

51
205



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

V N A M

“ DETECCION DE TOXINA COLERICA EN CEPAS DE
Vibrio cholerae 01 Y NO 01 ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

LETICIA DEL CARMEN MOGUEL PECH

ASESORES: Q. F. I. ANDREA BECERRIL OSNAYA

DRA. SILVIA GIONO CEREZO

CUAUTITLAN, ZCALTIL, EDO. DE MEX.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	PAG
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	
ANTECEDENTES	3
AGENTE INFECCIOSO	6
TAXONOMIA	7
PATOGENICIDAD	10
ECOLOGIA Y MECANISMOS DE TRANSMISION	15
DIAGNOSTICO	16
<i>Vibrio cholerae</i> NO 01	20
PRUEBAS PARA DETECCION DE TOXINA	22
ENSAYO INMUNO ENZIMATICO (ELISA)	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES	29
METODOS	32
RESULTADOS	44
DISCUSION	67
CONCLUSIONES	71
APENDICE	72
BIBLIOGRAFIA	74

INDICE DE TABLAS

	PAG
TABLA 1. SEROTIPOS DE <i>Vibrio cholerae</i>	9
TABLA 2. DIFERENCIACION BIOQUIMICA DE <i>Vibrio cholerae</i>	18
TABLA 3. PRUEBAS PARA DIFERENCIACION ENTRE BIOTIPOS EL CLASICO Y EL TOR	19
TABLA 4. CARACTERISTICAS DE LAS ENTEROTOXINAS DE <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGENICA 23	23
TABLA 5. LOCALIDADES DONDE FUERON AISLADAS LAS CEPAS DE <i>Vibrio cholerae</i> 01	51
TABLA 6. LOCALIDADES DONDE FUERON AISLADAS LAS CEPAS DE <i>Vibrio cholerae</i> NO 01	52
TABLA 7. NUMERO DE CEPAS SELECCIONADAS PARA EL ENSAYO DE ELISA CON PEROXIDASA Y FOSFATASA EN LA SELECCION DE CEPAS TOXIGENICAS	53
TABLA 8. PORCENTAJE TOTAL DE <i>Vibrio cholerae</i> 01 Y NO 01 TOXIGENICOS Y NO TOXIGENICOS PRBADOS POR EL METODO DE ELISA	54
TABLA 9. PORCENTAJE DE <i>Vibrio cholerae</i> 01 Y NO 01 TOXIGENICOS Y NO TOXIGENICOS PRBADOS POR EL METODO DE ELISA (PEROXIDASA)	55
TABLA 10. PORCENTAJE TOTAL DE <i>Vibrio cholerae</i> 01 Y NO 01 TOXIGENICOS Y NO TOXIGENICOS PRBADOS POR EL METODO DE ELISA (FOSFATASA)	56
TABLA 11. DISTRIBUCION DE MUESTRAS DE <i>Vibrio cholerae</i> 01 DE ACUERDO AL SEROTIPO	57
TABLA 12. DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS DE HUMANOS DE ACUERDO AL SEXO	58
TABLA 13. DISTRIBUCION DE ACUERDO A EDAD EN MUESTRAS HUMANAS	59
TABLA 14. ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE ELISA (PEROXIDASA)	60
TABLA 15. ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE ELISA (FOSFATASA)	61
TABLA 16. RESULTADOS POR LAS CEPAS PRBADAS POR AGLUTINACION CON LATEX (ELISA (PEROXIDASA Y FOSFATASA)	62
TABLA 17. ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CONSIDERANDO COMO METODO DE REFERENCIA EL DE AGLUTINACION CON LATEX (OVID) Y METODO DE ESTUDIO ELISA (PEROXIDASA)	63

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 19. ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CONSIDERANDO COMO METODO DE REFERENCIA EL DE AGLUTINACION CON LATEX (OXOID) Y METODO DE ESTUDIO ELICA (FOSFATASA)	64
TABLA 19. RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS Y SEROLOGIA REALIZADAS A 12 CEPAS DE <i>Vibrio cholerae</i> NO 01	65
TABLA 20. RESULTADOS DE API REALIZADOS A 12 CEPAS DE <i>Vibrio cholerae</i> NO 01	66

INDICE DE FIGURAS

	PAG
FIGURA 1 CLASIFICACION DE <i>Vibrio cholerae</i>	8
FIGURA 2 MECANISMO DE ACCION DE LA TOXINA	14
FIGURA 3 AISLAMIENTO DE <i>Vibrio cholerae</i>	17
FIGURA 4 METODO DE PRODUCCION DE LA TOXINA	33
FIGURA 5 DETERMINACION DE TOXINA COLERICAS EN FILTRADOS POR EL METODO DE ELISA	36
FIGURA 6 AGLUTINACION CON FITOAGLUTININA	38
FIGURA 7 PRUEBAS BIOQUIMICAS Y SEROLOGIA	40
FIGURA 8 SISTEMA API 20C	42
FIGURA 9 COMPARACION DE 4 REGULADORES EN LA SENSIBILIZACION DE LAS PLACAS CON GM1	46
FIGURA 10 COMPARACION DE 2 TEMPERATURAS EN LA SENSIBILIZACION DE LAS PLACAS CON GM1	47
FIGURA 11. TITULACION DEL CONJUGADO DE PEROXIDASA	48
FIGURA 12. TITULACION DE LA ANTITOXINA DE CABRA	49
FIGURA 13. TITULACION DEL CONJUGADO DE FOSFATASA	50

Abreviaturas utilizadas en el presente trabajo

µl: microlitros
°C: Grados centígrados
TCBS: Medio de tiosulfato citrato sales biliares sacarosa
MIO: Medio de Movilidad, Indol, Ornitina
LIA: Medio de Lisina hierro agar
TSI: Triple azúcar hierro agar
CT: Toxina colérica
LT: Toxina termolábil
ELISA: Ensayo Inmuno enzimático
HIA: Agar infusión corazón
BAB: Base para agar sangre
CST: Caldo soya tripticasa
CP: Caldo peptonado
OX: Prueba de oxidasa
SS: Solución salina 0.85%
SNC: Suero normal de conejo
VP: Vapor fluente
ONPG: Orto nitro fenil
ADH: Arginina descarboxilasa
LDC: Lisina descarboxilasa
ODC: Ornitina descarboxilasa
Cit: Crecimiento en Citrato
H₂S: Producción de Acido sulfhídrico
Ure: Urea
TDA: Triptófano
Ind: Indol
VP: Voges- Proskauer, producción de acetoina
Gel: Hidrólisis de Gelatina
Glu: Fermentación de Glucosa
Man: Fermentación de Manosa
Ino: Fermentación de Inositol
Sor: Fermentación de Sorbitol
Rha: Fermentación de Ramnosa
Sac: Fermentación de Sacarosa
Mel: Fermentación de Melobiosa
Ara: Fermentación de Arabinosa
NO₂: Producción de Nitratos
mm. milímetros
µg. microgramos
ml. mililitros
h. horas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN

En junio de 1991 ingresó el cólera en nuestro país, dicha enfermedad se caracteriza por la aparición de una diarrea acuosa y severa, su agente causal es *Vibrio cholerae*, bacteria que produce una toxina que al unirse a receptores específicos estimula la secreción de agua y electrolitos.

Se probaron 1223 cepas de *Vibrio cholerae* por el método de ELISA para determinar la producción de toxina. 900 cepas correspondieron a *Vibrio cholerae* O1 y 323 a *Vibrio cholerae* NO O1.

Para la estandarización de la técnica se probaron 4 reguladores para la sensibilización de las placas, se eligió el PBS más desoxicolato de sodio, también se probaron dos temperaturas de incubación en la sensibilización eligiendo 37°C, la dilución de trabajo de la antitoxina utilizada fue de 1:1000.

Se probaron 2 conjugados: fosfatasa y peroxidasa, su dilución de trabajo fue de 1:1000. 587 cepas se probaron con el conjugado de peroxidasa y 636 con fosfatasa.

Las cepas trabajadas eran de muestras humanas (830) y muestras ambientales(331).

El serotipo predominante fue Inaba, en cuanto a la distribución por sexo se obtuvo un mayor porcentaje en el sexo masculino.

Todas las cepas de *Vibrio cholerae* O1 fueron toxigénicas y las de *Vibrio cholerae* NO O1 trabajadas fueron no toxigénicas.

De los dos conjugados probados el que proporcionó mayor sensibilidad y especificidad fue el de fosfatasa, se obtuvo un sensibilidad de 96.0% y una especificidad de 91.0%.

INTRODUCCION

El cólera es una infección intestinal que se caracteriza por la aparición de una diarrea acuosa severa que lleva rápidamente a la deshidratación y acidosis metabólica y en enfermos no tratados se puede producir la muerte dentro de las 24 horas de su aparición (1b)

El agente causal es el *Vibrio cholerae* O1, bacteria que infecta solamente a los seres humanos, es capaz de sobrevivir por largos periodos fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos y templados. En el agua permanece viable unas cuantas horas, sin embargo, si esta se encuentra contaminada con materia orgánica y tiene las condiciones de alcalinidad adecuadas puede hacerlo durante varias semanas (21)

El cólera se transmite por la ingestión de agua o alimentos contaminados con diarrea o vómito de los enfermos (21)

El diagnóstico clínico de la enfermedad se hace en base a la presencia de diarrea y vómito característicos. El diagnóstico de laboratorio se lleva a cabo mediante el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1 a partir de muestras diarreicas o vómito del paciente, sin embargo son de gran ayuda las pruebas serológicas para determinar la presencia de anticuerpos contra el microorganismo y su toxina (21)

El presente trabajo tiene como finalidad determinar en las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y NO O1 aisladas de humanos la producción de toxina colérica por ser, dicha toxina la causante de la diarrea característica de la enfermedad, esta determinación de toxigenicidad se realiza mediante la técnica de ELISA, así mismo se estudiaron cepas aisladas de alimentos, aguas negras y aguas blancas por ser el vehículo principal de transmisión de la enfermedad.

GENERALIDADES

ANTECEDENTES.

El cólera se conoce en la región asiática desde los tiempos más remotos; fue descrita antes de Cristo por Sursuto, Hipócrates, Galeno y Wang-Shooho(11)

Apareció en Europa por primera vez en el siglo XIX. Las rutas comerciales fueron la vía por la que la enfermedad pasó de la India a Europa, África y América del Norte. En cada país por el que pasaba la enfermedad, se presentaban miles de enfermos, de los cuales morían aproximadamente la mitad (11,37)

La segunda pandemia alcanzó Europa y llegó a América en 1832. Una de las ciudades más afectadas en esa época fue Nueva York.

La sexta pandemia (1903-1923) se dispersó principalmente en Asia, fue limitada en África y Europa y no llegó a afectar el Hemisferio Occidental (37).

La séptima pandemia comenzó en 1961 y llegó hasta la Indonesia y se extendió a otros países del Asia Oriental (6,34).

Vibrio cholerae fue descrito primeramente y nombrado en 1854 por Pacini, 32 años después Koch lo aisló y en su descripción introduce el término de "Kommabacillus" por la morfología del microorganismo (18).

Posteriormente Gotschlich logró aislar vibrios en cadáveres de peregrinos examinados en una estación de cuarentena llamada El Tor, en Egipto. Este tipo de *Vibrio cholerae* denominado El Tor es el responsable de la séptima pandemia (34).

En 1970 el cólera invadió el África Occidental y se dispersó rápidamente a lo largo de las costas y vías fluviales hasta penetrar tierra adentro. La enfermedad es ahora endémica en ese continente especialmente en las zonas costeras donde la temperatura, pluviosidad y densidad de población contribuyen a su persistencia, y en los años siguientes el cólera penetró a los países industrializados (6).

En América el cólera originó epidemias durante el siglo XIX y desapareció la transmisión durante 100 años. En 1978 se informó el aislamiento de *Vibrio cholerae* en el drenaje en Río de Janeiro, Brasil; sin embargo no se observaron infecciones en seres humanos. En 1988 se reportaron dos casos de diarrea en turistas norteamericanos que visitaron Perú a los que se les aisló *Vibrio cholerae* O1 El Tor serotipo Ogawa no productores de toxina. Estos datos sugieren la presencia de *Vibrio cholerae* O1 en Sudamérica, varios meses antes de su aparición en forma epidémica en 1991, esta epidemia inició en Perú, se distribuyó a Ecuador, Colombia, Brasil, Chile, Estados Unidos y México (34).

En México la enfermedad ingresó el 27 de junio de 1883 en Saltillo y se presentó después en Campeche, Yucatán y Tampico, donde murieron 140 personas diarias (34).

Se propagó en San Luis Potosí y Guanajuato durante ese año, en agosto se registró en la Ciudad de México y Guadalajara. Entre Agosto y Septiembre se presentó en Puebla y Oaxaca.

El cólera originó epidemias en 1849 y 1854 en todo el territorio, estimándose que murieron cerca de dos mil personas. La enfermedad tuvo un comportamiento endémico de 1855 a 1871 (34).

En 1882 de nuevo ocurrió la epidemia en Chiapas, Tabasco y Oaxaca. En esta última se observó que la propagación siguió el trayecto de las rutas comerciales y el sentido de las corrientes de los ríos. Juchitán fué

invadido al final y ahí se logró extinguir la enfermedad a mediados de 1883, por medio de una incomunicación rigurosa de este lugar (34).

En junio de 1991 surgió un caso de cólera en San Miguel Totolmaloya Municipio de Sultepec, Estado de México, de aquí la epidemia se extendió al Valle de Tula (Hidalgo), Huasteca (Hidalgo, Veracruz), Ciudad Hidalgo (Chiapas), Miahuatlán (Puebla), Tabasco, Distrito Federal, Oaxaca, Tajín (Veracruz), Puerto de Veracruz, Estado de México, Mérida (Yucatán), Umán (Yucatán), Morelos, Michoacán, Guerrero, en estas entidades los brotes han sido en forma de epidemia o casos aislados (34).

AGENTE INFECCIOSO

El agente causal del cólera es *Vibrio cholerae*, bacteria Gram negativa la cual pertenece a la familia *Vibrionaceae* en la que se incluyen cuatro géneros:

- A) *Vibrio*
- B) *Aeromonas*
- C) *Plesiomonas*
- D) *Photobacterium*

(3,18)

El género *Vibrio* son bacterias Gram negativas que miden 0.5 μm X 3 μm , con morfología al microscopio de "coma", son móviles por la presencia de un flagelo polar único, son anaerobios facultativos, poseen metabolismo fermentador y respiratorio, para su crecimiento requieren ser estimulados con NaCl además de requerir una fuente de carbohidratos, nitrógeno inorgánico, azufre, fósforo, minerales, buffer adecuado. Crecen a pH de 7.0, pero toleran pH alcalino de 9.0 (2,16).

Su hábitat es generalmente acuático con variedad de salinidad, son muy comunes en ambientes marinos, algunas especies se encuentran sobre la superficie y el contenido intestinal de animales marinos, puede encontrarse en agua fresca en donde sobrevive más horas y algunas semanas si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica y tiene un pH entre 6 y 9. Es susceptible a la desecación, la ebullición, el cloro, otros desinfectantes y a las tetraciclinas (21).

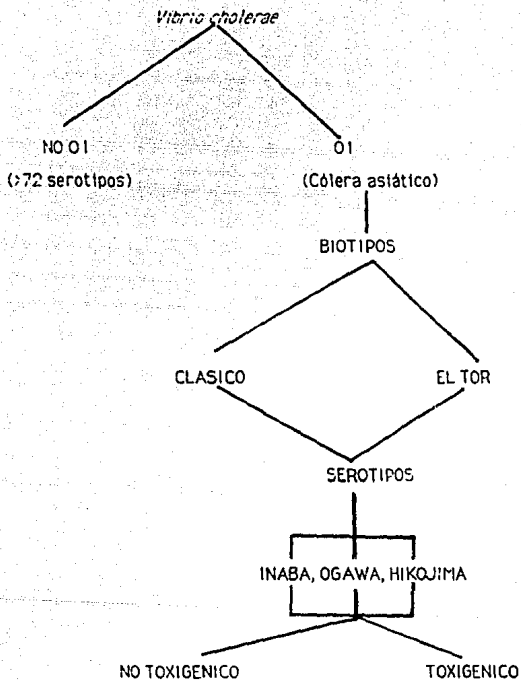
La mayoría de las cepas son oxidasa positiva y crecen entre 18 y 37°C (16).

TAXONOMIA

El organismo causal del cólera ha sido llamado *Vibrio cholerae* "O" grupo 1, este reacciona con el antisuero somático del grupo O1, mientras que otros vibrios bioquímicamente iguales a las cepas de *Vibrio cholerae* O 1 pero que no aglutinan con el antisuero para *Vibrio cholerae* O1 en el pasado han sido referidos como vibrios no aglutinables (NAGs) o como vibrios no coléricos, pero en la actualidad a estos vibrios se les denominan *Vibrio cholerae* no O1, en este grupo se incluyen las otras especies de *Vibrio*. *Vibrio cholerae* del grupo no O1 incluyen alrededor de 72 serotipos (4).

El antígeno O somático es un polisacárido típico de las bacterias Gram negativas, componente de la superficie de la célula, las porciones lipídicas tienen actividad endotóxica y la especificidad antigénica depende de los polisacáridos, este antígeno es importante en el diagnóstico a diferencia del antígeno H que es compatible con otros microorganismos (2,16).

Las cepas de *Vibrio cholerae* son divididas en dos biotipos: el clásico y El Tor, serológicamente los biotipos se subdividen en serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima (Figura 1)(Tabla 1) (3,16).



Ref: 21

FIGURA 1. CLASIFICACION DE *Vibrio cholerae* EN BIOTIPOS Y SEROTIPOS

TABLA 1

SEROTIPOS DE *Vibrio cholerae* O1 BASADOS EN ANTIGENOS SOMATICOS

serotipo	Antígeno presente	Aglutinación con suero absorbido	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima	A, B, I	+	+

Tomado de 3

PATOGENICIDAD

Como otras enfermedades infecciosas, el desarrollo del cólera depende de una interacción entre el hospedero y el microorganismo.

Los mecanismos de defensa del hospedador y los factores de virulencia del microorganismo son importantes en la patogénesis del cólera. Entre los mecanismos de defensa del hospedador se tienen:

- Saliva
- Acidez gástrica
- Peristaltismo intestinal
- Flora normal
- Inmunoglobulinas intestinales (28)

La adherencia a la superficie intestinal y la producción de la toxina son dos factores necesarios para la patogénesis. La motilidad es también un factor de virulencia para *Vibrio cholerae*. Se ha observado que las cepas inmóviles son menos virulentas que las cepas móviles.

Las cepas virulentas también producen proteínas extracelulares incluyendo:

Enterotoxina

Hemaglutininas

Endotoxina

Enzimas

Neuraminidasa

Mucinas

Proteasa

(28).

Se ha demostrado que este microorganismo penetra a la mucosa intestinal y ataca las microvellosidades de las células epiteliales del borde de cepillo (28)

La movilidad, la temperatura y algunos cationes alteran la adherencia que es otro factor de patogenicidad de *Vibrio cholerae*(28).

Vibrio cholerae elabora una exotoxina (toxina colérica o colerágeno) que se une a receptores específicos sobre la mucosa intestinal y estimula la secreción de electrolitos y agua de las células, esta toxina es la responsable de la diarrea (13,26).

De acuerdo a estudios genéticos se ha demostrado que la producción de toxina es codificada por un gen de la bacteria (7,15).

La toxina colérica esta compuesta de tres subunidades:

- A1
- A2 y
- B

Su peso molecular es de 84,000 D, la subunidad A1 posee un peso molecular de 22,000-23,000 D A2 de 2,500-5,000 D y la subunidad B con un peso molecular de 11,000-14,000D (5 subunidades B idénticas)(12,13,28).

La subunidad biológicamente activa es A(o H "heavy"), está compuesta de una molécula de A1 y A2 que se encuentran unidas por un único puente disulfuro . El complejo subunidad A esta unido de una forma no covalente a 4 ó 6 subunidades B (o L "light") (12,13,28).

La subunidad B que es la responsable de la unión de la toxina a las membranas celulares, contiene 2 residuos de cistina que pueden formar puentes intrasubunidad, esta subunidad constituye el toxoide colérico o coleragenoide, el cual carece de actividad tóxica pero es capaz de unirse a la membrana celular (12).

La subunidad A1 es un pobre inmunógeno y no es neutralizada por el antisuero anti-toxina colérica, esta subunidad es responsable de toda la actividad tóxica de A, y la subunidad A2 sirve unicamente para estabilizar el complejo A antes de que actue sobre la célula (12,28).

El primer evento de la toxina colérica sobre las células intestinales es rápido, es la unión hermética a la membrana celular; se ha sugerido que el gangliósido GM1 (galactosil N-acetil galactosaminil sialosil-galactosil - glucosil cerámico) es el receptor natural de la toxina colérica. El número de sitios de unión de la toxina colérica (GM1) en varias células de diferentes especies va de un intervalo de $100-10^7$ sitios de unión, sin embargo la constante de asociación está cerca de $10^{-9} M$ (12).

Los gangliósidos son sustancias anfipáticas que consisten de un cerámico hidrofóbico y un oligosacárido, el cual contiene uno o más residuos de ácido siálico. En las células, el cerámico lipofílico está ubicado en la mitad externa de la membrana plasmática, mientras que el carbohidrato sale de la superficie celular (12).

La subunidad B es la responsable de la unión de la toxina colérica al GM1; se propone que se dan cambios conformacionales que dan como resultado la exposición de las regiones hidrofóbicas ocultas de esta subunidad, que son capaces de unirse con proteínas hidrofóbicas o componentes lipídicos de la membrana plasmática (12)

Se proponen dos mecanismos por los cuales la subunidad B se ubica parcialmente en la membrana, lo que puede conducir a la entrada de la subunidad A:

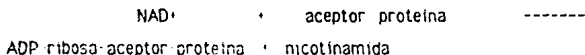
1. La subunidad B forma un canal hidrofóbico a través de la membrana por lo cual puede pasar la subunidad A.
2. Entre la subunidad B y un componente de la membrana, se produce una interrelación hidrofóbica que facilita la entrada, de la subunidad A a la membrana interna. A1 se libera por una reducción intracelular con glutación del enlace disulfuro entre A1-A2 (12).

La neuraminidasa producida por *Vibrio cholerae* puede hidrolizar los oligosialosil gangliósidos de GM1, lo cual es importante ya que se cree

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incrementa el número de receptores en las células intestinales para la interacción de la toxina (12).

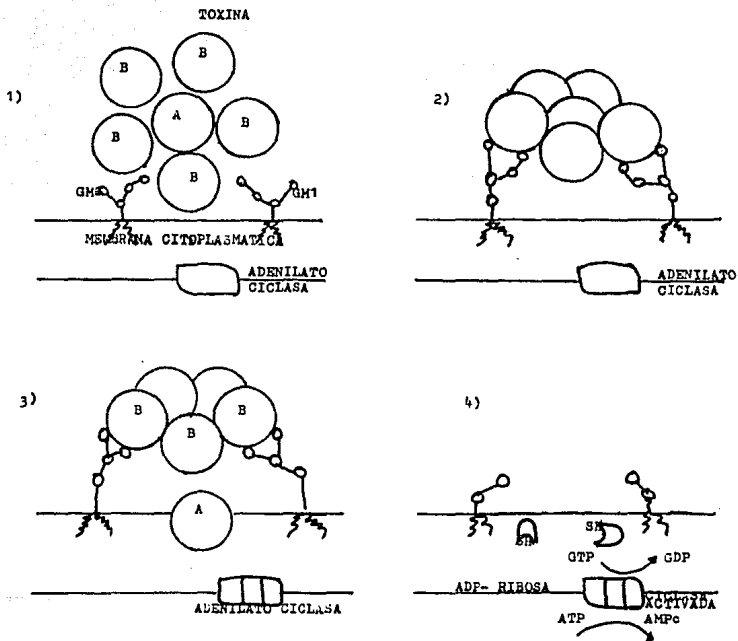
La toxina ejerce sus efectos sobre el intestino delgado *in vivo* y sobre una variedad de células de otros organismos *in vitro* a través de la activación de la adenilato ciclasa. La acción de la toxina es lenta y permanente, posee una actividad de ADP ribosil transferasa ya que cataliza la reacción:



La proteína ADP-ribosilada, ha sido identificada como una proteína unida al guanidil nucleótido; al parecer la modificación de esta proteína ribosilada es la responsable de los cambios en la adenilato ciclasa que induce la toxina colérica (Figura 2) (12).

La elevación del AMPc intracelular causa un incremento en el potencial eléctrico de la membrana y un decremento en la absorción de sodio y se observa un cambio en el transporte neto de absorción de cloro. Estos cambios en los flujos de cloro y sodio dan como resultado un aumento en la fuerza osmótica que provoca la secreción de agua (12).

Vibrio cholerae O1 no toxigénico puede ser capaz de multiplicarse en tejido humano y causar infecciones extraintestinales (15).



TOMADO DE 27

FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS EVENTOS EN LA ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA POR LA TOXINA COLERICA

ECOLOGIA Y MECANISMOS DE TRANSMISION

El reservorio natural es el hombre aunque también se sugieren reservorios ambientales. El cólera sigue un ciclo de transmisión hombre-medio ambiente-hombre.

La transmisión se presenta normalmente por la ingestión de agua o alimentos contaminados con vómitos o heces del paciente y en menor grado de persona a persona, por contacto directo, las manos sucias o las moscas. Los organismos *El Tor* pueden persistir en el agua por períodos prolongados(21).

La dosis infecciosa es variable. El período de incubación es de unas cuantas horas a cinco días, generalmente 2 a 3 días. El período de transmisibilidad dura mientras se mantega el estado de portador que generalmente es de unos cuantos días, aunque puede ser de varios meses; antibióticos como la tetraciclina acortan el periodo de transmisibilidad (21).

DIAGNOSTICO

Para el aislamiento de *Vibrio cholerae* cuando se trata de materia fecal se puede tener la muestra en un medio de transporte (Cary-Blair), si es que no se puede inocular inmediatamente en el agar selectivo (Figura 3)(2).

Se puede utilizar el agua peptonada alcalina que es un caldo de enriquecimiento útil en especial, para la detección de un número pequeño de *Vibrio cholerae*. Este caldo debe ser subcultivado al medio selectivo tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS) después de no más de 8 horas de incubación a 35-37°C para prevenir el sobrecrecimiento de las otras bacterias (2,16).

Después de 18-24 h de incubación en el medio de TCBS se pueden observar colonias amarillas, lisas y brillantes de 2-4 mm de diámetro con centro opaco y periferia transparente (17).

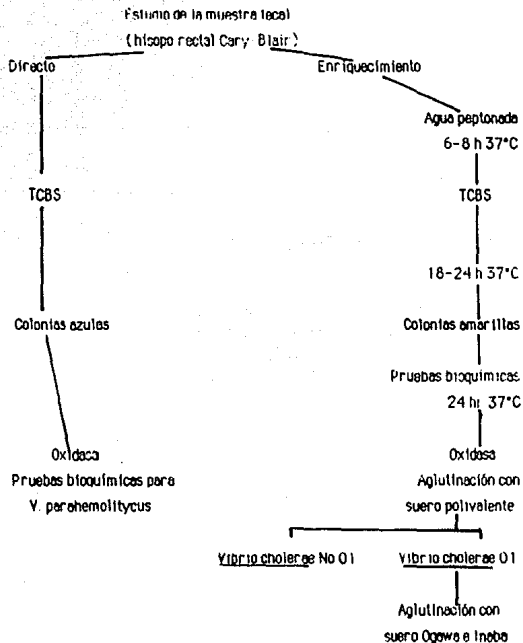
El agar gelatina (AG) también sirve como medio de aislamiento primario donde se observan colonias translúcidas y brillantes rodeadas de un halo opaco (por licuación de la gelatina) (21,17).

Si se tienen colonias sospechosas de *Vibrio cholerae* se procede a realizar lo siguiente:

- A) Pruebas bioquímicas (MIO, LIA, TSI, Arginina, Oxidasa)
- B) Confirmación serológica (Suero Polivalente O1, Sueros Monovalentes Ogawa e Inaba)

(Tabla 2) (21).

Para poder realizar una diferenciación entre los biotipos clásico y El Tor se realizan pruebas como son: Voges-Proskauer (producción de acetoina), resistencia a polimixina B, aglutinación de glóbulos rojos de pollo, hemólisis de eritrocitos, lisis por bacteriófago Clásico IV (Tabla 3) (3,18).



Ref: 21

FIGURA 3. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

TABLA 2Diferenciación bioquímica de *Vibrio cholerae*

	<i>VIBRIO cholerae</i> O1	<i>VIBRIO parahaemolyticus</i>
TSI	A(R)/A	R/A
Gas de glucosa	-	-
Glucosa	A	A
Lactosa	A	-
Sacarosa	A	-
Lisina	+	+
Arginina	-	-
Oxidasa	+	+

A= ácido

R= alcalino

- = Negativo

+ = Positivo

Ref:21

TABLA 3

Pruebas para diferenciación entre biotipos el clásico y El Tor

	El Tor	Clásico
Voges -Proskauer	+	-
Polimixina B 300 U	R	S
Agglutinación de glóbulos rojos de pollo	+	-
Hemólisis de eritrocitos	+	-
Lisis por bacteriófago Clásico IV	R	S

R= Resistente

S= Sensible

Ref: 3,18

Vibrio cholerae NO 01

Las cepas del serogrupo NO 01 no se clasifican en las especies de *Vibrio cholerae*, pero en el pasado eran reportados como "Vibrios no aglutinables" "NAGs" o Vibrios no coléricos. En la actualidad son clasificados como *Vibrio cholerae* NO 01.

Estos organismos pueden causar casos esporádicos de gastroenteritis (3).

Se han propuesto sistemas de serotipificación para estos vibrios, además de utilizar la clasificación de Heiberg basada en la fermentación de Sucrosa, Arabinosa y Manosa (32).

En cuanto a la patogénesis de la infección intestinal, se han postulado 3 mecanismos de patogenicidad:

- 1) Producción de una toxina similar a la colérica (positiva en asa ligada, células CHO).
- 2) Producción de una enterotoxina estable al calor (positiva en asa ligada y ratón infante).
- 3) Invasividad.

Algunas cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 no dan resultado positivo a ninguna de las pruebas anteriores (3).

La toxina similar a la colérica (CT-like) producida por algunas cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 es muy similar pero no idéntica a la toxina colérica.

Algunas cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 aparentemente producen más de una toxina(4).

La habilidad de *Vibrio cholerae* NO 01 para producir un toxina similar a la colérica tiene relevancia clínica. En un estudio realizado (Spira & Daniel) se mostró que 6 pacientes con cepas toxigénicas tuvieron una enfermedad más severa que 12 que mostraron aislamiento de cepas no toxigénicas (4).

Durante 1966-1967 en la Ciudad de México se aislaron cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 en heces de niños y adultos que presentaban diarrea, posteriormente en 1985 en Can-Cún se realizó un estudio en 134 personas enfermas y se aislaron 22 cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 (8,35).

Los síntomas que se presentan en la gastroenteritis producida por *Vibrio cholerae* No 01 son :

Diarrea (100% casos)

Fiebre (71% casos)

Naúseas y vómito (21 % casos)

Sangre en heces (25% casos) (25).

Esta bacteria se puede aislar de pacientes con septicemia, de infecciones en vías urinarias, tracto respiratorio, heridas, oído (3).

Vibrio cholerae NO 01 está distribuido en Europa, Asia y Estados Unidos. Se encuentran en aguas residuales, aguas contaminadas, alimentos marinos y animales. Estos organismos se asocian con agua de pH superior a 7.5 y salinidad de 0.01 (100mg NaCl/ litro) o más. Son más numerosos durante los meses de verano y no se asocian necesariamente con aguas residuales contaminadas (4).

El reservorio natural de *Vibrio cholerae* NO 01 que causa enfermedad en el humano no se conoce.

El humano puede ser el principal reservorio; el microorganismo en alimentos y agua que causa enfermedad puede surgir de humanos infectados (4).

El período de incubación varía de 20-30 horas y 5-38 horas..

La enfermedad gastrointestinal causada por *Vibrio cholerae* NO 01 probablemente se presenta en varias ciudades pero esto no ha sido reportado (4).

PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE TOXINA

Vibrio cholerae y *Escherichia coli* enterotoxigénica producen enfermedades diarreicas en el humano y en varias especies animales. *Escherichia coli* produce una toxina termolábil (LT) que posee muchas propiedades similares a la toxina colérica (Tabla 4), por lo cual se han realizado diversas pruebas para la identificación de estas toxinas, se cuentan con modelos animales, cultivos celulares y pruebas inmunológicas (27)

El primer ensayo desarrollado para la detección de la toxina colérica fue el asa ligada de conejo, otras pruebas con las que se cuenta son las de conejo infante, ratón recién nacido, piel de conejo (36).

En cuanto a cultivos celulares se pueden utilizar:

- Células Y-1,
- Células CHO y
- Células Vero (9,24,33).

En inmunodiagnóstico se tienen pruebas tales como:

- Inmunohemólisis pasiva
- Inmunohemólisis radial
- Inhibición de la inmunohemólisis
- Coaglutinación con la proteína A de *Staphylococcus*
- Radio inmuno ensayo
- ELISA
- Ensayo de Biken (Prueba de precipitación) (33,36).

La hibridización del DNA es un nuevo método de diagnóstico que utiliza sondas genéticas que detectan los genes que codifican la producción de la enterotoxina (19).

TABLA 4

Características de las enterotoxinas de *Vibrio cholerae*
y de *Escherichia coli* enterotoxigena

Propiedad	CT	LT
Peso molecular	84,000	91,000
Subunidades	A1, A2 y 5B	A y B
Sensibilidad al calor	+	+
Sensibilidad a la tripsina	+	+
Sensibilidad al ácido	+	+
Naturaleza química	Proteica	Proteica
Receptor en mucosa	GM1	GM1
Acción bioquímica	Activa adenilato ciclasa	
Acción fisiológica	Prolongada hipersecreción	
Inmunogénica	+	+
Neutralizada por antiLT	+	+(1/3)
por antiLT	+(1/100)	+
por GM1	+	+
Control genético	Cromosómico	Plásmido
Métodos de ensayo	Modelos animales, cultivos celulares métodos inmunológicos	
Serotipos	Ogawa, Inaba	Los más comunes

Tomado de 27,36

ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO (ELISA)

El ensayo inmuno enzimático se utiliza ampliamente ya que es una prueba sensible y específica además de rápida y sencilla de leer. Esta prueba se basa en una reacción antígeno anticuerpo que se pone de manifiesto mediante un conjugado inmunoenzimático (29,38).

Existen dos variedades de ensayo inmuno enzimático: el sistema homogéneo y el sistema heterogéneo. En el ensayo homogéneo la enzima se conjuga con un hapteno, este ensayo no requiere etapas o medios físicos para separar los complejos Ag-Ac, formados específicamente, de los anticuerpos o antígenos que permanecen libres en el sistema y que no han intervenido en la reacción. El ensayo se basa en la inhibición o activación de las enzimas, por la interacción con anticuerpos y se utilizan generalmente enzimas de bajo peso molecular (10).

En 1971, Engvall y Perlman desarrollaron el procedimiento de laboratorio que denominaron radioinmuno-sorbent Assay, en donde moléculas de antígeno marcadas radiactivamente interactuaban con anticuerpos inmovilizados en soportes como celulosa o Sephadex, después de que se lleva a cabo la reacción Ag-Ac, se aprovecha el recurso de que estos complejos queden retenidos a la fase sólida y, mediante lavados, se eliminan los anticuerpos o antígenos que no intervenían en la reacción. El hecho de requerir medios físicos para separar la fracción libre de la unidad, es lo que clasifica al sistema como heterogéneo, posteriormente se describió la conjugación con enzimas, en lugar de radioisótopos. A este procedimiento, lo denominaron ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay" (10).

Dentro del ensayo heterogéneo existen diversas modalidades, se cuenta con el método indirecto, método competitivo, método "sandwich" de doble anticuerpo, método de inhibición.

Una de las aplicaciones de este ensayo es la ayuda en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, a comienzos de la década de 1970 se determinaron anticuerpos contra *Salmonella* y *Vibrio* mediante ELISA posteriormente se aplicó a la serología de *Brucella*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Chlamydia* y *Treponema* y para infecciones micobacterianas y rickettsiales; la respuesta humoral a las vacunas de tétanos y difteria, ha sido también evaluada por medio del ELISA, la identificación de material antigénico, derivado de agentes infecciosos en diferentes fluidos biológicos se puede realizar mediante la técnica de ELISA (10, 30).

El primero en describir una ELISA para la detección de CT o LT fue Yolken en 1977 (38), posteriormente Sack en 1980 introdujo el uso del Gangliósido GM1 (31) y en 1983 Ristaino presenta un ensayo mejorado de ELISA utilizando como receptor el GM1 (29).

Para llevar a cabo esta prueba se requiere de un medio en el cual se va a favorecer la producción de la toxina, se han desarrollado varios medios entre los que se tienen:

Mundell Casaminoácidos (29)

Biken (29)

Sack casaminoácidos con extracto de levadura (29)

Evan casaminoácidos (29)

AKI (1985) (14)

De acuerdo a estudios nutricionales en cuanto a producción y liberación de la toxina, se ha observado que el medio debe contener asparagina y glucosa como soporte del crecimiento bacteriano, sin embargo si el medio no es amortiguado adecuadamente y se obtienen condiciones ácidas, la toxina es producida pero no es liberada, para obtener una máxima liberación el pH debe ser de 7.5 o arriba de este (14,17).

También se ha observado que el extracto de levadura es un componente del medio importante, al igual que el bicarbonato de sodio que parece estimular la producción de CT (17).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ingreso del cólera en junio de 1991 a nuestro país trajo consigo la implantación de técnicas para la confirmación del diagnóstico de *Vibrio cholerae*, una prueba muy importante es la determinación de toxina, debido a que es la causante de la diarrea, por ello se eligieron cepas de *Vibrio cholerae* O1 y NO O1 aisladas de humanos y muestras ambientales para realizarles la prueba de toxigenicidad por medio de la técnica de ELISA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL :

Determinar la producción de toxina colérica en cepas de referencia de *Vibrio cholerae* y de cepas aisladas en el INDRE pertenecientes al grupo O1 y NO O1 aisladas de materia fecal, aguas negras y aguas para consumo humano mediante la técnica de ELISA.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- A) Determinación de toxina colérica en cepas de *Vibrio cholerae* O1 y NO O1 por el método de ELISA

- B) Estandarizar la prueba de ELISA con GM1 para la identificación de cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae* O1 y NO O1

- C) Verificar si las cepas de *Vibrio cholerae* NO O1 sospechosas de producir toxina corresponden a cepas rugosas de *Vibrio cholerae* O1

MATERIALES

A. EQUIPO.

Centrifuga

Autoclave

Lector de El ISA

Balanza analítica

Balanza granataria

Potenciómetro

B REACTIVOS Y MATERIAL EN GENERAL:

Material comunmente utilizado en el lab. de microbiología

Viales Sumi

Multipipeta de 50-200ul

Pipeta eppendorf 10-100ul

Viales eppendorf 2 ml

Tubos de centrifuga Corning 50 ml

Placas Foster fondo en "V" No 3897

Placas Corning 48 pozos fondo en "U" (polystyrene) No 25802

Acido cítrico

Acido clorhidrico

Acido sulfúrico

Azida de sodio

Nitrate de sodio (J. T. Baker)

Cloruro de magnesio (J. T. Baker)

Cloruro de sodio (J. T. Baker)

Dietanolamina (J.T. Baker)

Desoxicolato de sodio (Difco)

Fosfato de sodio dibásico

Fosfato de sodio monobásico

Fosfato de potasio

Glucosa

Hidróxido de sodio

Metanol 65%

Peróxido de hidrógeno

Agua destilada

Casamino ácidos (Difco)

Extracto de levadura (Difco)

GM1 (Monosialoganglioside -GM1 5mg SIGMA G-7641 lote 128F-4016)

Polyoxythylene sorbitan monolaurate (Tween 20) SIGMA No. P-1379

Albúmina bovina fracción V SIGMA No. A-4503 lote 115F-0644

Antitoxina colérica de cabra (Cholera toxin β -subunit) Vibrio cholerae, goat Antiserum to, Calbiochem 227040)

Conjugado de fosfatasa alcalina anti cabra SIGMA Immuno chemicals A-4049

Conjugado de peroxidasa anti cabra (IgG) SIGMA A-4174

Tabletas sustrato de fosfatasa p-nitrofenil fosfato 5mg/tableta SIGMA 104-105

Orto- fenil endiamina (1,2 Benzenodiamina) dihidroclorada SIGMA P-1526

Kit OXOID para aglutinación

C. SOLUCIONES:

Solución reguladora de fosfatos 0.01M pH 7.2

Solución salina amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.2 (PBS)

Solución reguladora de carbonatos pH 9.6

Albúmina sérica bovina al 1% en PBS (BSA/PBS)

PBS-Tween 20 0.05%

Regulador de dietanolamino al 10%

Solución de glucosa al 0.2%

Regulador de citratos pH 5.6

* Para la preparación de las soluciones ver apéndice

D. MEDIOS DE CULTIVO:

Agar infusión corazón

Base para agar sangre

Craig

Caldo soya triptílica (CST)

MIO, LIA, TSI, caldo arginina

E. MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas de referencia del CDC de *Vibrio cholerae* productoras de toxina (13, 16, 15, 1800-82, 569 B)

Cepas de referencia del CDC de *Vibrio cholerae* no productoras de toxina (14, X316)

Cepas problema (1223) aisladas de humanos, alimentos, aguas negras y muestras ambientales.

MÉTODOS

A. Preparación de las muestras de toxina colérica para la prueba de ELISA

- 1.- Sembrar el cultivo a probar en un medio no selectivo (HIA). Incubar toda la noche a 37° incluir dos cepas control (una cepa positiva y una cepa negativa) (FIGURA 4).
- 2.- Inocular los cultivos con 10 ml de medio de Craig contenido en un frasco con capacidad de 50 ml y con tapón de rosca. Incubar en cultivo estacionario a 30°C por 48h (37°C 24 h)
- 3.- Centrifugar y separar el sobrenadante. Almacenarlo a 4°C hasta que se realice la prueba de ELISA.

B. Técnica de ELISA Ristaino y cols, 1963 (29)

- 1.- Adicionar 0.1 ml de gangliósido G11 (2ug/ml) en PBS) a cada uno de los pozos de la microplaca en fondo en U. Poner las placas en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente toda la noche.
- 2.- Lavar cada pozo de la placa tres veces con 0.2 ml de PBS-tween, antes de usarse. Si no se usan de inmediato, se pueden almacenar a 4°C durante 4 a 6 semanas.
- 3.- Adicionar 0.15 ml de BSA/PBS a cada uno de los pozos e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Lavar tres veces cada pozo de la microplaca con 0.2 ml de PBS/tween.
- 4.- Adicionar a cada pozo 0.1 ml del sobrenadante de los cultivos a probar. Esto se hace por duplicado. Incluir 1 ó 2 testigos positivos y 1 ó 2 testigos negativos por placa. En dos de los pozos, adicionar caldo sin inocular como otro control negativo. Con PBS/tween llenar los pozos hasta cerca del límite de la placa.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CULTIVO FRESCO EN AGAR DE INFUSION CORAZON

MEDIO DE CRAIG

INCUBAR 24H A 37°C

CENTRIFUGAR

3000RPM X 10 MIN

SOBRENADANTE (TOXINA)

FIGURA 4. METODO DE PRODUCCION DE LA TOXINA

5.- Incubar la placa en una cámara húmeda toda la noche a 25°C. lavar cada pozo tres veces con PBS/tween.

6.- Adicionar 0.15 ml de BSA/PBS a cada uno de los pozos e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Lavar la placa tres veces con PBS/tween.

7.- Adicionar a cada pozo 0.1 ml de suero de conejo (o cabra) anti-toxina colérica diluido 1:2000 en BSA/PBS. La concentración de antitoxina óptima se determina por titulación de cada lote de antitoxina. Incubar por 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Lavar tres veces con 0.2 ml de PBS/tween.

8.- Adicionar a cada pozo 0.1 ml de suero de cabra anti conejo marcado con fosfatasa alcalina diluido 1:200 en BSA/PBS. La concentración óptima del conjugado se determina previamente por titulación de cada lote de reactivo. Incubar por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Lavar tres veces con 0.2 ml de PBS/tween.

9.- Adicionar 0.1 ml de sustrato enzimático (p-nitro fenil fosfato) a cada uno de los pozos e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Detener la reacción rápidamente después de 30 minutos por la adición de 0.05 ml de NaOH 3M.

10.- La cantidad de color amarillo producida por la interacción del sustrato con la enzima fijada a la fase sólida es determinante en la lectura visual y para medir espectrofotométricamente. El sobrenadante se considera positivo para la presencia de toxina colérica, si los pozos probados tienen una densidad optica de al menos el doble que los pozos control negativos.

C. Técnica de ELISA modificada

1.- Adicionar 0.1 ml de gangliósido GM1 (2ug/ml) en PBS más desoxicolato de sodio (1mg/ml) a cada uno de los pozos de la microplaca en fondo en U.

Incubar 1 hora a 37°C y poner en refrigeración las placas toda la noche.
(FIGURA 5)

- 2.- Lavar cada pozo de las placas 3 veces con 0.2 ml de PBS/tween. Si no se usan de inmediato, se pueden almacenar a 4°C durante 4 a 6 semanas.
- 3.- Adicionar 0.2 ml de BSA/PBS a cada uno de los pozos e Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Succionar la albúmina.No lavar.
- 4.-Adicionar a cada pozo 0.1 ml del sobrenadante de los cultivos a probar. Esto se hace por duplicado. Incluir testigo positivo, testigo de medio y un testigo negativo (colocarlo en 6 pozos).
- 5.- Incubar la placa 1 hora a 37°C . Lavar cada pozo 3 veces con 200 ul de PBS/tween .
- 6.- Adicionar 0.2 ml de BSA/PBS a cada uno de los pozos e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Succionar la albúmina.No lavar.
- 7.- Adicionar a cada pozo 0.1 ml del suero de cabra anti-toxina colérica diluido 1:1000 en BSA/PBS. Incubar por 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Lavar 3 veces con 0.2 ml de PBS/tween.
- 8.- Adicionar a cada pozo 0.1 ml de suero de conejo anti-cabra marcado con peroxidasa de rábano diluido 1:1000 en BSA/PBS*. Incubar por 1 hora a 37°C. Lavar 3 veces con 0.2 ml de PBS/tween.
- 9.- Adicionar 0.1 ml de sustrato enzimático a cada uno de los pozos e Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en la oscuridad. El sustrato enzimático es la orto-fenil endiamina disuelta en amortiguador de citratos con peróxido de hidrógeno. Detener la reacción rápidamente después de 30 minutos por la adición de 50 ul de H₂SO₄**..Leer a 490 nm.

El valor de corte se obtiene de la siguiente manera:

Promedio del valor de los controles negativos más dos desviaciones

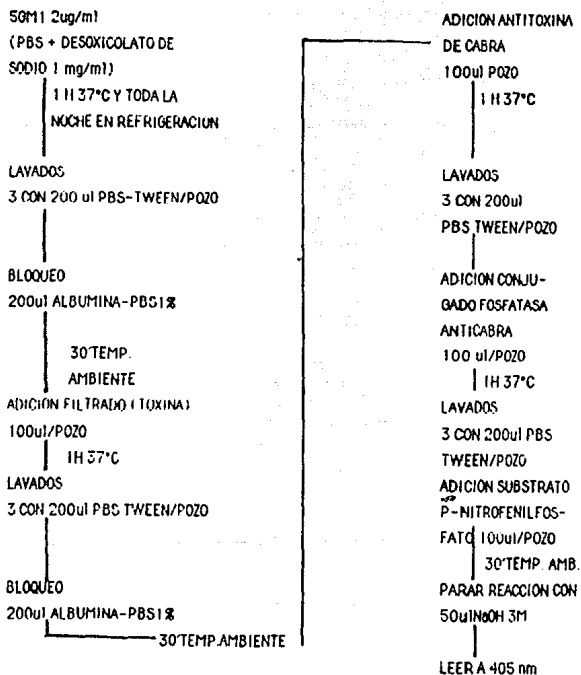


FIGURA 5. DETERMINACION DE TOXINA COLERICA EN FILTRADOS POR EL METODO DE ELISA

estandar. Las densidades ópticas por arriba de este valor son positivas y por de bajo de este son negativas.

* Se utilizó también un suero de conejo anti- cabra marcado con fosfatasa alcalina diluido 1:1000 en BSA/PBS.

** Para el caso del conjugado de fosfatasa las placas se incuban 30 minutos a temperatura ambiente. El sustrato enzimático es el p-nitro fenil fosfato disuelto en amortiguador de dietanolamina. La reacción se detiene con 50 ul/pozo de Na OH 3 M.Leer a 405 nm.

D. Aglutinación Kit Oxoid

- 1.- Se utiliza el sobrenadante obtenido para la prueba de ELISA .(FIGURA 6).
- 2.- En una placa para microtitulación con pozos en fondo en "V" colocar 25 ul en el pozo A1 y A2 de enterotoxina control (incluida en el kit).
- 3.- Colocar 25 ul en los pozos A3,A4,A9 yA10 de control positivo (cepa de referencia); en los pozos A5, A6, A11 y A12 se coloca medio de cultivo sin Inocular, en los pozos A7 y A8 colocar 25 ul de control negativo.
- 4.- Colocar 25 ul de muestra problema a cada pozo. Esto se hace por duplicado.
- 5.- Colocar 25 ul de latex sensibilizado con anticuerpos específicos contra la toxina de *Vibrio cholerae* excepto a los pozos A9, A10, A11 y A12 a los cuales se les adiciona 25 ul de latex control (sensibilizado con globulinas de conejo no inmunizado).
- 6.- Incubar 1 h a 37°C.
- 7.- Inmediatamente refrigerar las placas 24 h.

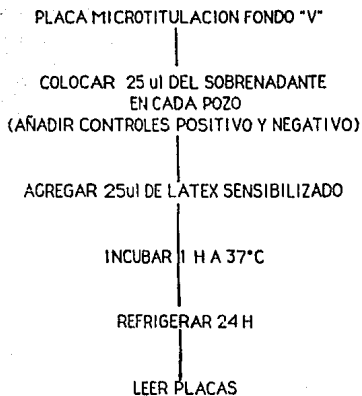


FIGURA 6. AGLUTINACION CON KIT OXOID

8.- Leer las placas con ayuda de un espejo.

Aglutinación: (+) Red difusa en el pozo

Botón: (-)

E. Pruebas bioquímicas

A las cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 que son sospechosas de producir toxina se les realiza pruebas bioquímicas:

1.- Del tubo de IIIA sembrar en una placa de BAB por estria cruzada .
(FIGURA 7)

2.-Incubar de 18-24h a 37°C

3.-Seleccionar 3 colonias y sembrar en las pruebas bioquímicas (MIO, LIA, TSI, Arginina).

4.-Incubar 18- 24 h a 37°C.

5.- Leer pruebas y realizar prueba de oxidasa.

Si las bioquímicas corresponden a *Vibrio cholerae* se procede a realizar aglutinación utilizando suero polivalente y posteriormente sueros monovalentes de *Vibrio cholerae* , se utiliza solución salina y suero normal de conejo como controles negativos, de la siguiente manera:

1.- Del tubo de TSI sembrar en una placa de BAB en forma masiva.

2.- Incubar 24h a 37°.

3.-Colocar 0.2 ml de solución salina 0.85% en un tubo y tomar una asada de la colonia para obtener una suspensión homogénea.

4.- En una placa de aglutinación colocar una gota de la suspensión anterior en cada una de las divisiones de la placa.

5.- Cerca de cada gota agregar una gota de solución salina y una gota de suero normal de conejo.

6.- Mezclar las 2 gotas de cada división con la ayuda de un asa.

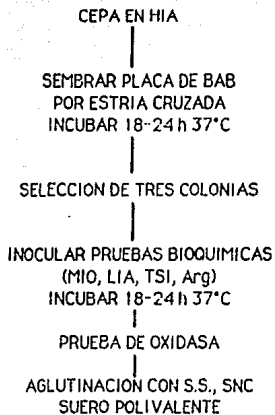


FIGURA 7. PRUEBAS BIOQUIMICAS Y SEROLOGIA

- 7.- Oscilar la placa suavemente con la mano durante 1 minuto.
- 8 - Buscar aglutinación colocando la placa sobre una lámpara.
- 9.- Si la aglutinación con solución salina y suero normal de conejo es negativa, se procederá a probar el suero polivalente y posteriormente el monovalente (repetir del paso 3 al 8).

Si las cepas no aglutinaron con el suero polivalente se procede a realizar la prueba de vapor fluente para corroborar que se trate de cepas lisas, se realiza lo siguiente:

- 1.- Inocular en CST de la placa de BAB
- 2.- Incubar de 5-6h a 37°C.
- 3.- Pasar los tubos a vapor fluente (1-3 libras 1 h).
- 4.- Inmediatamente pasar al refrigerador 24 h.
- 5.- Observar sin mover la gradilla.

Botón: cepa lisa

Malla: cepa rugosa

F. API 20E

A las cepas de *Vibrio cholerae* NO O1 sospechosas de ser toxigénicas también se les realiza API 20 de la siguiente manera:

- 1.- Del tubo original de HIA sembrar en forma masiva en placas de BAB, se incuba 24 h a 37°C (FIGURA 8)
- 2.- Del crecimiento en placa se realiza una suspensión bacteriana en solución salina estéril.
- 3.- Se procede a realizar el llenado del sistema y se incuba 18-24h a 37°.
- 4.- Realizar lecturas.

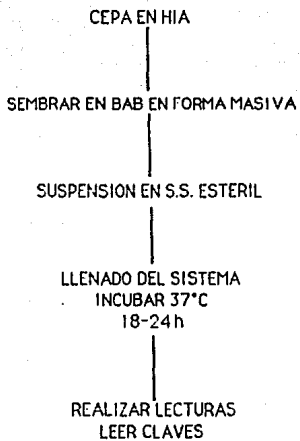


FIGURA 8. SISTEMA API 20E

ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para validar la exactitud de las pruebas de laboratorio se debe conocer su sensibilidad y especificidad.

Se define la sensibilidad de una prueba como la capacidad que posee dicha prueba para detectar a los verdaderamente enfermos.

La especificidad se define como la capacidad de detectar como sanos a los que verdaderamente lo están.

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad se requiere de una tabla de doble entrada, como la siguiente:

A	B
C	D

A= No. casos verdaderos positivos

B= No. casos falsos positivos

C= No. casos falsos negativos

D= No. casos verdaderos negativos

S= $(A/A+C)100$ E= $(D/B+D)100$

VPP= $(A/A+B)100$ VPN= $(D/D+C)100$

Efic= $(A+D/A+B+C+D)100$

S= Sensibilidad

E= Especificidad

VPP= Valor predictivo positivo

VPN= Valor predictivo negativo

Efic= Eficiencia

Para la validación de una prueba se requiere compararla con una prueba de referencia (20).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Para la estandarización de la técnica de ELISA se probaron 4 diluyentes para la sensibilización de las placas con el gangliósido GM1.

-Regulador de carbonatos pH 9.6

-Regulador de fosfatos salino pH 7.2

-Metanol 65%

-Regulador de fosfatos salino pH 7.2 más desoxicolato de sodio 1 mg/ml

Obteniendo un mejor resultado con el regulador de fosfatos salino más desoxicolato de sodio (1mg/ml) FIGURA 9.

También se compararon dos temperaturas de incubación (25 y 37°C) en el momento de realizar la sensibilización de las placas con el GM1 siendo 37 °C la temperatura que proporcionó un mejor resultado. FIGURA 10

Tanto el conjugado de fosfatasa, peroxidasa y la antitoxina se les realizó una titulación obteniendo que el título de la dilución de trabajo para ellos fué de 1:1000. FIGURAS 11, 12 Y 13

Tanto las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y NO O1 se distribuyeron de acuerdo al lugar de procedencia de la muestra obteniendo que para *Vibrio cholerae* O1 el mayor número de muestras procedían del Estado de Hidalgo, siguiendo Puebla y Chiapas, mientras que en el caso de *Vibrio cholerae* NO O1 principalmente provenían del Estado de Veracruz, Distrito Federal y Guerrero. Tabla 5 y 6

Se trabajaron un total de 1223 muestras siendo 900 *Vibrio cholerae* O1 y 323 *Vibrio cholerae* NO O1, de estas muestras 587 se trabajaron por la técnica de ELISA utilizando conjugado de peroxidasa y 636 con conjugado de fosfatasa. Tabla 7



Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y NO O1 provenían de humanos, muestras ambientales (aguas negras, aguas blancas y alimentos), un grupo de muestras se clasificó como "cepas" debido a que se desconocía su origen. Todas las cepas de *Vibrio cholerae* O1 trabajadas fueron toxigénicas mientras que todas las cepas de *Vibrio cholerae* NO O1 probadas fueron no toxigénicas. La distribución de todas las cepas se muestra en las tablas 8,9 y 10.

En las cepas de *Vibrio cholerae* O1 trabajadas se encontraron dos serotipos: Ogawa e Inaba, resultando todas toxigénicas. Tabla 11

Las muestras humanas se pudieron clasificar de acuerdo al sexo, encontrando mayor proporción en el sexo masculino. Tabla 12.

En la tabla 13 se muestra la distribución de acuerdo a la edad en muestras humanas.

Tanto para las técnicas de ELISA con conjugado de peroxidasa y conjugado de fosfatasa se obtuvo su sensibilidad y especificidad con respecto a el cultivo. Tablas 14 y 15.

Para la validación de las técnicas se tomó como prueba de referencia la técnica de aglutinación con latex de Oxoid, para ello se seleccionaron 75 cepas de *Vibrio cholerae* O1 y 75 de *Vibrio cholerae* NO O1 tanto para la técnica de ELISA con conjugado de fosfatasa como para peroxidasa, se obtuvo una sensibilidad del 86.6% y una especificidad del 72.0% para la técnica de ELISA con conjugado de peroxidasa, mientras que para la técnica de ELISA con conjugado de fosfatasa se obtuvo una sensibilidad de 85.4% y una especificidad del 78.4%. Tablas 16, 17 y 18.

En las tablas 19 y 20 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas y API realizadas a doce cepas de *Vibrio cholerae* NO O1 que fueron sospechosas de producir toxina colérica.

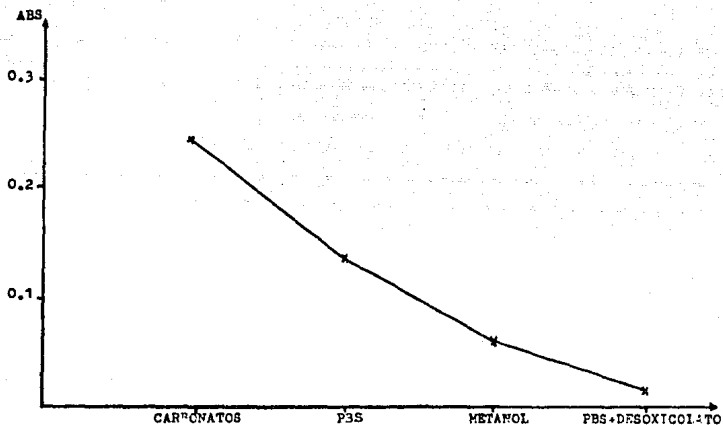


FIGURA 9. COMPARACION DE 4 REGULADORES EN LA SENSIBILIZACION DE LAS PLACAS CON GM1. EN LA GRAFICA SE MUESTRAN LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS CON CADA REGULADOR. SE UTILIZO UNA CEPA NO TOXIGENICA PARA ESTA DETERMINACION.

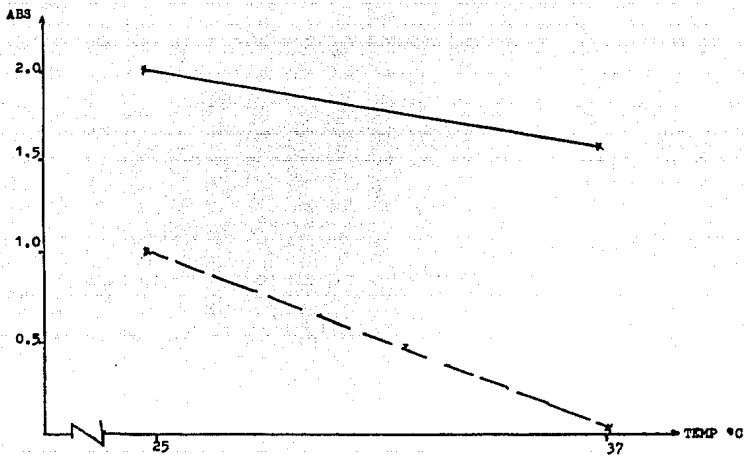


FIGURA 10. COMPARACION DE 2 TEMPERATURAS EN LA SENSIBILIZACION DE LAS PLACAS CON EL GMI. SE UTILIZO UNA CEPA CONTROL NEGATIVO (NO TOXIGENICA) (---) Y UNA CEPA CONTROL POSITIVO (TOXIGENICA) (——).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

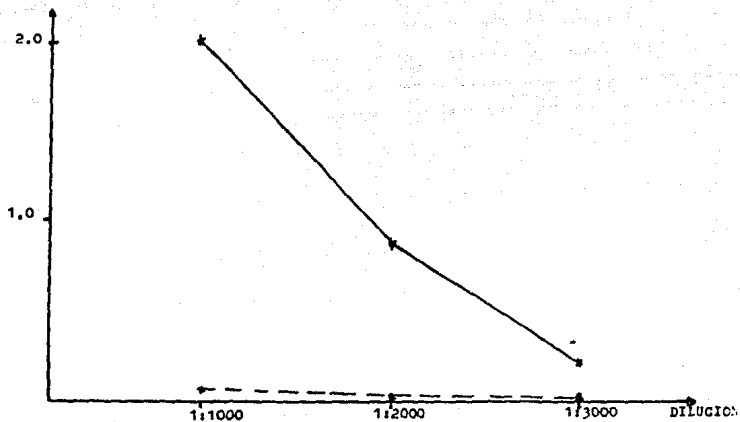


FIGURA 11. TITULACION DEL CONJUGADO DE PEROXIDASA. SE UTILIZO UNA CEPA TOXIGENICA (————) Y UNA CEPA NO TOXIGENICA (-----)

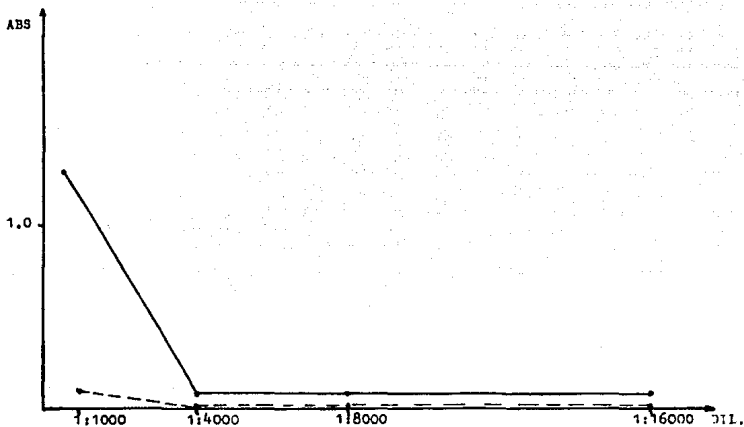


FIGURA 12. TITULACION DE LA ANTITOXINA DE CABRA. SE PROBO UNA CEPA TOXIGENICA (—) Y UNA CEPA NO TOXIGENICA (---)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

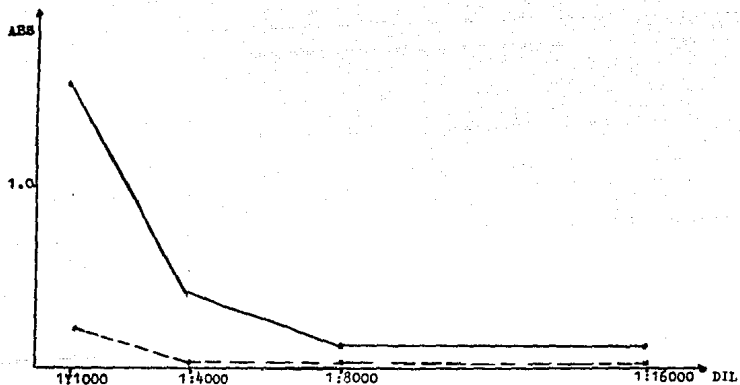


FIGURA 13. TITULACION DEL CONJUGADO DE FOSFATASA. SE UTILIZO UN CEPA CONTROL POSITIVO (TOXIGENICA ———) Y UNA CEPA CONTR L NEGATIVO (NO TOXIGENICA---)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5LOCALIDADES DONDE FUERON AISLADAS LAS CEPAS DE *Vibrio cholerae* O1

TOTAL DE CEPAS 900

ESTADO	HUMANO	AGUA NEGRA	AGUA BLANCA	ALIMENTO	CEPA
CAMPECHE	7				9
CHIAPAS	106				
D.F.	49	13	1		2
GUANAJUATO	1				
GUERRERO	2				
HIDALGO	213	1	2		
MEXICO	134	11	4	2	7
MORELOS	1				
NUEVO LEON					16
OAXACA	1				1
PUEBLA	206	2	2		1
QUINTANA ROO	2				
TABASCO	1				3
TAMAULIPAS	4				
VARACRUZ	74				12
YUCATAN					9
ZACATECAS					1
TOTAL	801	27	9	2	61

TABLA 6

LOCALIDADES DONDE FUERON AISLADAS LAS CEPAS DE *Vibrio cholerae* NO 01
TOTAL DE CEPAS 327

ESTADO	HUMANO	AGUA NEGRA	AGUA BLANCA	ALIMENTO	CEPA
CAMPECHE		4	1	1	
COLIMA		39			
CHIAPAS		7			
CHIHUAHUA		5			
D.F.	3	53			
GUANAJUATO		21			
GUADALAJARA		5			
QUERRERO		46	1		
HIDALGO	3	2	9		
MEXICO	15	6			1
PUEBLA	8		7		
TLAXCALA		3			
VERACRUZ		64		1	
YUCATAN		11			
ZACATECAS		7			
TOTAL	29	267	24	2	1

TABLA 7

No. CEPAS SELECCIONADAS PARA EL ENSAYO DE ELISA CON PEROXIDASA
Y FOSFATASA EN LA SELECCION DE CEPAS TOXIGENICAS

ELISA

CONJUGADO

PEROXIDASA FOSFATASA No.

Vibrio cholerae 01

450	450	900
137	186	323
587	636	1223

Vibrio cholerae NO 01

TOTAL

TABLA 8

PORCENTAJE TOTAL DE *Vibrio cholerae* 01 y NO 01 TOXIGENICOS Y NO TOXIGENICOS PRBADOS POR EL METODO DE ELISA

	CEPAS <i>V. cholerae</i> 01		CEPAS <i>V. cholerae</i> NO 01	
	No.	PORCIENTO POSITIVAS	No.	PORCIENTO POSITIVAS
HUMANO	801	100	29	100
AMBIENTALES				
AGUAS NEGRAS	27	100	267	100
AGUAS BLANCAS	9	100	24	100
ALIMENTOS	2	100	2	100
CEPAS	61	100	1	100
TOTAL	900		323	

TABLA 9

PORCENTAJE DE VIBRIO cholerae 01 Y NO 01 TOXIGENICOS Y NO TOXIGENICOS
 PRUBADOS POR EL METODO DE ELISA
 (PEROXIDASA)

CEPAS	CEPAS V cholerae 01		V cholerae NO 01	
	No	PORCIENTO	No	PORCIENTO
HUMANAS	427	100	14	100
AMBIENTAL				
AGUAS NEGRAS	12	100	101	100
AGUAS BLANCAS	6	100	20	100
ALIMENTO	2	100	1	100
CEPAS	3	100	1	100
TOTAL	450		137	

TABLA 10

PORCENTAJE TOTAL DE *Vibrio cholerae* 01 y NO 01 TOXIGENICOS Y NO TOXIGENICOS PRBADOS POR EL METODO DE ELISA (FOSFATASA)

	CEPAS		CEPAS	
	V. cholerae 01		V. cholerae NO 01	
	No.	PORCIENTO	No.	PORCIENTO
HUMANOS	374	100	15	100
AMBIENTAL				
AGUA NEGRA	15	100	166	100
AGUA BLANCA	3	100	4	100
ALIMENTO	-	-	1	100
CEPAS	58	100	-	-
TOTAL	450		186	

TABLA 11

DISTRIBUCION DE MUESTRAS DE *Vibrio cholerae* O1 DE ACUERDO AL
SEROTIPO

	INABA	OGAWA	TOTAL
No. CEPAS	898/900	2/900	900
PORCENTAJE	99.77	0.22	100
PORCENTAJE DE CEPAS TOXIGENICAS	100	100	

TABLA 12

DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS DE HUMANOS DE ACUERDO AL SEXO

	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
No MUESTRAS	521	280	801
PORCENTAJE	65 05	34 95	100

TABLA 13

DISTRIBUCIÓN DE ACUERDO A EDAD EN MUESTRAS HUMANAS

EDAD (AÑOS)	AÑOS
<1	12
1-10	121
11-20	100
21-30	136
31-40	130
41-50	118
51-60	64
61-70	69
71-80	33
81-90	16
90-100	2

TABLA 14

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE ELISA
(PEROXIDASA)

	Vibrio cholerae O1	Vibrio cholerae NO O1	TOTAL
E L POSITIVOS	90	18	108
I S NEGATIVOS	10	82	92
A TOTAL	100	100	200

SENSIBILIDAD = $(90/90 + 10) 100 = 90.0\%$

ESPECIFICIDAD = $(82/82 + 18) 100 = 82.0\%$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO = $(90/90 + 18) 100 = 83.3\%$

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO = $(82/82 + 10) 100 = 89.0\%$

EFICIENCIA = $(90 + 82 / 90 + 18 + 10 + 82) = 86.0\%$

TABLA 13

ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE ELISA
(FOSFATASA)

	Vibrio cholerae 01	Vibrio cholerae NO 01	TOTAL
E L POSITIVOS	96	9	105
I S NEGATIVOS	4	91	95
A TOTAL	100	100	200

SENSIBILIDAD= $(96/96 + 4) 100 = 96.0\%$

ESPECIFICIDAD= $(91/91+9) 100 = 91.0\%$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO= $(96/95+9) 100 = 91.4\%$

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO= $(91/91 + 4) 100 = 95.8\%$

EFICIENCIA= $(96+91/96 + 9+4+91) 100 = 93.5\%$

TABLA 16RESULTADOS DE LAS CEPAS PROBADAS POR AGLUTINACION CON LATEX Y
ELISA (PEROXIDASA Y FOSFATASA)

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
<i>Vibrio cholerae</i> 01			
AGLUTINACION	68	7	75
ELISA (PEROXIDASA)	69	6	75
<i>Vibrio cholerae</i> NO 01			
AGLUTINACION	7	68	75
ELISA (PEROXIDASA)	17	58	75
<i>Vibrio cholerae</i> 01			
AGLUTINACION	55	20	75
ELISA (FOSFATASA)	72	3	75
<i>Vibrio cholerae</i> NO 01			
AGLUTINACION	7	68	75
ELISA (FOSFATASA)	-	75	75

TABLA 17

ANALISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CONSIDERANDO
COMO METODO DE REFERENCIA EL DE AGLUTINACION
CON LATEX (OXOID) Y METODO DE ESTUDIO ELISA
(PEROXIDASA)

AGLUTINACION CON LATEX

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
E L POSITIVOS	65	21	86
I S NEGATIVOS	10	54	64
A TOTAL	75	75	150

SENSIBILIDAD = $(65 / (65 + 10)) \cdot 100 = 86.6\%$

ESPECIFICIDAD = $(54 / (54 + 21)) \cdot 100 = 72.0\%$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO = $(65 / (65 + 10)) \cdot 100 = 75.5\%$

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO = $(54 / (54 + 10)) \cdot 100 = 84.3\%$

EFICACIA = $(65 + 54 / (65 + 21 + 10 + 54)) \cdot 100 = 79.3\%$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 18

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CONSIDERANDO
 COMO MÉTODO DE REFERENCIA EL DE AGLUTINACIÓN
 (CON LATEX (OXOID)) Y MÉTODO DE ESTUDIO EL ISA
 (FOSFATASA)

	AGLUTINACION CON LATEX		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
E I POSITIVOS	53	19	72
I S NEGATIVOS	9	69	78
A TOTAL	62	88	150

$$\text{SENSIBILIDAD} = (53/53+9)100 = 85.4\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = (69/69+19)100 = 78.4\%$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO} = (53/53+19)100 = 73.6\%$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO} = (69/69+9)100 = 88.4\%$$

$$\text{EFICIENCIA} = (53+69/53+19+9+69)100 = 81.3\%$$

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

TABLA 19

RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS Y SEROLOGIA REALIZADAS A 12
CEPAS DE *Vibrio cholerae* NO 01

CLAVE CEPA	AGLUTINACION								
	TSI	LIA	MIO	CP	OX	SS	SNC	S. POL	V.F
105	K/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	L
126	K/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	R
136	K/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	L
185	K/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	L
219	A/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	L
1427	A/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	R
1425	A/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	R
1416	A/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	R
1364	A/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	R
1375	A/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	R
1379	K/A--	K/N--	+++	+	+	-	-	-	L

CLAVES.

TSI: Fondo/Picadura Gas H₂S

LIA: Fondo/Picadura Gas H₂S

MIO. Motilidad Indol Ornitina

CP. Caldo peptonado (indol)

OX. Oxidasa

SS. Solución salina

SNC. Suero Normal de Conejo

S. POL. Suero polivalente

V.F. Vapor fluente

K. Alcalino

A. Acido

+ Positivo

- Negativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 20

RESULTADOS DE API 20 REALIZADOS A 12 CEPAS DE
Vibrio cholerae NO 01

CLAVE CEPA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXI	NO ₂
105	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
126	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
136	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
185	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
219	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1427	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1425	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
1416	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1364	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1375	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1379	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
1382	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+

TODOS LOS RESULTADOS ANTERIORES CORRESPONDEN A Vibrio cholerae

DISCUSION

Las cepas de *Vibrio cholerae* 01 producen una toxina, que es el principal mecanismo de patogenicidad del microorganismo dicha toxina es la responsable de la diarrea característica de la enfermedad, por lo cual para completar el diagnóstico, se realiza una prueba de toxigenicidad a las cepas, que en este caso fué el ensayo de ELISA.

Para esto, se procedio a estandarizar la técnica, teniendo como variables:

Diluyente del GM1

Temperatura de incubación en la sensibilización

Título de la antitoxina

Título el conjugado

Para la sensibilización de las placas se probaron 4 diluyentes: regulador de carbonatos pH 9.6, regulador de fosfatos salino pH 7.2, metanol al 65% y regulador de fosfatos salino más desoxicolato de sodio, Ristaino y otros autores (22,29,31,33,36,38) realizan el inmuno ensayo enzimático para la determinación de toxina colérica utilizando el regulador de fosfatos salino como diluyente de el GM1; en este caso el que ofreció un mejor resultado fué el regulador de fosfatos salino más el desoxicolato de sodio, este presentó una menor coloración debida a reacciones inespecíficas por lo cual, este regulador se utilizó para la sensibilización de las placas.

Se realizó un cambio en la temperatura de incubación de placas en la sensibilización, se recomienda que estas se incuben a 25° C (29) toda la noche, sin embargo se probó incubar las placas 1 h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C obteniendo un mejor resultado con esta última, para la determinación de la temperatura óptima de incubación se utilizaron 2

cepas control, una cepa toxina positiva y una cepa toxina negativa, observando que a 37 °C se presentaba menor fondo por lo cual se puede diferenciar un resultado positivo y uno negativo, mientras que incubando las placas a 25 °C la cepa control negativo daba una absorbancia muy elevada (cercana a 1.0) lo cual provocaría problemas para poder diferenciar un resultado positivo de un negativo

La anti-toxina colérica y los conjugados de peroxidasa y fosfatasa se titularon, obteniendo que la dilución de trabajo para los tres fué de 1:1000, debido a que en dicha dilución se observa la diferencia entre un testigo positivo y un negativo; a diluciones mayores, el testigo negativo da una absorbancia muy cercana a la del testigo positivo lo cual provocó que al obtener el valor de corte no se pudiera determinar si un resultado era positivo o negativo.

Para la realización de ensayos útiles para la determinación de toxina colérica, se ha recomendado la utilización de diversos medios (14,17,22,29) para la obtención de la toxina, en este trabajo se utilizó el medio de Craig, se quiso probar otro medio (Mundell) para compararlo con el medio de Craig para saber cual de los dos proporciona mejores resultados, sin embargo, esto no se pudo realizar debido a que el medio de Mundell no se pudo utilizar ya que presentó un precipitado en el momento de su preparación.

Se realizó una distribución de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 de acuerdo al lugar de procedencia obteniendo una mayor cantidad de cepas del Estado de Hidalgo , Puebla y Chiapas, siendo efectivamente en estos lugares donde se han reportado mayor número de casos (5).

Se trabajaron tanto cepas de *Vibrio cholerae* O1 como NO O1 las cuales fueron de humanos y ambientales en las que se incluyeron aguas blancas, aguas negras y alimentos, estas últimas se incluyeron debido a

que el muestreo ambiental es importante ya que la transmisión se da por la ingestión de agua o alimentos contaminados con vómitos o heces de individuos infectados (34), en los resultados presentados se observa la distribución de estas cepas donde se ve que todas las cepas de *Vibrio cholerae* O1 trabajadas son toxigénicas y las de *Vibrio cholerae* NO O1 probadas por el método de ELISA son no toxigénicas, algunos autores (4,25) proponen que *Vibrio cholerae* NO O1 produce una toxina similar a la colérica la cual han denominado CT-like, han observado que dicha toxina da resultado positivo en asa ligada de conejo, sin embargo en este caso dieron un resultado negativo.

Vibrio cholerae O1 incluye los serotipos Ogawa e Inaba los cuales son productores de toxina colérica (36), se determinó toxigenicidad a estos dos serotipos comprobando que, en efecto dichos serotipos son productores de toxina, además de que se observa que el serotipo predominante fué el Inaba.

Aunque *Vibrio cholerae* O1 infecta tanto a hombres como a mujeres de cualquier edad (23), de acuerdo a los resultados mostrados se observa que existe un mayor porcentaje de casos en el sexo masculino y en cuanto a edad existe un número similar de casos en cada rango aunque se observa un número mayor en el rango de 21-30 y 31-40, existe una disminución de casos a partir de 51 años, esto se puede explicar ya que existe una menor población de esta edad

Al realizar el análisis de sensibilidad y especificidad de las técnicas de ELISA, utilizando diferentes conjugados (peroxidasa y fosfatasa), se obtuvo una mayor sensibilidad y especificidad para la técnica de ELISA con conjugado de fosfatasa (S=96.0% y E = 91.0%), de hecho en las técnicas descritas por diferentes autores (17,22,29) siempre utilizan el conjugado de fosfatasa y no mencionan el uso de otro.

Para la validación de ambas técnicas se tomó como prueba de referencia la de aglutinación con latex de Oxoid para la cual se ha reportado una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100% (1), se probaron para cada caso (peroxidasa y fosfatasa) 75 cepas de *Vibrio cholerae* O1 y 75 cepas de *Vibrio cholerae* obteniendo así una S=86.6% y E=72.0% para la técnica de ELISA con conjugado de peroxidasa mientras que para fosfatasa se obtuvo una S=85.4% y una E=78.4%, por lo cual la prueba con fosfatasa es más confiable que la de peroxidasa.

De todas las cepas de *Vibrio cholerae* NO O1 12 de ellas fueron sospechosas de producir toxina colérica por lo cual se les realizó pruebas bioquímicas y serología, además se les realizó API 20 E, los resultados obtenidos corroboraron que dichas cepas eran *Vibrio cholerae* NO O1 aunque 7 de estas cepas fueron rugosas. Estas cepas no se reportaron como toxigénicas debido a que existió la oportunidad de enviarlas al CDC (Centro de control de enfermedades de Atlanta) donde se les realizó una prueba de PCR donde se confirmó que eran *Vibrio cholerae* NO O1 no toxigénicas. El hecho de que por el método de ELISA dieran un resultado positivo se puede explicar como los falsos positivos de la técnica, o bien que dichas cepas producen una toxina similar a la colérica (4,25) que se puede detectar por la técnica de ELISA.

CONCLUSIONES

El regulador de fosfatos salino más desoxicolato de sodio proporciona un mejor resultado en la sensibilización de las placas de ELISA con el GM1.

Los serotipos Inaba y Ogawa son toxigénicos determinados por la técnica de ELISA.

Todas las cepas trabajadas de *Vibrio cholerae* O1 fueron toxigénicas por el método de ELISA.

Todas las cepas trabajadas de *Vibrio cholerae* NO O1 fueron no toxigénicas por el método de ELISA.

La técnica de ELISA con fosfatasa fue más sensible y específica que la de peroxidasa probada en este trabajo.

APENDICE

1 - Solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH 7.2 (Solución patrón 50X)

Na_2HPO_4 543 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 153 g

Agua destilada 1000 ml

2.- Solución salina amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.2 (PBS)

Regulador de fosfatos soln. patrón 50 X 20 ml

NaCl 5.5 g

Agua destilada 980 ml

3.- Solución reguladora de carbonatos pH 9.6

Na_2CO_3 70 g

NaHCO_3 28 g

Agua destilada 1000 ml

4.- Albúmina sérica bovina al 1 % en PBS (BSA/PBS)

Albúmina sérica bovina 1 g

PBS 100 ml

Almacenar en refrigeración. Descartar cuando se precipite o muestre signos de contaminación

5 - PBS-Tween

PBS 1000 ml

Tween 20 0.5 ml

6 - Regulador de dietanolamina al 10%

Dietanolamina 97 ml

Agua destilada 800 ml

NaN_3 0.7 g

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg

Ajustar el pH a 9.8 con HCl 1 M. Aforar a un litro con agua destilada y almacenar a 4°C en la oscuridad

TEES CON
FALLA DE ORIGEN

7 - Regulador de citratos pH 5.6

Citrato de sodio 29 g
Acido citrico 4.1 g
Agua destilada 1000 ml

8 - Acido sulfúrico 8N

H_2SO_4 (95%) 113 ml
Agua destilada 387 ml

9 - Hidroxido de sodio 3M

NaOH 60.6 g
Agua destilada 500 ml

10 - Sustrato de peroxidasa

Orto-tetil endiamina (OPD) 6 mg
Regulador de citratos pH 5.6 12 ml
 H_2O_2 3% 0.3 ml

11 - Sustrato de fosfatasa (p-nitro fenil fosfato)

5mg/tableta
5mg/5 ml regulador dietanolamina

12 - Medio de Craig

Casamino ácidos 3.0%
Extracto de levadura 0.4%
 K_2HPO_4 0.05%

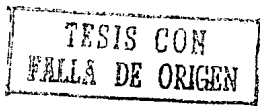
Después de esterilizar adicionar glucosa esterilizada por filtración para una concentración final de 0.2% (10 ml por litro de una solución de glucosa al 20%)

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida, R. Hickman-Brenner, F. 1990. Comparison of a latex Agglutination Assay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Cholera Toxin. *J. Clin. microbiol.* 28:128-130
2. Bailey. Diagnóstico microbiológico. 7a. ed. Panamericana. argentina.(1989):424-428
3. Balows. Manual of Clinical Microbiology. Fifth ed. American Society for Microbiology. Washington D.C.(1991):384-395
4. Blake, P. 1980. Diseases of humans (other than cholera) Caused by vibrios. *Ann Rev Microbiol.* 34: 341-367
5. Boletín Cólera/Diarreas Infecciosas.1992. Situación del cólera en México. Año 2.(1):1-3
6. Bol. of Sanit Panam.1991. Epidemia de cólera en el Perú y pautas para su control. 110(4):277-297
7. Chen, F. 1991. Genetic diversity among toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 Isolated from the Western Hemisphere. *Epidemiol. Infect*: 1-9
8. Finch, M. Valdespino, J.L. 1985. Non-O1 *Vibrio cholera* Infections in Cancun, México. *Wang Document*.(9102E):384-395
9. Guerrant, R. 1977. Characterization of the Chinese Hamster Ovary Cell Assay for the Enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* and for Antitoxin: Differential Inhibition by gangliosides specific Antisera, nd Toxoid. *J. Invec. Dis.* 135(5): 720-728
10. Hicks, J. Biología e Inmunología. Ira ed. Pienza México.(1988):549-553
11. Hirschhorn N.1971. Cholera. *Scientific American.* 225(2):15-21
12. Holmgren.1980. Cellular Action and pathophysiological Effects of cholera toxin. *Molecular Basis of Micobial Pathogenicity*:269-284
13. Holmgren.1982³ Pathogenesis and prevention of cholerae. *escand. J. Invec. Dis.* 36: 58-64



14. Iwanaga, M. 1985. New Medium for the Production of cholera Toxin by *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor. *J Clin Microbiol.* 22: 405-408

15. Johnston, J. 1983. Isolation of Nontoxicogenic *Vibrio cholerae* O1 from a Human Wound Infection. *J. Clin. Microbiol.* 17: 918-920

16. Joklik. Zinsse Microbiology. 19th ed. Appleton & Lange. USA. (1988):480-486

17. Koneman. Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. 1ra. ed. Panamericana. México. (1985):252-253

18. Koneman. Color Atlas and Testbook of Diagnostic Microbiology. Third Ed. Lippincott. EUA. (1988):209-215

19. Lanata, C. 1985. Sensitivity and Specificity of DNZ Probes with the stool Blot Technique for Detection of *Escherichia coli* Enterotoxins. *J. Infect Dis.* 152:1087-1090

20. Manual de laboratorios de detección de anticuerpos Anti-VIH. Secretaría de Salud Dirección General de Epidemiología. 1989.

21. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. Publicación técnica del INDRE #10, Secretaría de Salud. 1991.

22. Manual of laboratory investigations of Acute Enteric Infections. Who. documento no publicado. CDC/83.3 Rev. (1986)

23. Manual sobre cólera para personal de salud. Publicación técnica del INDRE #11. Secretaría de Salud. 1991

24. Morgan, D. 1983. Comparison of Methods to Detect *Escherichia coli* Heat Labile Enterotoxin in stool and Cell-Free Culture Supernatants. *J. Clin. Microbiol.* 18:798-802

25. Morris, J. 1985. Cholera and other vibrioses in the United States. *New England J. Medicine.* 312:343-349

26. Mudd, S. Infectious Agents and Host Reactions. 1th. W.B. Saunders Company. Philadelphia. (1970):285-302

27. Pérez, P. 1983. Toxina termolábil (TL) de *Escherichia coli*. *Infectología* 5:223-232

28. Richards, K. 1978. Pathophysiological Effects of *Vibrio cholerae* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Their Exotoxins on Eucaryotic Cells. *Microbiol Reviews*. 42: 592-613
29. Ristaino, P. 1983. Improved GM1-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Escherichia coli* Heat-Labile enterotoxin. *J. Clin Microbiol*. 19 (4):808-815
30. Rose, N. El Laboratorio en Inmunología Clínica. 2a. ed. Panamericana. Argentina (1984):549-553
31. Sack, D. 1980. Microtiter Ganglioside Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxins and Antitoxin. *J Clin Microbiol*. 11: 35-40
32. Smith, H. 1979. Serotyping of Non-cholera Vibrios. *J. Clin Microbiol*. 10: 85-90
33. Sussman. The virulence of *Escherichia coli* Reviews and Methods. 1th. Society for General Microbiology by Academic Press.(1985):395-405
34. Valdespino, J.L. 1991. Epidemia de cólera en América. *Ciencia y desarrollo*. XVII: 55-64
35. Varela, G. 1971. Failure to find cholera and noncholera vibrios in diarrheal disease in Mexico-city, 1966-67. *Amer. J. Tropical medicine and hygiene* 20: 925-926
36. Wachsmuth, K. 1984. Laboratory Detection of Enterotoxins. Public Health Service, Center for Disease Control: 93-115
37. Weekly Epidemiological record. 1991. Epidemic in Peru.(9):61-63
38. Yolken, R. 1977. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Escherichia coli* Heat Labile Enterotoxin. *J. Clin Microbiol*. 6: 439-444

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN