes de distancias que fue la base para generar un dendrograma con el programa informático PHYLIP, utilizando el método UPGMA.

El dendrograma obtenido se muestra en la figura 3.20, y representa las relaciones genéticas existentes entre los diferentes tipos electroforéticos (ETs), y por tanto, entre las

diferentes cepas analizadas en el estudio. El coeficiente de correlación cofenética (r_C) para el total de la muestra fue de 0,81, lo que representa que el 81% de la diversidad génica obtenida está explicada por las relaciones expresadas en el dendrograma.

En la parte derecha del dendrograma se indica el nº de ET que corresponde, el serogrupo/biotipo de la cepa que agrupa, el país de aislamiento y la fuente de origen. La fuente se indica con una letra: C, clínica; A, ambiental; F, fecal y D, desconocido. Los ETs que contienen más de una cepa se indican con un asterisco (*), y el conjunto de cepas que agrupan y sus principales características se muestran en la tabla 3.13. La escala de la figura indica distancia genética.

En la figura 3.21 se muestra el mismo dendrograma generado para el total de la muestra, señalando con símbolos y colores los principales atributos de las cepas que agrupan. La siguiente tabla muestra la correlación de símbolos y colores.

Tabla 3.18 Leyenda del dendrograma que se muestra en la figura 3.21.

Letra	País aislamiento	Forma	Serogrupo	Color	Fuente
B	Brasil		O1	Azul	Ambiental
I	India		O1 <i>El Tor</i>	Amarillo	Clínica
P	Perú		O1 <i>clásico</i>	Magenta	Fecal
M	México		No-O1/no-O139	Verde	Desconocido
T	Tanzania		O139		
G	Bangladesh		No tipado		
E	EEUU				
R	Reino Unido				
D	Varios				

Figura 3.20 Dendrograma construido que muestra las relaciones genéticas existentes entre los 99 ETs identificados.

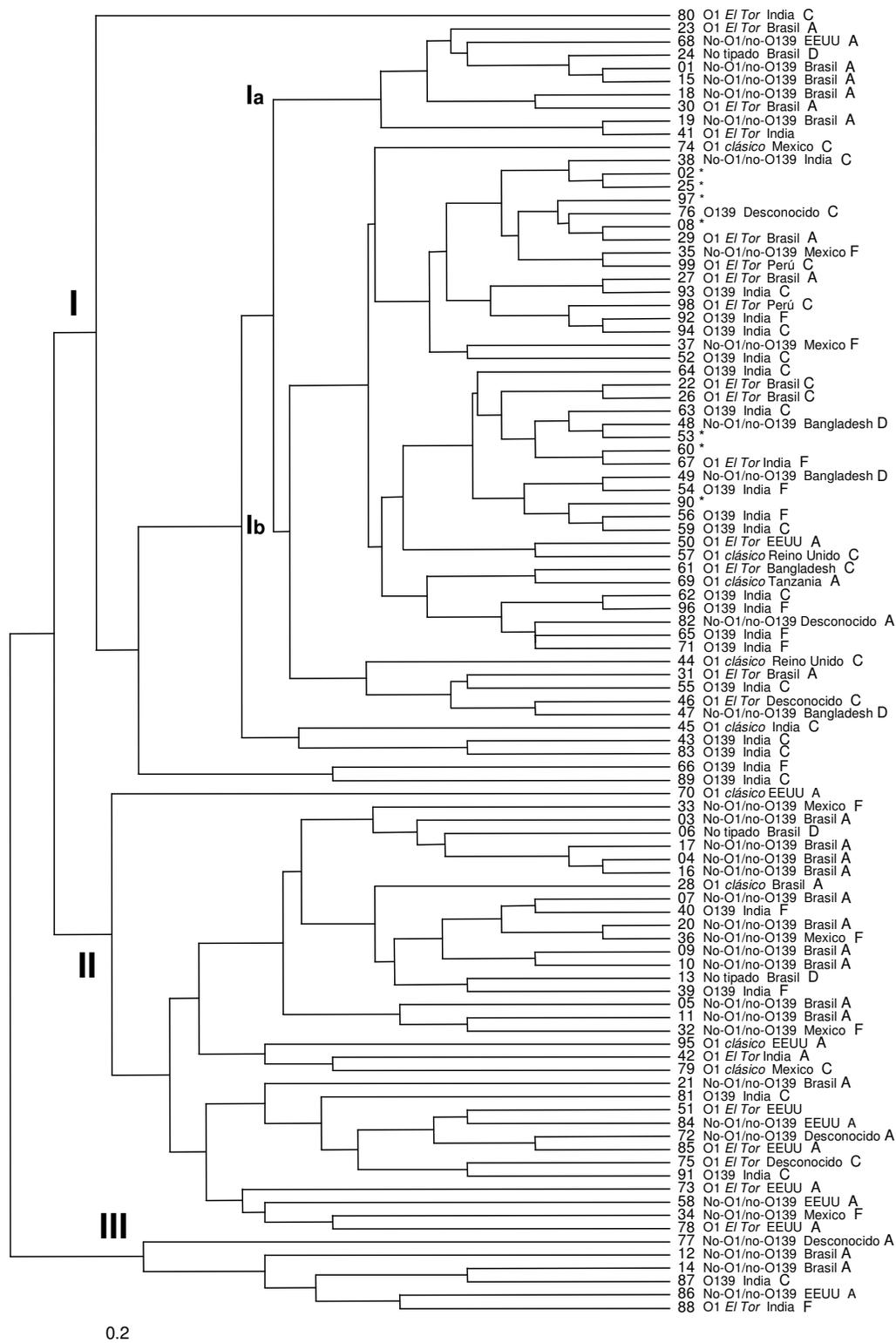
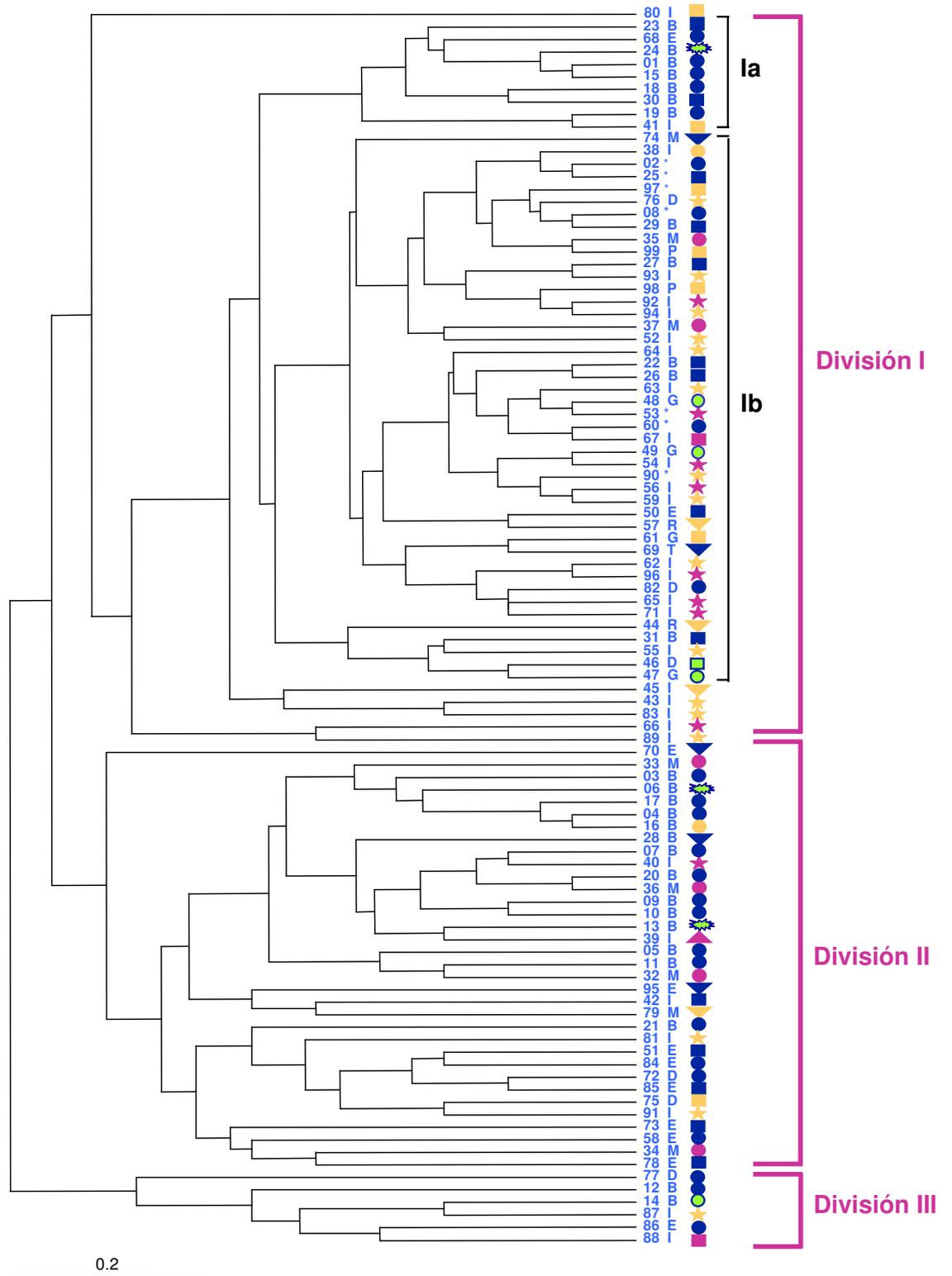


Figura 3.21 Dendrograma mostrando las relaciones genéticas existentes entre los 99 ETs identificados, señalando las características de las cepas con símbolos y colores (Tabla 3.18).



El dendrograma generado no mostró un agrupamiento significativo de las cepas de *V. cholerae* analizadas en relación a su serogrupo, biotipo o origen geográfico. El dendrograma se subdividió en tres grandes clusters: I, II y III, que se separan a una distancia genética de 0,65. A su vez, la división I se subdividió en 2 grupos: Ia, que incluye un gran número de cepas ambientales, y Ib, que agrupa un mayor número de cepas clínicas. La división II está constituida por 34 ETs, que agrupa mayoritariamente cepas no-O1/no-O139 ambientales. La división III está representada por 6 ETs sin ninguna relación aparente entre ellos, y diverge a una distancia genética de 0,65 respecto a las otras dos divisiones, separándose claramente del resto de cepas analizadas.

La distancia genética más pequeña que se observó en el dendrograma entre todos los ETs, y que correspondía a una única diferencia alélica en el genotipo multilocus de estos ETs, fue de 0,06.

La tabla 3.19 muestra los 30 pares de ETs que difieren entre ellos en un solo locus, indicando las cepas que agrupan y sus principales características. De los 30 pares de ETs que aparecen, 15 de ellos están formados por cepas del mismo serogrupo: 7 parejas de cepas O139, 5 de cepas no-O1/no-O139 y 3 de cepas O1 *El Tor*. En sólo cuatro de esos casos, las parejas de ETs están representadas por cepas de origen geográfico distinto. Por otra parte, el resto de parejas de ETs agrupan cepas de diferentes serogrupos o biotipos, excepto aislados O1 *clásico*.

Los loci que con más frecuencia difieren estas parejas de ETs son los que codifican para las enzimas GP1 (7 pares de ETs) y LAP (6 pares de ETs). En cambio, no se han encontrado diferencias en 4 de los loci analizados, los que codifican para las enzimas EST, FUM, NSP y PGI.

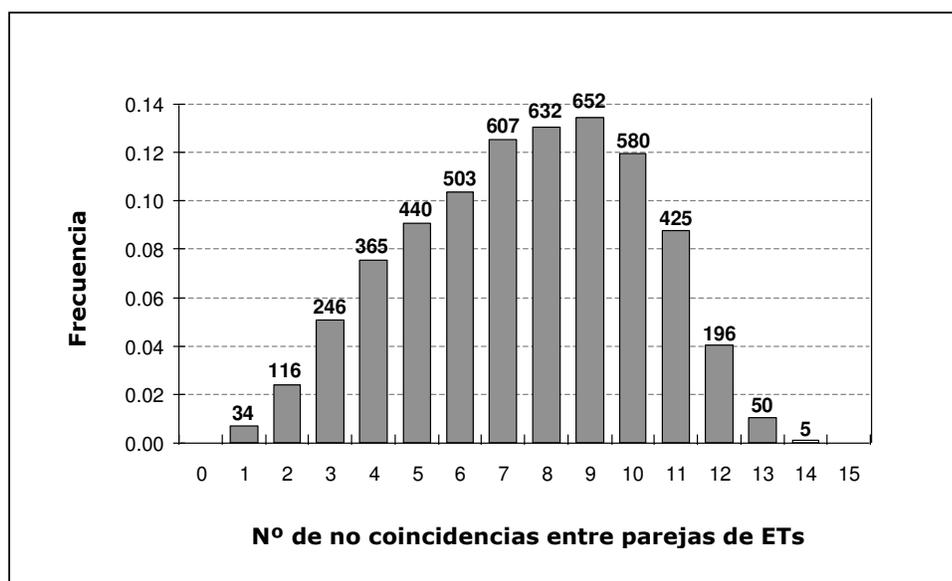
Tabla 3.19 Parejas de ETs que difieren en un solo locus.

ET	Serogrupo	Origen geográfico	Locus	ET	Serogrupo	Origen geográfico	Locus
1	no-O1/no-O139	Brasil	ME	29	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	C230
15	no-O1/no-O139	Brasil	ME	97	O1 <i>El Tor</i>	Perú	C230
1	no-O1/no-O139	Brasil	IDH	35	no-O1/no-O139	México	LAP
24	desconocido	Brasil	IDH	99	O1 <i>El Tor</i>	Perú	LAP
2	no-O1/no-O139	Brasil	MDH	48	no-O1/no-O139	Bangladesh	C230
25	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	MDH	53	O139	India	C230
	O1 <i>El Tor</i>	Perú	MDH				
2	no-O1/no-O139	Brasil	IDH	48	no-O1/no-O139	Bangladesh	XDH
38	no-O1/no-O139	India	IDH	94	O139	India	XDH
4	no-O1/no-O139	Brasil	6PG	49	no-O1/no-O139	Bangladesh	6PG
16	no-O1/no-O139	Brasil	6PG	54	O139	Desconocido	6PG
4	no-O1/no-O139	Brasil	GP1	49	no-O1/no-O139	Bangladesh	ALD
17	no-O1/no-O139	Brasil	GP1	59	O139	India	ALD
8	no-O1/no-O139	Brasil	GP1	53	O139	India	XDH
	no-O1/no-O139	India	GP1	56	O139	India	XDH
	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	GP1	67	O1 <i>El Tor</i>	India	XDH
29	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	GP1	53	O139	India	GP1
19	no-O1/no-O139	Brasil	LAP	63	O139	India	GP1
41	O1 <i>El Tor</i>	India	LAP	56	O139	India	6PG
20	no-O1/no-O139	Brasil	ASD	59	O139	India	6PG
36	no-O1/no-O139	México	ASD	56	O139	India	LAP
22	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	6PG	90	O139	India	LAP
26	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	6PG	56	O139	India	C230
22	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	LAP	94	O139	India	C230
53	O139	India	LAP	60	no-O1/no-O139	Desconocido	GP1
	O139	India	LAP		O139	India	GP1
25	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	LAP	67	O1 <i>El Tor</i>	India	GP1
	O1 <i>El Tor</i>	Perú	LAP	62	O139	India	G6P
29	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	LAP	96	O139	India	G6P
76	O139	Desconocido	LAP	90	O139	India	GP1
25	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	GP1	96	O139	India	GP1
	O1 <i>El Tor</i>	Perú	GP1	92	O139	India	GP1
99	O1 <i>El Tor</i>	Perú	GP1	94	O139	India	GP1
27	O1 <i>El Tor</i>	Brasil	XDH	94	O139	India	LAP
93	O139	India	XDH	98	O1 <i>El Tor</i>	Perú	LAP

3.2.7 ANÁLISIS DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

La distribución de no coincidencias entre parejas de ETs se muestra en la figura 3.22. La población de *V. cholerae* analizada en este estudio presentó una distribución unimodal.

Figura 3.22 Distribución de no coincidencias entre parejas de ETs para los 99 ETs identificados en la muestra de *V. cholerae* estudiada.



En el eje de ordenadas se muestran las frecuencias relativas, y en la parte superior de las barras se indican las frecuencias absolutas.

La tabla 3.20 indica los resultados obtenidos al realizar el análisis del desequilibrio de ligamiento para el total de la muestra y para algunos subgrupos de la muestra inicial. El índice de asociación (I_A) para el total de la muestra fue de $1,25 \pm 0,14$, valor significativamente distinto de cero ($P < 0,0001$), y por tanto, sugiere que la población de *V. cholerae* estudiada presenta una estructura clonal.

Al analizar subgrupos formados a partir de la muestra inicial, considerando las distintas divisiones del dendrograma, los serogrupos/biotipos, el origen geográfico y las fuentes de aislamiento, todos los subgrupos obtuvieron valores de I_A significativamente distintos de

cero ($P < 0,0001$), excepto 4 casos, cuando consideramos solamente las cepas de la división II del dendrograma, las cepas de la división III del dendrograma, las cepas pertenecientes al serogrupo O1 *clásico* y las cepas aisladas de EEUU y México, que exhiben valores de I_A de 0,41, 0,60, 0,64 y 0,42, respectivamente.

Tabla 3.20 Resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento para el total de la muestra y para los diferentes subgrupos estudiados.

	Nº de ETs	V_O	V_E	Límites de confianza del 95% de V_E	$I_A \pm SD^2$	Simulación Montecarlo Valor p
Total 107 aislados	99	7,13	3,17	2,29 - 4,04	$1,25 \pm 0,14$	< 0,0001
Dendrograma						
División I	59	3,91	2,62	1,67 - 3,56	$0,49 \pm 0,18$	< 0,0001
División II	34	3,77	2,67	1,41 - 3,92	$0,41 \pm 0,24$	0,0010
División III	6	2,99	1,88	0,24 - 3,99	$0,60 \pm 0,56$	0,1011
Serogrupo / Biotipo						
O1	35	6,54	3,04	1,63 - 4,44	$1,15 \pm 0,23$	< 0,0001
O1 <i>El Tor</i>	24	7,01	2,94	1,29 - 4,57	$1,39 \pm 0,28$	< 0,0001
O1 <i>clásico</i>	9	4,35	2,65	0,20 - 5,09	$0,64 \pm 0,46$	0,0152
No-O1/no-O139	37	6,72	3,20	1,75 - 4,64	$1,10 \pm 0,23$	< 0,0001
O139	26	8,05	2,94	1,34 - 4,52	$1,74 \pm 0,27$	< 0,0001
Origen geográfico						
América ¹	54	6,37	3,10	1,94 - 4,25	$1,05 \pm 0,19$	< 0,0001
Brasil	31	7,82	3,01	1,53 - 4,49	$1,59 \pm 0,24$	< 0,0001
EEUU/México	20	4,49	3,15	1,22 - 5,08	$0,42 \pm 0,31$	0,0113
India	32	8,74	3,05	1,57 - 4,53	$1,86 \pm 0,24$	< 0,0001
Fuente de aislamiento						
Ambiental	47	6,17	3,16	1,89 - 4,42	$0,95 \pm 0,19$	< 0,0001
Fecal	22	10,16	3,27	1,35 - 5,18	$2,10 \pm 0,29$	< 0,0001
Clínica	31	6,17	2,96	1,50 - 4,42	$1,08 \pm 0,25$	< 0,0001

¹ Considerando de forma conjunta cepas procedentes de Brasil, México, Perú y EEUU.

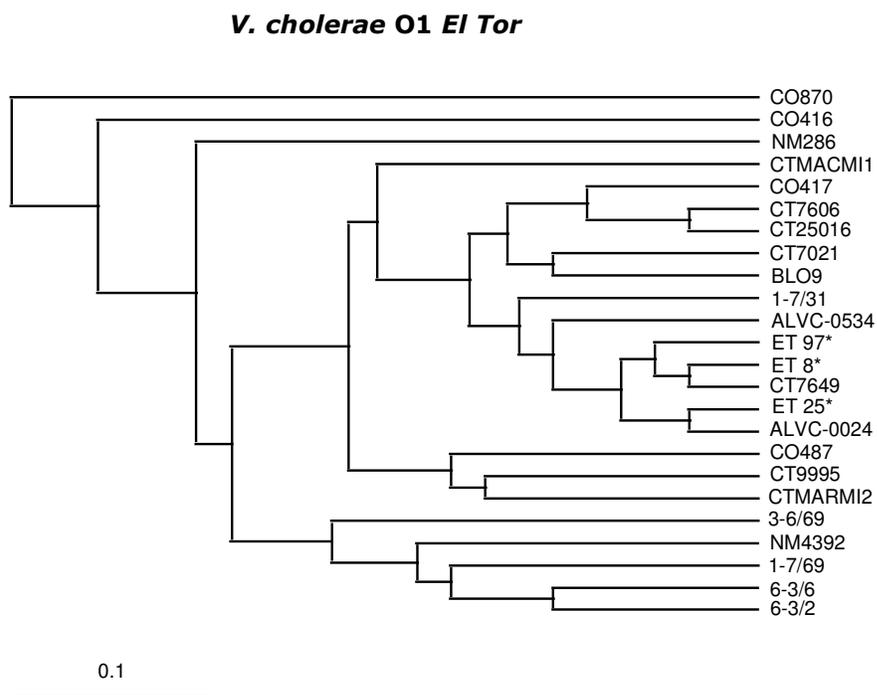
² $I_A \pm SD$, esta desviación estándar fue calculada como $SD = \frac{\sqrt{\frac{Mu4 - (Mu2)^2}{n^\circ ETs}}}{Mu2}$, donde Mu

es el momento esperado.

3.2.8 RELACIÓN GENÉTICA ENTRE O1 *El Tor* y O139

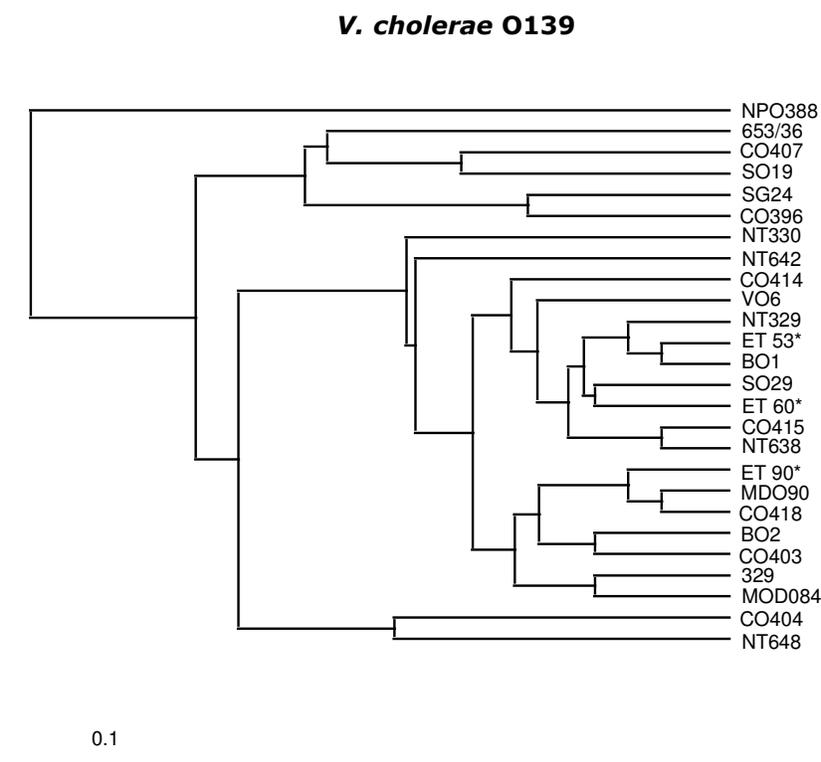
También se han generado dendrogramas para 2 subpoblaciones de la muestra, O1 *El Tor* y O139, a partir de una matriz de coeficientes de distancias, aplicando el programa PHYLIP y utilizando el método UPGMA. En las figuras 3.23 y 3.24 se muestran los dendrogramas construidos para cada subpoblación.

Figura 3.23 Dendrograma obtenido para la subpoblación de cepas de *V. cholerae* del serogrupo O1 biotipo *El Tor*.



* ETs que agrupan más de una cepa, ver tabla 3.13.

Figura 3.24 Dendrograma obtenido para la subpoblación de cepas de *V. cholerae* del serogrupo O139.



* ETs que agrupan más de una cepa, ver tabla 3.13.

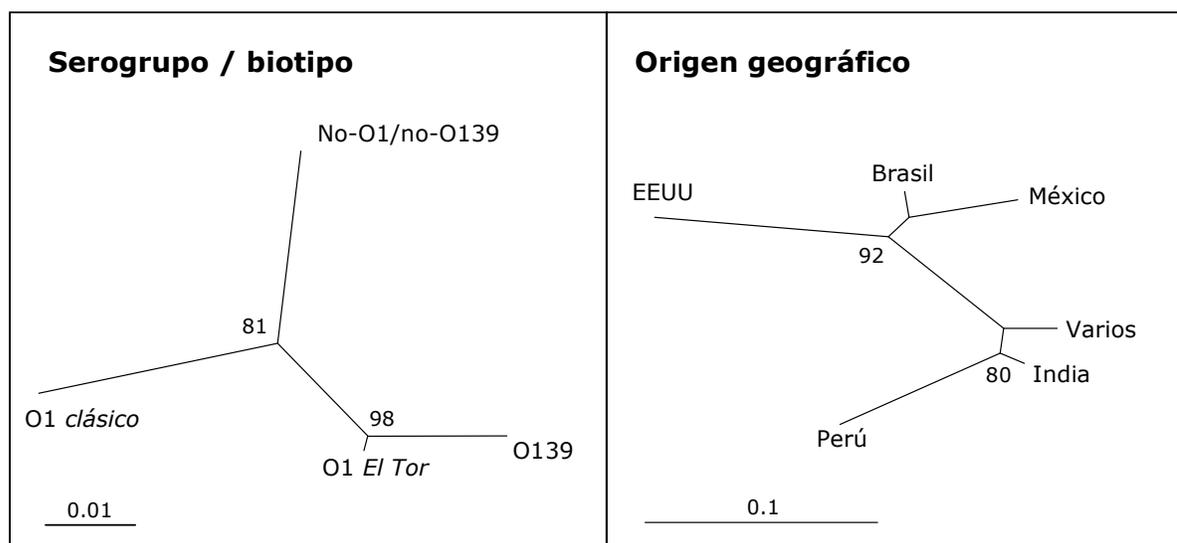
3.2.9 DISTANCIAS GENÉTICAS DENTRO DE SUBPOBLACIONES

Se han construido cladogramas a partir de la distancia genética de Nei entre subgrupos de poblaciones de la muestra considerando su serogrupo y/o biotipo, y su origen geográfico. Los árboles generados se muestran en la figura 3.25.

El cladograma de la izquierda muestra como se agrupan las distintas subpoblaciones según su serogrupo y/o biotipo, apareciendo el serogrupo O139 mucho más relacionado genéticamente con las cepas O1 *El Tor* que con el resto de serogrupos analizados.

En el cladograma de la derecha se observa como se distribuyen las diferentes subpoblaciones de la muestra considerando el origen geográfico de su aislamiento, y mostró que las cepas aisladas de EEUU, Brasil y México están más relacionadas genéticamente entre ellas que con los aislados procedentes de Perú y la India.

Figura 3.25 Cladogramas de distintas subpoblaciones a partir de la muestra inicial generado por el método Neighbour-Joining usando la distancia genética de Nei.



Los valores que se muestran en los nodos de los cladogramas corresponden a aquellos valores superiores al 80% obtenidos en el análisis de "bootstrap". La escala indica distancia genética.

3.3 Discusión

Vibrio cholerae es una especie bacteriana bien definida en base a pruebas bioquímicas y estudios de homología de DNA (Baumann y col., 1984). Sin embargo, esta especie constituye un grupo heterogéneo en relación a su potencial patógeno, ya que se pueden realizar distinciones importantes entre cepas en cuanto a la producción de toxina colérica (CT), a su serogrupo y a su potencial de causar brotes epidémicos de cólera. Hasta el momento, sólo dos de los cerca de 200 serogrupos definidos para esta especie, O1 y O139, se han asociado como agentes causales de epidemias de cólera. Todo ello, conlleva que muchos aspectos de la ecología, patogénesis y epidemiología de *V. cholerae* se desconozcan todavía.

Se han utilizado métodos clásicos (serotipado, biotipado) y moleculares (ribotipado, RAPD, AFLP) para analizar la diversidad de poblaciones de *V. cholerae*, permitiendo realizar estudios epidemiológicos a una escala global. La electroforesis de aloenzimas multilocus (MLEE) constituye el método clásico en el estudio de la genética de poblaciones bacterianas (Selander y col., 1986). Por eso, en los últimos años se ha utilizado esta técnica como una herramienta útil para estimar la diversidad génica y la frecuencia de recombinación en poblaciones de *V. cholerae*. Estos aspectos son de gran importancia para poder establecer su estructura poblacional y permitir un mejor conocimiento de su epidemiología.

Revisando la bibliografía se encuentran 5 trabajos previos (Desmarchelier y col., 1988; Salles y Momen, 1991; Wachsmuth y col., 1993; Evins y col., 1995; Beltrán y col., 1999) al que se presenta en esta memoria (Farfán y col., 2000), que utilizan la metodología de MLEE para analizar el tipo de población que presenta *V. cholerae*.

Como se puede apreciar en la tabla 3.21, estos trabajos previos de MLEE en poblaciones de *V. cholerae* utilizan colecciones de cepas muy diferentes y heterogéneas, así como variaciones experimentales en la técnica, tanto en el uso de geles de poliacrilamida o almidón como en el número y tipo de loci analizados. Sin embargo, con los resultados experimentales obtenidos en todos ellos, todavía no se ha podido determinar de manera clara las relaciones genéticas existentes entre las cepas de las distintas epidemias de cólera descritas desde 1817, y entre las cepas procedentes de fuentes clínicas y de fuentes ambientales.

Tabla 3.21 Características generales de los distintos trabajos de MLEE realizados en poblaciones de *Vibrio cholerae*.

Trabajos publicados	Nº total de cepas	Características cepas <i>V. cholerae</i>	Tipo de gel ¹	Enzimas	
				Nº total	Abreviaturas
Desmarchelier y col. (1988)	90	50 cepas O1 y 40 cepas no-O1 aisladas de fuentes clínicas y ambientales de Australia	PA	12	ACO, ALD, G6P, GPI, IDH, MDH, ME, NSE, PEP1, PEPD, PGM, 6PG
Salles y Momen (1991)	260	181 cepas O1 <i>El Tor</i> y clásico y 79 cepas no-O1 de diversas fuentes y orígenes.	PA	13	ACO, ALD, G6P, GPI, IDH, MDH, ME, NSE, PEP1, PEP2, PEPD, PGM, 6PG
Wachsmuth y col. (1993)	196	192 cepas O1 <i>El Tor</i> de EEUU (Gulf Coast), Australia, África, Asia, islas del Pacífico y América Latina, y 4 cepas O1 clásico toxigénicas.	AL	16	ADK, ALD, DA1, DA2, DA3, G6P, GOT, GPT, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, NSP, PGI, THD
Evins y col. (1995)	447	424 cepas O1 <i>El Tor</i> toxigénicas de América Latina (352) y EEUU (72), y 23 cepas O1 <i>El Tor</i> no-toxigénicas de América Latina (14) y EEUU (9).	AL	16	ADK, ALD, DA1, DA2, DA3, G6P, GOT, GPT, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, NSP, PGI, THD
Beltrán y col. (1999)	397	143 cepas de serogrupos distintos de colección, 244 cepas de México y Guatemala de diferentes serogrupos, 6 cepas O139 de Tailandia y 4 cepas O1 <i>El Tor</i> de Australia, Perú, Rumania y EEUU.	AL	17	ALD, CAT, G6P, GOT, HEX, IDH, IPO, LAP, MDH, ME, NSP, PGI, PGM, PLP, SHK, THD, 6PG
Farfán y col. (2000)	107	100 cepas aisladas de diversos países y fuentes, y de distintos serogrupos: 36 cepas no-O1/noO139, 29 cepas O139, 26 cepas O1 <i>El Tor</i> , 6 cepas O1 clásico y 3 cepas no tipadas. Se incluye 7 cepas de colección.	PA	15	ALD, ASD, C230, EST, FUM, G6P, GP1, IDH, LAP, MDH, ME, NSP, PGI, XDH, 6PG

¹ Los geles utilizados pueden ser de poliacrilamida (PA) o almidón (AL).

Por eso, en 1997 nuestro grupo decidió iniciar el trabajo que se presenta en esta memoria, con una colección de cepas de *V. cholerae* bastante diversa, incluyendo un número importante de cepas del serogrupo O139, que hasta ese momento no habían sido analizadas con la técnica de MLEE. Además, el estudio no se centró solamente en obtener los perfiles alélicos de cada cepa para estimar la diversidad génica en la población estudiada, como se había hecho en estudios previos, sino que se realizó un completo análisis del desequilibrio de ligamiento para determinar su estructura poblacional.

A pesar de que en los distintos trabajos considerados existen variaciones entre ellos, como ya se ha explicado, los resultados experimentales obtenidos en todos ellos parecen revelar que las poblaciones de *Vibrio cholerae* presentan una estructura clonal. Sin embargo, analizando más detalladamente los datos obtenidos en todos ellos, se observa una cierta discordancia con los datos que se presentan en este trabajo (Tabla 3.22).

Tabla 3.22 Análisis comparativo de los resultados obtenidos en los distintos trabajos considerados. Los datos publicados se muestran en negrita y en color gris los datos calculados por nuestro grupo a partir de la matriz de perfiles alélicos publicada.

Trabajos publicados	Nº total cepas	Nº total ETs	Nº alelos medio por locus	Diversidad génica media (H)	Indice de asociación ($I_A \pm SD$)
Desmarchelier y col. (1988)	90	42	3,5	0,329	0,03 ± 0,21
Salles y Momen (1991)	260	73	4,3	0,326	0,92 ± 0,20
Wachsmuth y col. (1993)	196	6	1,75	0,325	3,73 ± 0,18
Evins y col. (1995)	447	14	2,25	0,285	0,53 ± 0,34
Beltrán y col. (1999)	397	279	9,5	0,436	1,24 ± 0,08
Farfán y col. (2000)	107	99	4,8	0,500	1,25 ± 0,14

Las diferencias encontradas en los resultados entre los distintos trabajos se deben atribuir fundamentalmente a tres factores determinantes en los estudios de poblaciones con MLEE. Por un lado, la técnica de electroforesis utilizada, algunos estudios utilizan el almidón como matriz del gel y otros emplean geles de poliacrilamida, lo que puede provocar variaciones en la resolución de las bandas de proteína. También influye el origen de la muestra analizada, las diferencias en el serogrupo y/o biotipo, la procedencia geográfica, la fuente de aislamiento, el año de aislamiento y la presencia de la toxina colérica son factores que podrían explicar estas diferencias. Por último, el número y tipo de enzimas ensayadas, en general son distintos. En la mayoría de los estudios los loci analizados son monomórficos y sólo unos pocos contribuyen a la diversidad génica de la población. Sin embargo, en el presente trabajo todos los loci fueron polimórficos contribuyendo a obtener un alto grado de diversidad génica. Por tanto, las comparaciones entre los distintos estudios se han de analizar con precaución.

Uno de los parámetros que presenta una mayor divergencia es el número de ETs. En la mayoría de trabajos aparecen uno o dos ETs mayoritarios, sobretodo aquellos que realizan la técnica de MLEE con geles de almidón. Estos ETs mayoritarios agrupan, normalmente, las cepas de origen clínico, siendo las cepas ambientales más diversas. En el trabajo de Desmarchelier y col. (1988) con cepas aisladas de Australia, todas las cepas toxigénicas de origen clínico se agruparon en un único ET. En el trabajo de Salles y Momen hay dos ETs mayoritarios, ET13 (27 cepas) y ET14 (127 cepas), que agrupan las cepas O1 *clásico* y O1 *El Tor* toxigénicas respectivamente. En los trabajos de Wachsmuth y col. (1993) y Evins y col. (1995) que analizan cepas de *V. cholerae* O1 *El Tor*, las cepas toxigénicas se asocian a 4 ETs determinados según su procedencia: ET1 -Australia; ET2 -EEUU (costa del Golfo); ET3 -Asia y África (séptima pandemia) y ET4 -América Latina (epidemia de 1991). En el trabajo de Beltrán y col. (1999) todas las cepas de *V. cholerae* O1 y O139 toxigénicas se agrupan en 4 ETs.

Todo ello ha servido para mostrar que las cepas toxigénicas de *V. cholerae* presentaban una diversidad génica limitada, que permitía poder identificarlos al obtener perfiles alélicos idénticos o muy similares que diferían en uno o pocos loci. Los trabajos de Wachsmuth y col. (1993) y Evins y col. (1995) mostraron que los aislados de la sexta pandemia (biotipo *clásico*), de la séptima pandemia (biotipo *El Tor*), de Australia y de EEUU procedentes de la costa del Golfo (Gulf Coast) eran cuatro clones independientes. Así mismo, en el trabajo de Beltrán y col. (1999) que era el primero que analizaba cepas del serogrupo O139, postularon que todas las cepas de este serogrupo era un solo clon porque se agrupaban en un único ET.

Sin embargo, en nuestro estudio cuando aplicamos la técnica MLEE a una colección de cepas diversa, tanto en el serogrupo y/o biotipo, procedencia geográfica, fuente de aislamiento y toxigenicidad, mostró un alto grado de variación genética. Se analizaron 107 cepas, se obtuvieron 99 ETs, de los cuales una gran mayoría (84 ETs) contenían una sola cepa, 6 ETs contenían dos cepas y un sólo ET con tres cepas. Estos resultados no son concordantes con los obtenidos previamente en otros estudios, porque las cepas toxigénicas no se agruparon en uno o pocos ETs, sino que encontramos una diversidad génica más elevada.

A partir de los genotipos obtenidos para todas las cepas se generó un dendrograma (Fig. 3.20) en el cual no se encontró evidencia de una asociación significativa para el total de ETs en función del serogrupo y/o biotipo de las cepas o de su procedencia geográfica. El mismo serogrupo estaba presente en varias líneas diferentes y no se agrupaba de forma separada del resto. Beltrán y col. (1999) obtuvieron resultados similares, ya que cepas del mismo serogrupo se distribuían en dos o más ETs. Aunque si que parece que hay una cierta asociación respecto a su origen de aislamiento clínico o ambiental, ya que en la división II y en el subgrupo Ia de la división I hay un mayor número de cepas ambientales, y en el subgrupo Ib predominan las cepas clínicas. Por otra parte, cabe resaltar que la mayoría de cepas del serogrupo O139 se agruparon en la división I del dendrograma (24 de 29 aislados), mientras que el resto de serogrupos parecen estar distribuidos al azar. Aunque la asociación de las cepas estudiadas no coincide con estudios previos, el valor del coeficiente de correlación cofenética ($r_c = 0,81$) se encuentra dentro del intervalo de correlaciones cofenéticas que ocurren más frecuentemente (0,74-0,90) descrito por Sneath y Sokal (1973).

Otro parámetro a considerar es el número de alelos medio por locus, que presenta una gran variabilidad en función del estudio considerado, desde un rango de 1,75 (Wachsmuth y col., 1993) a 9,5 (Beltrán y col., 1999). Nuestro trabajo presentó un valor intermedio de 4,8. Estas diferencias observadas hay que atribuirles fundamentalmente a que el número y el tipo de enzimas estudiadas en todos estos trabajos son distintos.

El valor de la diversidad génica media (H) obtenido en el presente trabajo (0,500) es más alto que los descritos anteriormente para las poblaciones de *V. cholerae* (Tabla 3.22). Si consideramos la muestra estudiada, observamos que los valores más bajos corresponden a los estudios de Evins (H=0,285) y Wachsmuth (H=0,325) que trabajan sólo con poblaciones de *V. cholerae* pertenecientes al serogrupo O1, mientras que en los trabajos donde se muestran valores más altos, Beltrán y col. (H=0,436) y el presente estudio

($H=0,500$), en la muestra estudiada se incluyen cepas de *V. cholerae* correspondientes a los serogrupos O1, O139 y no-O1/no-O139.

En relación al serogrupo O139, la diversidad génica media (H) para estas cepas fue de 0,396, valor más alto que el descrito en un estudio previo de MLEE (Beltrán y col., 1999). Si comparamos el valor de diversidad génica media obtenido por MLEE para este único serogrupo de *V. cholerae* ($H=0,396$) con el descrito para otras especies bacterianas patógenas en su conjunto (Øsrkov y col., 1990; Go y col., 1996; Rius y col., 2001), se observa que este valor es similar a los de *Neisseria gonorrhoeae* ($H=0,410$) y *Escherichia coli* ($H=0,433$), mayor que el obtenido para *Staphylococcus aureus* ($H=0,289$) y *Legionella pneumophila* ($H=0,312$), y menor que los descritos para *Helicobacter pylori* ($H=0,735$) y *Pseudomonas stutzeri* ($H=0,876$).

La distribución unimodal de no coincidencias alélicas que se obtiene para la muestra estudiada (Fig. 3.22) y la forma del dendrograma generado (Fig. 3.20) corresponde según Whittam a los de una población panmíctica (Whittam, 1995). Sin embargo, al realizar el análisis del desequilibrio de ligamiento se evidencia una estructura clonal, con un valor de índice de asociación significativamente distinto de cero al considerar el conjunto de la población ($I_A=1,25 \pm 0,14 / P<0,0001$), indicando que existe un nivel de asociación entre alelos. Al validar estos resultados con el método de Montecarlo, se comprobó que efectivamente las poblaciones analizadas en su conjunto estaban fuera de los límites de varianza esperada para una población en equilibrio de ligamiento. Este valor de I_A es muy similar al obtenido en el trabajo de Beltrán y col. ($I_A=1,24 \pm 0,08$). Para el resto de trabajos no se disponía del valor del índice de asociación, por ello fue calculado para estas poblaciones (Tabla 3.22), oscilando entre 0,03 (Desmarchelier y col., 1988) y 3,73 (Wachsmuth y col., 1993). Todos estos datos, excepto en el caso de las cepas procedentes de Australia estudiadas por Desmarchelier y col. (1988), evidencian que estas poblaciones de *V. cholerae* están en desequilibrio de ligamiento, y por tanto, presentan una estructura clonal.

Por otra parte, al analizar distintos subgrupos de cepas dentro del conjunto de la población, observamos que algunos de estos grupos presentan valores de I_A no significativamente distintos de cero. En nuestro caso, cuando analizamos subgrupos que corresponden a divisiones del dendrograma, serogrupos o procedencia geográfica, algunos de ellos (subgrupo división II, subgrupo división III, subgrupo O1 clásico y subgrupo EEUU/México) mostraron valores de I_A menores de uno (0,41, 0,60, 0,64 y 0,42,

respectivamente). Los valores de la varianza observada (V_o) de estos subgrupos estaban dentro de los límites de confianza del 95% de la varianza esperada (V_E) y con un valor de P no despreciable cuando se realizó una simulación de Montecarlo ($P \geq 0,001$). Sin embargo, cabe remarcar que los valores de I_A de los subgrupos división III y O1 *clásico* se han de considerar con precaución por el bajo número de ETs que incluyen estos subgrupos (6 y 9 ETs, respectivamente).

Resultados similares fueron obtenidos por Beltrán y col. (1999), lo cual nos lleva a considerar que en realidad la estructura poblacional de *V. cholerae* correspondería a la que Maynard-Smith denomina población epidémica (Maynard-Smith y col., 1993). Dicho autor define una población de este tipo como una población con recombinación pero que en un momento determinado un grupo concreto de individuos sufre una expansión clonal probablemente porque habrán originado un brote epidémico, y rápidamente se extiende este clon, enmascarando la base recombinante de la población.

En relación a los cladogramas generados en función del serogrupo y/o biotipo y el origen geográfico (Fig. 3.25), mostraron una alta concordancia con estudios previos. En el cladograma que muestra las distancias genéticas de 6 subpoblaciones según el país de aislamiento, se observa que las cepas procedentes del Perú están más relacionadas genéticamente con las cepas aisladas de la India, que con el resto de cepas aisladas del continente americano. Este resultado es totalmente concordante con el origen de las cepas del Perú (1991-1993) previamente determinado por Wachsmuth y col. (1993). En cuanto a las cepas aisladas de EEUU y México, se observa que están poco relacionadas con las cepas de la India, como también apuntaba Wachsmuth y col. (1993).

Al considerar el cladograma que muestra las relaciones genéticas de las distintas subpoblaciones según su serogrupo y/o biotipo, se observa la relación genética del serogrupo O139 más próxima al serogrupo O1 *El Tor* que al resto de serogrupos estudiados. Este resultado es concordante con referencias previas en relación al posible origen del serogrupo O139 (Bik y col., 1995; Popovic y col., 1995; Stroehrer y col., 1997). De este análisis de distancias genéticas entre subpoblaciones se podría deducir, al observar el cladograma generado, que estos dos serogrupos se originaron a partir de un único evento, y por consiguiente, O1 *El Tor* y O139 mantendrían una diversidad similar ($H=0,40$ y $H=0,45$, respectivamente). Si además, se observa los dendrogramas construidos para cada una de estas poblaciones (Fig. 3.23 y 3.24), se puede ver que la población de cepas O139 está distribuida en diferentes ETs de la misma manera que para el serogrupo O1 *El Tor*. Las pequeñas diferencias que aparecen al comparar los dos dendrogramas se pueden explicar al

considerar el origen geográfico de las dos subpoblaciones, ya que todas las cepas O139 proceden de la India, en cambio las cepas O1 *El Tor* fueron aisladas de varios países.

Beltrán y col. (1999) postulaban un origen monoclonal del serogrupo O139 de *V. cholerae*, ya que según estos autores todas las cepas analizadas se agrupaban en un único ET. Sin embargo, al analizar nuestra población de O139 hemos determinado la existencia de diferentes ETs dentro de este serogrupo, evidenciando una mayor diversidad de la descrita hasta el momento. Esta mayor diversidad, puede ser explicada o bien porque la divergencia entre O1 *El Tor* y O139 hubiera ocurrido, no recientemente tal como se supone (1992), sino mucho tiempo atrás, y así ambas poblaciones han podido ir acumulando diversidad a lo largo de este período de tiempo. O bien porque la aparición de O139 aunque reciente, ha sufrido diferentes fenómenos de recombinación que han dado origen a la diversidad detectada dentro del serogrupo.

Esta mayor diversidad de O139 ha sido evidenciada por otros estudios de población basados en técnicas moleculares como RFLP, secuencias de DNA flanqueantes de genes conservados, etc. (Faruque y col., 1997). Los resultados obtenidos con estas técnicas están de acuerdo también con un origen policlonal de las cepas del serogrupo O139 de *V. cholerae*.

4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST)

4.1 Material y métodos

4.1.1 CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

Para realizar el análisis de secuencias de nucleótidos se han seleccionado un total de 31 cepas de *V. cholerae*: 29 pertenecientes al serogrupo O139, una cepa O1 *El Tor* toxigénica (CO487) y una cepa no-O1/no-O139 ambiental (25872). Estas cepas habían sido analizadas previamente con la técnica de MLEE (apartado 3.1.1).

En la siguiente tabla se muestran las características principales de este grupo de cepas.

Tabla 4.1 Principales características de las cepas de *V. cholerae* utilizadas en el tipado de secuencias multilocus (MLST).

Cepa N°	Código referencia	Serogrupo/ Biotipo/ Serotipo	Fuente	Origen geográfico	Fecha aislamiento	Presencia <i>ctxAB</i>
1	CO391	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
2	CO407	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
3	SG24	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
4	NT330	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
5	CO402	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
6	CO414	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
7	NT642	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
8	BO1	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
9	NT329	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
10	MDO90	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
11	SO29	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
12	CO406	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
13	VO6	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
14	BO2	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
15	CO404 NT656	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
16	SO30	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
17	CO403	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
18	329	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
19	653/36	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
20	CO396 NT646	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
21	NPO388	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +

Cepa N°	Código referencia	Serogrupo/ Biotipo/ Serotipo	Fuente	Origen geográfico	Fecha aislamiento	Presencia <i>ctxAB</i>
22	NT648	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
23	NPO390	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
24	SO19	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
25	CO415	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
26	MOD084	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
27	NT638	O139	Clínica	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
28	BO4	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
29	CO418	O139	Heces	India	1992 / 1993	<i>ctx</i> +
30	CO487	O1 El Tor Ogawa	Clínica	India	1993	<i>ctx</i> +
31	25872	No-O1/no-O139	Ambiental	NC	NC	NC

Nota: NC indica dato no conocido.

Para la conservación de las cepas a corto y largo plazo se ha seguido la metodología descrita en el apartado 3.1.4.

4.1.2 SOLUCIONES Y TAMPONES

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

4.1.2.1 Tampón Tris–borato–EDTA x10 (TBE x10)

Esta solución se ha utilizado para preparar los geles de agarosa y como tampón de recorrido en el proceso de electroforesis.

Se preparó diez veces concentrado (x10), siendo su composición:

Tris-(hidroximetil)-aminometano	0,90M	109,9 g
Ácido bórico	0,90M	55,6 g
EDTA	0,20M	40,0 ml
Agua destilada	csp. 1000 ml	csp. 1000 ml

pH final 8,2

Se mezclaron en un vaso de precipitados los solutos (tris y ácido bórico) con una parte del volumen del agua destilada necesaria, y una vez disueltos se añadió una solución de EDTA 0,20M previamente preparada (74,4 g de ácido etilendiaminatetracético en 1 l de agua destilada; Sigma ED2SS), y en un matraz se enrasó con agua destilada hasta volumen final. Se comprobó el pH final de la solución que ha de ser de 8,2, y se ajustó en caso de ser necesario.

El tampón se conservó a 4 °C hasta su uso. Se preparó tampón TBE x1 diluyendo con agua destilada.

4.1.2.2 Tampón de muestras

Esta solución se ha utilizado en la preparación de los productos de PCR que fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (apartado 4.1.7). El glicerol actúa incrementando la densidad de las muestras para asegurar que se introduzcan correctamente en los pocillos practicados en el gel y no sobrenaden. Además, cuenta con un colorante que permite el seguimiento del proceso electroforético.

Su composición para un volumen final de 5 ml es:

Solución EDTA 0,5M pH 8,0	1,0	ml
Glicerol	2,5	ml
Agua milli-Q estéril	1,5	ml
Azul de bromofenol	0,025	g

Para preparar la solución de EDTA 0,5M pH 8,0, se mezcló 186,1 g de ácido etilendiaminatetracético (Sigma ED2SS) en 1 l de agua destilada.

La solución final se guardó protegida de la luz y a una temperatura de 4 °C.

Este tampón se añade en una proporción 1:5 (v/v) a las muestras de DNA que son sometidas a electroforesis en geles de agarosa (apartado 4.1.7).

4.1.3 GENES ESTUDIADOS

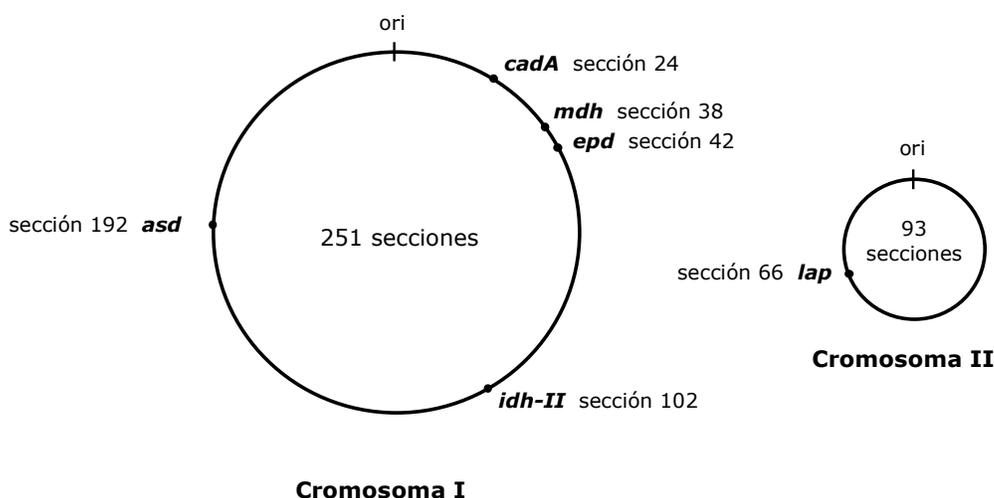
Se han analizado fragmentos internos de aprox. 480 pb de 6 genes (Tabla 4.2) distribuidos en los dos cromosomas de *V. cholerae* (Fig. 4.1), y cuyos productos actúan en vías metabólicas importantes para la bacteria.

Tabla 4.2 Genes de *V. cholerae* estudiados con la técnica de MLST.

Gen	Enzima que codifica	EC nº ¹
<i>asd</i>	Aspartato semialdehído deshidrogenasa	1.2.1.11
<i>cadA</i>	Lisina descarboxilasa	4.1.1.18
<i>epd</i>	Eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.-
<i>idh-II</i>	Isocitrato deshidrogenasa NADP2	3.4.11.1
<i>lap</i>	Leucina aminopeptidasa	1.1.1.42
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	1.1.1.37

¹ El Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) describe cada tipo de enzima caracterizada y le proporciona un número de la EC (Comisión de la Enzima).

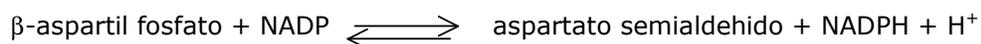
Figura 4.1 Distribución cromosómica de los 6 genes metabólicos estudiados.



Representación circular de los 2 cromosomas de *V. cholerae*: I y II. Las localizaciones genómicas de los 6 genes metabólicos analizados se basan en la secuencia completa del

genoma secuenciado de la cepa *V. cholerae* O1 *El Tor* N16961 disponible en la base de datos GenBank (cromosoma I: AE003852, y cromosoma II: AE003853).

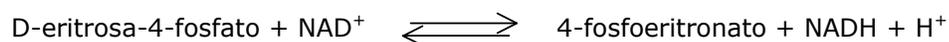
El gen **asd** codifica la enzima aspartato semialdehido deshidrogenasa, que cataliza la síntesis de aspartato semialdehido a partir de β -aspartil fosfato, utilizando NADP como cofactor.



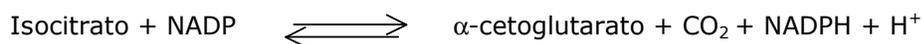
El gen **cadA** codifica la enzima lisina descarboxilasa, que participa en la vía de degradación del aminoácido lisina, hidrolizando su grupo carboxilo.



El gen **epd** codifica una oxidoreductasa dependiente de NAD, la eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa, que interviene en la vía de formación de la vitamina B₆ o piridoxina, convirtiendo el sustrato D-eritrosa-4-fosfato en 4-fosfoeritronato.



El gen **idh-II** codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, que participa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, y corresponde a uno de las dos isoenzimas descritas en *Vibrio* spp. (Ishii y col., 1993).



Los genes *lap* y *mdh* codifican las enzimas leucina aminopeptidasa y malato deshidrogenasa, respectivamente, cuya actividad enzimática ya ha sido previamente descrita en el apartado 3.1.11.

4.1.4 EXTRACCIÓN DEL DNA CROMOSÓMICO

Se aisló el DNA cromosómico de cada una de las cepas a ensayar mediante un método simple de extracción por ebullición, descrito previamente en otros trabajos moleculares de *Vibrio cholerae* (Fields y col., 1992; Karaolis y col., 1995; Falklind y col., 1996).

Se realizó el siguiente protocolo para la obtención del DNA cromosómico bacteriano:

1. Siembra en medio TSA (apartado 3.1.3.1.2) por agotamiento en estría de las cepas a analizar. Incubación a 35 °C durante 24 horas.
2. Transferencia de 1 ó 2 colonias aisladas de cada cepa a un tubo eppendorf estéril y resuspender en 30 µl de agua milli-Q estéril.
3. Llevar a ebullición (100 °C) durante 10 minutos para lisar las células. Al romper la célula bacteriana los ácidos nucleicos pasan al sobrenadante.
4. Centrifugar a 4.500 rpm durante 5 minutos para que se depositen en la parte inferior los restos celulares, quedando el DNA en el sobrenadante.
5. Transferir el sobrenadante (~ 25 µl) a un tubo eppendorf estéril vacío y guardar a - 20 °C hasta su uso.

El DNA cromosómico extraído de cada cepa puede ser utilizado directamente como muestra ("template") en la reacción de PCR (apartado 4.1.6).

4.1.5 DISEÑO DE CEBADORES

La selección de oligonucleótidos iniciadores o cebadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. El cebador sirve de punto de anclaje para la DNA polimerasa, y como promotor del inicio de la reacción de replicación del DNA.

Los principales criterios a tener en cuenta en su diseño son:

- Tamaño: ideal 20-25 nucleótidos de longitud, generalmente 18-30 nucleótidos.
- Temperatura de fusión del cebador (T_m): 50 – 65 °C.
- Contenido G + C: 40 – 60 %.
- Autocomplementariedad: debe ser evitada, para minimizar la formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores.
- Similaridad: debe tener un 100% de apareamiento con la secuencia escogida como molde.

Los cebadores utilizados en este estudio se diseñaron a partir de secuencias (Tabla 4.3) disponibles en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), excepto para los genes *asd* y *lap* que se usaron cebadores previamente descritos para *V. cholerae* por Karaolis y col. (1995) y Toma y col. (1996), respectivamente.

Tabla 4.3 Secuencias utilizadas para el diseño de cebadores.

Gen	Secuencia utilizada del GenBank	Bibliografía
<i>cadA</i>	AF077081 <i>Vibrio cholerae</i> lysine decarboxylase (<i>cadA</i>) gene, partial cds.	Merrell y Camilli (1990)
<i>epd</i>	U72152 <i>Vibrio cholerae</i> iron-regulated virulence proteins (<i>irgB</i>) and (<i>irgA</i>) and erythrose-4-phosphate dehydrogenase (<i>epd</i>) genes, complete cds. and phosphoglycerate kinase (<i>pgk</i>) gene, partial cds.	Carroll y col. (1997)
<i>idh-II</i>	AF262023 <i>Vibrio cholerae</i> strain 569B isocitrate dehydrogenase NADP2 (<i>idh-II</i>) gene, complete cds.	Segunpta y col. (2000) Direct submission
<i>mdh</i>	AF117876 <i>Vibrio cholerae</i> isolate M551 malate dehydrogenase (<i>mdh</i>) gene, complete cds.	Byun y col. (1999)

Se diseñaron cebadores específicos para los genes *cadA*, *epd*, *idh-II* y *mdh* a partir de regiones altamente conservadas de esos genes. De esta manera, se obtuvieron parejas de cebadores que amplificaban fragmentos internos de 500-600 pb de cada uno de los genes metabólicos a estudiar, y que permitían a su vez después de una secuenciación directa con los mismos cebadores, la obtención de secuencias fiables, de ambas cadenas de DNA, de aproximadamente 480 pb de los fragmentos amplificados para cada gen.

Tabla 4.4 Cebadores utilizados en el estudio MLST.

Gen	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Posición inicio 5' ¹	Contenido G + C (%)
<i>asd</i>	<i>asd</i> -Up	CGACTACGACATTCCTC	+ 306	52,9
	<i>asd</i> -Dn	GTTATCCGCCACTACCC	+ 948	58,8
<i>cadA</i>	<i>cadA</i> -Up	CACGGCTTCAAGATCTT	+ 1	47,1
	<i>cadA</i> -Dn	TTCAGTTTGACCGCGCA	+ 480	52,9
<i>epd</i>	<i>epd</i> -Up	TCAGCCATGATCAGCAGCAT	+ 179	50,0
	<i>epd</i> -Dn	GTACACTGAGATGCGTTCAC	+ 824	50,0
<i>idh-II</i>	<i>idh-II</i> -Up	GTATCAGCGATGCGTTGACT	+ 188	50,0
	<i>idh-II</i> -Dn	AGATCACTGGATCCGAGACT	+ 805	50,0
<i>lap</i>	<i>lap</i> -Up	CGGCAGCGTTGAGCGCCAAT	+ 32	65,0
	<i>lap</i> -Dn	GCATCATCATCCGCGCCGGG	+ 665	70,0
<i>mdh</i>	<i>mdh</i> -Up	CTGGCGGCATTGGTCAAG	+ 26	61,1
	<i>mdh</i> -Dn	CGGTACCCGCGTTTTGGA	+ 634	61,1

¹ Relativo a la adenosina del codón de inicio de la transcripción ATG, con excepción del gen *cadA* que sólo se disponía de un fragmento parcial secuenciado en el momento que se realizó este estudio (GenBank number accession:AF077081).

Una vez diseñados los cebadores, éstos fueron sintetizados y preparados en forma desalada y liofilizada por PROGENETIC, S.L., siguiendo las indicaciones de la secuencia solicitada. Los cebadores preparados se resuspendieron en 1 ml de agua milli-Q estéril para su manejo en el laboratorio y se guardaron a 4 °C. Para cada cebador, se prepararon 2 soluciones de trabajo de volumen final 500 µl, la primera a una concentración de 30 ng /µl de cebador para la reacción PCR, y una segunda solución a una concentración final de cebador de 3,2 pmol /µl para la reacción de secuenciación.

La temperatura de asociación de los cebadores (T_a) es uno de los factores más críticos para optimizar la especificidad de una reacción PCR. En general, se emplea como temperatura de asociación el resultado de la resta de la temperatura de fusión (T_m) – 5 °C aproximadamente. Existen muchos métodos para calcular la temperatura de fusión, pero en la mayoría de los casos, después de efectuado el cálculo teórico es necesario ensayar en el laboratorio con diferentes temperaturas de asociación cercanas a la temperatura de fusión para determinar la temperatura óptima para cada reacción.

En nuestro caso, utilizamos la siguiente aproximación, aplicable a secuencias de 20 pb o menor, para estimar el valor de la temperatura de fusión de los cebadores utilizados en este estudio de MLST:

$$T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

donde A, T, G y C es el número de bases de adenosina, timina, guanosina y citosina que tiene la secuencia de nucleótidos estudiada.

Tabla 4.5 Temperaturas de asociación de los cebadores utilizados.

Gen	T_a PCR ¹	T_a sec ²
<i>asd</i>	50 °C	48 °C
<i>cadA</i>	48 °C	45 °C
<i>epd</i>	55 °C	54 °C
<i>idh-II</i>	55 °C	54 °C
<i>lap</i>	55 °C	54 °C
<i>mdh</i>	53 °C	52 °C

¹ Temperaturas de asociación de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

² Temperaturas de asociación de los cebadores utilizados en las reacciones de secuenciación.

4.1.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa se ha utilizado para amplificar fragmentos internos de los genes metabólicos a estudio, a partir del DNA cromosómico aislado de cada cepa.

En abril de 1983, Kary Mullis da a conocer la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, recibiendo por este descubrimiento el Premio Nobel de Química en 1993. La mezcla de reacción es sometida a distintas temperaturas para que se produzca de forma cíclica la desnaturalización del DNA, la unión de los cebadores al DNA por complementariedad, y la síntesis de las copias del fragmento a amplificar por la DNA polimerasa. La PCR es una técnica que presenta una gran especificidad por el fragmento a amplificar, así como una elevada sensibilidad, al permitir detectar cantidades muy pequeñas del material genético.

Para la reacción de PCR se utiliza una DNA polimerasa, que al ser termoestable, permite realizar ciclos sucesivos de síntesis de DNA, soportando las elevadas temperaturas que son necesarias tanto para la separación de las cadenas de DNA como para la hibridación de los cebadores a las cadenas complementarias del DNA. En este trabajo se ha utilizado la Taq polimerasa DyNAzyme EXT DNA Polymerase (Finnzymes).

Para realizar esta reacción, se necesitan, además del DNA molde y del enzima DNA polimerasa, un tampón adecuado que contiene magnesio (DyNAzyme EXT buffer 10x, Finnzymes), dNTPs y 2 cebadores, uno directo y otro reverso, que flanquean la región del DNA que se quiere amplificar.

La mezcla de dNTPs ha de ser equimolar para los 4 nucleótidos para reducir la tasa de error de la DNA polimerasa. Para ello, se preparó una solución de trabajo de mezcla de dNTPs a una concentración 2,5 mM, partiendo de 4 soluciones individuales 10 mM de cada dNTP (Gene Amp dNTPs, 4 viales de dATP, dCTP, dGTP, dTTP; PE Applied Biosystems, N808-0007). Se mezclaron 6,25 µl de cada uno de los 4 dNTPs en un tubo eppendorf con 75 µl de agua milli-Q estéril.

Para la amplificación, se utilizó el termociclador GeneAmp System 2400 de Perkin Elmer. Se optimizaron las condiciones de PCR siguiendo las indicaciones generales de los fabricantes, llevándose a cabo como se indica a continuación en las tablas 4.6 y 4.7.

Tabla 4.6 Mezcla de reacción para cada PCR.

Reactivos	Cantidad
DNA molde	25,0 µl
Cebador-Up	1,0 µl
Cebador-Dn	1,0 µl
Mezcla de dNTPs	5,0 µl
Tampón x10 (con Mg ²⁺)	5,0 µl
Taq - DNA polimerasa	1,0 µl
Agua milli-Q estéril	12,0 µl
Volumen total	50,0 µl

Tabla 4.7 Condiciones de PCR.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1
Desnaturalización	94 °C	45 seg	35
Anillamiento	48 - 55 °C	1 min	
Elongación	72 °C	1,30 min	
Elongación final	72 °C	10 min	1
Final	4 °C	∞	

4.1.7 ELECTROFORESIS DEL DNA AMPLIFICADO EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis en geles de agarosa se utilizó para separar e identificar fragmentos de DNA amplificados por PCR.

Este método de separación se basa en la carga negativa que presenta el DNA a pH neutro, que condiciona su migración hacia el polo positivo cuando es sometido a un campo eléctrico. Variando la concentración de agarosa en el gel se consiguen separar con buena resolución fragmentos de DNA de diversa longitud. La velocidad de migración es

inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular, lo que permite valorar el tamaño de diferentes fragmentos de DNA de igual conformación frente a un patrón de tamaños conocidos. Por otra parte, existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética y la porosidad del gel. Variando la concentración de agarosa puede determinarse el rango de tamaños que se pretende separar con buena resolución. Se utilizan concentraciones desde 0,3 % (para resolver fragmentos grandes) hasta 2% (para fragmentos de alrededor de 100 pb) (Sambrook y col., 1989).

Los fragmentos génicos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% (BIO-RAD 162-0133). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente utilizando una cubeta horizontal HE33 de Hoefer, sumergiendo el gel de agarosa en tampón TBE x1 (apartado 4.1.2.1), y aplicando un voltaje de 75 voltios. Las muestras se acondicionaron para su carga en el gel mediante la adición de tampón de muestras a una proporción 1:5 del volumen total de las mismas (apartado 4.1.2.2).

Composición de un gel de agarosa al 1%:

- 0,5 g agarosa
- 50 ml tampón TBE x1
- 2 µl solución bromuro de etidio al 1%

Para preparar el gel de agarosa, se disuelve completamente la agarosa en la solución TBE x1 calentándola en un microondas. Se deja enfriar 3-4 minutos, y se añade el bromuro de etidio antes de colocar la solución en el portagel de la cubeta de electroforesis.

La visualización del DNA amplificado se consigue mediante la adición de un agente intercalante, bromuro de etidio, en la composición del gel de agarosa a una concentración de 0,4 µg/ml. Para ello, es necesario preparar con mucha precaución, debido a su toxicidad y elevado poder mutágeno, una solución de bromuro de etidio al 1 % (10 mg de bromuro de etidio en 1 ml de agua destilada; Sigma E-8751). Este agente se intercala entre las bases del DNA y permite observarlo como bandas gracias a la fluorescencia de color naranja que produce bajo un transiluminador de luz ultravioleta.

El tamaño de las bandas fue estimado empleando un patrón comercial de peso molecular (100 bp PCR Molecular Ruler; BIO-RAD 170-8206). Posteriormente, se recuperaron las bandas del tamaño adecuado directamente del gel y se procedió a su purificación.

4.1.8 PURIFICACIÓN DEL DNA EN COLUMNAS

Previo a la secuenciación directa de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, es necesario incorporar un paso de purificación con objeto de eliminar los productos que no han reaccionado en la PCR, como restos de nucleótidos y cebadores, así como componentes del gel, restos de agarosa y de bromuro de etidio, ya que la presencia de algunos de ellos podría afectar a la secuenciación.

Para la purificación de estos fragmentos de DNA obtenidos a partir de los geles de agarosa se utilizó el sistema *QIAquick Gel Extraction Kit* de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa, principalmente, en la retención del DNA en una matriz de sílice, la cual se lava varias veces para eliminar contaminantes no deseados. Finalmente se eluye el DNA purificado, se guarda en un tubo eppendorf estéril y se conserva a - 40 °C hasta su uso.

4.1.9 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

La cuantificación del DNA puede realizarse mediante medición de la absorbancia de la muestra a 260 nm en un espectrofotómetro, o bien, mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a un marcador de pesos moleculares (Sambrook y col., 1989).

Para cuantificar el DNA, se ha de tener en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm, medida en una cubeta de cuarzo de 1000 µl, equivale a una concentración de DNA de 44 µg/ml.

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260 \text{ nm}} \times 44 \times 1 / V \text{ muestra } (\mu\text{l})$$

donde A es la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 260 nm, y V es el volumen de la muestra analizada.

Alternativamente, se puede efectuar la cuantificación del DNA a partir de la intensidad de fluorescencia que emite el bromuro de etidio cuando se intercala entre las bases de la doble hélice de DNA. Esta emisión es directamente proporcional a la masa total del DNA. De manera que, en un gel de agarosa se carga la muestra a cuantificar y un patrón cuantitativo comercial, y por comparación de la intensidad de las bandas del patrón con la de la muestra se estima la concentración de DNA problema.

4.1.10 SECUENCIACIÓN

Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación del DNA se utilizó el método descrito por Sanger (Sanger y col., 1977) basado en el marcaje con fluorocromos. La secuenciación se realiza de forma automática en varias etapas. Consiste en volver a amplificar el DNA por medio de una reacción de PCR especial con ddNTPs marcados, cada uno de ellos, con un indicador fluorescente de longitud de onda diferente, obteniéndose fragmentos fluorescentes de distintos tamaños, que son luego separados por electroforesis. Durante este proceso un lector láser detecta la emisión fluorescente de cada fragmento, la cual a su vez, depende de la última base nitrogenada que se incorporó en cada uno de ellos en la reacción de PCR, es decir, que de acuerdo con la fluorescencia emitida se identifica la base. Finalmente, esta información es transmitida a un ordenador que transforma los datos obtenidos en la secuencia del fragmento.

Este proceso se realizó utilizando *ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de PE Applied Biosystems, y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La siguiente tabla muestra los reactivos adicionados para cada reacción de secuenciación.

Tabla 4.8 Mezcla realizada para cada secuenciación.

Reactivos	Cantidad
Mezcla de reacción (<i>Terminator Ready Reaction Mix</i>)	4,0 μ l
Producto de PCR	1,5 μ l
Cebador	1,0 μ l
Agua milli-Q estéril	3,5 μ l
Volumen total	10,0 μ l

Para cada cepa se secuenciaron las dos cadenas del producto obtenido en la PCR utilizando los mismos cebadores que en la reacción de PCR pero en diferente concentración (apartado 4.1.5).

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el termociclador Gene Amp System 2400 de Perkin Elmer, realizando un ciclo inicial de desnaturalización a 96 °C durante 4 minutos, para posteriormente realizar 25 ciclos de la siguiente manera: 96 °C durante 10 segundos, 5 segundos a la temperatura de interacción DNA/cebador, y posteriormente 60 °C durante 4 minutos para la secuenciación a partir de la extensión del cebador con integración de los marcadores fluorescentes correspondiente a cada nucleótido. Finalmente, se mantiene la reacción a 4 °C.

Tabla 4.9 Condiciones de secuenciación.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96 °C	4 min	1
Desnaturalización Anillamiento Elongación	96 °C 45 - 54 °C 60 °C	10 seg 5 seg 4 min	25
Final	4 °C	∞	

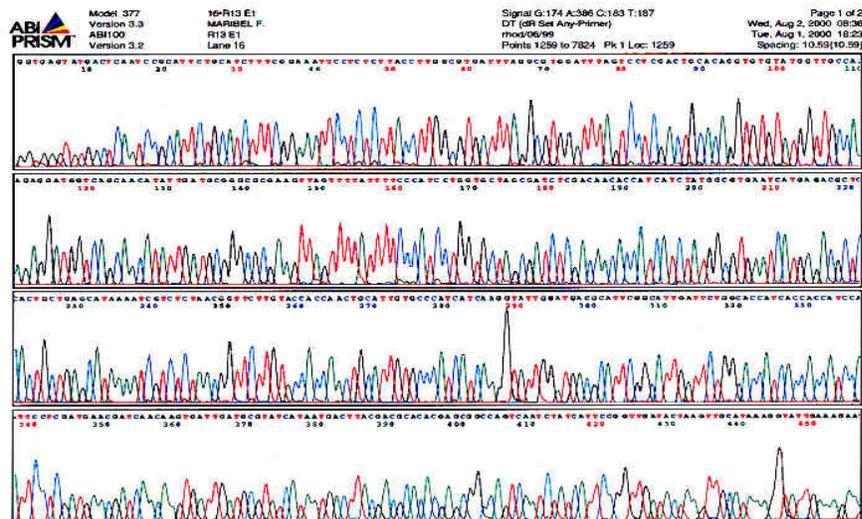
Una vez finalizada la reacción de secuenciación, se realizó una precipitación de la mezcla con la finalidad de purificar los productos obtenidos. Se utilizó el siguiente protocolo siguiendo las indicaciones del proveedor del kit:

1. Preparar un tubo eppendorf estéril con 25 µl de etanol 96% (Panreac 141085) y 1 µl de acetato sódico 3M, pH 4,6 (246,1 g de acetato sódico en 1 l de agua destilada; Panreac 141633).
2. Transferir el producto de la reacción de secuenciación, aproximadamente 10 µl, al tubo eppendorf anterior y mezclar.
3. Mantener el tubo eppendorf en hielo durante 10-20 minutos, para que en presencia del etanol precipite el DNA.
4. Centrifugar a 4.500 rpm durante 15-30 minutos.
5. Retirar el sobrenadante con cuidado de no resuspender el sedimento y añadir 250 µl de etanol al 70%.

6. Centrifugar a 4.500 rpm durante 5 minutos.
7. Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
8. Secar el sedimento al aire, dejando los tubos eppendorfs abiertos al lado de la llama de un mechero Bunsen.
9. Una vez evaporado todo el etanol, cerrar el tubo eppendorf, guardarlo a temperatura ambiente o en refrigeración, quedando dispuesto para ser sometido a electroforesis.

A continuación, se analiza el precipitado por electroforesis en un sistema acoplado a un fluorímetro. Esta última parte se llevó a cabo en el Servei de Sequenciació dels Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona, utilizando un secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer de Perkin Elmer. Todas las muestras se han procesado de forma automatizada por los SCT, dando como resultado la secuencia y el cromatograma correspondiente.

Figura 4.2 Cromatograma que muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento del gen *epd* de una cepa del estudio.



4.1.11 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

El paso previo a la realización del estudio poblacional, consistió en alinear todas las secuencias obtenidas para un mismo gen y comprobar el número de coincidencias nucleotídicas. Para realizar este alineamiento múltiple se utilizó el programa CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment (versión 1,8, disponible en la web EMBL European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>), que compara base por base todas las secuencias a procesar e indica si hay o no coincidencia.

Para cada locus, después de comparar todas las secuencias obtenidas de las cepas de *V. cholerae*, se asignaron arbitrariamente números alélicos diferentes a las secuencias distintas, aunque sólo difiriesen en un único nucleótido. Para cada cepa, la combinación de alelos obtenida para todos los loci estudiados definió su perfil alélico o genotipo. Los distintos genotipos identificados en la población estudiada se les denominó **Secuencia Tipo** (ST).

4.1.12 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los fragmentos secuenciados, que permitió calcular los parámetros necesarios para determinar la estructura genética de la población de *V. cholerae* O139 estudiada.

4.1.12.1 Diversidad alélica por locus (δ_j)

La diversidad alélica para cada gen fue calculada como

$$\delta_j = \left(1 - \sum_i f_i^2\right) \left(\frac{n}{n-1}\right)$$

donde f_i es la frecuencia del alelo i en la muestra y n el número de secuencias examinadas.

4.1.12.2 Diversidad alélica media (Δ)

La diversidad alélica media, Δ , es la media aritmética de δ_j para los seis genes analizados.

4.1.12.3 Índice de asociación (I_A)

Este estadístico estima el desequilibrio de ligamiento presente dentro de una población a partir del conjunto de perfiles alélicos obtenidos. Para ello, se calculó el índice de asociación como se describió en el apartado 3.1.16.5.

Además, se realizó una simulación de Montecarlo para estimar la significación del valor de I_A obtenido. Se generaron 10.000 matrices de alelos al azar, sin reemplazamiento, de acuerdo con las respectivas frecuencias alélicas obtenidas para todos los loci analizados. Esta simulación nos da un valor P , que según el nivel de significación aplicado, en nuestro caso fue del 99,9% ($\alpha=0,001$), nos permite rechazar la hipótesis nula (H_0) de asociación de alelos al azar. Si $P \leq 0,001$ se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa de desequilibrio de ligamiento; en cambio si $P > 0,001$ no se puede descartar esta hipótesis nula.

4.1.12.4 Índice de asociación estandarizado (I_A^S)

Este estadístico es una modificación del índice de asociación, que fue descrito por Hudson (Haubold y col., 2000), cuyo valor no depende del número de loci analizados. Su cálculo se llevó a cabo aplicando la siguiente fórmula:

$$I_A^S = \frac{1}{l-1} \left(\frac{V_O}{V_E} - 1 \right)$$

donde l es el número de loci.

Un valor igual a 0 indica que los alelos están en equilibrio de ligamiento. En cambio, valores significativamente diferentes de 0 indican una estructura clonal de la muestra estudiada (desequilibrio de ligamiento).

4.1.12.5 Diversidad nucleotídica (π)

La diversidad nucleotídica, entre los distintos alelos obtenidos, fue calculada usando el programa DnaSP, versión 3.51 (Facultat Biologia, Universitat Barcelona; <http://www.bio.ub.es/~julio/DnaSP.html>), como

$$\pi = \left(\sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij} \right) \left(\frac{n}{n-1} \right),$$

donde n , x y π_{ij} son el número de alelos, la frecuencia del alelo i ó j en la muestra, y la proporción de nucleótidos distintos entre los alelos i y j , respectivamente.

4.1.12.6 Relación d_N/d_S

Las sustituciones nucleotídicas que se producen en genes que codifican para proteínas pueden ser: *sinónimas*, también llamadas sustituciones silenciosas, porque no producen un cambio del aminoácido que codifican; o *no sinónimas*, cuando se produce un cambio del aminoácido que codifican. Normalmente, la mayoría de los cambios no sinónimos son eliminados por selección purificadora, pero bajo ciertas condiciones selectivas pueden fijarse. Analizando el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas se puede obtener información del grado de selección que opera en la población estudiada.

Usando el programa START (Sequence Type Analysis and Recombination Tests; <http://www.mlst.net>) se calculó el cociente d_N/d_S , de acuerdo con el método de Nei y Gojobori (1986).

4.1.12.7 Test de Sawyer

Este test permite evidenciar la presencia de recombinación dentro de un conjunto de secuencias alineadas. El test de Sawyer fue realizado con el programa START (Sequence Type Analysis and Recombination Tests; <http://www.mlst.net>), siguiendo el método descrito previamente por Sawyer (1989).

Se realizan comparaciones entre pares de secuencias que contienen solo sitios polimórficos silenciosos (secuencias condensadas). Cada par de secuencias es dividida en fragmentos que contienen secuencias con sitios idénticos. Los tamaños de todos los fragmentos encontrados entre cada pareja de secuencias por comparación son usados para obtener dos valores: la suma de cuadrados de fragmentos condensados (SSCF) y el fragmento máximo condensado (MCF). Un evento de recombinación tiende a incrementar los valores de SSCF y MCF ya que produce un fragmento inusualmente largo. Los valores SSCF y MCF no son significativamente influenciados por mutaciones puntuales.

4.1.13 REPRESENTACIÓN GRÁFICA

A partir de las secuencias obtenidas para cada uno de los loci analizados se generaron representaciones gráficas con ayuda de programas informáticos como se detalla a continuación.

4.1.13.1 Dendrograma

La relación existente entre las cepas con distintos perfiles alélicos o STs se mostró generando un dendrograma a partir de una matriz de no coincidencias alélicas entre parejas de STs, y aplicando el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages). Este dendrograma se construyó con el programa START (Sequence Type Analysis and Recombination Tests; <http://www.mlst.net>).

El coeficiente de correlación cofenética (r_c) fue calculado usando el programa NTSYS-pc, versión 1.80 (Rolf, 1993). Cuando el valor de r_c es próximo a uno, existe una clara estructura jerárquica entre los STs. En cambio, valores bajos de r_c sugieren una distorsión notable entre las distancias iniciales y las que resultan del dendrograma. Normalmente r_c oscila entre 0,6 y 0,95. Valores de $r_c \geq 0,9$ indica un ajuste muy bueno; entre 0,8 y 0,9 es un ajuste bueno; entre 0,7 y 0,8 es un ajuste regular; y valores menores de 0,7 es un ajuste malo.

4.1.13.2 Árboles génicos

Se construyeron árboles génicos con ayuda del programa MEGA, versión 2.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; <http://megasoftware.net>) y utilizando la distancia de Jukes-Cantor, la cual supone que la velocidad de sustitución nucleotídica es la misma para los 4 nucleótidos A, T, C y G (Jukes y Cantor, 1969).

El nivel de confianza de los árboles génicos construidos se determinó mediante un análisis de "bootstrapping" después de generar 1000 réplicas, los valores obtenidos se indican en los nodos de la figura.

4.1.13.3 Diagramas de descomposición de particiones ("split graphs")

Las relaciones evolutivas entre distintos taxones se representan frecuentemente por esquemas en forma de árboles filogenéticos. Este proceder ha sido justificado admitiendo

que la evolución de los organismos es un proceso de bifurcación o ramificación. No obstante, sobretodo en el caso de los organismos procariotas, los datos experimentales no se ajustan en todos los casos a una representación única en forma de árbol. Uno de los argumentos que se han esgrimido para explicar este comportamiento es la existencia de transferencia lateral de información genética entre distintos taxones bacterianos. Maynard-Smith (Maynard-Smith y col., 1993) propuso que, en este caso, la representación más adecuada del proceso evolutivo no sería un esquema jerárquico en forma de árbol sino un esquema no jerárquico en forma de red.

Para tratar de resolver este problema, Bandelt y Dress (1992) desarrollaron el método de la descomposición de particiones ("split decomposition analysis"). Esencialmente, los datos son transformados en una serie de particiones compatibles y representados en forma de diagrama ("split graph"). Para datos ideales, en los que no habría recombinación y, por tanto, el proceso evolutivo sería descrito convenientemente por un proceso de ramificación, este diagrama coincide con un árbol. En cambio, para datos más reales, el diagrama tiene la forma de un árbol reticulado, que puede interpretarse como indicador de la presencia de distintas filogenias dentro de la población analizada.

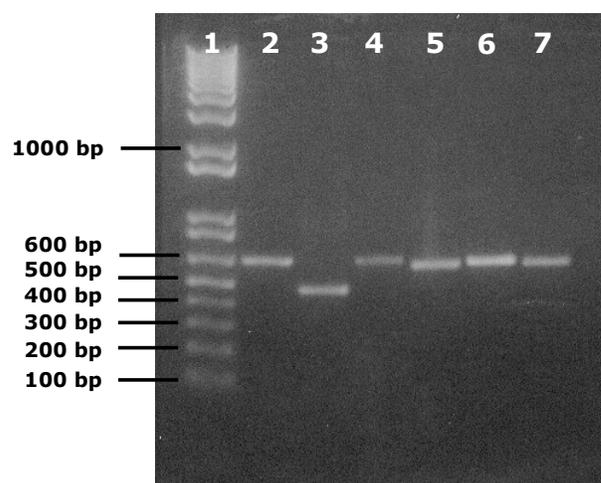
Para completar el estudio de la estructura poblacional de *V. cholerae* O139 se aplicó el método de descomposición de particiones para cada uno de los loci estudiados y para el conjunto de perfiles alélicos obtenidos con el total de la muestra. Para ello, previamente se ha de convertir a formato NEXUS las secuencias obtenidas en cada locus, y la matriz de distancias generada a partir de los datos obtenidos al comparar todas las parejas posibles entre los distintos STs $\left(\frac{n(n-1)}{2}\right)$. El análisis se realizó con el programa Splits Tree2 (Huson, 1998; <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/splits>).

4.2 Resultados

4.2.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Se realizó la amplificación por PCR de los fragmentos internos de los 6 genes a estudio para las 31 cepas de *Vibrio cholerae*. En la siguiente figura (Fig. 4.3) se aprecia la fotografía de un gel de agarosa que muestra bandas de DNA que corresponden a cada uno de estos fragmentos amplificados para una determinada cepa (BO4). Se observa la similitud del tamaño de las bandas, aproximadamente de 600 pb, excepto la que corresponde al locus *cadA*, que se amplificó un fragmento más pequeño de 480 pb.

Figura 4.3 Electroforesis en gel de agarosa de los distintos fragmentos amplificados por PCR de los 6 genes estudiados. De izquierda a derecha: 1- marcador de pesos moleculares (100 bp PCR Molecular Ruler, BIO-RAD), 2- *asd*, 3- *cadA*, 4- *epd*, 5- *idh-II*, 6- *lap* y 7- *mdh*.



Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de estos fragmentos génicos para ambas cadenas de DNA. Estas secuencias fueron procesadas, para detectar posibles errores, y acotadas de forma arbitraria, según la fiabilidad de la secuencia obtenida, a fragmentos internos de aproximadamente 480 pb para realizar el posterior análisis. La siguiente tabla indica el tamaño de estos fragmentos y la posición dentro del gen.

Tabla 4.10 Características de los fragmentos génicos amplificados y de los fragmentos utilizados en el análisis de secuencias multilocus.

Gen	Tamaño del gen (pb) ¹	Fragmento amplificado		Fragmento considerado	
		Tamaño (pb)	Posición 5' ²	Tamaño (pb)	Posición 5' ²
<i>asd</i>	1.284	643	+ 306	480	+ 402
<i>cadA</i>	480	480	+ 1	441	+ 36
<i>epd</i>	1.026	646	+ 179	486	+ 267
<i>idh-II</i>	2.520	618	+ 188	540	+ 230
<i>lap</i>	1.506	634	+ 32	490	+ 116
<i>mdh</i>	936	609	+ 26	495	+ 111

¹ El tamaño especificado es el del gen completo, excepto para el gen *cadA* que sólo se disponía de una secuencia parcial.

² Relativo a la adenosina del codón de inicio de la transcripción ATG, con excepción del gen *cadA* que sólo se disponía de un fragmento parcial secuenciado en el momento que se realizó este estudio (GenBank number accession:AF077081).

Las secuencias nucleotídicas determinadas en este estudio de MLST están disponibles en la base de datos GenBank del NCBI (National Center of Bioinformatic Informations; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), desde el número AF343125 hasta AF344410.

4.2.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Para cada uno de los loci, se realizó un alineamiento múltiple de las 31 secuencias obtenidas, sin encontrarse deleciones o inserciones, excepto en el caso de la cepa BO1 que se obtuvo de forma repetitiva una deleción en la posición 263 en el fragmento interno del gen *cadA* que codifica la enzima lisina descarboxilasa. Se confirmó fenotípicamente que esta cepa presentaba actividad lisina descarboxilasa. Estos datos indican la posible presencia de un duplicado de este gen en esta cepa, de la cual detectaríamos a nivel génico una copia truncada.

Como resultado del alineamiento de secuencias realizado para cada locus, las distintas secuencias que diferían en uno o más nucleótidos se les asignaba un alelo diferente. En la figura 4.4 se muestran las variaciones nucleotídicas obtenidas y su posición dentro de los fragmentos secuenciados para todos los loci analizados.

Todos los loci fueron polimórficos, y el número de sitios nucleotídicos polimórficos en los fragmentos secuenciados osciló entre 8 (*mdh*) y 28 (*cadA*). Estos resultados revelaron un bajo número de sitios polimórficos en estos fragmentos y, mayoritariamente, estos cambios nucleotídicos se producían en la tercera posición del codón.

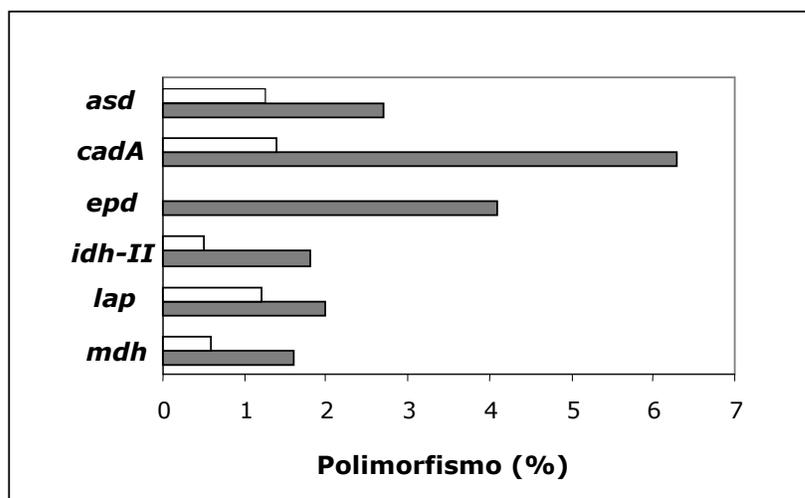
Figura 4.4 Sitios polimórficos obtenidos para cada uno de los 6 fragmentos génicos estudiados.

<i>asd</i>	111111234444 5666667841346 5013462698950	<i>idh-II</i>	11112345 1202781583 1972358453
alelo 1	CGATATCGCACTC	alelo 1	GACTCATGTG
alelo 2G...	alelo 2	.CTC..GT..
alelo 3	TACAGATATGTGT SSNNNNSSSSSSS	alelo 3	A.TCTCG.CA SSSSSSSNSS
<i>cadA</i>	11111111222222223333333334 251346699900223378133455770 7822066916938060272017908390	<i>lap</i>	1112333444 1457138357 3686254889
alelo 1	CGCTTCTTTGCTGCCCGCTGCTATGGTG	alelo 1	CATGGTCAGC
alelo 2	TC.....TC.....	alelo 2	T.G.A...CT
alelo 3	.CTCCT...T...TT..CATCGC...C	alelo 3	TGGTACAGC.
alelo 4	...CC.CCCA.CTT..A.CATCGCTAC. SSSSSSSSSSSSSSSSSNSSSSSNSS		SSSNSSSNSS
<i>epd</i>	11111111112222334 45922255677790012676 35414717925865876760	<i>mdh</i>	123444 18727038 69830137
alelo 1	TTCTTTCGGCTCTTCTGGA	alelo 1	CCCGGGTT
alelo 2	C.....T..	alelo 2	ATTAA.C.
alelo 3	.CGGCCTTACTACTA.CG SSSSSSSSSSSSSSSSSS	alelo 3	.TTAATCC SSSSSNSS

La primera línea muestra los nucleótidos para el alelo 1 presentes en cada uno de los sitios nucleotídicos polimórficos obtenidos con la técnica MLST. Para el resto de alelos, sólo se muestran los nucleótidos que difieren del alelo 1, mientras que se señala con puntos los nucleótidos que coinciden con el alelo 1. Las variaciones polimórficas pueden ser sinónimas (S) o no sinónimas (N) y se muestra en la parte inferior de cada sitio polimórfico. Cada sitio nucleotídico está numerado en la parte superior en formato vertical.

En la siguiente figura se observa un gráfico de barras que indica el grado de polimorfismo obtenido a nivel nucleotídico y a nivel aminoacídico en cada locus analizado. El porcentaje de polimorfismo nucleotídico por locus osciló entre 1,6% (*mdh*) y 6,3% (*cadA*), y el porcentaje a nivel aminoacídico fue entre 0% (*epd*) y 1,4% (*cadA*). El locus *epd* fue un caso especial porque todas las variaciones nucleotídicas obtenidas fueron sinónimas y no afectaron a la composición de aminoácidos.

Figura 4.5 Porcentaje de posiciones variables a nivel nucleotídico (barras grises) y a nivel aminoacídico (barras blancas).



En la tabla 4.11 se resume la variación nucleotídica obtenida en los 6 loci analizados, así como los valores de diversidad nucleotídica y de relación d_N/d_S calculados. Los dos loci que presentaron valores más altos en el número de sustituciones nucleotídicas por sitio nucleotídico y de diversidad nucleotídica fueron *cadA* y *epd*. En relación al cociente d_N/d_S , éste fue calculado para los 6 loci, y en todos los casos, excepto para el locus *lap*, fue menor del 10%, indicando que estos genes se encuentran bajo una fuerte presión selectiva. La relación d_N/d_S para el locus *lap* fue del 12,4%, valor superior al 10%, que muestra que este locus no está bajo condiciones de selección tan fuertes como en el caso de un gen metabólico importante ("housekeeping gene").

Tabla 4.11 Variaciones nucleotídicas en los fragmentos génicos secuenciados para los 6 loci estudiados.

Gen	Tamaño fragmento (pb)	Nº de alelos	Nº de sitios polimórficos	Substituciones nucleotídicas por sitio nucleotídico	Diversidad nucleotídica ¹	d_N/d_S ²
<i>asd</i>	480	3	13	0,027	1,81 ± 0,008	8,3
<i>cadA</i>	441	4	28	0,063	3,48 ± 0,008	1,2
<i>epd</i> ³	486	3	20	0,041	2,74 ± 0,012	0
<i>idh-II</i>	540	3	10	0,019	1,24 ± 0,004	3,1
<i>lap</i>	490	3	10	0,020	1,36 ± 0,004	12,4
<i>mdh</i>	495	3	8	0,016	1,08 ± 0,003	5,1

¹ Se muestra la diversidad nucleotídica ± la desviación estándar, calculado con el programa informático DnaSP. La diversidad nucleotídica está expresada en %.

² El cociente d_N/d_S fue calculado con el programa START y se expresa como porcentaje (%).

³ Todos los cambios nucleotídicos obtenidos en el locus *epd* fueron sinónimos.

El análisis de una secuencia de nucleótidos también contempla la determinación de su composición, dando información sobre el porcentaje de bases G+C (Tabla 4.12) y el uso de codones sinónimos (Tabla 4.13).

En la tabla 4.12 se muestran las proporciones en bases G+C obtenidas en los distintos fragmentos identificados para todos los loci estudiados. El valor medio total obtenido fue de 49,01%. Este valor está muy próximo a la media genómica descrita para *Vibrio cholerae* (47-48%) en el trabajo de Heidelberg y col. (2000), en el que analizan los dos cromosomas que tiene esta bacteria. Estos autores obtienen un contenido en bases G+C de 47,7% en el cromosoma I y de 46,9% en el cromosoma II en una cepa O1 *El Tor*.

Tabla 4.12 Porcentaje del contenido G+C de los fragmentos génicos obtenidos.

Alelo	Loci						Media % G+C TOTAL
	<i>asd</i>	<i>cadA</i>	<i>epd</i>	<i>idh-II</i>	<i>lap</i>	<i>mdh</i>	
1	48,54	49,89	45,06	47,78	51,63	51,72	
2	47,92	49,66	45,06	47,96	51,22	50,91	
3	48,75	49,66	45,27	47,78	51,63	51,11	
4	---	50,57	---	---	---	---	
Media % G+C	48,40	49,94	45,13	47,84	51,49	51,25	49,01

La redundancia o degeneración en el código genético de los diferentes organismos queda reflejada en la relación del uso de codones, ya que la mayoría de los aminoácidos están codificados por dos o más codones. En la tabla 4.13 se pueden observar los distintos codones que codifican para cada aminoácido, y cual o cuales de ellos son utilizados con mayor frecuencia en los fragmentos génicos analizados en este estudio.

Tabla 4.13 Uso de codones sinónimos para los 6 fragmentos génicos analizados.

Aminoácido	Codón	Frecuencia por familia de codones sinónimos (%)	Aminoácido	Codón	Frecuencia por familia de codones sinónimos (%)
Glicina Gly	GGT	54,6	Fenilalanina Phe	TTC	56,6
	GGC	34,1		TTT	43,4
	GGG	8,0	Tirosina Tyr	TAC	63,3
	GGA	3,3		TAT	37,7
Ácido glutámico Glu	GAA	56,1	Triptófano Trp	TGG	100,0
	GAG	43,9	Cisteína Cys	TGT	59,8
Ácido aspártico Asp	GAT	74,5		TGC	40,2
	Valina Val	GAC	25,5	Alanina Ala	GCG
GCA					21,9
GCT	17,3				
GCC	16,2				
Serina Ser	AGC	26,3	Arginina Arg	CGT	43,2
				CGC	29,8
				CGA	9,1
				AGA	9,1
				CGG	8,7
				AGG	0,0
Lisina Lys	AAA	71,0	Histidina His	CAT	62,5
	AAG	29,0		CAC	37,5
Asparagina Asn	AAC	62,8	Prolina Pro	CCA	38,9
	AAT	37,2		CCG	26,9
Metionina Met	ATG	100,0		CCT	26,4
				CCC	7,8
Glutamina Gln	CAA	73,5	Leucina Leu	CTG	46,3
	CAG	26,5		TTG	18,3
Isoleucina Ile	ATC	51,2		TTA	16,8
				ATT	45,8
				ATA	3,0
Treonina Thr	ACC	41,2	Terminación Ter	TGA	57,1
	ACT	27,2		TAA	28,6
	ACG	17,3		TAG	14,3
	ACA	14,3			

4.2.3 SECUENCIAS TIPO o STs

Después de procesar las secuencias obtenidas y realizar un alineamiento múltiple para cada uno de los 6 genes estudiados (apartado 4.1.11), se asignaron a las distintas secuencias obtenidas alelos diferentes. En función de las combinaciones de alelos obtenidos en los 6 loci analizados se identificaron 5 STs distintos para el total de la muestra analizada. En la siguiente tabla se muestran los perfiles alélicos obtenidos para todas las cepas analizadas, así como el ST que le corresponde a cada una.

Tabla 4.14 Perfiles alélicos obtenidos para las 31 cepas de *V. cholerae* analizadas.

ST	Referencia cepa	Alelos en cada locus						Serogrupo/Biotipo
		<i>asd</i>	<i>cadA</i>	<i>epd</i>	<i>idh-II</i>	<i>lap</i>	<i>mdh</i>	
1	CO418	1	1	1	1	1	1	O139
1	BO4	1	1	1	1	1	1	O139
1	NT638	1	1	1	1	1	1	O139
1	MOD084	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO415	1	1	1	1	1	1	O139
1	NPO390	1	1	1	1	1	1	O139
1	NT648	1	1	1	1	1	1	O139
1	NPO388	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO396 NT646	1	1	1	1	1	1	O139
1	329	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO403	1	1	1	1	1	1	O139
1	SO30	1	1	1	1	1	1	O139
1	BO2	1	1	1	1	1	1	O139
1	VO6	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO406	1	1	1	1	1	1	O139
1	SO29	1	1	1	1	1	1	O139
1	MDO90	1	1	1	1	1	1	O139
1	NT329	1	1	1	1	1	1	O139
1	BO1	1	1	1	1	1	1	O139
1	NT642	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO414	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO402	1	1	1	1	1	1	O139
1	NT330	1	1	1	1	1	1	O139
1	SG24	1	1	1	1	1	1	O139
1	CO487	1	1	1	1	1	1	O1 El Tor
2	SO19	1	4	1	2	2	2	O139
3	CO404 NT656	2	1	1	1	3	1	O139
4	CO391	2	2	3	3	3	3	O139
4	CO407	2	2	3	3	3	3	O139
4	653/36	2	2	3	3	3	3	O139
5	25872	3	3	2	1	1	1	No-O1/no-O139

Se observa un grupo mayoritario de 25 cepas de *V. cholerae* (24 cepas O139 y 1 cepa O1 *El Tor*) que presentan el mismo perfil alélico en los 6 loci estudiados (ST1). Un segundo grupo (ST4) que agrupa 3 cepas O139 (CO391, CO407, 653/36), con un genotipo que difiere en todos los loci si se compara con el grupo anterior. Por último, los 3 STs restantes (ST2, ST3 y ST5) están representados cada uno por una sola cepa. ST2 y ST3 agrupan cepas O139 (SO19 y CO404, respectivamente), y ST5 formado por una cepa no-O1/no-O139 (25872).

En la siguiente tabla se muestran las frecuencias de los distintos perfiles alélicos obtenidos para el conjunto de cepas analizadas.

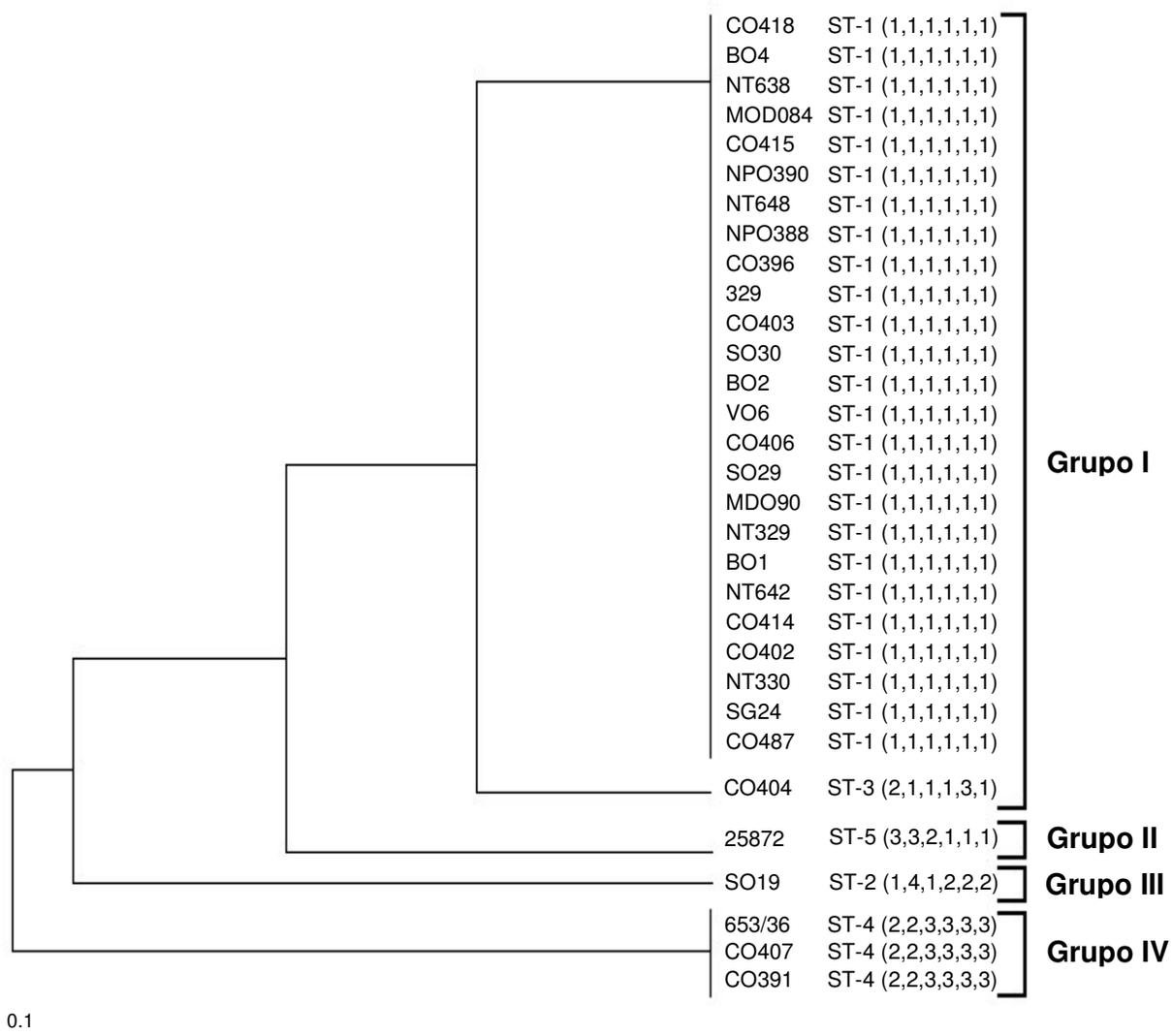
Tabla 4.15 Frecuencias de los distintos perfiles alélicos o STs identificados.

ST	Perfiles alélicos						Nº cepas	% de muestra
	<i>asd</i>	<i>cadA</i>	<i>epd</i>	<i>idh-II</i>	<i>lap</i>	<i>mdh</i>		
1	1	1	1	1	1	1	25	80,65
4	2	2	3	3	3	3	3	9,68
2	1	4	1	2	2	2	1	3,23
3	2	1	1	1	3	1	1	3,23
5	3	3	2	1	1	1	1	3,23

Las relaciones genéticas existentes entre los distintos STs identificados se muestra de forma gráfica en un dendrograma (Fig. 4.6). Este dendrograma se construyó a partir de los perfiles alélicos obtenidos aplicando la técnica MLST (Tabla 4.14), utilizando el método UPGMA. Se generó una matriz de coeficientes de distancias por comparación entre parejas de STs de la coincidencia o no coincidencia de alelos para cada locus analizado. El coeficiente de correlación cofenética (r_c) obtenido para el total de la muestra fue de 0,83, indicando que el 83% de la diversidad genética obtenida está explicada en las relaciones que muestra el dendrograma (apartado 4.1.13.1).

En la parte derecha del dendrograma se indica la referencia de cada una de las cepas y el nº de ST que le corresponde y su perfil alélico obtenido.

Figura 4.6 Dendrograma que muestra las relaciones genéticas existentes entre los 5 STs identificados para el total de la muestra.



¹ La escala indica distancia.

4.2.4 VARIABILIDAD ALÉLICA

Todos los loci fueron polimórficos, y el número de alelos por locus osciló entre 3, para los fragmentos internos de los genes *asd*, *epd*, *idh-II*, *lap* y *mdh*, y 4 para el del gen *cadA*. El número medio de alelos por locus fue 3,2. Este rango tan pequeño en el número de alelos obtenido, sugiere que estos 6 loci evolucionan a una velocidad similar. Estos resultados se muestran en la tabla 4.16 y las frecuencias alélicas en cada uno de estos loci se observa en la tabla 4.17.

Tabla 4.16 Variabilidad alélica obtenida con el análisis de secuencias multilocus para el conjunto de cepas de *V. cholerae* estudiadas.

Nº cepas = 31
Nº loci = 6
Nº STs = 5
Nº total de alelos = 19
Nº mínimo de alelos / locus = 3 (<i>asd</i> , <i>epd</i> , <i>idh-II</i> , <i>lap</i> , <i>mdh</i>)
Nº máximo de alelos / locus = 4 (<i>cadA</i>)
Nº medio de alelos / locus = 3,2

Tabla 4.17 Frecuencias alélicas en los 6 loci estudiados.

Loci	Nº cepas			
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 3	Alelo 4
<i>asd</i>	26	4	1	---
<i>cadA</i>	26	3	1	1
<i>epd</i>	27	1	3	---
<i>idh-II</i>	27	1	3	---
<i>lap</i>	26	1	4	---
<i>mdh</i>	27	1	3	---

4.2.5 ANÁLISIS DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Para evidenciar la estructura genética de la población se calculó el índice de asociación (I_A), que fue de 3,81 para el total de la muestra y de 0,97 cuando se consideraron sólo los 5 STs identificados. Estos valores de I_A son significativamente diferentes de cero, estimando que la población estudiada presenta desequilibrio de ligamiento, y por tanto, una estructura poblacional de tipo clonal.

Para evitar el error que se pudiese producir por no considerar el número de loci analizados, se calculó otro estadístico, el índice de asociación estandarizado (I_A^S), que sí lo tiene en cuenta. El valor de I_A^S para el total de la muestra fue de 0,762 y para el conjunto de STs fue de 0,194. Estos valores son distintos de cero, y por tanto, corroboran la presencia de desequilibrio de ligamiento en la población estudiada.

Tabla 4.18 Análisis del desequilibrio de ligamiento multilocus de las 31 cepas de *V. cholerae* estudiadas.

	Nº de STs	Nº medio de alelos por locus	V_E	V_O ¹	$I_A \pm SD$ ²	P ³	I_A^S
Total 31 cepas	5	3.17	1.16	5.59	3.81 ± 0.24	< 0,0001	0,762
Total 5 STs	5	3.17	1.04	2.04	0.97 ± 0.62	0.065	0,194

¹ Varianza observada (V_O) calculada de acuerdo con Maynard-Smith y col. (1993).

² Se muestra el índice de asociación \pm desviación estándar (SD).

³ El valor P expresa la probabilidad de obtener un valor de I_A igual o más extremo que los datos originales, basándose en una simulación de Montecarlo con 10.000 randomizaciones.

4.2.6 TEST DE SAWYER

Con los resultados obtenidos con la técnica MLST, se realizó el test de Sawyer para detectar estadísticamente la presencia de recombinación en la muestra. Se considera que hay recombinación cuando el valor de P es cero, ya que se rechaza la hipótesis nula de no recombinación.

Los resultados obtenidos en este test se indican en la tabla 4.19, y no revelaron casos de recombinación intragénica en la muestra, excepto en el locus *cadA*. En este locus, se evidencia una ligera presencia de recombinación cuando se considera el valor de suma de cuadrados de fragmentos condensados ($P=0,07$), pero desaparece cuando se analiza el valor de máximo fragmento condensado ($P=0,28$).

Tabla 4.19 Resultados del test de Sawyer.

Locus	SSCF	Valor P de SSCF	MCF	Valor P de MCF
<i>asd</i>	35	0,74	5	0,74
<i>cadA</i>	420	0,07	15	0,28
<i>epd</i>	262	0,17	16	0,22
<i>idh-II</i>	15	0,65	2	0,97
<i>lap</i>	9	1,00	2	1,00
<i>mdh</i>	27	0,19	5	0,19

Los resultados que se muestran fueron obtenidos después de 10.000 muestreos al azar.

Abreviaciones: SSCF (la suma de cuadrados de fragmentos condensados) y MCF (el máximo fragmento condensado).

4.2.7 OTRAS REPRESENTACIONES GRÁFICAS

A partir de las secuencias obtenidas para todas las cepas estudiadas en cada locus, se han generado otras representaciones gráficas, los árboles génicos y los diagramas de descomposición de particiones ó "splits", para obtener mayor información sobre las cepas de *V. cholerae* O139.

4.2.7.1 Árboles génicos

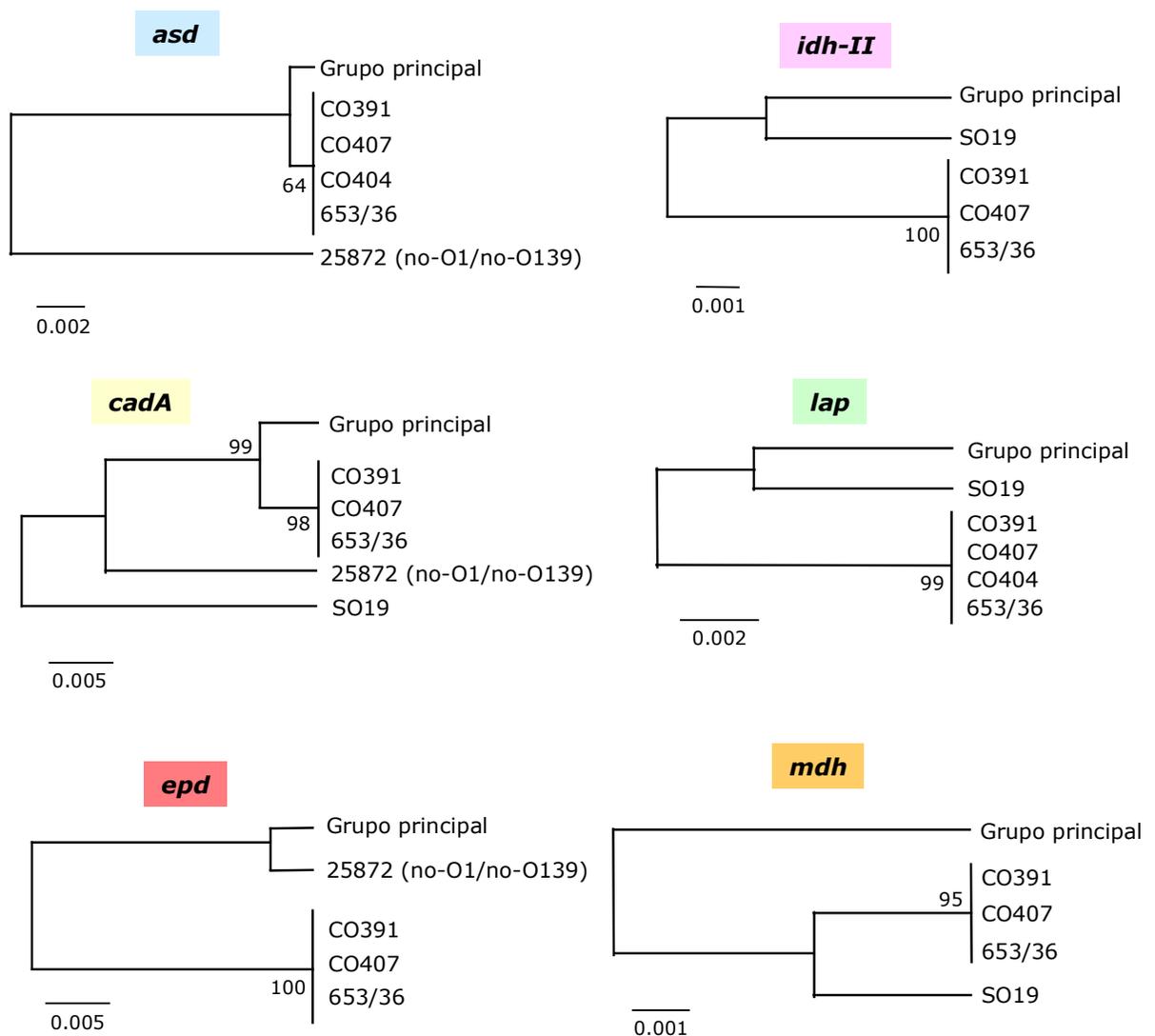
Una vez realizado el alineamiento múltiple de las secuencias, se pueden representar los resultados de forma gráfica mediante la construcción de árboles génicos para cada uno de los loci analizados (Fig. 4.7).

Estos árboles han sido construidos con el programa informático MEGA, que a su vez también ha realizado el análisis de "bootstrapping". Estos gráficos se generaron basándose en las distancias Jukes-Cantor a partir de los fragmentos génicos secuenciados, y utilizando

el método UPGMA. Para el análisis de "bootstrapping", se generaron 1.000 réplicas para cada uno de los locus estudiados, y los valores de "bootstrap" se muestran en los nodos de cada árbol, representando la fiabilidad estadística.

En la parte derecha de cada árbol se muestran las referencias de las cepas, excepto en el caso de "grupo principal" que indica el resto de cepas que no aparecen en el árbol. En la parte inferior izquierda de cada árbol se presenta la escala que indica distancia genética.

Figura 4.7 Árboles genéticos para cada uno de los loci analizados.



Al comparar los distintos árboles genéticos obtenidos, se observa un agrupamiento de cepas bastante similar en todos ellos con pequeñas modificaciones. Un grupo de 25 cepas, que se incluyen en el grupo principal en todos los árboles generados, tienen idénticas secuencias para todos los loci analizados. Un segundo grupo de 3 cepas (CO391, CO407 y 653/36) que también muestran secuencias idénticas en todos los loci pero que difieren totalmente del grupo anterior en los 6 loci. Estos dos clusters agrupan el 90,3% de las cepas del estudio. Sólo 3 cepas (CO404, SO19 y 25872) son las responsables de la distinta topología obtenida en los árboles construidos, porque, dependiendo del locus analizado, se agrupan con unas cepas u otras.

4.2.7.2 Diagramas de descomposición de particiones

Se realizó este análisis para examinar la estructura poblacional de *V. cholerae* O139. Con este método se puede detectar la presencia de recombinación cuando aparece una estructura de red o malla en el gráfico generado, y una divergencia en los nodos en ausencia de recombinación. En la figura 4.8 se muestran los distintos gráficos, o también denominados "splits", construidos para cada locus a partir de las distintas secuencias identificadas. En los nodos de cada "split" se muestran las referencias de las cepas, excepto en el caso de "grupo principal" que indica el resto de cepas que no aparecen en el gráfico.

Se observa que solamente uno de ellos, el que corresponde al locus *cadA*, presenta una red en el gráfico. Para los demás loci, se obtuvieron "splits" con una estructura de árbol, sin ninguna interconexión, poniendo de manifiesto la ausencia de recombinación intragénica. El parámetro "fit" fue de 100 para todos los "splits" generados, indicando que toda la información filogenética de las secuencias analizadas se visualiza en los gráficos.

También se realizó un análisis de descomposición de particiones basándose en la matriz de distancias de no coincidencias alélicas entre parejas de STs para todas las cepas estudiadas. En este caso, la presencia en el gráfico de una estructura de estrella es característico de una población con recombinación intragénica. En nuestro caso, el gráfico generado (Fig. 4.9) no mostró esta disposición de estrella.

Figura 4.8 "Splits" generados para cada locus estudiado.

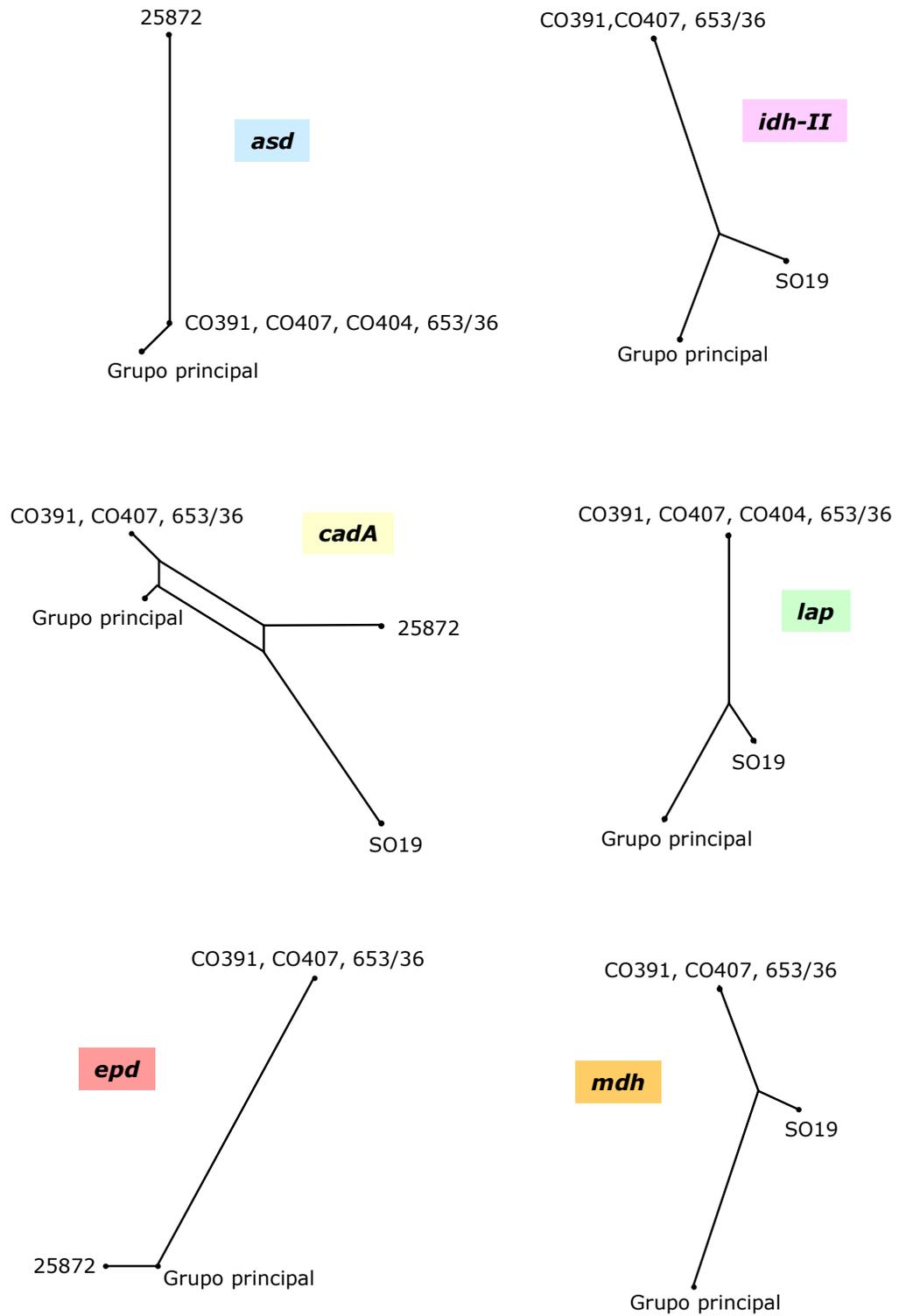
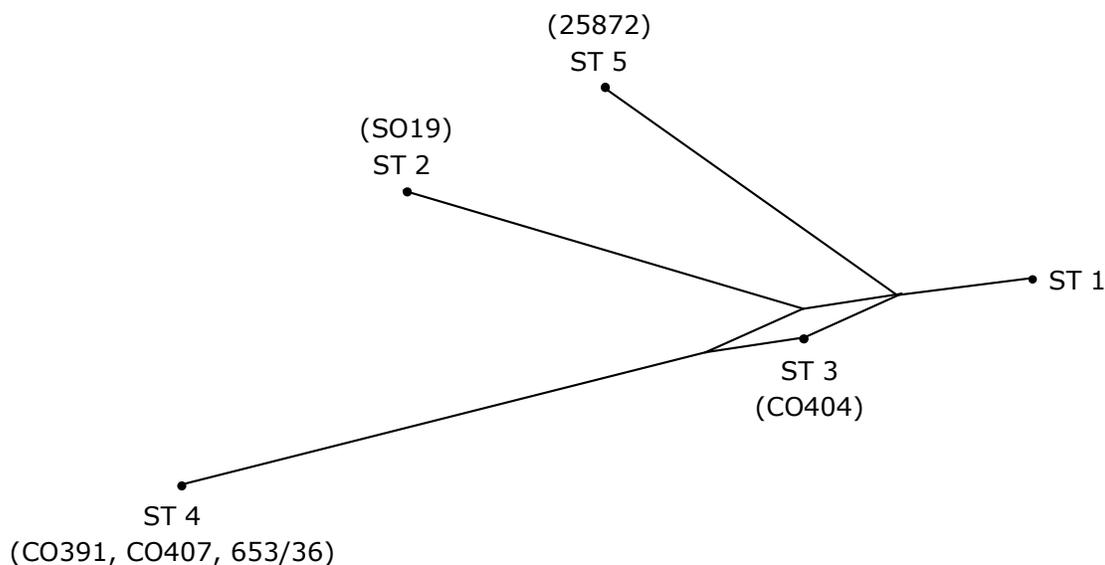


Figura 4.9 "Split" general para el total de la muestra.



4.2.8 COMPARACIÓN DE RESULTADOS MLST Y MLEE

Las 31 cepas analizadas con la técnica MLST, también habían sido estudiadas previamente utilizando la metodología MLEE (ver apartado 3.1.1). Al comparar los distintos loci analizados con las dos técnicas, se observa que comparten 4 loci en común (*asd*, *idh-II*, *lap* y *mdh*). En la tabla 4.20 se muestra la comparación de los resultados obtenidos con la aplicación de estas dos técnicas, considerando solamente este grupo de 31 cepas de *V. cholerae*.

Si nos fijamos en el número máximo de alelos hallados para cada uno de los loci en común, se observa que se obtienen valores similares para los loci *asd*, *idh-II* y *mdh*. En cambio, para el locus *lap* se encontró con la técnica MLEE un número mayor de alelos que con el análisis de secuencias multilocus.

También se muestran en la tabla 4.20 los valores de diversidad alélica para los 6 loci analizados por MLST, que son muy similares entre ellos, y los valores de diversidad génica determinados a partir de MLEE, que oscilan considerablemente según el locus. La diversidad alélica media (Δ) es la media aritmética de δ_j para m loci, y fue de $0,264 \pm 0,028$. La diversidad génica media (H) es la media aritmética de h_j para m loci, y fue de $0,391 \pm 0,287$.

Tabla 4.20 Comparación de resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas en este estudio.

Locus	Nº alelos		Diversidad alélica (δ)	Diversidad génica (h)
	MLST	MLEE	MLST	MLEE
Aspartato deshidrogenasa	3	2	0,288	0,071
Lisina descarboxilasa ¹	4	---	0,295	---
Eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa ¹	3	---	0,239	---
Isocitrato deshidrogenasa	3	4	0,239	0,323
Leucina aminopeptidasa	3	6	0,288	0,765
Malato deshidrogenasa	3	3	0,239	0,405
			$\Delta = 0,264 \pm 0,028$	$H = 0,391 \pm 0,287$

¹ Estos dos loci no fueron analizados previamente con la técnica MLEE.

A partir de los STs ó los ETs identificados, se construyeron dendrogramas para conocer las relaciones genéticas existentes entre este grupo de cepas. Si comparamos las agrupaciones obtenidas para el serogrupo O139 con la técnica MLEE (Fig. 4.10) y con la técnica MLST (Fig. 4.6) en las siguientes páginas, a simple vista no se observa que exista una cierta correlación en los resultados. Pero si clasificamos las cepas analizadas por MLEE según la división del dendrograma en que se agrupa (Tabla 4.21), se muestra que la mayoría de cepas O139 están representadas por ETs que se agrupan en la división I, incluidas las cepas O1 *El Tor* (CO487) y no-O1/no-O139 (25872). Sin embargo, los dos clusters de cepas O139 identificados por MLST como ST2 y ST4, con perfiles alélicos bastante distintos respecto la mayoría de cepas, también se detectan como cepas distintas del resto por MLEE ya que se agrupan en la división II del dendrograma.

Figura 4.10 Dendrograma generado a partir de los datos obtenidos con la técnica de MLEE, mostrando solamente las cepas O139.

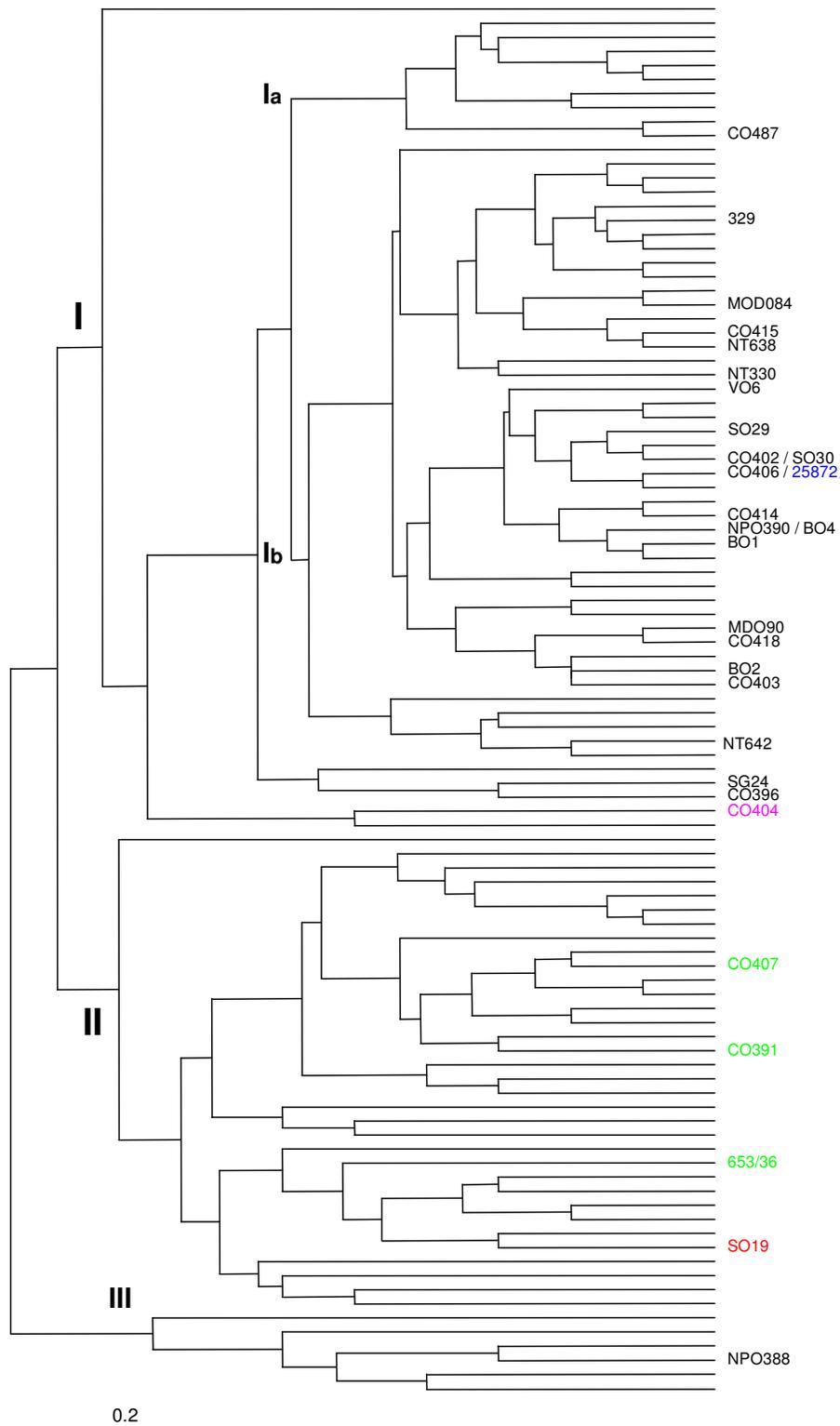
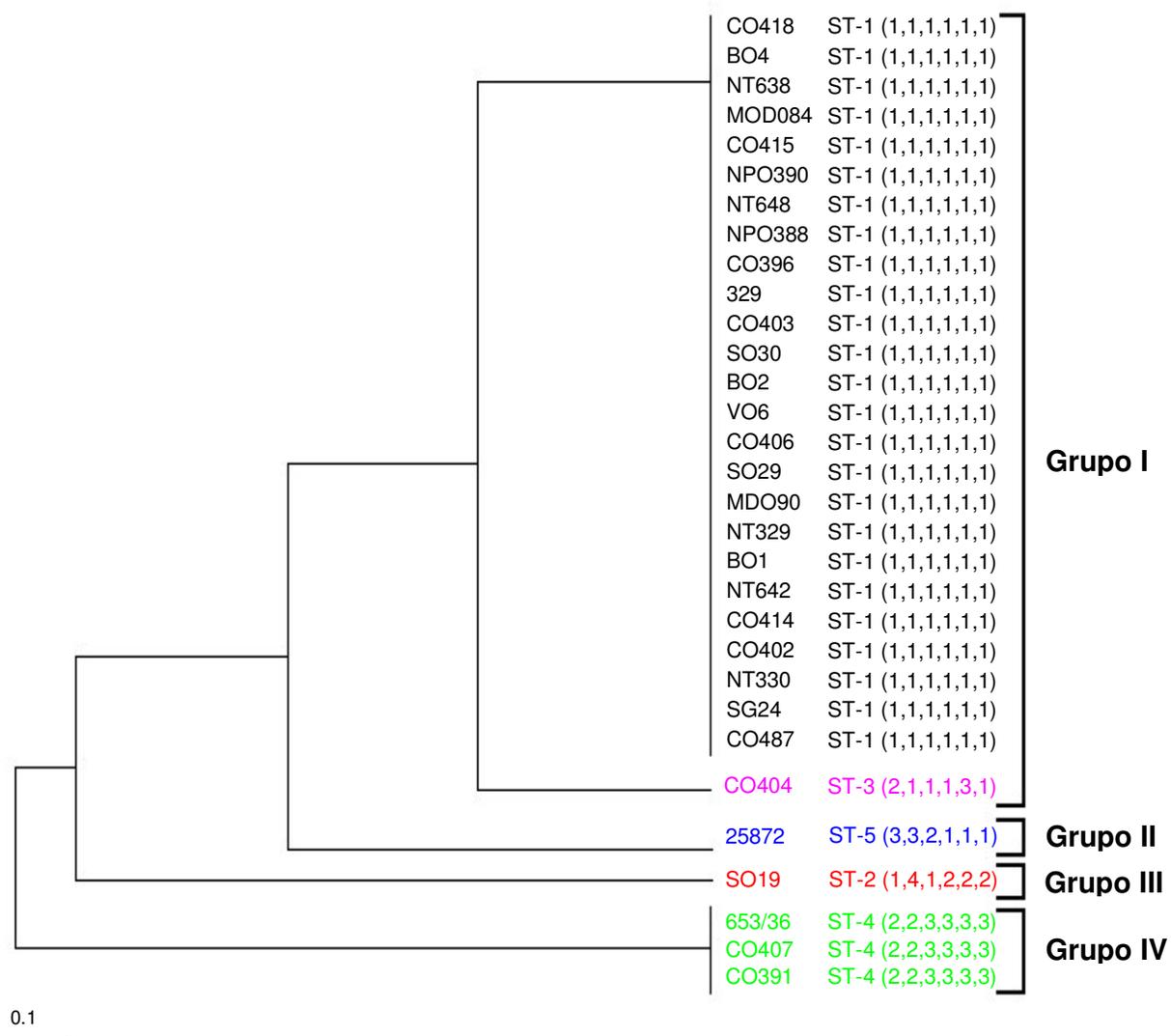


Figura 4.6 Dendrograma que muestra las relaciones genéticas existentes entre los 5 STs identificados para el total de la muestra.



¹ La escala indica distancia.

Tabla 4.21 Comparación del agrupamiento filogenético obtenido para las 31 cepas de *V. cholerae* analizadas con las técnicas MLST y MLEE.

Cepas		MLST	MLEE	
		ST	ET	Dendrograma
CO418	O139	1	96	División I (Ib)
BO4	O139	1	90	División I (Ib)
NT638	O139	1	94	División I (Ib)
MOD084	O139	1	93	División I (Ib)
CO415	O139	1	92	División I (Ib)
NPO390	O139	1	90	División I (Ib)
NT648	O139	1	89	División I
NPO388	O139	1	87	División III
CO396 NT646	O139	1	83	División I
329	O139	1	76	División I (Ib)
CO403	O139	1	71	División I (Ib)
SO30	O139	1	53	División I (Ib)
BO2	O139	1	65	División I (Ib)
VO6	O139	1	64	División I (Ib)
CO406	O139	1	60	División I (Ib)
SO29	O139	1	63	División I (Ib)
MDO90	O139	1	62	División I (Ib)
NT329	O139	1	59	División I (Ib)
BO1	O139	1	56	División I (Ib)
NT642	O139	1	55	División I (Ib)
CO414	O139	1	54	División I (Ib)
CO402	O139	1	53	División I (Ib)
NT330	O139	1	52	División I (Ib)
SG24	O139	1	43	División I
SO19	O139	2	91	División II
CO404 NT656	O139	3	66	División I
CO391	O139	4	39	División II
CO407	O139	4	40	División II
653/36	O139	4	81	División II
CO487	O1 <i>El Tor</i>	1	41	División I (Ia)
25872	No-O1/no-O139	5	60	División I (Ib)

4.3 Discusión

La emergencia de *V. cholerae* O139 constituye un hecho importante en la historia del cólera, ya que hasta 1992, *Vibrio cholerae* O1 era considerado como el único agente causal de la enfermedad. Cuando en septiembre de 1992 se identificó este nuevo serogrupo de *V. cholerae*, al que se le denominó O139 Bengal, a partir de diversos episodios de la enfermedad en India y Bangladesh, se pudo observar que *V. cholerae* O139 rápidamente se extendió a los países limítrofes. Al principio, este nuevo serogrupo desplazó totalmente las cepas O1 existentes en esta región asiática, pero un nuevo clon de *V. cholerae* O1 *El Tor* reemplazó a O139 durante los años 1994 y 1995. En 1996 emergió de nuevo *V. cholerae* O139 en Calcuta, coexistiendo con cepas O1 *El Tor* durante el período 1996-1997. En la actualidad, esta cepa sigue confinada en el sureste asiático, ya que su potencial epidémico todavía no ha sobrepasado estas áreas.

Estos hechos ponen de manifiesto algunas características de la compleja dinámica de la epidemiología de *V. cholerae*, así como las posibilidades de O139 para persistir y propagarse a otras regiones. Sin embargo, los factores que determinan la emergencia de este nuevo agente causal del cólera, su desaparición durante un cierto período de tiempo, su reemergencia y coexistencia con O1 *El Tor* en estas áreas endémicas, siguen siendo todavía desconocidos.

El estudio poblacional realizado con un grupo de cepas de *V. cholerae* utilizando la técnica de MLEE, entre los que se incluían 29 cepas pertenecientes al serogrupo O139 aislados durante el primer período (1992-1993), evidenció una mayor diversidad genética que la descrita hasta el momento dentro del conjunto de *V. cholerae* O139, ya que se identificaron 26 ETs distintos, que diferían entre ellos en un promedio de 6 loci. Para poder verificar esta diversidad observada en la población estudiada, decidimos analizar la población de *V. cholerae* O139 con una nueva técnica, Multilocus Sequence Typing (MLST), descrita por Maiden y col. (1998) para el análisis de la estructura genética de las poblaciones bacterianas.

Al realizar el análisis de secuencias de 6 genes metabólicos en esta población de cepas O139, los resultados obtenidos corroboraron la mayor diversidad detectada por MLEE. A partir de las diferencias nucleotídicas encontradas en los fragmentos secuenciados se identificaron 4 perfiles alélicos distintos (ST1, ST2, ST3 y ST4) para O139, observándose

dos grupos (ST1 y ST4) que exhibían diferencias alélicas en los 6 loci analizados. Estos grupos incluyen el 80,6% y el 9,6%, respectivamente, de las cepas de la muestra. El resto de STs (ST2, ST3 y ST5) están representados por un sola cepa (Fig. 4.6).

El hecho de que las cepas O139 que se agrupan en el ST4 (CO391, CO407 y 653/36) difieren del ST mayoritario (ST1 con 25 cepas) en todos los loci, demuestra que existe una gran divergencia con el grupo principal de cepas O139. Las diferencias nucleotídicas detectadas en las cepas del ST4 fueron de 1 a 18 bases, lo que implica un total de 47 cambios sobre 2.932 pb, o si expresamos los resultados en forma de porcentaje, el 1,6%. Este valor está dentro de los límites determinados en un trabajo previo de Byun y col. (1999) con los loci *mdh* (1,52%) y *hlyA* (3,25%) para una amplia colección de cepas de *V. cholerae*. Estos resultados dan consistencia a la hipótesis de un origen diverso de O139, ya que parece lógico pensar que las cepas pertenecientes a ST1 y los incluidos en ST4 divergieron hace mucho tiempo.

El número de alelos por locus para los 6 loci estudiados osciló entre 3 y 4, implicando que el número máximo de perfiles alélicos distintos posibles teóricamente no es muy alto (entre 729 (3^6) y 4.036 (4^6)). Sin embargo, si es improbable que cepas O139 no relacionadas entre ellas exhibieran el mismo perfil alélico sólo por azar. Con los datos obtenidos por MLST en este estudio, es difícil llegar a la conclusión de si la frecuencia de los diferentes genotipos identificados refleja la estructura poblacional de *V. cholerae* O139, o si es el resultado de un brote epidémico, en el que predomina un perfil alélico determinado como consecuencia de la patogenicidad variable que existe entre los distintos genotipos de este serogrupo. Por otra parte, la existencia de 4 perfiles alélicos distintos en una muestra pequeña (29 cepas), sugiere la coexistencia de varios clones del serogrupo O139 durante la epidemia.

El dendrograma generado a partir de los perfiles alélicos identificados para la muestra puso de manifiesto las relaciones genéticas entre los distintos clusters obtenidos (Fig. 4.6). Se observa que el grupo I, que agrupa las cepas representadas por los ST1 y ST2, están más relacionadas con la cepa no-O1/no-O139 (grupo II) que con otras cepas de O139 (grupos III y IV). Cabe resaltar, que la cepa O1 *El Tor* incluida en este estudio (CO487) presenta el mismo perfil alélico que el grupo mayoritario de cepas O139 (ST1), estando más relacionado genéticamente con este grupo que con el resto de cepas. Estos resultados son concordantes con estudios previos sobre el posible origen de las cepas O139, que postulan que derivaron de un clon O1 *El Tor* (Bik y col., 1995; Stroehrer y col., 1997).

En un estudio previo, Karaolis y col. (1995) analizaron una región de 931 pb del gen *asd* para 45 cepas de *V. cholerae*, que incluían distintos serogrupos (O1, O139 y no-O1/no-O139) y que procedían de fuentes clínicas y ambientales. Sus resultados determinaron que todas las cepas clínicas estudiadas, excepto una, compartían la misma secuencia para este locus. En el presente trabajo, cuando analizamos un fragmento de 480 pb de este mismo gen, obtuvimos dos secuencias distintas (alelos 1 y 2) para las 29 cepas O139 estudiadas. La variación nucleotídica obtenida entre estas dos secuencias fue mínima, ya que diferían entre ellas en el cambio de un solo nucleótido.

También es importante mencionar, que se detectó una región inusual (posiciones 160 a 167) al comparar los distintos fragmentos génicos secuenciados para este locus (Fig. 4.11). Estos cambios nucleotídicos daban como resultado dos cambios consecutivos a nivel aminoacídico (Asn en vez de Gln, y Thr en vez de Ala). Estos cambios también fueron detectados en el trabajo de Karaolis y col. en las posiciones 561 a 567 de sus secuencias, dentro del cluster que agrupaba las cepas de *V. cholerae* de la sexta pandemia, y estos autores lo consideraron como un rasgo típico de estas cepas. En nuestro caso, lo relacionamos con la secuencia correspondiente al alelo 3, que agrupaba una cepa no-O1/no-O139. El resto de cepas analizadas en nuestro estudio (O139 y O1 *El Tor*) mostraron la misma secuencia que la descrita por Karaolis y col. para sus cepas de *V. cholerae* patógenas.

Figura 4.11 Región de 7 pb en el locus *asd* (posiciones 160 a 167) con cambios no sinónimos consecutivos.

```

asd          111111234444
              5666667841346
              5013462698950
alelo 1      CGATATCGCACTC
alelo 2      .....G...
alelo 3      TACAGATATGTGT
              SSNNNNSSSSSSS

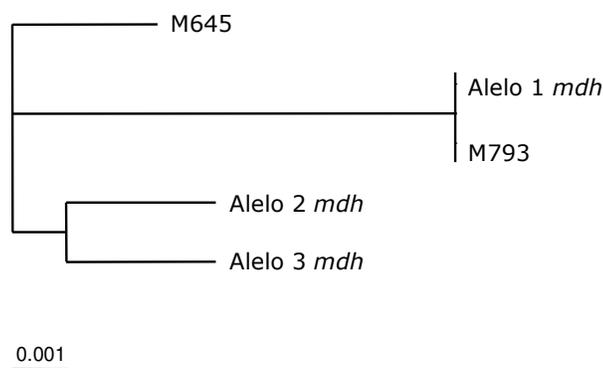
```

En el caso del gen *mdh*, en este trabajo se obtuvieron 3 secuencias distintas de 495 pb para las 31 cepas de *V. cholerae* analizadas, y se designaron como alelo 1, 2 y 3. Revisando la bibliografía, en el trabajo de Byun y col. (1999) se estudió también este locus para 33 cepas toxigénicas y no toxigénicas de diferentes serogrupos de *V. cholerae*. Después de

determinar la secuencia nucleotídica de una región de 936 pb de este gen, determinaron que todas las cepas patógenas analizadas en su estudio (cepas de la sexta y de la séptima pandemia, de la costa del Golfo en EEUU y 2 cepas O139) presentaban idéntica secuencia, representada por M793, excepto una cepa pre-séptima pandemia que presentó la secuencia M645.

Comparando los resultados obtenidos en los dos estudios, se observa que el presente trabajo, aunque se ha analizado un fragmento más pequeño del gen *mdh* que en el estudio de Byun y col. (1999), se ha detectado mayor diversidad en un grupo de cepas toxigénicas, dentro del serogrupo O139 de *V. cholerae*. A partir de las 3 secuencias distintas obtenidas en este estudio (alelos 1, 2 y 3) y de las 2 secuencias del trabajo de Byun y col. (1999), M793 y M645, se construyó un dendrograma (Figura 4.12).

Figura 4.12 Dendrograma generado para el locus *mdh*, que compara las relaciones entre las distintas secuencias obtenidas en este estudio (alelos 1, 2 y 3) con dos secuencias descritas previamente por Byun y col. (1999).



A partir del dendrograma construido para este locus, se observa que la secuencia del alelo 1, que agrupaba 27 cepas (25 cepas O139, una cepa O1 El tor y una cepa no-O1/no-O139), tiene idéntica secuencia que la mayoría de las cepas patógenas del trabajo de Byun, representadas por M793. Sin embargo, los alelos 2 (3 cepas O139) y 3 (una cepa O139) difieren en 6 y 7 sitios nucleotídicos respectivamente, de la secuencia común del alelo 1 y M793.

En el análisis del desequilibrio de ligamiento se calculó el índice de asociación (I_A) para detectar la existencia de asociación entre los alelos. El valor de I_A obtenido para el conjunto de cepas, fue significativamente distinto de cero ($I_A = 3,81 \pm 0,24$, $P < 0,0001$), al igual que cuando se consideraron sólo los STs identificados ($I_A = 0,97 \pm 0,62$, $P < 0,065$). Estos resultados son consistentes con la presencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los alelos, y sugiere una estructura poblacional clonal. Sin embargo, el valor de P obtenido cuando consideramos los STs de la muestra no nos permite descartar la hipótesis nula de distribución de los alelos al azar. Aunque este resultado debe tomarse con precaución porque hemos identificado un número muy bajo de STs (5 STs en total). Para evitar la influencia del número de loci en este análisis, se calculó otro estadístico, el índice de asociación estandarizado (I_A^S), que fue más bajo en ambos casos: para todas las cepas ($I_A^S = 0,762$) y para el conjunto de STs ($I_A^S = 0,194$).

La contribución relativa de recombinación y mutación a la divergencia clonal es difícil de fijar debido a los problemas asociados para obtener una estimación exacta de la presencia de recombinación en la población estudiada. En el análisis de secuencias de nucleótidos, la recombinación puede ser detectada por la incongruencia de los árboles génicos construidos (Dykhuizen y col., 1993), por un exceso de homoplasias dentro de los árboles de máxima parsimonia (Maynard-Smith y col., 1998), por la presencia de una malla o red en los "splits" generados en el análisis de descomposición de particiones (Huson, 1998), o por el test de Sawyer, que es un análisis estadístico para detectar recombinación intragénica (Sawyer, 1989).

Las relaciones genéticas que se observan en los árboles génicos construidos (Fig. 4.7) muestran que la mayoría de las cepas analizadas (28 cepas) se agruparon de idéntica manera en todos los loci. Sólo 3 cepas, 2 cepas O139 (CO404 y SO19) y una cepa no-O1/no-O139 (25872), exhibieron una disposición incongruente en los distintos árboles génicos, que no excluye la posibilidad de eventos recombinatorios en ellas. La cepa CO404 (ST3) presenta los mismos alelos que el grupo principal (ST1) en 4 de los loci analizados (*cadA*, *epd*, *idh-II*, *mdh*), mientras que en los otros dos (*asd*, *lap*) corresponde al perfil alélico del grupo de cepas del ST4. Este hecho sugiere que dicha cepa podría haberse originado por recombinación entre cepas pertenecientes al ST1 y ST4. Sin embargo, la cepa SO19 (ST2) que presentó en dos loci (*asd*, *epd*) los mismos alelos que ST1, y el resto (*cadA*, *idh-II*, *lap*, *mdh*) de alelos fueron distintos a los de cualquier grupo, parece ser que es muy diferente del resto de cepas analizadas, pero es difícil a partir de los datos de que

disponemos sugerir un posible origen de la misma.

El test de la homoplasia (Maynard-Smith y col., 1998) estima la recombinación entre miembros de una población. Este test sólo es posible aplicarlo cuando las secuencias difieren en polimorfismo nucleotídico $\leq 5\%$, y requiere un número suficiente de alelos y de sitios informativos para obtener resultados fiables. Este test requiere al menos seis secuencias distintas que contengan como mínimo 10 sitios informativos, que son sitios en los cuales la más rara de las bases está presente al menos dos veces. En nuestro caso, todos los loci analizados tenían un número insuficiente de alelos y de sitios informativos para poder realizar este análisis.

A partir de los fragmentos secuenciados se realizó el análisis de descomposición de particiones, generándose los "splits" para cada locus (Fig. 4.8). Sólo el "split" correspondiente al locus *cadA* exhibió una estructura de red, sugiriendo la presencia de recombinación. Sin embargo, estos resultados se han de interpretar con precaución por el bajo número de alelos obtenidos en todos los loci.

Los resultados obtenidos en el test de Sawyer (Tabla 4.19) no muestran evidencia clara de recombinación en ninguno de los loci analizados, incluyendo el locus *asd*, en el cual identificamos una región de 7 pb (Fig. 4.10), previamente descrita por Karaolis y col. como resultado de un evento recombinatorio, en la cepa no-O1/no-O139 de nuestro estudio. En este caso, el test de Sawyer no detectó presencia de recombinación. Esta incoherencia puede ser explicada basándonos en la definición de fragmentos condensados que utiliza este test, los cuales son diseñados para detectar conversión génica, siempre y cuando las secuencias origen y diana estén presentes en la muestra analizada. La única excepción pudiese ser el locus *cadA* (SSCF $P=0,07$ / MCF $P=0,28$), resultado que también se entrevee con el análisis de descomposición de particiones.

De todos estos resultados, se demuestra la existencia de al menos 3 clones distintos para el conjunto de cepas O139 estudiado, confirmándose que la población de *V. cholerae* O139 presenta una estructura clonal, aunque la presencia de un cierto grado de recombinación en algunos loci no puede ser excluida.

La comparación de los resultados obtenidos por MLST y MLEE para *V. cholerae* O139 no es lineal, ya que en un caso estamos comparando las secuencias nucleotídicas del gen (MLST) y en el otro la actividad de los productos génicos (MLEE). Si consideramos el número de alelos obtenidos con las dos técnicas para los 4 loci en común (Tabla 4.20) se

observa una buena correlación, excepto en el caso del locus *lap*, el cual presenta una mayor diversidad alélica en el estudio de MLEE. Estas diferencias podrían ser explicadas porque con MLEE se detecta la actividad de la enzima que es codificada por el gen completo, mientras que en MLST se secuencia una región parcial del gen, y por tanto, no se detectan los cambios nucleotídicos que pudiesen haber en el fragmento génico no secuenciado. Este mayor grado de diversidad génica detectada con la técnica MLEE respecto el análisis de secuencias, también se ha puesto de manifiesto en estudios de otras bacterias patógenas, como *Salmonella* grupo I (Nelson y col., 1991) y *Neisseria meningitidis* serogrupo A (Feil y col., 1999).

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

5.1 Resumen

Se ha estudiado la variabilidad genética de poblaciones de *V. cholerae* procedentes de distintas fuentes y orígenes geográficos, que agrupan diferentes serogrupos y biotipos de esta especie. También se han incluido en el estudio algunas cepas de colección. Se ha analizado la variabilidad genética a dos niveles: a un nivel proteico, aplicando la técnica de electroforesis de aloenzimas multilocus (MLEE), y a nivel génico, realizando el análisis de secuencias multilocus (MLST). Con ello, se ha intentado determinar la relación genética existente entre las distintas cepas estudiadas, analizando los datos obtenidos globalmente y por subgrupos de poblaciones, para establecer la estructura poblacional y la diversidad génica que presenta *V. cholerae*. Todo ello, ayudará a entender mejor las relaciones entre las cepas epidémicas y las cepas ambientales, y la epidemiología global del cólera.

Se analizó una colección heterogénea de 107 cepas de *V. cholerae*, incluyendo distintos serogrupos y biotipos, con la técnica de electroforesis de aloenzimas multilocus (MLEE) para determinar la variación alélica de 15 enzimas metabólicas. Todos los loci fueron polimórficos, y se identificaron 99 ETs para el total de la muestra. Se generó un dendrograma para la población estudiada a partir de una matriz de coeficientes de distancias, y no se encontró asociación significativa de las cepas en función de su serogrupo/biotipo y país de aislamiento. Los resultados mostraron que las cepas O139 no se agrupaban en un único ET, en contraposición con la hipótesis monoclonal del serogrupo O139 que postulaban estudios previos de MLEE. En relación a la fuente de aislamiento, se observó en el dendrograma una cierta asociación, diferenciándose grupos con predominio de cepas clínicas o de cepas ambientales. La diversidad génica media obtenida ($H=0,500$) para la población de *V. cholerae* estudiada fue más alta que las publicadas anteriormente para esta especie (Salles y Momen, 1991; Beltrán y col. 1999).

A partir de los datos obtenidos por MLEE, se realizó un análisis del desequilibrio de ligamiento, mostrando una estructura clonal para el conjunto de cepas, pero cuando se estudiaron subgrupos de esta población hubo excepciones, que hacen pensar en la existencia de un cierto grado de recombinación. Estos resultados sugieren que la población estudiada presenta una estructura poblacional epidémica (Maynard-Smith y col., 1993).

Los resultados obtenidos con la técnica de MLST con las cepas del serogrupo O139, demuestran la existencia de al menos 3 clones distintos entre las cepas analizadas. Es muy interesante este resultado, porque nos ha permitido determinar al menos tres orígenes distintos entre las cepas O139 aisladas durante el primer período (1992-1993), hecho que no se había detectado antes en los numerosos estudios realizados con cepas patógenas de *V. cholerae* O1, en los que sólo dos biotipos, *El Tor* (séptima pandemia) y *clásico* (sexta pandemia) se asociaban a los brotes epidémicos de cólera. Además, estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el estudio previo de MLEE, afianzando la hipótesis de un origen policlonal del serogrupo O139, como se estaba empezando a entrever en algunos estudios moleculares (Faruque y col., 1997).

En el análisis de secuencias multilocus (MLST), se determinaron dos grupos principales de cepas O139 (ST1 y ST4), que exhibían diferencias en el perfil alélico para los 6 loci analizados, distribuidos entre los dos cromosomas de la bacteria. La presencia de estos dos grupos de cepas O139 tan diferentes sugiere que este serogrupo O139 emergió de forma independiente de diferentes cepas progenitoras que han adquirido la capacidad de producir la enfermedad. Este argumento está en concordancia con el origen de cepas patógenas en otras especies bacterianas como *E. coli*. La variación genética detectada entre las cepas O139 permite pensar que pudiesen existir cepas patógenas O139 antes de la epidemia producida en 1992, pero como eran formas minoritarias en la población de *V. cholerae* no se habían detectado hasta que un clon de este serogrupo emergió como forma dominante de un brote epidémico. Sin embargo, no podemos excluir otra posibilidad para explicar esta variabilidad, y es la de que cepas de *V. cholerae* de diferente origen adquirieran el antígeno O139 como parte de su adaptación, ya que aportaba ventajas al no estar la población inmunizada para este serogrupo.

El análisis del desequilibrio de ligamiento ha permitido establecer una estructura poblacional clonal para el serogrupo O139, aunque con los resultados obtenidos en el análisis de descomposición de particiones ("split decomposition") y el test de Sawyer no se pueden descartar eventos recombinatorios en la población, los cuales no llegarían a romper la asociación entre alelos.

También remarcar, que la cepa O1 *El Tor* incluida en el estudio se asoció con el grupo mayoritario de cepas O139 analizadas (ST1), de acuerdo con la hipótesis actual del origen del serogrupo O139 a partir de un clon de la séptima pandemia.

Estos resultados obtenidos se podrían explicar si consideramos que durante los períodos interepidémicos las poblaciones de *V. cholerae* podrían estar asociadas con un reservorio ecológico. Este reservorio no ha sido identificado hasta el momento, pero si se ha descrito que *V. cholerae* puede vivir de forma comensal en el medio acuático unido a fitoplancton y zooplancton, así como a caparazones de quitina de crustáceos y copépodos. Además, se conoce la persistencia de *V. cholerae* en el medio ambiente durante mucho tiempo, meses y probablemente años, que está facilitada por su capacidad de mantenerse en un estado viable pero no cultivable, en el que sus requerimientos de nutrientes y oxígeno disminuyen mucho (Colwell y Huq, 1994).

De esta manera, consideraríamos la especie *V. cholerae* como una metapoblación que agrupa múltiples poblaciones ecológicas. En esta situación, las distintas poblaciones ecológicas divergerían de forma diferente en cada uno de los hábitats donde residiesen, aunque dentro de cada una de estas poblaciones actuarían los episodios de selección periódica para eliminar la diversidad generada. El hecho de que los genes que codifican los principales factores de virulencia se adquieran de forma horizontal a través de bacteriófagos, implicaría que cualquier cepa ambiental de *V. cholerae* podría potencialmente convertirse en patógena, es decir, que tendría la misma probabilidad de transformarse en cepa toxigénica. La activación o presencia de algunos factores ambientales, que aún se desconocen, sería el punto de arranque de un nuevo brote epidémico, produciendo una multiplicación explosiva y masiva de distintos clones de *V. cholerae* fuera de su reservorio, agrupando varias poblaciones locales e incluyendo una diversidad de clones toxigénicos que potencialmente podrían infectar al hombre.

5.2 Conclusiones

1. Se ha estudiado la variabilidad genética de 107 cepas de *V. cholerae*, procedentes de diferentes fuentes y orígenes geográficos, agrupando distintos serogrupos y biotipos, mediante la técnica de electroforesis de aloenzimas multilocus (MLEE), los 15 loci analizados fueron polimórficos.
2. Mediante la técnica de MLEE se ha puesto de manifiesto la existencia de 99 tipos electroforéticos o ETs para el total de la muestra.
3. Se ha obtenido un valor de diversidad génica media de 0,500 para la especie *V. cholerae*, que es más alto que los reportados previamente con la misma técnica.
4. El análisis del desequilibrio de ligamiento realizado a partir de los datos obtenidos por MLEE mostró que *V. cholerae* presentaba una estructura poblacional clonal.
5. El análisis de las secuencias parciales de los genes *asd*, *cadA*, *epd*, *idh-II*, *lap* y *mdh* ha demostrado la existencia de al menos 3 orígenes distintos para las cepas O139 analizadas, contradiciendo la hipótesis monoclonal de este serogrupo.
6. Las dos técnicas utilizadas en este estudio han mostrado la relación genética próxima existente entre los serogrupos O1 *El Tor* y O139.
7. Los dos grupos de cepas de *V. cholerae* O139, ST1 y ST4, identificados con la técnica de MLST, y que se caracterizan por diferir alélicamente en los 6 loci estudiados, se agrupan en clusters distintos en el dendrograma generado a partir de los datos obtenidos por MLEE, hecho que corrobora la bondad de ambos métodos para el análisis de la estructura poblacional de bacterias.

6. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Los resultados presentados en esta memoria han sido publicados en los siguientes artículos:

→ **Genetic relationships between clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis**

Farfán, M., Miñana, D., Fusté, M.C. and Lorén, J.G.

Microbiology (2000), **146**, 2613-2626.

→ **Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 Bengal based on nucleotide sequence analysis**

Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Fusté, M.C. and Lorén, J.G.

Journal of Bacteriology (2002), **184**, 1304-1313.

7. BIBLIOGRAFÍA

Achtman, M., Heuzenroeder, M., Kusecek, B., Ochman, H., Caugant, D.A., Selander, R.K., Orskow, F. and Orskow, I. (1986). Clonal analysis of O2:K1 *Escherichia coli* isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* **51**, 268-276.

Ayala, F.J. (1965). Evolution of fitness in experimental populations of *Drosophila serrata*. *Science* **150**, 903-905.

Bandelt, H.J. and Dress, A.W.M. (1992). Split Decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol. Phylogen. Evol.* **1**, 242-252.

Basu, A., Garg, P., Datta, S., Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Khan, A., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Yamasaki, S., Takeda, Y. and Nair, G.B. (2000). *Vibrio cholerae* O139 in Calcutta, 1992-1998: Incidence, antibiograms and genotypes. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 139-147.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496.

Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. (1984). Genus I. *Vibrio*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp. 518-538. Edited by N. R. Kreig & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Beltrán, P., Delgado, G., Navarro, A., Trujillo, F., Selander, R.K. and Cravioto, A. (1999). Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 581-590.

Bertout, S., Renaud, F., Swinne, D., Mallie, M. and Bastide, J.M. (1999). Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: taxonomy and genetic structure. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 715-720.

Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., y col. (1990). Analysis of clinical and foodborne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2133-2141.

Bik, E.M., Bunschoten, A.E., Gouw, R.D. and Mooi, F.R. (1995). Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.* **14**, 209-216.

Blake, P.A. (1994). Historical perspectives on pandemic cholera. In *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*, pp. 293-295. Edited by I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik. Washington, DC, American Society for Microbiology.

Boerlin, P., Peter, O., Bretz, A.G., Postic, D., Baranton, G. and Piffaretti, J.C. (1992). Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect. Immun.* **60**, 1677-1683.

Bowman, J.E., Brubaker, R.R., Frischer, H. and Carson, P.E. (1967). Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **94**, 544-551.

Brenner, D.J., Mayer, L.W., Carlone, G.M., y col. (1988). Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* strains associated with Brazilian purpuric fever. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1524-34.

Brown, A.D., Feldman, M.W. and Nevo, E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**, 523-536.

Byun, R., Elbourne, L.D., Lan, R. and Reeves, P.R. (1999). Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. *Infect. Immun.* **67**, 1116-1124.

Campos, J., Fusté, M.C., Trujillo, G., Sáez-Nieto, J.A., Vázquez, J., Lorén, J.G., Viñas, M. and Spratt, B.G. (1992). Genetic diversity of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* **166**, 173-177.

Carroll, P.A., Zhao, G., Boyko, S.A., Winkler, M.E. and Calderwood, S.B. (1997). Identification, sequencing, and enzymatic activity of the erythrose-4-phosphate dehydrogenase gene of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **179**, 293-296.

Caugant, D.A., Levin, B.R. and Selander, R.K. (1981). Genetic diversity and temporal variation in the *Escherichia coli* population of a human host. *Genetics* **98**, 467-490.

Caugant, D.A., Bovre, K., Gaustad, P., Bryn, K., Holten, E., Holby, E.A. and Froholm, L.D. (1986). Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from humans patients with systematic disease and from healthy carriers. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 641-652.

Colwell, R.R. and Huq, A. (1994). Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*, pp. 117-133. Edited by I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik. Washington, DC, American Society for Microbiology.

Colwell, R.R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* **274**, 2025-2031.

-
- Davies, R.L., Arkinsaw, S. and Selander, R.K. (1997).** Genetic relationships among *Pasteurella trehalosi* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis. *Microbiology* **143**, 2841-2849.
- Day, N.P.J., Moore, C.E., Enright, M.C., Berendt, A.R., Maynard-Smith, J., Murphy, M.D., Peacock, S.J., Spratt, B.G. and Feil, E.J. (2001).** A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Science* **292**, 114-116.
- Desmarchelier, P.M., Momen, H. and Salles, C.A. (1988).** A zymovar analysis of *Vibrio cholerae* isolated in Australia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**, 914-917.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R. and Maiden, M.C.J. (2001).** Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 14-23.
- DiRita, V.J. (2000).** Genomics happens. *Science* **289**, 1488-1489.
- Dolina, M. and Peduzzi, R. (1993).** Population genetics of human, animal and environmental *Yersinia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 442-450.
- Dykhuisen, D.E., Polin, D.S., Dunn, J.J., Wilske, B., Preac Mursic, V., Dattwyler, R.J. and Luft, B.J. (1993).** *Borrelia burgdorferi* is clonal: implications for taxonomy and vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10163-10167.
- Eardly, B.D., Materon, L.A., Smith, N.H., Johnson, D.A., Rumbaugh, M.D. and Selander, R.K. (1990).** Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 187-194.
- Enright, M.C. and Spratt, B.G. (1998).** A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**, 3049-3060.
- Enright, M.C., Knox, K., Griffiths, D., Crook, D.W.M. and Spratt, B.G. (2000).** Multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* directly from cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 627-630.
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G. (2000).** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1008-1015.
- Enright, M.C., Spratt, B.G., Kalia, A., Cross, J.H. and Bessen, D.E. (2001).** Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect. Immun.* **69**, 2416-2427.
-

-
- Evins, G.M., Cameron, D.N., Wells, J.G., Greene, K.D., Popovic, T., Giono-Cerezo, S., Wachsmuth, I.K. and Tauxe, R.V. (1995).** The emerging diversity of the electrophoretic types of *Vibrio cholerae* in the Western Hemisphere. *J. Infect. Dis.* **172**, 173-179.
- Falkind, S., Stark, M., Albert, M.J., Uhlén, M., Lundeberg, J. and Weintraub, A. (1996).** Cloning and sequencing of a region of *Vibrio cholerae* O139 Bengal and its use in PCR-based detection. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2904-2908.
- Farfán, M., Miñana, D., Fusté, M.C. and Lorén, J.G. (2000).** Genetic relationships between clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis. *Microbiology* **146**, 2613-2626.
- Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Fusté, M.C. and Lorén, J.G. (2002).** Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 Bengal based on nucleotide sequence analysis. *J. Bacteriol.* **184**, 1304-1313.
- Faruque, S.M., Ahmed, K.M., Siddique, A.K., Zaman, K., Abdul Alim, A.R.M. and Albert, M.J. (1997).** Molecular analysis of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal strains isolated in Bangladesh between 1993 and 1996: evidence for emergence of a new clone of the Bengal vibrios. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2299-2306.
- Faruque, S.M., Albert, M.J. and Mekalanos, J.J. (1998).** Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1301-1314.
- Faruque, S.M., Saha, M.N., Asadulghani, Bag, P.K., Bhadra, R.K., Bhattacharya, S.K., Sack, R.B., Takeda, Y. and Nair, G.B. (2000).** Genomic diversity among *Vibrio cholerae* O139 strains isolated in Bangladesh and India between 1992 and 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 279-284.
- Feil, E.J., Maiden, M.C.J., Achtman, M. and Spratt, B.G. (1999).** The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1496-1502.
- Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP package, version 3.5. Seattle, WA: University of Washington (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).
- Fields, P.I., Popovic, T., Wachsmuth, K. and Olsvik, O. (1992).** Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2118-2121.
- Fusté, M.C., Pineda, M.A., Palomar, J., Viñas, M. and Lorén, J.G. (1996).** Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2760-2765.
- Gandara, B., Merino, A.L., Rogel, M.A. and Martínez-Romero, E. (2001).** Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 235-240.
-

Gargallo, D., Lorén, J.G., Guinea, J. and Viñas, M. (1987). Glucose-6-phosphate dehydrogenase alloenzymes and their relationship to pigmentation in *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1983-1986.

Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y. and Musser, J.M. (1996). Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacteriol.* **178**, 3934-3938.

Goulet, P. and Picard, B. (1984). Distinctive electrophoretic and isoelectric focusing patterns of esterases from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1471-1480.

Gutacker, M., Valsangiacomo, C. and Piffaretti, J.C. (2000). Identification of two genetic groups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis: distribution of antibiotic resistance (*cfiA*, *cepA*) and enterotoxin (*bft*) encoding genes. *Microbiology* **146**, 1241-1254.

Haubold, B. and Hudson, R.R. (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* **16**, 847-848.

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dobson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C. and Fraser, C.M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477-483.

Herrington, D.A., Hall, R.H., Losonsky, G., Mekalanos, J.J., Taylor, R.K. and Levine, M.M. (1988). Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* **168**, 1487-1492.

Hohwy, J., Reinholdt, J. and Kilian, M. (2001). Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect. Immun.* **69**, 6055-6063.

Holmes, E.C., Urwin, R. and Maiden, M.C.J. (1999). The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 741-749.

Hubby, J.L. and Lewontin, R.C. (1966). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 577-594.

-
- Huson, D.H. (1998).** Splits Tree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**, 68-73. (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/splits>).
- Ishii, A., Suzuki, M., Sahara, T., Takada, Y., Sasaki, S. and Fukunaga, N. (1993).** Genes encoding two isocitrate dehydrogenase isozymes of a psychrophilic bacterium, *Vibrio* spp. strain ABE-1. *J. Biol. Chem.* **175**, 6873-6880.
- Istock, C.A., Duncan, K.E., Ferguson, N. and Zhou, X. (1992).** Sexuality in a natural population of bacteria - *Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol. Ecol.* **1**, 95-103.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969).** Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*. Edited by H.N. Muro, Academic Press, New York.
- Kaper, J.B., Morris, J.G. and Levine, M.M. (1995).** Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 48-86.
- Kappos, T., John, M.A., Hussain, Z. and Valvano, M.A. (1992).** Outer membrane protein profiles and multilocus enzyme electrophoresis analysis for differentiation of clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2632-2637.
- Karaolis, D.K.R., Ruiting L. and Reeves, P.R. (1995).** The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **177**, 3191-3198.
- Karaolis, D.K., Johnson, J.A., Bailey, C.C., Boedeker, E.C., Kaper, J.B. and Reeves, P.R. (1998).** A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3134-3139.
- Leung, K., Strain, S.R., Bruijn, F.J. and Bottomley, P.J. (1994).** Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 416-426.
- Levin, B.R. (1981).** Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *Escherichia coli* populations. *Genetics* **99**, 1-23.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L. (1966).** A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 595-609.
- Lomholt, J.A., Poulsen, K. and Kilian, M. (2001).** Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*, evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect. Immun.* **69**, 6284-6295.
-

-
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lund, B.M. (1965).** A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D Streptococci. *J. Gen. Microbiol.* **40**, 413-419.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. and Spratt, B.G. (1998).** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3140-3145.
- Martin, C., Boyd, E.F., Quentin, R., Massicot, P. and Selander, R.K. (1999).** Enzyme polymorphism in *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from cystic fibrosis patients in France. *Microbiology* **145**, 2587-2594.
- Maynard-Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M. and Spratt, B.G. (1993).** How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4384-4388.
- Maynard-Smith, J. and Smith, N.H. (1998).** Detecting recombination from gene trees. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 590-599.
- McLellan, T. (1984).** Molecular charge and electrophoretic mobility in cetacean myoglobins of known sequence. *Biochem. Genet.* **22**, 181-200.
- Merrell, D.S. and Camilli, A. (1990).** The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol. Microbiol.* **34**, 836-849.
- Milkman, R. (1973).** Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* **182**, 1024-1026.
- Milkman, R. and Bridges, M.M. (1990).** Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics* **126**, 505-517.
- Munoz, R., Musser, J.M., Crain, M., Briles, D.E., Marton, A., Parkinson, A.J., y col. (1992).** Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*, characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin. Infect. Dis.* **5**, 112-118.
- Musser, J.M., Hewlett, E.L., Peppler, M.S. and Selander, R.K. (1986).** Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J. Bacteriol.* **166**, 230-237.
- Musser, J.M., Kroll, J.S., Granoff, D.M., y col. (1990).** Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev. Infect. Dis.* **12**, 75-111.
-

Musser, J.M. and Selander, R.K. (1990). Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. In Molecular biology of the staphylococci, pp 59-67. Edited by Novick, R. and Skurray, R. A. New York: VCH Publishers.

Musser, J.M., Hauser, A.R., Kim, M.H., Schlievert, P.M., Nelson, K. and Selander, R.K. (1991). *Streptococcus pyogenes* causing toxic shock like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2668-2672.

Musser, J.M. (1996). Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: selected insights. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 1-17.

Nachamkin, I., Engberg, J., Gutacker, M., Meinersman, R.J., Li, C.Y., Arzate, P., Teeple, E., Fushing, V., Ho, T.W., Asbury, A.K., Griffin, J.W., McKhann, G.M. and Piffaretti, J.C. (2001). Molecular population genetic analysis of *Campylobacter jejuni* HS:19 associated with Guillain-Barre syndrome and gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **184**, 221-226.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**, 283-292.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.

Nei, M. and Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**, 418-426.

Nelson, E.T., Clements, J.D. and Finkelstein, R.A. (1976). *Vibrio cholerae* adherence and colonization in experimental cholera: electron microscopic studies. *Infect. Immun.* **14**, 527-547.

Nelson, K., Whittam, T.S. and Selander, R.K. (1991). Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6667-6671.

Ochman, H., Whittam, T.S., Caugant, D.A. and Selander, R.K. (1983). Enzyme polymorphism and genetic structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2715-2726.

Ohman, R. and Ridell, M. (1995). Enzymatic and antigenic analyses of strains of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Microbiol.* **30**, 161-165.

O'Brien, S.J., Simonson, J.M., Grabowski, M.N. and Barile, M.F. (1981). Analysis of multiple isoenzyme expression among 22 species of *Mycoplasma* and *Acoelplasma*. *J. Bacteriol.* **146**, 222-232.

O'Rourke, M. and Stevens, E. (1993). Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non-clonal pathogen. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2603-2611.

-
- Øsrkov, F., Whittam, T.S., Cravioto, A. and Øsrkov, I. (1990).** Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. *J. Infect. Dis.* **162**, 76-81.
- Popovic, T., Fields, P.I., Olsvik, O., Wells, J.G., Evins, G.M., Cameron, D.N., Farmer III, J.J., Bopp, C.A., Wachsmuth, K., Sack, R.B., Albert, M.J., Nair, G.B., Shimada, T. and Feeley, J.C. (1995).** Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. *J. Infect. Dis.* **171**, 122-127.
- Pupo, G.M., Karaolis, D.K., Lan, R. and Reeves, P.R. (1997).** Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* **65**, 2685-2692.
- Ramshaw, J.A., Coyne, J.A. and Lewontin, R.C. (1979).** The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variation. *Genetics* **93**, 1019-1037.
- Reeves, M.W., Perkins, B.A., Diermayer, M. and Wenger, J.D. (1995).** Epidemic-associated *Neisseria meningitidis* detected by multilocus enzyme electrophoresis. *Emerg. Infect. Dis.* **1**: 53-54.
- Rius, N., Fusté, M.C., Guasp, C., Lalucat, J. and Lorén, J.G. (2001).** Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.* **183**, 736-744.
- Robinson, K. (1966).** Some observations on the taxonomy of the genus *Microbacterium*. II. Cell wall analysis, gel electrophoresis and serology. *J. Appl. Bacteriol.* **29**, 616-624.
- Rolf, F.J. (1993).** Numerical taxonomy and multivariate analysis (NTSYS), version 1.80. New York: Exeter Software.
- Sáez-Nieto, J.A., Luján, R., Berrón, S., Campos, J., Viñas, M., Fusté, M.C., Vázquez, J., Zhang, Q.Y., Bowler, L.D., Martínez-Suárez, J.V. and Spratt, B.G. (1992).** Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: a 5-year history (1985-1989). *Clin. Infect. Dis.* **14**, 394-402.
- Salles, C.A. and Momen, H. (1991).** Identification of *Vibrio cholerae* by enzyme electrophoresis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Hyg.* **85**, 544-547.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sawyer, S. (1989).** Statistical tests for detecting gene conversion. *Mol. Biol. Evol.* **6**, 526-538.
-

-
- Selander, R.K., McKinney, R.M., Whittam, T.S., Bibb, W.F., Brenner, D.J., Nolte, F.S., y col. (1985).** Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **163**, 1021-1037.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. and Whittam, T.S. (1986).** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 873-884.
- Selander, R.K. and Smith, N.H. (1990).** Molecular population genetics of *Salmonella*. *Rev. Med. Microbiol.* **1**, 219-228.
- Shi Z-Y, Enright, M.C., Wilkinson, P., Griffiths, D., and Spratt, B.G. (1998).** Identification of three major clones of multiply antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwanese hospitals using multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3514-3519.
- Schill, W.B., Phelps, S.R. and Pyle, S.W. (1984).** Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 975-979.
- Sibold, C., Wang, J., Henrichsen, J. and Hakenbeck, R. (1992).** Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect. Immun.* **60**, 4119-4126.
- Sikorski, J., Rossello-Mora, R. and Lorenz, M.G. (1999).** Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 393-402.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973).** *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman.
- Souza, V., Rocha, M., Valera, A. and Eguiarte, L.E. (1999).** Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3373-3385.
- Stroeher, U.H., Parasivam, G., Dredge, B.K. and Manning, P.A. (1997).** Novel *Vibrio cholerae* O139 genes involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**, 2740-2747.
- Suerbaum, S., Lohregel, M., Sonnevend, A., Ruberg, F. and Kist, M. (2001).** Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **183**, 2553-2559.
- Tzanakaki, G., Urwin, R., Musilek, M., Kriz, P., Kremastinou, J., Pangalis, A., Blackwell, C.C. and Maiden, M.C. (2001).** Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1235-1240.
- Toma, C. and Honma, Y. (1996).** Cloning and genetic analysis of the *Vibrio cholerae* aminopeptidase gene. *Infect. Imm.* **64**, 4495-4500.
-

Tomayko, J.F. and Murray, B.E. (1995). Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2903-2907.

Wachsmuth, I.K., Evins, G.M., Fields, P.I., Olsvik, O., Popovic, T., Bopp, C.A., Wells, J.G., Carrillo, C. and Blake, P.A. (1993). The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J. Infect. Dis.* **167**, 621-626.

Waldor, M. and Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910-1914.

Wasen, C.F., McCarthy, C.M. and Murray, L.W. (1991). Multilocus enzyme electrophoresis analysis of the *Mycobacterium avium* complex and other mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 264-271.

Watnick, P.I., Fullner, K.J. and Kolter, R. (1999). A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**, 3606-3609.

WER. 2001. Weekly epidemiological record. WHO/OMS **76**, 233-240.

Whittam, T.S., Ochman, H. and Selander, R.K. (1983). Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1751-1755.

Whittam, T.S., Wachsmuth, I.K. and Wilson, R.A. (1988). Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **157**, 1124-1133.

Whittam, T.S. (1995). Genetic population structure and pathogenicity in enteric bacteria. In *Population Genetics of Bacteria*, pp. 217-245. Edited by S. Baumberg, J. P. Young, E. M. H. Wellington & J. R. Saunders. Cambridge: Cambridge University Press.

Williams, R.A. and Bowden, E. (1968). The starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus faecalis*, *S. faecium* and *S. durans*. *J. Gen. Microbiol.* **50**, 329-336.

Wise, M.G., Shimkets, L.J. and McArthur, J.V. (1995). Genetic structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1791-1798.

Zhou, J., Enright, M.C. and Spratt, B.G. (2000). Identification of the major spanish clones of penicillin-resistant pneumococci via the internet using multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 977-986.

8. ANEXO

8.1 Abreviaturas y símbolos

%	Porcentaje
° C	Grado Celsius
1/4	Una cuarta parte
3/4	Tres cuartas partes
5x	Cinco veces concentrado
10x	Diez veces concentrado
3´	Extremo 3 prima del DNA
5´	Extremo 5 prima del DNA
6PG	6-fosfogluconato deshidrogenasa
AFLP	Polimorfismo de fragmentos amplificados ["Amplified Fragment Length Polymorphism"]
ALD	Alanina deshidrogenasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
aprox.	aproximadamente
ASD	Aspartato deshidrogenasa
<i>asd</i>	Gen aspartato semialdehido deshidrogenasa
ATCC	Colección americana de cultivos tipo ["American Type Culture Collection"]
ATP	Adenosina trifosfato
C23O	Catecol-2,3-oxigenasa
<i>cadA</i>	Gen lisina descarboxilasa
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
cm	centímetro
csp.	cantidad suficiente para
CT	Toxina colérica ["Cholera toxin"]
<i>ctxAB</i>	Operón que codifica la toxina colérica
CTXØ	Bacteriófago filamentoso que contiene el operón <i>ctxAB</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico ["Deoxiribonucleic Acid"]
dNTP	dideoxinucleótido
EDTA	Ácido etilendiaminatetracético
EEUU	Estados Unidos
<i>epd</i>	Gen eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa
EST	Esterasas
ET	Tipo electroforético ["Electrophoretic Type"]
etc.	etcétera
Fig.	Figura
FUM	Fumarasa

g	gramo
G	Diversidad genotípica
G6P	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GP1	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD
h	hora
H	Diversidad génica media
H ⁺	protón
HCl	Ácido clorhídrico
I_A	Índice de asociación
I_A^S	Índice de asociación estandarizado
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
<i>idh-II</i>	Gen isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP2
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
l	litro
LAP	Leucina aminopeptidasa
<i>lap</i>	Gen leucina aminopeptidasa
LPS	Lipopolisacárido
M	Concentración molar (mol soluto / litro solución)
mA	miliamperio
MDH	Malato deshidrogenasa
<i>mdh</i>	Gen malato deshidrogenasa
ME	Enzima málico
mg	miligramo
min	minuto
MgCl ₂	Cloruro magnésico
ml	mililitro
MLEE	Electroforesis de aloenzimas multilocus ["Multilocus Enzyme Electrophoresis"]
MLST	Tipado de secuencias multilocus ["Multilocus Sequence Type"]
mM	Concentración milimolar (M / 1000)
mm	milímetro
MTT	Dimetiltiazol tetrazolio
N	Concentración normal (equivalente soluto / litro solución)
nº	número
Na ₂ HasO ₄ · 7H ₂ O	Arseniato disódico heptahidratado
NaCN	Cianuro sódico
NAD	α-nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico

NaH ₂ PO ₄	Fosfato monosódico
NaOH	Hidróxido sódico
NC	No conocido
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NSP	Nucleósido fosforilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ori	Origen de replicación
P inorg	Fósforo inorgánico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ["Polymerase Chain Reaction"]
PFGE	Electroforesis en campo pulsante ["Pulsed-field gel electrophoresis"]
PGI	Fosfoglucoisomerasa
pH	log 1/(H ⁺)
PMS	Metosulfato de fenazina
pmol	10 ⁻⁹ mol
por ej.	por ejemplo
RAPD	Amplificación de DNA con cebadores aleatorios ["Random Amplification of Polymorphic DNA"]
r _C	Coficiente de correlación cofenética
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restricción ["Restriction Fragment Length Polymorphism"]
RNA	Ácido ribonucleico ["Ribonucleic Acid"]
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundo
ST	Secuencia tipo ["Sequence Type"]
T _a	Temperatura de asociación del cebador
T _m	Temperatura de fusión del cebador
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
TCP	Factor de colonización TCP ["toxin co-regulated pilus"]
ToxR	Proteína reguladora
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades
V	Voltio
V _E	Varianza esperada
V _O	Varianza observada
VPI	Isla de patogenicidad de <i>Vibrio</i> [" <i>Vibrio</i> Pathogenicity Island"]
VPIØ	Bacteriófago filamentoso que transfiere la isla de patogenicidad VPI
v/v	volumen por volumen
XDH	Xantina deshidrogenasa

y col.	y colaboradores
α	Letra griega <i>alfa</i>
β	Letra griega <i>beta</i>
Δ	Diversidad alélica media
π	Diversidad nucleotídica
μg	microgramo
μl	microlitro
\leq	menor o igual
\geq	mayor o igual
∞	infinito

8.2 Índice de Tablas

	Tabla	Página
Tabla 1.1	Especies bacterianas analizadas con la técnica de MLEE.	26
Tabla 1.2	Especies bacterianas analizadas con la técnica de MLST.	27
Tabla 1.3	Casos de cólera y fallecimientos por esta enfermedad notificados a la OMS durante el año 2000 por continente.	39
Tabla 3.1	Principales características de las cepas de <i>V. cholerae</i> utilizadas en el estudio de MLEE.	46
Tabla 3.2	Uso y composición de tampones Tris / HCl de diferentes concentraciones y pHs.	52
Tabla 3.3	Características diferenciales entre los biotipos <i>clásico</i> y <i>El Tor</i> del serogrupo O1 de <i>V. cholerae</i> .	59
Tabla 3.4	Interpretación del halo de inhibición de la polimixina B.	61
Tabla 3.5	Composición de geles continuos.	64
Tabla 3.6	Composición de geles discontinuos.	65
Tabla 3.7	Tipo y dureza del gel empleado según la enzima estudiada.	66
Tabla 3.8	Condiciones optimizadas de electroforesis de corta y larga duración.	67
Tabla 3.9	Clasificación de las enzimas utilizadas en el estudio de MLEE.	68
Tabla 3.10	Resultados de las pruebas bioquímicas para el biotipado.	83
Tabla 3.11	Concentración proteica de los extractos preparados, según el método Lowry, para todas las cepas de <i>V. cholerae</i> a estudio.	84
Tabla 3.12	Perfiles alélicos obtenidos para cada una de las cepas de <i>V. cholerae</i> analizadas.	86
Tabla 3.13	Principales características de los grupos de cepas que presentaron idéntico genotipo multilocus.	89
Tabla 3.14	Variabilidad alélica obtenida con la técnica MLEE para el conjunto de cepas de <i>V. cholerae</i> estudiadas.	90
Tabla 3.15	Distribución de los 72 alelos obtenidos en los 15 loci estudiados.	90
Tabla 3.16	Diversidad génica por locus y diversidad génica media para la muestra estudiada.	95
Tabla 3.17	Comparación de valores de diversidad génica media entre diferentes subgrupos de la muestra estudiada.	96
Tabla 3.18	Leyenda del dendrograma que se muestra en la figura 3.21.	97
Tabla 3.19	Parejas de ETs que difieren en un solo locus.	101

	Tabla	Página
Tabla 3.20	Resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento para el total de la muestra y para los diferentes subgrupos estudiados.	103
Tabla 3.21	Características generales de los distintos trabajos de MLEE realizados en poblaciones de <i>V. cholerae</i> .	108
Tabla 3.22	Análisis comparativo de los resultados obtenidos en los distintos trabajos considerados.	109
Tabla 4.1	Principales características de las cepas de <i>V. cholerae</i> utilizadas en el estudio de MLST.	116
Tabla 4.2	Genes de <i>V. cholerae</i> estudiados con la técnica MLST.	119
Tabla 4.3	Secuencias utilizadas para el diseño de cebadores.	122
Tabla 4.4	Cebadores utilizados en el estudio de MLST.	123
Tabla 4.5	Temperaturas de asociación de los cebadores utilizados.	124
Tabla 4.6	Mezcla de reacción para cada PCR.	126
Tabla 4.7	Condiciones de PCR.	126
Tabla 4.8	Mezcla realizada para cada secuenciación.	129
Tabla 4.9	Condiciones de secuenciación.	130
Tabla 4.10	Características de los fragmentos génicos amplificados y de los fragmentos utilizados en el análisis de secuencias multilocus.	138
Tabla 4.11	Variaciones nucleotídicas en los fragmentos génicos secuenciados para los 6 loci estudiados.	141
Tabla 4.12	Porcentaje del contenido G+C de los fragmentos génicos obtenidos.	141
Tabla 4.13	Uso de codones sinónimos para los 6 fragmentos génicos analizados.	142
Tabla 4.14	Perfiles alélicos obtenidos para las 31 cepas de <i>V. cholerae</i> analizadas.	143
Tabla 4.15	Frecuencias de los distintos perfiles alélicos o STs identificados.	144
Tabla 4.16	Variabilidad alélica obtenida con el análisis de secuencias multilocus para el conjunto de cepas de <i>V. cholerae</i> estudiadas.	146
Tabla 4.17	Frecuencias alélicas en los 6 loci estudiados.	146
Tabla 4.18	Análisis del desequilibrio de ligamiento multilocus de las 31 cepas de <i>V. cholerae</i> estudiadas.	147
Tabla 4.19	Resultados del test de Sawyer.	148
Tabla 4.20	Comparación de resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas en este estudio.	153
Tabla 4.21	Comparación del agrupamiento filogenético obtenido para las 31 cepas de <i>V. cholerae</i> analizadas con las técnicas MLST y MLEE.	156

8.3 Índice de Figuras

	Figura	Página
Fig. 1.1	Distintos modelos de estructuras de poblaciones.	24
Fig. 1.2	Principales causas de muerte a nivel mundial.	28
Fig. 1.3	Diferentes estilos de vida de <i>V. cholerae</i> .	30
Fig. 1.4	Estructura y mecanismo de acción de la toxina colérica (CT).	31
Fig. 1.5	Modelo propuesto de emergencia de nuevas cepas patógenas de <i>V. cholerae</i> .	34
Fig. 1.6	Distribución de las áreas endémicas del cólera en el sudeste asiático.	36
Fig. 1.7	Evolución del número de casos de cólera y de fallecimientos por esta enfermedad declarados a la OMS por continente entre los años 1950 y 1998.	38
Fig. 3.1	Serogrupos y biotipos de las cepas de <i>V. cholerae</i> estudiadas con la técnica MLEE.	49
Fig. 3.2	Origen geográfico de las cepas de <i>V. cholerae</i> estudiadas.	49
Fig. 3.3	Fuente de aislamiento de las cepas de <i>V. cholerae</i> utilizadas en este estudio.	49
Fig. 3.4	Esquema que muestra los pasos seguidos en la obtención de los extractos proteicos.	63
Fig. 3.5	Actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH).	91
Fig. 3.6	Actividad de la enzima málico (ME).	91
Fig. 3.7	Actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH).	91
Fig. 3.8	Actividad de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG).	91
Fig. 3.9	Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P).	92
Fig. 3.10	Actividad de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GP1).	92
Fig. 3.11	Actividad de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH).	92
Fig. 3.12	Actividad de la enzima alanina deshidrogenasa (ALD).	92
Fig. 3.13	Actividad de la enzima aspartato deshidrogenasa (ASD).	93
Fig. 3.14	Actividad de la enzima catecol-2,3-oxigenasa (C23O).	93
Fig. 3.15	Actividad de la enzima nucleósido fosforilasa (NSP).	93
Fig. 3.16	Actividad de las enzimas estererasas (EST).	93

	Figura	Página
Fig. 3.17	Actividad de la enzima leucina aminopeptidasa (LAP).	94
Fig. 3.18	Actividad de la enzima fumarasa (FUM).	94
Fig. 3.19	Actividad de la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI).	94
Fig. 3.20	Dendrograma construido que muestra las relaciones genéticas existentes entre los 99 ETs identificados.	98
Fig. 3.21	Dendrograma mostrando las relaciones genéticas existentes entre los 99 ETs identificados, señalando las características de las cepas con símbolos y colores.	99
Fig. 3.22	Distribución de no coincidencias entre parejas de ETs para los 99 ETs identificados en la muestra de <i>V. cholerae</i> estudiada.	102
Fig. 3.23	Dendrograma obtenido para la subpoblación de cepas de <i>V. cholerae</i> del serogrupo O1 biotipo <i>El Tor</i> .	104
Fig. 3.24	Dendrograma obtenido para la subpoblación de cepas de <i>V. cholerae</i> del serogrupo O139.	105
Fig. 3.25	Cladogramas de distintas subpoblaciones a partir de la muestra inicial generado por el método Neighbour-Joining usando la distancia genética de Nei.	106
Fig. 4.1	Distribución cromosómica de los 6 genes metabólicos estudiados.	119
Fig. 4.2	Cromatograma que muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento del gen <i>epd</i> de una cepa del estudio.	131
Fig. 4.3	Electroforesis en gel de agarosa de los distintos fragmentos amplificados por PCR de los 6 genes estudiados.	137
Fig. 4.4	Sitios polimórficos obtenidos para cada uno de los 6 fragmentos génicos estudiados.	139
Fig. 4.5	Porcentaje de posiciones variables a nivel nucleotídico y a nivel aminoacídico.	140
Fig. 4.6	Dendrograma que muestra las relaciones genéticas existentes entre los 5 STs identificados para el total de la muestra.	145
Fig. 4.7	Árboles génicos para cada uno de los loci analizados.	149
Fig. 4.8	"Splits" generados para cada locus estudiado.	151
Fig. 4.9	"Split" general para el total de la muestra.	152
Fig. 4.10	Dendrograma generado a partir de los datos obtenidos con la técnica de MLEE, mostrando solamente las cepas O139.	154
Fig. 4.11	Región de 7 bp en el locus <i>asd</i> (posiciones 160 a 167) con cambios no sinónimos consecutivos.	159
Fig. 4.12	Dendrograma generado para el locus <i>mdh</i> , que compara las relaciones entre las distintas secuencias obtenidas en este estudio (alelos 1, 2 y 3) con dos secuencias descritas previamente por Byun y col. (1999).	160

