

63



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

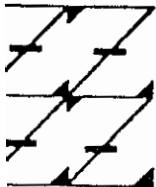
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

VARIACION Y SUSTITUCION ANTIGENICA DE Vibrio cholerae

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LIC. EN QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA:
CARMEN SANCHEZ CRUZ

COLECCION DE LA BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ZARAGOZA

UNAM FES ZARAGOZA



EL HOMBRE EN SU REFLEXION

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Nombre : Sánchez Cruz Carmen

Número de Cuenta: 7538538-9

Número de Folio: Q - 75 - 505

Año de Terminación de la Carrera: 1985

Orientación : Bioquímica Clínica

Proyecto: "Variación y Sustitución Antigenica de *Vibrio cholerae*"

Area Especifica Del Proyecto: Microbiología Clínica

Director De Tesis: Q.B.P. Javier Zavala González

Asesor: Q.B.P. María Luisa Delgado Briseño

Lugar De Desarrollo Del Proyecto: Hospital General Regional No 25 I.M.S.S.

JURADO

PRESIDENTE: Q.F.B. JOSÉ PONCE GUERRERO

VOCAL: Q.B.P. JAVIER ZAVALA GONZÁLEZ

SECRETARIO: Q.B.P. MA. LUISA DELGADO BRISEÑO

SUPLENTE: Q.B.P. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

SUPLENTE: Q.F.B. ANGEL GARCÍA SÁNCHEZ

Agradecimientos:

A Dios:

Por permitir la realización de esta meta.

A los profesores:

De la F.E.S. Zaragoza por el empeño y la dedicación en la enseñanza.

A mis padres:

Ana María y Juventino, por haberme dado la vida y el haberme apoyado en esta profesión.

A mis hermanos:

Ana María, Jesús, Elvira, Juventino, José Luis, Emma Gpe., Angel E. Por su confianza.

A mi director de Tesis:

Q.B.P Javier Zavala González, por su apoyo incondicional.

A mi familia:

Francisco, Adriana, y Ana Llena por su amor y comprensión.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. MARCO TEÓRICO	5
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
V. OBJETIVOS	15
VI. HIPÓTESIS	16
VII. MATERIAL	17
VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
IX. MÉTODOS	20
X. METODOLOGIA REALIZADA	21
XI. RESULTADOS	26
XII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
XIII. CONCLUSIONES	42
XIV. REFERENCIAS	44

I RESUMEN.

El cólera se considera una enfermedad emergente o reemergente la cual sigue siendo un problema de salud pública muy importante en la actualidad, fundamentalmente en los continentes Asiático y Africano en donde se considera endémica ya que sigue causando un número considerable de muertes y tomando en cuenta la velocidad de propagación de los microorganismos en la actualidad debemos estar alerta para detectar nuevas formas patógenas que pudieran presentarse ya sea por mutación o recombinación así como la reactivación de las formas que se han presentado en México.

Esto se afirma sobre la base de los estudios realizados del comportamiento adaptativo de *Vibrio cholerae*, aislado en pacientes hospitalizados en el Hospital General Regional No 25 durante el período 1991-2000, en ese tiempo se procesaron 2292 muestras diarreicas y se logró el aislamiento de 508 cepas de este microorganismo. Empleando la metodología clásica propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y un método desarrollado en este hospital. Estos procesos se realizaron junto con la valoración de Anticuerpos Vibriocidas (técnica de Benenson) y antitoxina colérica por técnica de Elisa para algunos de los enfermos, más tarde se logró la identificación de otro proceso adaptativo y corresponde al morfotipo rugoso empleando los métodos de aglutinación con acriflavina y vapor fluente.

De lo anterior se obtuvieron los siguientes resultados: La capacidad de recuperación fue de 16.1% de aislamientos con el método propuesto por el H.G.R. No25, mientras que con el propuesto por la OMS fue de 22.1%. Con la valoración de anticuerpos Vibriocidas se encontró en sueros pares títulos positivos para ambos serotipos, tanto en la etapa aguda de la enfermedad como en la de convalecencia. La búsqueda de antitoxina colérica mostró concordancia con la identificación del serotipo, pero en 12 muestras fue negativo el título de anticuerpos vibriocidas, obteniendo solo títulos positivos para antitoxina colérica.

Se confirmaron 2 cepas rugosas con el método de vapor fluente a partir de 6 muestras identificadas como tales previamente con acriflavina.

Con esta serie de evidencias podemos concluir que en 1992 se realiza la sustitución del serotipo Inaba por Ogawa, sin embargo los resultados de las pruebas de anticuerpos Vibriocidas nos muestran que ambos serotipos estuvieron presentes y que infectaban los dos a un mismo paciente. A partir de 1995 se observaron formas atípicas de este microorganismo, las formas rugosas con características morfológicas similares a las de *V. parahaemolyticus* y posiblemente la presencia de

las formas viables no cultivable las cuales solo se evidenciaron por la presencia de 82 casos de pacientes con más de 20 evacuaciones por día, sin lograr el aislamiento de *Vibrio cholerae* y ningún otro enteropatógeno. Todos estos estudios nos están mostrando que nos encontramos frente a un microorganismo altamente adaptativo tanto a las condiciones ambientales como del huésped y que para su diagnóstico también es necesario estar adecuando los procesos diagnósticos que se empleen para su identificación.

II INTRODUCCIÓN

La información documentada reseña que *Vibrio cholerae* ha causado siete pandemias de la enfermedad conocida como cólera, en 183 años (1817 - 2001).

Hasta hace unos cuantos años el cólera se consideraba como un padecimiento estacional y por ello cíclico, esta bacteria era incapaz de persistir viable y fuera de su huésped humano y de carecer de factores de adaptación que le permitieran sobrevivir fuera de un ambiente acuático salino o medianamente salino, por ello causó sorpresa su aislamiento de aguas dulces sin contaminación fecal humana y más tarde se le encontró en un ambiente en condiciones desfavorables para su propagación. Esta serie de hallazgos muestran una gran capacidad de adaptación de este microorganismo y es por ello que el conocimiento de sus mecanismos de regulación han empezado a explicar como suceden estos fenómenos y porque ha sido letal durante este tiempo.

Se ha calculado que se presentan 120 000 casos anuales de cólera en todo el mundo, de los cuales la mayoría se presenta en niños de 1 a 5 años, lo cual indica su carácter endémico generalmente de forma estacional, mientras que la resistencia antimicrobiana a cambiado año con año en estas cepas debido a la diversidad de clonas en las cepas epidémicas, por lo cual se le considera una enfermedad emergente y reemergente ejemplo de esto son las epidemias en América iniciada en 1991, así como la epidemia explosiva en Ruanda con los refugiados, y la de Zaire en 1994 en la cual se presentaron 70 000 casos, de ellos 12 000 murieron. También fue reportada una epidemia de esta enfermedad tanto en Madras como en otras regiones de la India y el sur de Bangladesh en 1992, se observó que el cuadro clínico era el mismo pero el agente etiológico era distinto y que más tarde se identificó como *Vibrio cholerae* O139, la epidemia continuó aumentando en 1993 en estos países y otros vecinos como Pakistán, Nepal, China, Tailandia, Kazakhanstan, Afganistán y Malasia, algunos casos aislados en Inglaterra y Estados Unidos. Lo anterior indica la coexistencia de las cepas de *Vibrio cholerae* El Tor y *Vibrio cholerae* O139, también conocido como biotipo Bangladesh. El cólera ha permanecido endémico en África, el sur y sureste de Asia. En esta zona la enfermedad constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad no obstante las medidas que se han implementado para su control. Se considera que

factores ambientales y climáticos que prevalecen en estas regiones y que pudieran estar relacionados con las deficiencias sanitarias en estas poblaciones.

Reportes recientes indican que en Nigeria se presentaron 160 casos de cólera con 10 defunciones en 1999, en Ghana 269 casos de cólera y 9 defunciones identificando a *Vibrio cholerae*, serotipo Inaba en ese mismo año, mientras que en Somalia el cólera ha permanecido endémico reportando 6964 casos reportados de *Vibrio cholerae* serotipo Ogawa, en Kenia en el año 2000 se presentaron 2232 de casos de *Vibrio cholerae* serotipo Ogawa con 230 defunciones, en Sierra Leona se tuvieron 143 casos en 1999, identificando cólera serotipo Ogawa, en Ruanda 140 casos de cólera, serotipo Inaba, República Democrática del Congo 75 casos con 5 defunciones en 1999, en Madagascar son 124821 casos de diciembre de 1999 a marzo del 2000, con 736 defunciones y en el año 2000 se presentaron 6983 casos, con 433 defunciones de marzo a noviembre. Como se puede observar con estos datos el cólera sigue siendo una amenaza en países en desarrollo en donde la sanidad es pobre, la atención a la salud limitada y el agua potable insegura.

La epidemia que llegó a América por Perú en Enero de 1991 fue el antecedente de los brotes que se presentarían en nuestro país a partir del 17 de Junio de ese mismo año en un poblado cercano a la CD. de México. Se presentó en la capital de nuestro país el 6 de agosto de 1991 en la zona oriente, ubicación del H.G.R.No25, y que a partir de ese momento se fueron presentando casos en forma continua en esta región. Dada la presión ejercida por el personal médico para lograr una confirmación en el diagnóstico de Cólera en un menor tiempo, fue el motivo para implementar un método el cual se llamo H.G.R No25 con el cual identificó a *Vibrio cholerae* en 8 a 10 hs, y de esta manera se realizaron acciones epidemiológicas para determinar la magnitud del brote y la modalidad de transmisión, a fin de poder aplicar medidas de control más eficaces y específicas. Durante este tiempo no se presentaba variabilidad o sustitución notoria en el aislamiento y fue hasta 1995 en donde se da la inestabilidad en la conservación de las cepas en su aspecto y morfología colonial. Se aislaron cepas rugosas verdes parecidas a *Vibrio parahaemolyticus* en TCBS dificultando su identificación y en 1998 se presentaron casos con diagnóstico clásico de Cólera, sin lograr aislar a *V. cholerae*, se sospecha la presencia de otro morfotipo de este microorganismo y que corresponde a formas viables no Cultivables. En este seguimiento se buscó conocer el comportamiento y variabilidad de *V.cholerae* creando las condiciones adecuadas de cultivo para obtener colonias características con las cuales se lograra su identificación.

III MARCO TEÓRICO

Vibrio cholerae es el agente etiológico de la diarrea infecciosa denominada cólera. El síntoma diarrea suele ser una manifestación común a una amplia variedad de enfermedades del tubo digestivo, las cuales pueden tener como origen una alteración orgánica o fisiológica.

La diarrea traduce una deficiente absorción intestinal de agua y electrolitos o bien hace patente la secreción exagerada de éstas sustancias en el aparato digestivo. Es por esta razón que se ha definido como un aumento en la frecuencia de las evacuaciones, que se acompaña de un incremento en el contenido de agua en las heces y por lo tanto en un cambio en su consistencia.¹⁹

DESCRIPCIÓN DEL AGENTE ETIOLOGICO

Vibrio cholerae es un bacilo anaerobio facultativo, gram-negativo en forma de coma, mide 0.5 a 0.8 μm de diámetro por 1.4 a 2.6 μm de largo, no forma esporas, es capaz de tener un metabolismo respiratorio y fermentativo, es oxidasa positiva, reduce nitratos y es móvil por la presencia de un solo flagelo polar. Su crecimiento se ve favorecido cuando se le adiciona NaCl al 1% a los medios de cultivo, sin embargo a diferencia de otras especies *Vibrio cholerae* puede crecer bien en ausencia de NaCl. *Vibrio mimicus* también puede crecer en ausencia de NaCl pero puede diferenciarse porque este no fermenta la sacarosa^{12, 13}

CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN ANTÍGENICA.

El diagnóstico de *Vibrio cholerae* se realiza generalmente por la sintomatología que presenta el paciente, sin embargo es necesario demostrar la presencia del microorganismo a partir de las heces fecales con aspecto de agua de arroz. El medio selectivo es el agar tiosulfato-citrato sales biliares-sacarosa (TCBS), en este medio crece formando colonias amarillas lisas escasamente planas de aproximadamente 3-5mm de diámetro seguida de la identificación bioquímica y confirmada serologicamente por la aglutinación con antisuero bivalente contra el antígeno O1.^{12, 15} De esta manera puede ser clasificado en serovares o serogrupos: O1 y NO O1.¹³ El serogrupo O1 es aquel en el que se encuentran todas las cepas de *Vibrio cholerae* que reaccionan con el antisuero

somático del grupo O1. Este serogrupo comprende tres serotipos Ogawa (AB), Inaba (AC) e Hikojima (ABC).¹¹ En el segundo nivel se pueden distinguir dos biotipos; Clásico y El Tor. Estos se han logrado diferenciar por su comportamiento fisiológico y por la susceptibilidad a bacteriófagos.^{1, 11}

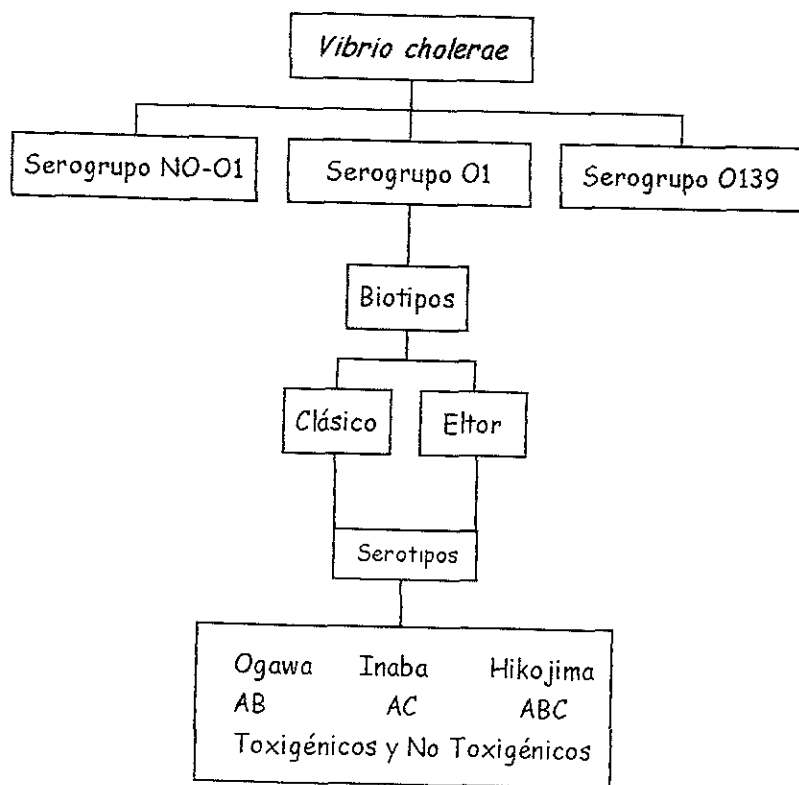


Fig. 1 Clasificación de *Vibrio cholerae* en Serovares o Serogrupos: O1 Y NO O1.¹³

A los miembros del serogrupo que no llevan a cabo una reacción de aglutinación cuando está en contacto con el antisuero somático O1, se le conoce como *Vibrio cholerae* NO O1 o vibriones no aglutinantes.¹

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *Vibrio cholerae*.

La infección causada por *Vibrio cholerae* inicia con la ingestión de alimentos contaminados o agua conteniendo a este microorganismo. Después pasa a través de el estomago, librando la barrera ácida, colonizando el epitelio del intestino delgado para lo cual requiere de ciertos factores de virulencia, una vez adherido produce la toxina colérica (CT) y probablemente otras toxinas que alteran el transporte de iones a través de las células del epitelio y como consecuencia se lleva a cabo una pérdida de agua y electrolitos que conducen a una diarrea severa característica del cólera.¹⁸

La colonización de *Vibrio cholerae* se inicia con la participación del flagelo polar, el cual ayuda al microorganismo a alcanzar y colonizar el intestino delgado esto aunado a la presencia y actuación de adhesinas. Poco se conoce acerca de la existencia de algún proceso de quimiotaxis o que se lleven a cabo señales que guíen al microorganismo a la mucosa, sin embargo existe la posibilidad de que ocurra.²²

Otro factor que favorece la colonización es la adherencia a la superficie celular, mediante (Toxin Correlated Pili) el pili TCP llamado así porque los genes que codifican para estos pili son regulados de manera similar a los genes que codifican la toxina colérica, el cual forma largos filamentos entre el microorganismo y las células hospederas. La adherencia del vibrión puede verse favorecida por hemaglutininas que poseen algunas cepas de este microorganismo, sin embargo esto no se ha comprobado.¹⁵

Otra posible adhesina o factor de colonización se encuentra en las proteínas (accessory colonization factor) Acf que se encuentran en la membrana externa, están codificadas por los genes Acf, y se ha observado que estas contribuyen a la colonización del tracto intestinal de animales.¹⁷

Una vez adherido en la mucosa intestinal, *Vibrio cholerae* secreta una proteasa dependiente de calcio y zinc conocida como mucinasa, la cual degrada fibronectina, lactoferrina y a la propia toxina colérica, ayudando así a la separación del microorganismo de la célula hospedera.¹⁸ Para que *Vibrio cholerae* pueda producir toxina colérica en el hospedero debe multiplicarse hasta alcanzar un número suficiente.

El principal factor de virulencia de *Vibrio cholerae* es la toxina colérica. Es un péptido ADP-ribosa del tipo A-B. La subunidad A tiene un peso de 27 kDa y está compuesta por dos fracciones, una fracción con actividad enzimática A₁ y una fracción A₂ que une a la fracción A₁ con las cinco subunidades B la cual pesa 11.7

kDa, ambas fracciones A_1 y A_2 están unidas covalentemente por un puente disulfuro^{15,17}

La subunidad B de la toxina colérica se une con el receptor celular que se encuentra en la membrana de las células intestinales, el gangliósido G_{M1} , que es un ácido siálico el cual contiene un oligosacárido unido covalentemente a un lípido (ceramida). La porción lipídica de las subunidades B se inserta dentro de la membrana de la célula hospedera quedando expuestos los oligosacáridos en la superficie de la célula hospedera. Una vez que la toxina se encuentra unida al receptor G_{M1} , la subunidad A_1 es liberada del complejo toxico, debido a la ruptura del puente disulfuro que la une a A_2 y entra posteriormente a la célula hospedera por un mecanismo de translocación aún desconocido.¹⁸

Una vez que la toxina se ha fijado actúa sobre la enzima adenilatociclasa que cataliza la transformación de adenosintrifosfato (ATP) a adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Los mayores niveles de AMPc inducen a la célula a una secreción activa de iones hacia el lumen intestinal; para mantener el equilibrio osmótico de las células deben secretar líquido en el lumen, el cual obtiene de todo depósito líquido del organismo.²⁰

Algunas cepas de *Vibrio cholerae* producen otras toxinas además de la colérica como es la (zona occludens Toxin) Zot descrita por Fasano et. al. quienes reportaron que la toxina produce un incremento en la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado debido a que afecta la estructura de las uniones intercelulares conocidas como zonula occludens¹⁹

Las uniones de la zonula occludens son muy efectivas como una barrera que evita que los iones difundan fácilmente entre las células de la mucosa. Estos iones pueden ser transportados por bombas específicas para iones a través de las células de la mucosa. Esta característica permite que el flujo de iones y agua a través de la mucosa intestinal sea controlada y es responsable de que el cuerpo sea capaz de retener agua.

La toxina Zot al romper las uniones intercelulares no sólo permite que el contenido del lumen se difunda hacia el tejido, sino también puede interrumpir el balance iónico y causar diarrea. Aún no está claro si todas las cepas de *Vibrio cholerae* tienen el gen que codifica para esta toxina¹⁹

La (accessory cholerae toxin) toxina ACE fue identificada en 1993 por Truckis et al. Estos investigadores demostraron que el producto del gene de una región abierta esta localizada inmediatamente río arriba del sitio zot en el genoma de este microorganismo y que puede causar un corto circuito en la cámara ussing. También se sabe que cepas que tiene clonado el gen ace causan una acumulación importante de fluido en asa ligada en conejo¹⁵, sin embargo se desconoce el papel que juega dicha toxina en el humano.¹⁸

O'Brien reportó en 1984 que algunas cepas de *Vibrio cholerae* O1 producen una citoxina parecida a la Shiga, esta toxina fue identificada con base al efecto citotóxico que produce sobre las células HeLa.^{14, 15}

Los genes que codifican para las toxinas citadas anteriormente (ace, zot) se encuentran en el elemento genético del fago CTX; Waldor y Mekalanos demostraron que el elemento genético, corresponde a parte del genoma de un bacteriófago lisogénico filamentoso llamado fago CTX.¹³

Se ha demostrado que bajo condiciones apropiadas, cepas toxigénicas de *V. cholerae* pueden inducir la formación de partículas extracelulares del fago CTX. Este bacteriófago puede ser propagado en cepas de *V. cholerae* receptoras las cuales pueden incluirlo en su genoma en un sitio específico, formando cepas lisogénicas, o mantenerlo extracromosomal como forma replicativa.^{8, 13}

Existen todavía muchas dudas acerca de la ecología acuática y la historia natural de *Vibrio cholerae* incluyendo su estado natural y la existencia de los sitios endémicos durante la presencia de este microorganismo en forma libre, los periodos interepidemicos, los factores ambientales tal como el clima, en América latina, lo cual sugiere que este agente patógeno puede sobrevivir en aguas relativamente libres de contaminación fecal humana. Esta idea ha sido confirmada posteriormente por medio de investigaciones de laboratorio que han apoyado la hipótesis de que el microorganismo es un miembro autóctono de la flora microbiana de las aguas medianamente salinas típicas de estuarios y pantanos costeros, concepto sugerido por Colwell, et al.¹⁵

Esta bacteria se ha aislado de plantas macrófitas acuáticas así como en aguas marinas y dulces, también en especies de fitoplacnton y zooplacnton de agua salina y dulce, se ha encontrado en la parte oral y el saco de huevos de los pépodos planctónicos; y en dos especies de algas verdes y verdiazules.²⁰

En 1938 Bruce White, del National Institute for Medical Reserch de Londres describió la existencia de dos variedades morfológicas en las colonias de *Vibrio cholerae*, con un aspecto arrugado denominado rugosa y otra lisa. Estudios realizados recientemente con cepas rugosas y lisas de *V. Cholerae* O1, aisladas durante la epidemia de Perú, se observo que al tratar a las cepas lisas aún con concentraciones bajas de cloro estas morían rápidamente, sin embargo al efectuar el mismo tratamiento a cepas de morfología rugosa se observó que éstas resistían por un lapso de hasta 20 min concentraciones incluso de 2mg/L de cloro libre. Estas condiciones de morfología rugosa presentan la propiedad de formar agregados celulares difíciles de separar aún con sonicación.²² Se considera que la morfología de algunas cepas de *Vibrio cholerae* de este tipo está relacionadas con la producción de "biopelículas" secundarias a la excreción de polisacaridos, los cuales favorecen la adherencia bacteriana a superficies sólidas y pudieran proteger a las bacterias de condiciones ambientales adversas. Estas cepas rugosas no solo conservan sus propiedades de virulencia, sino que su capacidad de adherencia se ve incrementada.²²

El término viable pero no cultivable fue propuesto por Valentine Bradfield, este fenómeno representa un estado de latencia, supervivencia y persistencia en el medio ambiente al igual que la forma rugosa, estas formas de supervivencia han provocado que se tenga una considerable atención sobre las formas "VIAIBLES PERO NO CULTIVABLES " ya que este estado le permite realizar funciones metabólicas y formar colonias sin poder ser cultivadas. Además, se incrementa la adherencia en las superficies de plantas macrófitas acuáticas, fitoplacnton y zooplacnton, esto le permite sobrevivir durante períodos interepidemicos sin perder su toxigenicidad, incluso en ecosistemas de agua dulce.

Vibrio cholerae en estado viable no cultivable se vuelve cocoide, decrece su volumen hasta un 90% del original y en 30 días se observa la pérdida de la integridad de la parte externa de la membrana acompañada por el citoplasma denso, comprimiéndose la región nuclear, se tiene también que después de 30 días los niveles de DNA y proteínas decrecen en un 70% a 75% y los niveles de RNA cambian poco. Hay formación de vesículas pero tienden a desaparecer rápidamente. Así el fenómeno viable pero no cultivable representa un estado de latencia, supervivencia y persistencia en el ambiente ^{20,21}. El rol en la interacción ambiental y en el estado fisiológico de *Vibrio cholerae*, no ha sido aclarado. Pero puede ser la explicación de su comportamiento cíclico y recurrente así como de virulencia variable a lo largo de por lo menos las siete pandemias identificadas.

El genoma de este microorganismo contiene dos cromosomas circulares, el mayor es de 2,961,146 pares de bases mientras que el segundo y mas pequeño esta constituido por 1,072,314 pares de bases. La mayoría de los genes reconocibles del cromosoma principal son los responsables de la codificación de las funciones fisiológicas de esta bacteria como son la replicación del DNA su transcripción y la biosíntesis de la pared celular y parte de los elementos de patogenicidad como toxinas, antígenos de superficie y adhesinas. En contraste el cromosoma pequeño posee una fracción mayor al 59% de los genes ancestrales de Proteobacteria comparados con el cromosoma mayor el cual solo posee él 42% de homología, con su ancestro. Este pequeño cromosoma también otros genes que parecen ser generados por la Proteobacteria, adicionalmente el cromosoma pequeño lleva también un grupo de genes que constituyen la isla de patogenicidad así como los genes de adhesión al huésped los cuales están constituyendo un plasmido, de lo cual se que el cromosoma pequeño pudo haber sido originalmente parte de un megaplasmido que fue tomado por un tipo de *Vibrio* ancestral.

La secuencia del genoma de *Vibrio cholerae*, es el punto de partida para entender como vive en forma libre, y como el organismo emerge del medio ambiente para ser un patógeno significativo en el humano.

En la actualidad estudios de las diferentes bioformas de este microorganismo se realizan para conocer sus aspectos ecológicos, inmunológicos y el conocimiento de la variabilidad y sustitución antigenica y puedan ser utilizados para conocer como este patógeno sobrevive en condiciones de estrés ambiental. Y con ello establecer las condiciones para el control de nuevos brotes o pandemias.

EPIDEMIOLOGIA.

El cólera ha sido clasificado como un problema de salud pública prioritario ya que ha amenazado a muchos países en vías de desarrollo, como México, Centro y Sudamérica²⁰

A través del tiempo han ocurrido siete pandemias, todas excepto la 7ª que se originó en Swalesi Indonesia, han ocurrido en la India y se han diseminado a otros continentes.²¹

En 1817-1824 inició la 1ª pandemia en Nepal, Afganistán, Ceylan, y las Indias orientales Holandesas, El sureste Asiático, Indochina, China y Japón finalizó en 1823.

De 1826 -1840 inició la 2ª afecto a Rusia, Inglaterra, Irlanda, los inmigrantes la transportaron en 1832 a Canadá de ahí a USA, Cuba y México en 1833 y en 1837 apareció en Guatemala y Nicaragua.

En 1848 - 1862 inicia la 3ª pandemia que fue una de las más mortíferas, se presentó en Francia, Italia, Inglaterra. En América, la puerta de entrada fue Nueva Orleans, desde ahí a California y luego al sureste de México.

De 1864 - 1875 inicia la 4ª pandemia en Africa y debido al tráfico de esclavos y negros se extendió a los países de Medio Oriente y el Golfo Pérsico. La peregrinación de la Meca en 1865, cobró por lo menos 30,000 víctimas entre 100,000 enfermos, fueron afectadas también Brasil y Paraguay.

De 1883 - 1896 se presentó la 5ª pandemia en Africa, Europa y América, México, Rusia, Asia Menor, Egipto y Hamburgo.

En 1899 - 1923 se inicia en Europa, Asia, Africa, el Sureste Europeo y la Rusia Europea.

En 1961 - y la actualmente en curso, se inició en Sudawesi (antes Célebes), en Indonesia. Su extensión al Sudeste Asiático, el Subcontinente Indico y Oriente de México. En 1970 invadió a Africa y países del Mediterráneo, en Europa, se presentaron casos aislados, en la Unión Soviética e Italia.

La 7ª pandemia es la más extensa de las pandemias tanto en diseminación geográfica como en duración, causado por *Vibrio cholerae* O1 biotipo el Tor. Comenzó en el Oriente, y ha afectado muchos países Asiáticos, Europeos y Africanos. Llegó a Perú en enero de 1991, afectando a América del Sur por primera vez.

En México el primer caso confirmado de cólera ocurrió en Junio de 1991 en un individuo de 68 años residente de San Miguel Totolmoloya, Municipio de Cuhtepéc, Estado de México, posteriormente se extendió a Estados del sureste y de ahí a otros sitios del país como son Campeche, Veracruz, Guerrero, Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Puebla, Yucatán, Oaxaca, San Luis Potosí, Guanajuato, Tabasco, Tamaulipas, Chihuahua, Baja California Sur y Querétaro.

Resumen epidemiológico de casos de Cólera durante la 7ª pandemia en México 1991- 2001.²⁵

AÑO	Número de casos reportados en México.	Número de casos reportados en el D.F.
1991	2690	369
1992	8162	112
1993	5478	1111
1994	4075	237
1995	16147	1051
1996	1088	13
1997	2339	199
1998	71	9
1999	9	1
2000	1	0
2001	0	0

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cólera se considera una enfermedad, altamente contagiosa aunada a la velocidad con que se realizan las comunicaciones en esta época de globalización en que vivimos nos obliga a estar alerta a un nuevo brote por este microorganismo ya sea como consecuencia de una nueva forma patógena, por mutación o recombinación de *Vibrio cholerae* con otra especie de esta familia o por las condiciones ambientales que se presenten favoreciendo este cambio la expresión de formas rugosas a lisas, o viceversa que condicionen nuevos brotes.

La realización de este trabajo se planteo con el propósito poner de manifiesto el comportamiento cambiante y adaptativo de *Vibrio cholerae*, para lo cual se cuestiono si la cepa de *Vibrio cholerae* aislada en 1991 fuese la misma que las cepas aisladas en el tiempo que duro este seguimiento hasta el año 2000, para lo cual se combinó el uso de diferentes procesos diagnósticos para tal fin.

V OBJETIVOS

1. Caracterizar las cepas aisladas de muestras clínicas
2. Establecer la prevalencia de los serotipos, durante la realización de este estudio.
3. Poner de manifiesto las formas de adaptación ambiental que ha presentado este microorganismo (cepas lisas a rugosas).
4. Considerando todos estos estudios realizados crear las condiciones para responder de una forma precisa y oportuna ante nuevos brotes.

VI HIPOTESIS

Si las cepas de *Vibrio cholera*, aisladas en 1991 de pacientes con diagnóstico de cólera fueran las mismas en su comportamiento metabólico y tuvieran el mismo morfotipo hasta el año 2000 se identificarán con las metodologías empleadas en ese tiempo pero si esta premisa no se cumpliera y se presentan morfotipos distintos al de la cepa original será necesario crear procesos que nos permitan identificarlos.

VII MATERIAL.

1. - Sustancias Químicas y Reactivos.

Agua destilada

Agar hierro triple azúcar (medio TSI) (Bioxon)

Agar Mac Conkey (Bioxon)

Agar tiosulfato -citrato-sales biliares y sacarosa (AgarTCBS) (Bioxon)

Agua peptonada (Bioxon)

Medio de base agar sangre (ABS) (Bioxon)

Medio de cultivo lisina arginina (medio LIA) (Bioxon)

Medio de cultivo movilidad indol ornitina (medio MIO) (Bioxon)

N, N, N, N-tetrametil p-fenilendiamina (reactivo de oxidasa) (Sigma)

Papel indicador de pH (baxter)

Reactivo para prueba de Indol Erlich

Hidróxido de sodio (Merck)

Solución de hipoclorito de sodio al 6%

ANTISUEROS.

Antisuero polivalente (anti O) para *Vibrio cholerae* (Difco)

Antisuero Anti- *Vibrio cholerae* Inaba (Difco)

Antisuero Anti-*Vibrio cholerae* Ogawa (Difco)

2. MATERIAL

Asas bacteriológicas
Aplicadores de madera
Cajas petri
Cubreobjetos
Gasas
Gradilla de alambre para tubos de 18 X 100
Guantes de látex estériles (Dentilab S.A.de C.V)
Micropipetas estériles de ocho canales 25 ml
Microplacas (Costar) con fondo de U
Portaobjetos (Fisher-Brand)
Tubos de rosca con tapa de baquelita 13 X 100 (Pyrex)

3. MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de materia fecal de pacientes hospitalizados en el servicio de Urgencias
del Hospital General Regional No 25 con Diagnóstico probable de Cólera
Cepas aisladas de *Vibrio cholerae*
Cepa control de *Vibrio cholerae* Inaba cepa VC -13 y Ogawa VC-12
Complemento liofilizado de cobayo (Sigma), reconstituido con agua destilada.

4. EQUIPO

Autoclave
Incubadora (precisión)
Balanza semianalítica (Sartorius)
Espectrofotómetro Coleman Junior
Microscopio óptico (Carl-Zeiss)
Refrigerador (General Electric)

VIII DISEÑO EXPERIMENTAL

Población de estudio.

508 cepas aisladas en el H.G.R. No25 y confirmadas por el Laboratorio de Salud Comunitaria del IMSS y por Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológica(INDRE),

Criterios de inclusión

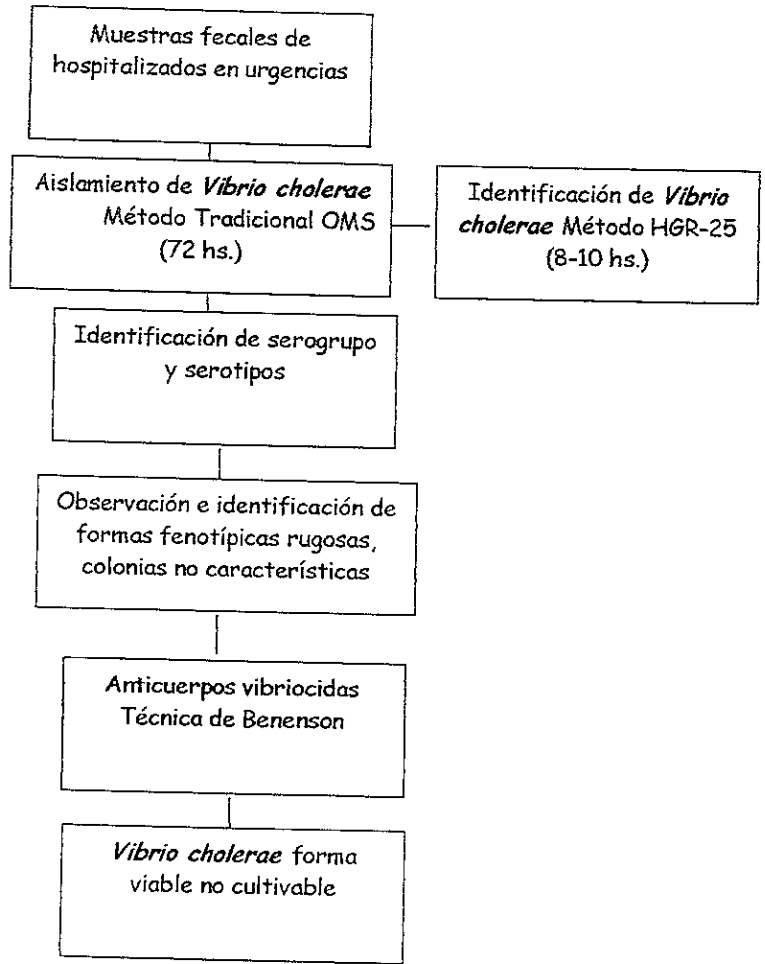
Se utilizaron cepas viables debidamente identificadas mediante su patrón de actividad enzimática y confirmadas serologicamente: con el antisuero anti *Vibrio cholerae* polivalente y ratificado por los monovalentes INABA Y OGAWA

Criterios de exclusión

Se descartaron cepas de *Vibrios* No O1, así como cepas aisladas de los pacientes con diarreas provocadas por otros patógenos como: *Shigella sp*, *Salmonela sp*, *Escherichia coli* toxigenica.

IX MÉTODOS.

DIAGRAMA DE FLUJO REALIZADO
1991-2000



K METODOLOGÍA REALIZADA

1. Método clásico. Metodología clásica descrita por la OMS para la identificación y aislamiento de cepas de *Vibrio cholerae* de muestras diarreicas de pacientes hospitalizados en el servicio de urgencias.
2. Muestras fecales fueron inoculadas en medio de enriquecimiento (agua peptonada pH 9), y medio selectivo de TCBS y Mc Conkey para su primoaislamiento.
3. Colonias sospechosas características, sacarosa positiva (TCBS) y lactosa negativa (Mc Conkey) realizar identificación metabólica en los medios: TSI, LIA y MIO.
4. Prueba de oxidasa. Si esta resulta positiva pasar al punto 4.
5. Identificación serológica. La identificación serológica se llevó a cabo utilizando un antisuero polivalente O1, para lo cual se utilizaron las cepas a probar crecidas en medio LIA. Se colocó una gota de antisuero polivalente O1 en un portaobjeto, colocando sobre esta una pequeña asada de cultivo fresco con un aplicador, se homogenizó y se observó si se llevaba a cabo una reacción de aglutinación. Como testigo negativo se utilizó solución salina para cada antisuero utilizado. Se utilizaron también antisueros monovalentes para serotipificar el grupo al que pertenecían las cepas: Inaba (antígeno AC) y para el subgrupo Ogawa (antígeno AB).
6. Obtención de la cepa pura: *Vibrio cholerae*, el tiempo en realizar esta metodología llevaba 72 hs.
7. La cepa pura, se enviaba al centro de referencia INDRE para realizar su certificación y tener control de las cepas positivas.

L Metodología H.G.R. 25

Muestras fecales fueron inoculadas simultáneamente en: agua peptonada (pH 9), tubo de agar base de sangre en pico de flauta, caldo selenito, TCBS y Mc Conkey.

Identificación serológica de *Vibrio cholerae* con el crecimiento obtenido en el tubo de agar base de sangre, esto sin tener la cepa pura. El tiempo de la

identificación se llevaba de 8 a 10 hs. Lo anterior con la finalidad de realizar acciones epidemiológicas en esta jurisdicción.

3. Siguiendo la metodología clásica para el aislamiento se realizó la identificación metabólica con la finalidad de tener la cepa pura.

4. Identificación serológica con antisuero polivalente y monovalente.

5. La cepa obtenida por medio de la metodología clásica ya identificada y pura se enviaba al INDRE.

III. Determinación de anticuerpos vibriocidas. Técnica de Benenson.

Estandarización y preparación del antígeno (inóculo).

1. Ajustar el espectrofotómetro Coleman Junior a 530nm. Utilizar solución salina como blanco y ajustar la suspensión bacteriana a densidad de 0.420 DO.
2. Preparar el inóculo de la forma siguiente:

Microorganismos estandarizados	1 parte
Complemento	2 partes
Solución salina fría	17 partes

Nota: La preparación del antígeno debe ser hecha a 4°C. La mezcla puede hacerse en un cuarto frío o en una bandeja con hielo. Los matraces para las mezclas, pipetas y reactivos deben estar fríos. Si más de un vial de complemento es necesario, juntar con los demás y usar.

NSAYO.

1. Diluir los sueros problema 1:10 con solución salina.
2. Colocar 0.05 ml del suero diluido en los pozos de la fila número 1 de la placa de microtitulación y 0.025 ml en la fila número 12.

3. Colocar 25 uL de salina en los demás pozos de la fila número 2 a la fila número 11.
4. Con microdilutores hacer la serie de diluciones dobles de la fila 1 a la fila 11.
5. Añadir 25uL del inóculo que contiene vibrios y complemento a cada uno de los pozos, excepto a la fila 12 (suero control). Incubar por 1 hora a 37 °C.
6. Añadir 0.15 mL de caldo infusión de corazón a los 96 pozos.
7. Leer las placas cuando el tubo control de complemento (complemento + salina + caldo BHI) alcance una densidad óptica de 0.15 (71% transmitancia) 580nm en el espectrofotómetro Coleman Junior (usualmente después de 3-4 hs).
8. La lectura final se hace después de una noche de refrigeración de la placa: puede distinguirse claramente entre el contenido turbio en los pozos de la placa donde crecieron los vibrios y un contenido translúcido en los que el microorganismo murió y se lisó.

IV Identificación de *Vibrio cholerae* por el método comercial CHOLERA SMART.

Inmunoanálisis colorimétrico para detección directa de la toxina de *V. Cholerae* O1.

1. Adicionar la muestra de heces fecales en el dispositivo filtrante a la mitad de la capacidad si las heces son acuosas o un cuarto si son sólidas agregando el amortiguador de extracción hasta completar la capacidad del volumen del dispositivo. Agitar vigorosamente.
2. Abrir la bolsa que contiene el dispositivo Smart, en el tubo de reacción adicionar dos gotas de amortiguador de reconstitución y cuatro gotas de la muestra del dispositivo filtrante. Mezclar.
3. Introducir el hisopo estéril dentro del tubo de reacción y mezclar con el reactivo.
4. Abrir el dispositivo que contiene dos compartimentos, exponer el de la parte superior y colocar la punta del hisopo en este, cerrando y dejando dentro el hisopo y esperar al menos 3 min.

5. Abrir el compartimento inferior, para quedar expuesta el área de resultado, observar el círculo superior si este es de color rosa la prueba se considera positiva.

Obtención e identificación de formas rugosas de *Vibrio cholerae*.

1. Inoculación y aislamiento de cepas sospechosas como rugosas de *V. cholerae*, en medios de TCBS, a 37 °C por 24 hs.
2. Identificación serologica de *V. cholerae* de colonias secas con aspecto rugoso.
3. Se sometió a un proceso de estrés a las colonias de tipo rugoso obtenidas en placa a una temperatura de 4 °C (refrigeración).
4. La incubación a esta temperatura fue de 48 a 72 hs.
5. Se identificaron morfotipos con un carácter posible de rugosidad, por aglutinación con colorante de acriflavina.

Interpretación de la prueba

Prueba positiva. Presencia de grumos que indica aglutinación positiva y rugosidad de colonia para *Vibrio cholerae*.

Prueba negativa. La ausencia de grumos indica aglutinación negativa y carácter liso la colonia para *V. cholerae*.

VII. Identificación de formas rugosas mediante aglutinación por vapor fluente.

1. Se realizó la inoculación por estría de aislamiento de las cepas estresadas en placa de ABS (una cepa por placa), incubando a 37 °C por 24hs.
2. Se enriqueció en caldo de soya y tripticaseína (CST) contenida en tubos a tres colonias de cada cepa presente en las placas de ABS (una colonia por tubo) por 24hs a 37 °C.
3. Los tubos con crecimiento se colocaron en el autoclave a 5lb de presión por 2hs.
4. Después se colocaron los tubos en refrigeración a 4 °C por 24 hs.
5. Se realizó la lectura de resultados y posteriormente la identificación de morfotipo rugoso (presencia de botón en el fondo del tubo) o lisos (presencia de sedimento en el fondo del tubo).

Interpretación de la prueba.

Prueba positiva. Indica rugosidad positiva y se manifiesta por presencia de un botón en el fondo del tubo que se desprende y causa turbidez en caldo de enriquecimiento.

Prueba negativa. Indica rugosidad negativa y se manifiesta por presencia de un botón en el fondo del tubo que no se desprende y mantiene claro y transparente el caldo de enriquecimiento.

XI RESULTADOS

Con la llegada de esta epidemia a nuestro país inicialmente y más tarde a nuestra ciudad, por la ubicación de este hospital: H.G.R.No25 siendo la puerta de entrada por la zona oriente enfrentó esta epidemia inicialmente con la metodología propuesta por los organismos de salud local y mundial, sin embargo la necesidad de los médicos por tener resultados en el menor tiempo posible presiono para buscar un camino que acortara el tiempo de identificación de este patógeno con el propósito de aplicar un tratamiento preciso y más tarde el cerco sanitario que limitara su diseminación al resto de la población y fue por ello que se creo el método al que denominó HGR-25 con el se obtuvo la identificación de este patógeno entre 8 y 10 horas a diferencia de los otros métodos propuestos por la Secretaria de Salud y con este procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla No 1 Aislamiento de *Vibrio cholerae* 1991-2000 en el Hospital General Regional No 25.

Año	Número de muestras clínicas	Método Propuesto por la OMS	Método HGR25
1991	372	66	66
1992	145	35	35
1993	995	192	192
1994	165	25	15
1995	281	121	111
1996	52	0	0
1997	244	69	59
1998	29	0	0
1999	6	0	0
2000	3	0	0

Resultados obtenidos del procesamiento de 2292 muestras diarreas, obteniéndose 08 cepas de *Vibrio cholerae*.

Con estos resultados se realizó el seguimiento de las serovariedades el cual se expresa en la siguiente tabla.

Tabla No 2 Sustitución Serologica de *Vibrio cholerae*(1991-2000)

Año	Aislamientos de cepas de <i>Vibrio cholerae</i>	Serotipo Inaba	Serotipo Ogawa
1991	66	66	0
1992	35	3	32
1993	192	0	192
1994	25	0	25
1995	121	0	121
1996	0	0	0
1997	69	0	69
1998	0	0	0
1999	0	0	0
2000	0	0	0

En esta tabla se presentan los aislamientos de *V. cholerae* que correspondieron al aislamiento de 508 cepas de *V. cholerae* aisladas, en donde se observó la sustitución serologica de Inaba por Ogawa y la frecuencia de aislamiento en 1991 fue del 100% correspondiendo al serotipo Inaba y en 1992 un porcentaje del 8.5% para serotipo Inaba y el 91.5% para Ogawa, manteniendo este último serovar hasta el año 2000.

Durante el procesamiento de las muestras diarreicas se encontró que no en todos los casos el patógeno aislado fue *Vibrio cholerae*, razón por la cual en la siguiente tabla se reportan los patógenos identificados durante esta epidemia:

Tabla No 3 Enteropatógenos aislados de pacientes hospitalizados en Urgencias con Diagnóstico de Cólera en los años 1996-2000.

Enteropatógenos
<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella flexnerii</i>
<i>Shigella sonnei</i>
<i>Shigella sp</i>
<i>Salmonella typhi</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

La validación del proceso H.G.R.N25 se realizó comparando dos medios de cultivo diseñados para el aislamiento de este microorganismo como es el de Mc Conkey contra el de Agar base de sangre(ABS).

Tabla No 4 Comparación de dos medios de cultivo en el crecimiento de *Vibrio cholerae*

Medios	Crecimiento	Sin crecimiento
TCBS	50	2
Mc Conkey	28	24
Agar Base	49	3

En esta tabla se valoró la capacidad predictiva de desarrollo, para cada uno de los medios sometidos a este proceso, probándose 52 muestras en donde existe una diferencia altamente significativa en el porcentaje de desarrollo microbiano de los dos medios valorados. El medio TCBS fue el control para tal comparación.

Tabla No 5 Especificidad(93.5%) del Método Cholerae Smart

Microorganismo	Prueba positiva
<i>Vibrio cholerae O1</i>	(+)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	(-)
<i>Escherichia coli B7A</i>	(-)
<i>Escherichia coli M-14502</i>	(-)
<i>Escherichia coli 9034A</i>	(-)
<i>Salmonella enteritis</i>	(-)
<i>Salmonella paratyphi A</i>	(-)
<i>Salmonella typhi</i>	(-)
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	(-)

En esta tabla se reafirma la especificidad de este método, pero sin llegar a la sensibilidad(89.6%) que se necesita para detectar a *Vibrio cholerae*.

al principio de la epidemia las autoridades sanitarias de nuestro país buscaron conocer el grado de respuesta de los pacientes afectados por este padecimiento incluyeron la valoración de anticuerpos Vibriocidas en el año de 1991 realizado en el INDRE, ya que no se contó con los reactivos necesarios, esta prueba proporcionó los siguientes resultados:

Tabla No 6 Serología de Cólera. Anticuerpos Vibriocidas(aglutinación en tubo)

Folio	Sueros 1º, 2º Muestras.	Ac. Vibriocidas Owaba	Ac vibriocidas Inaba.	Antitoxina Método Elisa	Aislamiento de V. cholerae
100	**	1:160 1:320	1:160 1:320	Neg Neg	+
101	**	1:160 1:160	Neg 1:160	Neg Neg	+
108	**	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	-
114	**	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	-
277	**	Neg 1:40	Neg Neg	Neg Neg	-
280	**	Neg 1:320	Neg 1:2560	Neg 1:3200	+
288	**	1:80 1:320	1:160 1:2560	Neg 1:3200	+
291	**	Neg Neg	Neg 1:40	Neg Neg	-
293	**	Neg Neg	1:80 1:160	Neg 1:200	+
305	**	Neg 1:5120	1:20 1:1280	Neg 1:800	+
308	**	Neg Neg	Neg Neg	Neg 1:400	-
335	**	1:20 1:5120	1:80 1:1280	Neg 1:800	+
336	**	1:80 1:160	Neg Neg	1:200 1:200	+
345	**	Neg 1:20	1:40 1:320	Neg 1:800	+
347	**	Neg 1:80	1:20 1:640	Neg 1:800	+
358	**	Neg 1:80	1:160 1:1280	Neg 1:400	+
360	**	1:20 1:40	1:20 1:40	Neg Neg	- *
362	**	Neg 1:160	Neg Neg	Neg 1:400	+
363	**	Neg 1:10240	Neg 1:640	Neg 1:400	+
364	**	1:1280 1:10240	1:40 1:320	1:400 1:800	+

La interpretación para los anticuerpos vibriocidas de esta tabla son los siguientes títulos iguales o mayores de 1:80 son indicativos de infección por Cólera.

Tabla No7 Determinación de Anticuerpos Vibriocidas(aglutinación en tubo)

Folio	Inaba y Ogawa	Cultivo
100	1:320, 1:320	+
101	1:160, 1:160	+
280	1:320,1:2560	+
288	1:320,1:2560	+
305	1:1510,1:1280	+
335	1:5120, 1:1280	+
363	1:10240,1:640	+
364	1:10240,1:320	+

En esta tabla se observó que en ese momento se encontraban circulando ambos serotipo Inaba y Ogawa dado el título detectado en la tabla anterior.

Tabla No 8 Determinación de Toxina colérica (método de Elisa) en muestras de sueros sin identificación de serotipo Inaba y Ogawa.

Folio	Ac. Vibriocidas Inaba	Ac. vibriocidas Owaba	Enterotoxina. Elisa
91	Neg	Neg	1:400
92	Neg	Neg	1:200
96	Neg	Neg	1:200
03	Neg	Neg	1:200
08	Neg	Neg	1:200
84	Neg	Neg	1:400
34	Neg	Neg	1:200
37	Neg	Neg	1:400
43	Neg	Neg	1:400
53	Neg	Neg	1:800
92	Neg	Neg	1:200
94	Neg	Neg	1:200

Los títulos para lectura de antitoxina por Elisa son iguales o mayores de 1:200 los cuales son indicativos de infección. Cabe mencionar que en esta tabla se observa que se determinaron títulos positivos para antitoxina, sin obtener aislamiento positivo para *V. cholera* y sin título positivo de Anticuerpos Vibriocidas por lo que se sospechó de la presencia de *Vibrio cholerae* NO O1, ya que los pacientes presentaron un cuadro clínico diarreico.

En 1998 la valoración de anticuerpos Vibriocidas se realizó, empleando la técnica de Benenson, proceso sensible y específico en donde se valoró la respuesta inmune de algunos pacientes a los cuales se les aisló *Vibrio cholerae*, con estos resultados se observó que este microorganismo se encontraban circulando en sus tres formas antigénicas, es decir Ogawa, Inaba e Hikojima con lo cual se confirmó que este microorganismo estaba presentando cambios morfológicos y fisiológicos.

Tabla No 9 Determinación de anticuerpos vibriocidas mediante la técnica de Benenson, en sueros pares de pacientes con aislamiento de *Vibrio cholerae*.

No. de Muestra	Título Inaba	Título Ogawa
900 (1ª muestra)	1:5120	1:10,240
900 (2ª muestra)	1:640	1:2560
901 (1ª muestra)	1:1280	1:10,240
901 (2ª muestra)	1:640	1:5120
902 (1ª muestra)	1:1280	1:1280
902 (2ª muestra)	1:680	1:1040
903 (1ª muestra)	1:1280	1:320
903 (2ª muestra)	1:1280	1:1250
904 (1ª muestra)	1:10,240	1:10,240
904 (1ª muestra)	1:1680	1:1680

En la técnica de Benenson, se emplea el suero humano, la bacteria viva de referencia de ambos serotipos (*V. cholerae* 01 cepa VC12 y VC13) y complemento fresco de caballo, es importante señalar que un título positivo es aquel mayor a 1:160 y por debajo se considera negativo. (Agradecimiento a Q.B.P. Fabiola K Díaz Silva)

Apartir de 1998 se empezó a observar que las cepas previamente aisladas de pacientes con procesos sospechosos de cólera eran inestables a diferencia que en los primeros años eran bastante estables (figura 1) cuando se mantenían en refrigeración, más tarde se observó que las cepas aisladas con una morfología característica, se modificaban al día siguiente adquiriendo el aspecto morfológico propio de otro miembro de este género microbiano como es *Vibrio parahemolyticus* (figura 2) con lo cual queda la sospecha que desde el principio de la epidemia en México en 1991 se encontraban cepas con estas características como lo muestran estos resultados.

Con el propósito de confirmar si algunas de las cepas aisladas y conservadas eran rugosas se abordó este problema de la siguiente manera; se aglutinaron 24 cepas como sospechosas de presentar la forma rugosa de *V. cholerae*, con acriflavina al 0.01% obteniendo 23 cepas aglutinadas. Mas tarde se realizó la prueba de vapor fluente, solo a 6 de estas cepas, con apoyo del INDRE por que no se contó con los recursos en este hospital

Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

Tabla No 11 Identificación de morfotipos rugosos mediante aglutinación por vapor fluente

No de cepa	Resultado de la prueba de Aglutinación
	-
0	-
3	-
4	+
7	+
8	-
ID2	+

En la tabla No 11 se observan los resultados de rugosidad obtenidos por el método de vapor fluente. La cepa ID2 corresponde al control positivo. De 24 cepas con aglutinación con acriflavina al 0.01%, solo se les realizaron a seis cepas la prueba de vapor fluente. (Agradecimiento a Q.F.B. Manuel G Galicia Ruiz)

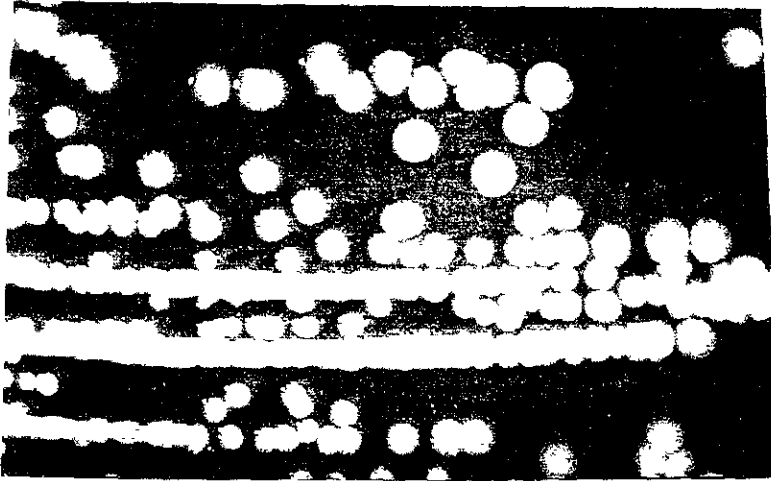


Figura No 2 Colonias características de *Vibrio cholerae*.

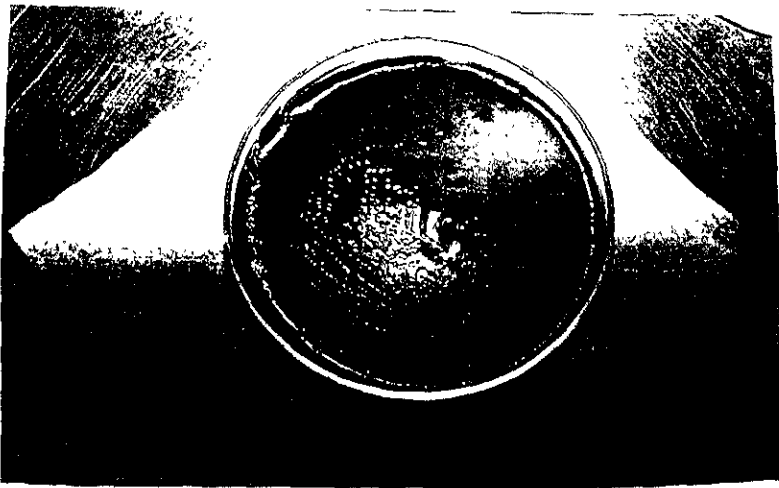


Figura No 3. Formas adaptativas de *Vibrio cholerae*.

Tabla No 12 *Vibrio cholerae* viable no cultivable, muestras fecales diarreicas sin aislamiento de *Vibrio cholerae*.

Número de evacuaciones en 24 hs	Pacientes que presentaron el cuadro clínico 1997	1998	1999	2000
0-20	20	0	0	3
20-30	25	17	4	0
30-40	22	0	1	0
40-50	15	2	1	0

El número de evacuaciones que se cuantificaron en los pacientes hospitalizados con diagnósticos de probable Cólera fue en las primeras 24 hs de estancia en este servicio. En el laboratorio no se logró un solo aislamiento, sospechando que *Vibrio cholerae* estaba presente solo por el cuadro clínico.

XII ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la Tabla No 1 en la cual se expresa el comportamiento de este microorganismo desde su aparición en nuestra ciudad el 6 de agosto de 1991 al 2000 y en ella se puede ver que en los años noes de este intervalo, los brotes eran de mayor intensidad que en los pares y siendo en 1993 el año en que se encontró el clímax de esta epidemia en región de referencia datos en el que no coincidió con los reportes obtenidos por otros autores (Salud Publica Mex 1999; 41:487-491), en donde reportan el mayor número de casos en 1995, nosotros en ese tiempo ya teníamos un número menor de ingresos al servicio de urgencias de nuestro hospital y como consecuencia los aislamientos fueron en menor número, para 1996 el número de casos fue nulo, el último año de casos confirmados fue en 1997 y a partir de ese año no se ha confirmado ningún caso por aislamiento de este microorganismo. Con esto se hace evidente el comportamiento cíclico bianual va desapareciendo gradualmente.

La obtención de estos resultados se logra por la combinación de diferentes procedimientos como el HGR-25 y la propuesta por la Secretaria de Salud, esto permitió proporcionar resultados precisos en menor tiempo con lo cual se complementaron medidas de control oportunas como cercos sanitarios para limitar la diseminación del patógeno. Comparando los resultados obtenidos por estos métodos en los cuales el desarrollado en este hospital se encontró que la diferencia fundamental radica en que este emplea medios de enriquecimiento inicialmente como es el agua peptonada y el agar base de sangre, este ultimo es sólido lo cual permite localizar el crecimiento microbiano mientras que en agua peptonada se dispersa por todo el volumen con lo cual la carga microbiana se distribuye en todo su contenido líquido, mientras que con el medio de cultivo sólido en el cual se tiene ubicado y concentrado el crecimiento podemos realizar una serie de pruebas tamiz que permiten identificar a este microorganismo con precisión y en 8 horas, mientras que en el proceso de la Secretaria de Salud se requieren de 24 a 48 horas más para obtener un resultado equivalente ya que después de realizar la incubación inicial de 8 horas necesarias para obtener una masa critica de bacterias se debe sembrar en medios selectivos que nos permitan realizar su identificación morfológica y posteriormente su identificación bioquímica y serologica.

Mientras que con el método H.G.R. 25 después de haber sido incubado el tubo de agar base de sangre, inoculado con unas gotas de materia fecal líquida (8 hs), se

realizó la prueba de la oxidasa y su aglutinación serológica correspondiente, también de estos resultados se desprende porque se realizó una valoración de los medios selectivos: TCBS como referencia, Mc Conkey y agar base de sangre en la cual se encontró un porcentaje del 40% en el medio de agar base y por su misma naturaleza nos permite realizar la aglutinación del crecimiento microbiano, cosa que no sucede con el TCBS. Basándose en esta metodología se obtuvieron estos resultados, otra modificación significativa realizada fue la sustitución del hisopo rectal por gotas de heces fecales. Estos resultados fueron englobados en el reporte realizado por Vilchis-Guizar y colaboradores en el cual se comparan las características clínico-epidemiológicas de los casos atendidos en las unidades médicas de la delegación 2 noreste del Distrito Federal del Instituto Mexicano del Seguro Social (Salud Pública Mex 1999; 41:487-491), en este estudio se analizaron los datos de 4952 notificaciones reunidas entre 1995 y 1998 del número de casos registrados en donde se aislaron 588 cepas de *Vibrio cholerae* y de 4364 pacientes en los cuales el cuadro diarreico correspondió a otra etiología. Del total de aislamientos en esta zona el 99% de ellos correspondió a la cero variedad Ogawa y solo el 1% de Inaba, las delegaciones políticas con mayor número de casos fue el siguiente: Gustavo A. Madero con el 27%, la Cuauhtémoc 21%, la Venustiano Carranza con el 16%, y el municipio de Nezahualcóyotl del Estado de México con el 25% y a la vez que adicionar Iztapalapa, así como los municipios de Chalco, Los Reyes la Paz y Texcoco que pertenecen a la jurisdicción del HGR-25. Como se puede notar este hospital atiende una de las zonas con las condiciones más favorables para que la epidemia fuera más intensa, sin embargo se puede ver que los brotes fueron controlados favorablemente por el equipo de trabajo que se formó, y los recursos empleados, así como otros que se denominaron rápidos (Cólera Smart) que son de bajo costo, complicados y no tan sensibles ya que requieren de una masa microbiana crítica, la cual favorezca la producción de la toxina colérica en la concentración necesaria para que sea reconocida por el sistema. Los resultados obtenidos con estos procedimientos nos permitieron seguir la sustitución de Serotipo Inaba por Ogawa iniciándose en 1991 y terminado en 1992. La siguiente observación de cambio fue la pérdida de cepas de nuestra colección, lo cual marca la aparición de cepas nuevas en forma intermitente, las tenían el aspecto de *Vibrio parahemolyticus*, este cambio fue evidente desde 1997, las cepas aisladas con colonias características de *Vibrio cholerae* sin embargo cuando se dejaban las placas a temperatura ambiente al día siguiente se observaban cambios notorios en cuanto a aspecto morfológico y colorido lo cual se reflejaba en una incapacidad para realizar su aglutinación, esto se explica por la pérdida parcial de su lipopolisacárido membranal, en ese momento se marcaba un cambio adaptativo de este

microorganismo en su entorno, este problema fue abordado inicialmente probando la capacidad de crecimiento con 175 cepas mantenidas en refrigeración de las cuales solo se recuperaron 68, a pesar de haberles proporcionado las condiciones para su crecimiento, estas cepas aisladas fueron pasadas al medio de enriquecimiento, agua peptonada, pH de 9.0 a partir del TCBS con el propósito de reproducir las condiciones de un primoaislamiento recomendado por el método de la Secretaria de Salud el resultado de estas medidas fue la recuperación de únicamente 24 cepas, más tarde se les aglutinó con acriflavina de la cual resultaron solo 6 positivas y a partir de ellas se confirmaron 2 como formas rugosas empleando el método de vapor fluente.

Además a las 24 cepas recuperadas se probaron efectuando cambios en las condiciones fisicoquímicas para su crecimiento tales como pH, temperatura y concentración de cloruro de sodio, este estudio mostró que la temperatura de refrigeración resultaba letal para este microorganismo aún cuando este se encontrara en un ambiente favorable de pH y concentración salina mientras que las temperaturas de 25 °C y 37 °C si permitían su recuperación a valores de pH de 7.0 a 8.5, se encontraron cepas que resistían la acción tóxica de hipoclorito de sodio de 25 y 3125 partes por millón.

Durante 1991 el análisis microbiológico se valoró la respuesta inmune en algunos pacientes que ingresaron a este hospital por la sospecha de este padecimiento, el estudio serológico buscaba identificar el grado de respuesta contra los determinantes antigénicos (aglutinación en tubo y Benenson) que le dan la identidad a los morfotipos Inaba y Ogawa con ello se logró encontrar diferente grado de respuesta en los pacientes, (tablas 7 y 8) así como títulos muy altos para ambos serotipos, una respuesta fue detectada al realizar por esta misma técnica, aunque de mayor sensibilidad y especificidad (tabla 9). Con lo anterior se infiere que desde 1991 se encontraban circulando ambos serotipos en nuestro medio ambiente e infectando a una misma persona. Otro parámetro estudiado fue la presencia de toxina colérica en donde 12 de estos sueros pares se encontraron positivos para toxina colérica, sin títulos para anticuerpos vibriocidas y no solo se debe asociarse a *Vibrio cholerae*, sino también a otros *Vibrios* NO O1 como ha sucedido con el *Vibrio* O: 139, al igual que en el estudio realizado en 1991 en 1998 los resultados expresan la misma información.

En la tabla 11 en donde se tabula la recopilación selectiva de pacientes que ingresaron al servicio de urgencias del HGRN025 entre 1997 y el año 2000 con un cuadro diarreico severo ya que presentaron más de 20 evacuaciones en 24 hs y de las cuales no se recupera ningún agente enteropatógeno, lo que sugiere la presencia

de la forma "viable no cultivable" de *Vibrio cholerae* con lo cual se denotaría otra forma adaptativa de este microorganismo para mantener su sobrevivencia y perpetuar su estado latente y su presencia patógena potencial.

Y finalmente la hipótesis que se postuló en este trabajo sí se cumple ya que la cepa al inicio de la epidemia aislada en 1991 no demostró el mismo comportamiento microbiológico a la cepa aislada hasta 1998, en dónde se crearon diferentes condiciones, principalmente en los cambios fisicoquímicos para lograr el aislamiento seguido de su identificación. Esto debido a los cambios adaptativos que *Vibrio cholerae* realiza para sobrevivir en su entorno.

XIII CONCLUSIONES

1. El método propuesto: H.G.R.No 25 resulto con una alta sensibilidad(16.1%) comparado con el propuesto por la Secretaria de Salud(22.1%) ya que se logró un aislamiento proporcional en comparación con el método propuesto por la OMS.
2. Se determinó el comportamiento inestable presentado por el serotipo Inaba, durante este seguimiento, ya que solo se le aisló al principio de la epidemia durante los ocho primeros meses en comparación con la serovariedad Owaba que se presentó durante los siguientes siete años de la misma.
3. Los resultados obtenidos de las pruebas serologicas nos muestran que durante la epidemia que se presentó en nuestra región podemos ver que tanto la forma serologica Inaba como Ogawa de *Vibrio cholerae* siempre estuvieron circulando ya que las pruebas realizadas en 1991 y en 1998 así lo hacen ver y las dos formas serologicas podrían afectar a un solo individuo al mismo tiempo.
4. Debido a la adaptación que presentó *Vibrio cholerae* a su entorno, se dan cambios morfológicos y fisiológicos evidenciados durante los aislamientos: se identificó inicialmente la forma rugosa con la técnica de acriflavina y más tarde confirmada por la de vapor fluente.
5. Se logró la reversión de las formas rugosas a formas lisas o cultivables cuando se realizaron cambios de pH, temperatura, concentración de salinidad y se mejora el enriquecimiento.
6. Dado que *V.cholerae* presenta formas rugosas o "Viabiles no Cultivables" se debe tener presente que son estados de latencia, sobrevivencia y persistencia y que durante ellos no se pierde su capacidad toxigenica y es por ello que se debe mantener un estado de alerta ante cualquier señal de nuevos brotes.

7. La frecuencia de los serotipos durante este seguimiento fue en 1991 para el serotipo Inaba el 100%, en 1992 se observó la sustitución serológica de Inaba correspondiendo un porcentaje del 8.5% y para Ogawa el 91.5%, manteniendo este en el último el año 2000 reportado en el estado de Tlaxcala.

XIV REFERENCIAS

1. Feeley J.C. Classification of *Vibrio cholerae* Including El Tor vibrios by Infrasubspecific characteristics. J Bacteriol. 1965; 89: 665-670.
2. Soberón G, Kumate J. La cólera, epidemias, endemias. Ed Mc Graw Hill. México D. F. 1993: 83-93.
3. Wachsmuth I K., Et Al. The Molecular Epidemiology of Cholerae in Latin America. J. Infect. Dis. 1993; 167: 621-626.
4. Costerton J.W, Cheng K. J Greesy G. G. Bacterial Biofilms in Nature and Disease Ann. Rev. Microbiol.
5. Barroto JRH. La Ecología de *Vibrio cholerae* Serogrupo O:1 en Ambientes Acuáticos. Rev. Panam. Salud Publica. 1997; 1: 3-8.
6. Morris C., Sztein M., Rice E.W. *Vibrio cholerae* O: 1 Can Assume A Chorine Resistent Rugose Survival Form That is Virulent for Humans. J Infect Dis 1996; 174: 1364-1368.
7. Miller C. Drasor B., Feachem R.J. Response of Toxigenic *Vibrio cholerae* O:1 To Physicochemical Stresses in Acuatic Environments. J Hygiene. 1984; 93: 475 - 495.
8. Faruque SM Albert MJ Mekalanos JJ Epidemiology Genetics and Ecology of Toxigenic. *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 1301-1314.
9. Giono Cerezo S. Et Al Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Vibrio cholerae*. Rev. Lat. Amer. Microbiolol. 1994; 36: 243 - 251.
10. Wachsmuth I.K. *Vibrio cholerae* and Cholerae: Molecular to Global Perspectives. ASM Press, Washington, D. C. 1994.
11. Kay B A C. A. Bopp, and J. G. Wells. 1994. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* O1 from Fecal Specimens. p. 3-26. In Wachsmuth I. K., P, A. Blake, O. Oisvik (ed), *Vibrio cholerae* and Cholerae: Molecular to Global Perspectives. American Society for Microbiology. Washington, D. C. USA.
12. Elliott L, A, C. Kaysner and M. L. Tamplin. 1992. *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* and Other *Vibrio sp.* P. 1111-1140. In FDA Bacteriology Analytical Manual, 7th edition. Food and Drug Administration Washington, D. C. USA.
13. Faruque, S. M., Asadulghain, A. R. M. Abdul Alim, J. Albert, K. M. N. Islam, and J. J. Mekalanos. 1998. Induction of the Lysogenic Phage Encoding Cholera Toxin in

- Naturally Occurring Strains of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infect. Immun.* 66: 3753-3757.
4. Janda J. M., C. Powers, R. G. Bryant, and S.L. Abbot. 1998. Current perspectives on the Epidemiology and Pathogenesis of Clinically Significant *Vibrio spp.* *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 245 - 267.
 5. Faruque, S.M., A. K. Siddique, M.N. Saha, Asadulghani, M.M. Arman, K. Zaman, M. J. Albert, D. A. Sack, and R. B. Sack, 1999. Molecular Characterization of a *Cholerae* in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 37:1313 - 1318.
 6. Kay B.A., C. A. Bopp, and J. G. Wells. 1994. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal Specimenens. P 3 - 36. In Wachsmuth I. K., P.A. Blake, O. Olsvik (ed), *Vibrio cholerae and cholerae : Molecular to global perspectives.* American Society for Microbiol. Washington, D. C. USA.
 7. Faruque S.M., M.L. Albert and J.J. Mekalanos. 1998. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1301 - 1314.
 8. Salyers, A, A. and D.D. Whitt. 1994. *Cholerae (Vibrio cholerae)*. P. 141 - 156. In : Salyers, A.A. and D.D. Whitt (ed) , *Bacterial Pathogenesis. A. Molecular Approach.* American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA.
 9. Vela-Franco L. 1987. Clasificación de síndromes diarreicos en niños. P. 11-16 en: *Síndromes Diarreicos . La Prensa Medica Mexicana. México.*
 10. Kaper J. B., J. G. Morris, JR and M. M Levine. 1995. *Cholera.* *Clin. Microbiol. Rev.* 8:48-86.
 1. Sharma C., M. Thungapathra, A. K. Mukhopadhyay, A. Basu, R. Mitra, I Basu, S. K. Bhattacharya, T. Shimada, T. Ramamurthy, T. Takeda, S. Yamasaki, Y. Takeda, and G. B. Nair. 1998. Molecular Analysis of Non-O1, Non -O139 *Vibrio cholerae* Associated with and Unusual upsurge in the Incidence of Cholera-Like Disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 36:756-763
 2. Gupta S., and R. Chowdhury. 1997. Bile Affects Production of Virulence Factors and Motility of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 65: 1131-1134.
 3. Colwell R. R. J. 1986. Human pathogens in the aquatic environment. *Aquatic Microbiol Ecology.* University of Maryland Sea Grant.
 4. Nature Macmillan Publisher Ltd 2000 Registered No. 785998 England
 5. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Vol. Información preliminar. Vol 1,5, 9,14,15,16,20.