

72
2es

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"



DESARROLLO DE UN REACTIVO DE COAGULACION PARA EL DIAGNOSTICO RAPIDO PRESUNTIVO DE Vibrio cholerae

T E S I S
Que para obtener el Título de :
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P r e s e n t a :
CLAUDIA ELENA WONG ARAMBULA

Asesor:
Q.B.P. JUDITH D. MARTINEZ ZAMITIZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

GLOSARIO

- **BAB** Base de Agar para Sangre (medio de enriquecimiento)
- **HIA** Agar Infusión Corazón (medio de enriquecimiento)
- **HIB** Caldo Infusión Corazón (medio de enriquecimiento)
- **LIA** Lisina Hierro Agar (prueba bioquímica)
- **MIO** Motilidad, Indol, Ornitina (prueba bioquímica)
- **PBS** Solución amortiguadora de fosfatos salinos.
- **TCBS** Tioglicolato, Citrato, Bilis, Sacarosa (medio selectivo)
- **TSB** Caldo Soya Tripticasina (medio de enriquecimiento)
- **TSI** Triple Azúcar Hierro (prueba bioquímica)

INDICE

1.0	RESUMEN	3
2.0	INTRODUCCION	4
	2.1 Presencia y Producción de la Proteína A	4
	2.2 Propiedades de la Proteína A	5
	2.3 Actividad de la Proteína A	7
	2.4 Aplicaciones de la Proteína A	8
3.0	GENERALIDADES	9
	3.1 Agente Etiológico	9
	3.2 Cuadro Clínico	14
	3.3 Patogénesis	15
4.0	HISTORIA	16
5.0	EPIDEMIOLOGIA	18
6.0	DIAGNOSTICO	25
7.0	TRATAMIENTO	29
8.0	OBJETIVOS	31
9.0	MATERIAL	32
10.0	METODOLOGIA	37

11.0	RESULTADOS	47
12.0	DISCUSION	55
13.0	CONCLUSIONES	56
14.0	BIBLIOGRAFIA	57

RESUMEN

La técnica de COAGULACIÓN, se basa en la unión de anticuerpos específicos a un acarreador, que al ser combinados con un antígeno forma agregados macroscópicos.

La proteína A es un componente principal en la pared del *Staphylococcus* que se liga intensamente al sitio de combinación de cualquier molécula IgG. Esto hace que la región que reacciona con los antígenos quede libre para combinarse.

Aquí en este trabajo se desarrolló un reactivo de Coagulación para la identificación de *Vibrio cholerae* O1, utilizando un cultivo de *Staphylococcus* rico en proteína A y diferentes antisueros polivalentes de *Vibrio cholerae* O1. Todo esto se hizo con el objeto de desarrollar una técnica de diagnóstico rápido y presuntivo para cólera, enfrentando el reactivo con muestras clínicas de pacientes sospechosos de cólera.

Se utilizaron como controles negativos, reactivos sensibilizados con suero normal de conejo y antisuero de *E. coli*.

INTRODUCCION

La proteína A está unida covalentemente a la pared celular de la mayoría de las cepas de *Staphylococcus*. Tiene la propiedad de unirse con gran afinidad y especificidad a la región Fc de las Inmunoglobulinas de varias especies animales, dejando libre la región que reacciona con los antígenos. Varios investigadores demostraron la capacidad de la proteína A de comportarse como receptor Fc, aunque estudios recientes muestran que también puede haber actividad en sitios Fab de ciertas inmunoglobulinas. Además, otras clases de inmunoglobulinas pueden unirse a la proteína A, y la actividad dependerá de las especies y subclases. Aunque la proteína A del *Staphylococcus* ha sido estudiada ampliamente, otros microorganismos como el *Streptococcus* producen proteína A que se une específicamente a IgG y otras clases de inmunoglobulinas a través de los sitios de unión Fc.

PRESENCIA Y PRODUCCION DE PROTEINA A

Una vez que la proteína A se ha clasificado como proteína de pared celular que se une en forma específica a la región Fc de moléculas de inmunoglobulinas, principalmente a la de clase IgG; se han realizado numerosos estudios para determinar su presencia, estudios más recientes sugieren que es común en diferentes cepas de *Staphylococcus* y las que generalmente se utilizan como controles son la Cowan I y Wood 46 (positivo y negativo respectivamente). Kronvall y cols. utilizan una IgG marcada con yodo radiactivo para cuantificar los sitios de unión en la superficie del *Staphylococcus aureus*. La proteína A se detecta principalmente por precipitación. (35)

Para su obtención, se hacen crecer los microorganismos en medios de enriquecimiento, de donde son colectados y lavados para su conservación.

Se ha demostrado la presencia de proteína A extracelular, así como también

ligada a células, esto implica que la proteína A sobre la membrana tiene fácil acceso a las moléculas de inmunoglobulinas en fluidos o a antígenos de superficie celular, de tal forma que la región Fc pueda interactuar con receptores de la proteína A. Los estudios han demostrado que se localiza primeramente en la superficie de la bacteria y está unida covalentemente a la porción de peptidoglicán de las membranas. (38,39)

Los ensayos sobre el origen de la proteína A extracelular han demostrado que las cepas Cowan I y 3695 secretan más del 9% del total producida, mientras que un 90% se encuentra unida a la pared celular y un 1% en el citoplasma. (38)

Durante el crecimiento exponencial de la bacteria se libera la proteína A extracelular, después de su síntesis ribosomal. (39)

PROPIEDADES DE LA PROTEINA A

Su aislamiento se realiza por extracción con calor de la cepa Cowan I en solución buffer de fosfatos, sometidos a ebullición, seguida de una precipitación con ácido o altas concentraciones de sal, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel o electroforesis en gel de poliacrilamida. (35,40)

En el procedimiento original después del tratamiento con la enzima y acidificación del precipitado, se extrae la proteína, la cual es precipitada con sulfato de amonio al 80% y es purificada por cromatografía de intercambio iónico seguida de la filtración en gel. (35)

La proteína A está constituida por 5 fragmentos: A, B, C, D y X. Los fragmentos A, B y C son monovalentes, no aglutinan eritrocitos sensibilizados de carnero, pero inhiben la reacción entre IgG y células cubiertas con proteína A pura. Los fragmentos A y B tienen un peso molecular entre 6000 y 7000 d. (40)

El fragmento D es altamente afin a la región Fc de unión y está compuesto por 60 aminoácidos; el fragmento X está compuesto por 150 aminoácidos, no se une a la región Fc y difiere mucho de los fragmentos activos (figura 2).

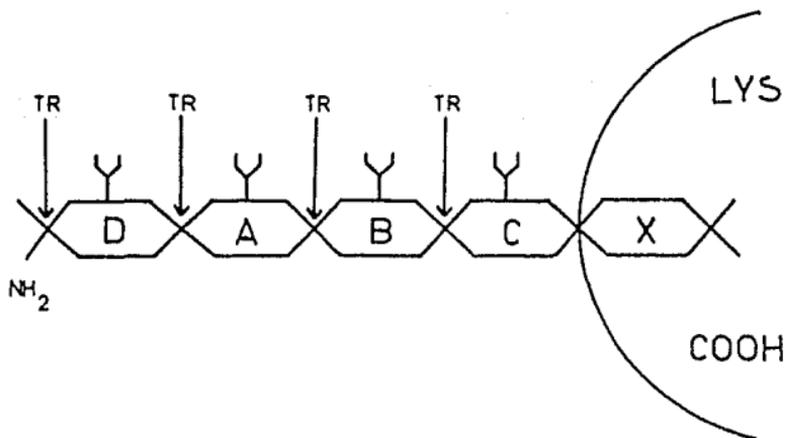


Figura 2. Diagrama esquemático de los sitios de unión de las inmunoglobulinas en la estructura de la proteína A, que incluye las regiones D, A, B, y C. La región COOH es por la cual se une a la porción de peptidoglicán de la membrana celular. LYS y TR indican los puntos de división por lisostafin y tripsina respectivamente; es probable que la región X quede enterrada en la pared celular haciendo que la región C sea menos accesible.

ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA A

La posible función biológica de acuerdo con los trabajos de Dosset, es el bloqueo completo del reconocimiento y por lo tanto la muerte de la bacteria en la fagocitosis utilizando opsoninas IgG. Otros investigadores han demostrado que la proteína A es capaz de provocar reacciones anafilácticas en cobayos, reacciones de Arthus en conejos, además de que los complejos proteína A-IgG fijan complemento de cobayo y complemento de suero fresco de humano, cerdo y perro. (36)

Algunos investigadores sugieren que la proteína A es otra sustancia capaz de unirse a la molécula de globulina en la proximidad necesaria para la activación de C1-Esterasa. Han sugerido que la dimerización de la IgG por la proteína A y de la estructura larga es debido a una agregación secundaria, pueden elevar el complemento activado por complejos. (36)

Por otra parte su actividad con inmunoglobulinas fue estudiada por algunos investigadores los cuales determinaron que las subclases 1, 2 y 4 de IgG se unen a la proteína A y que la IgG3 no lo hace. A los fragmentos y subfragmentos se les ha probado su actividad con la proteína A para localizar el sitio activo de la molécula IgG. Los datos indican que la actividad principal reside en la región Fc. (37)

Se ha demostrado que otras clases de inmunoglobulinas humanas son activas, en el caso de la IgM, se sabe que la subclase 2 reacciona mientras que la 1 no lo hace. Se concluyó que la actividad de la IgM reside en la región Fc, sin embargo, otros autores reportan que la unión de la proteína A a IgM se da en los fragmentos Fab. (37)

La IgA de calostro humano y de suero se unen a la proteína A donde su actividad se localiza en la región Fc y la unión se da en la porción Fab de la Ig. (37)

La IgE policlonal interactúa con la proteína A, no así la monoclonal, reportando que el punto de unión se localiza en la porción Fab. (36)

Con respecto a la IgD existe muy poca información. De las inmunoglobulinas animales se reporta que existe reconocimiento y afinidad por la proteína A y que en la mayoría de las clases dicho reconocimiento se da por la porción Fc. (36)

APLICACIONES DE LA PROTEINA A

La proteína A se ha convertido en un reactivo inmunológico extremadamente importante, más allá de su capacidad para aislar IgG o subclases de IgG. Se ha utilizado en métodos como inmunoensayos de linfocitos, antígenos tumorales de superficie celular, antígenos y anticuerpos virales, ensayos de anticuerpos IgG específicos a un antígeno en suero o anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas para la cuantificación de antígenos en fluidos fisiológicos. (36)

La bacteria de la cepa Cowan I muerta por calor y fijada con formalina es ofrecida por algunas compañías comerciales, representando una alternativa a la precipitación con doble anticuerpo o a otros métodos de separación de antígeno marcados o complejos Antígeno-Anticuerpo. (36)

La precipitación con proteína A en fase sólida también es una forma útil para aislar complejos inmunes de suero; así como también de membranas celulares solubilizadas o de otras fuentes. (35)

Algunos autores reportan la utilización de proteína A en la serotipificación de microorganismos, basándose en antígenos estables al calor, usando una combinación de técnicas, dentro del análisis de reacciones cruzadas, así como también en la técnica de coaglutinación, la cuál se ha comparado con otras técnicas inmunoenzimáticas como la contrainmunolectroforesis (CIE), resultando la coaglutinación altamente sensible y específica. (35)

GENERALIDADES

El cólera es una infección intestinal aguda, grave, que se caracteriza por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómito, deshidratación rápida, acidosis, colapso circulatorio y en los casos no tratados se produce la muerte dentro de las 24 horas siguientes a su aparición. También se sabe que la infección puede ser asintomática o solo provocar una leve sintomatología. La letalidad en los casos graves puede exceder el 50%, pero si se aplica el debido tratamiento se reduce a menos del 1%. (13, 17)

El diagnóstico se realiza mediante la búsqueda del agente etiológico, el cuál debe confirmarse mediante reacciones bioquímicas y serológicas (13, 17).

AGENTE ETIOLOGICO

El género *Vibrio* es un grupo muy amplio de microorganismos que se han clasificado dentro de la familia Vibrionaceae junto con otros tres géneros:

- Photobacterium
- Aeromonas
- Plesiomonas

El *Vibrio* es un bacilo gram negativo, que mide de 1.5 - 3 μm de longitud por 0.4 - 0.6 μm de ancho, es ligeramente curvo de bordes redondeados en uno de los cuales tiene un flagelo que lo hace móvil; puede presentarse aislado o en cadenas con aspecto de espirales cortas en forma de "S" (dos células). No tiene cápsula ni forma esporas. (11, 17)

Es anaerobio facultativo ya que posee ambos metabolismos, es decir, tanto respiratorio como fermentativo; no fija ni desnitrifica el nitrógeno, quimiorganotrofo, capaz de crecer en un medio mineral con glucosa y NaCl, oxidasa positivo, indol positivo y Voges Proskauer positivo (según cuadro No. 1) (11, 17).

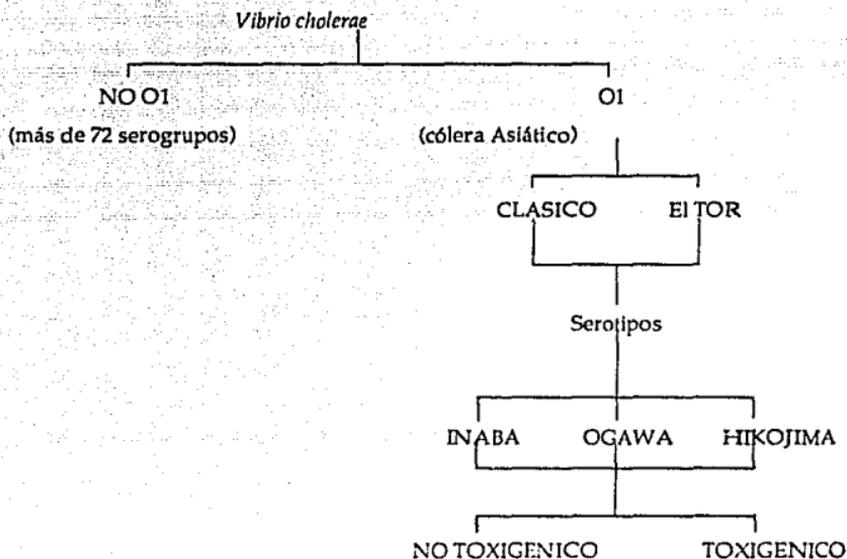
Varias especies de *Vibrio* son patógenas para el hombre así como también para animales marinos. Existen mas de 20 especies de *Vibrio* de las cuales sólo 12 se han encontrado en muestras clínicas humanas. Cinco especies han mostrado ser causantes o estar asociadas con diarrea. El *Vibrio cholerae* es causante de cólera, el *Vibrio parahaemolyticus* causa gastroenteritis aguda, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae* y *Vibrio mimicus* son causantes de diarrea de leve a moderada.(17)

El *Vibrio cholerae* se divide en *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* NO O1 (de los cuales existen aproximadamente 72 serogrupos). Todos los *vibrios* comparten un antígeno flagelar (H) común. El *Vibrio cholerae* O1 incluye 2 biotipos el Clásico y El Tor, dentro de los cuales hay 3 serotipos que se diferencian entre sí por la composición de su antígeno somático:

OGAWA	(AB)
INABA	(AC)
HIKJIMA	(ABC)

TABLA No. 3

CLASIFICACION DEL *Vibrio cholerae* EN BASE A SUS
ANTIGENOS SOMATICOS



La toxigenicidad de *Vibrio cholerae* O1 depende en gran parte de la producción de la enterotoxina, la cuál es una proteína oligomérica con peso molecular de 84000 d; compuesta por una subunidad A₁ de 21000 d, una subunidad A₂ de 7000 d y 5 subunidades B de 10000 d cada una. Se inactiva a 100°C por 15 minutos, es resistente a los ácidos; está estrechamente relacionada a la toxina LT de *Escherichia coli*, y produce además anticuerpos neutralizantes (15).

CUADRO # 1

DIFERENCIACION ENTRE *Vibrio* Y OTRAS BACTERIAS

ORGANISMO	FONDO DEL TSI ACIDO GAS H ₂ S	OXIDASA	LISINA DESCARB.	ARGININA DIHIDR.	ORNITINA DESCARB.	LICUEFACCION GELATINA
<i>Vibrio cholerae</i>	+ - -	+	+	-	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+ D -	+	D	+	-	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+ - -	+	+	+	+	-
Enterobacterias	+ D D	-	D	D	D	D

+ Positivo - Negativo D Diferente tipo bioquimico

CUADRO # 2

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Vibrio*

ESPECIES	CRECIMIENTO EN NaCl			VOGES PROSKAUER	ARGININA	INDOL
	0%	6%	8%			
<i>V. cholerae</i>	+	+/-	-	+/-	-	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	+	-	+/-
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	-	+	-	-
<i>V. damsela</i> ¹	-	+	-	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+/-	-	+	+/-
<i>V. furnissii</i> ²	-	+	+/-	-	+	-
<i>V. hollisae</i>	-	+	-	-	-	+
<i>V. metschnikovii</i> ³	+/-	+	+/-	+	+	+/-
<i>V. mimicus</i>	+	+/-	-	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i> ¹	-	+	+	-	-	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	-	-	-	+

¹Ureasa (+)²Gas de glucosa³Oxidasa (-), nitrato (-)

CUADRO CLINICO

La enfermedad causada por el *Vibrio cholerae* O1 es conocida como COLERA la cual se caracteriza por la falta de apetito, malestar abdominal y diarrea líquida inicialmente de color café pero que rápidamente adquiere un color pálido como de agua de arroz. Las heces son isotónicas, no tienen proteínas pero poseen bicarbonato y potasio, se produce deshidratación, no hay fiebre, ni sangre, ni moco; pero puede aparecer vómito y dolor abdominal.(17)

El paciente puede perder del 10 al 15 % de su peso corporal lo que genera un colapso circulatorio acompañado de pulso periférico ausente y presión arterial no detectable.(17)

Gran parte de las infecciones por *Vibrio cholerae* O1 son asintomáticas, o presentan manifestaciones que no pueden distinguirse de las diarreas causadas por otras etiologías (13, 17).

PATOGENESIS

Cuando los vibriones han sido ingeridos y sobreviven al pH ácido del estómago pasan al intestino delgado multiplicándose rápidamente, con la consiguiente autólisis y disolución de las células liberando la enterotoxina.(13)

De la toxina producida por el *Vibrio cholerae* O1, las subunidades B de la toxina de cólera son responsables de la fijación al receptor específico, Gangliósido GM₁, que se localiza sobre la membrana celular del epitelio intestinal del huésped. La subunidad A, de la toxina, activa el complejo enzimático adenilato ciclasa en las células incrementando los niveles intracelulares de AMP cíclico que provocan la hipersecreción de electrolitos y agua, dando como consecuencia una diarrea isotónica con respecto al plasma. El resultado es la aparición de hiperemesis (vómito) y una excreción masiva de heces acuosas en las que hay flóculos blanquecinos semejantes a granos de arroz, se produce hipotermia y deshidratación que llega a causar la muerte (13, 15, 17).

En 1988, se registró el cólera en más de 30 países. Hasta 1991, se consideraba que la región de América del Sur se encontraba libre de cólera, pero el 29 de Enero se iniciaba la epidemia de cólera en Perú, identificándose *Vibrio cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba (21).

EPIDEMIOLOGIA

En 1973 se reportó el cólera en la costa texana del Golfo de México, en 1978 en Louisiana, 1981 en Texas y dos años después se reportó un solo caso en Cancún. (18, 19)

Durante los últimos diez años se reportaron alrededor de 40,000 casos anuales en 35 países, la mayoría africanos y asiáticos. (19)

La difusión del cólera sigue las rutas migratorias y comerciales de los pueblos y en una época de transporte rápido puede utilizar las vías aéreas y marítimas, pero en una zona determinada se puede desplazar por vía terrestre, a través del excremento, en alimentos frescos o bien en bebidas contaminadas. (19)

Fue hasta 1978 cuando se reportó un aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 en el drenaje de Río de Janeiro, Brasil, pero no se reportaron casos en humanos. En 1988 se reportaron 2 casos de diarrea en turistas que visitaron Perú, los cuales fueron los primeros aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 provenientes de humanos en Sudamérica (18).

El 31 de Enero de 1991 se reportaron otros casos de cólera en Perú, para el 15 de Abril se habían notificado 146,877 de los cuales 1,045 fueron muertes. La mayoría de los casos corresponden a Lima, Puerto de Chimbote, Piura, La Libertad y otras regiones más. Durante los primeros 72 días se presentaron alrededor de 2,000 casos diarios, y el último reporte indica 297,000 casos acumulados. Las cepas aisladas corresponden a *Vibrio cholerae* O1 biotipo El tor (19).

Ecuador reportó en total 1,216 casos y 35 muertes por cólera hasta el 7 de Abril de 1991, cuya fuente de infección fue un pozo de agua que abastece a la comunidad así como los alimentos marinos. (19)

En Colombia se inició el reporte el 8 de Marzo y hasta el 11 de Abril DE 1991 fué un total de 49 casos en los que se aisló *Vibrio cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba.(19)

El 16 de Abril de 1991 en Chile reportaron el primer caso donde se aisló *Vibrio cholerae* O1, El tor, Inaba.(19)

El 17 de Abril de 1991, Brasil, reportó 5 probables casos con confirmación pendiente.(19)

Es muy probable que el *Vibrio cholerae* O1 circulara desde meses antes del reporte del inicio de la epidemia. Su distribución geográfica (de la epidemia) abarca 1500 km a lo largo de la costa peruana, ecuatoriana y parte de Colombia; su fuente de contagio se puede suponer que fueron los alimentos marinos y las condiciones bajas de saneamiento. Dichas condiciones fueron fundamentales en la difusión de la epidemia. Su probable origen pudieron ser pacientes infectados o alimentos contaminados provenientes de Asia y Africa (22).

En una siguiente etapa se difundió a países centroamericanos, del Caribe y México.(22)

En México el ingreso del cólera fué notificado en Saltillo el 27 de Junio de 1833 y tiempo después en Campeche, Yucatán y Tampico, donde morían 140 personas diarias. La epidemia se propagó a San Luis Potosí y Guanajuato; para Agosto se reportó ya en la ciudad de México, Guadalajara, Puebla y Oaxaca, es decir, que desde la primera invasión se extendió por toda la República.(22)

El cólera originó epidemias en 1849 y 1854 por todo el territorio causando alrededor de 200,000 muertes. De 1855 a 1871 el cólera fué endémico cuya transmisión se efectuaba sin interrupción.(22)

En 1882 nuevamente se presentó una epidemia en Chiapas, Oaxaca y Tabasco; en esta última epidemia se observó que la propagación siguió rutas comerciales y el sentido de las corrientes de los ríos, terminando en Juchitán (Oaxaca) donde se logró extinguir la enfermedad a mediados de 1883.(19,22)

Las epidemias de cólera como las del siglo XIX en nuestro país, no se han repetido. El cólera se extinguió antes de que se conocieran los métodos epidemiológicos descritos por Snow en 1849 o el descubrimiento del *Vibrio* por Koch (un año después) (18,19).

El 17 de Junio de 1991 se recibió una muestra de materia fecal de San Miguel Totolmaloya, Municipio de Sultepec, Estado de México; resultando positiva para *Vibrio cholerae* O1, El tor, Inaba. Para el 24 de Junio ya eran 16 los casos confirmados de los cuales 5 requirieron hospitalización.(19, 22 ,23)

El 26 de Junio de 1991 se recibió una muestra de Tepeji del Río en el Valle de Tula, siendo positiva para *Vibrio cholerae* O1, El tor, Inaba (23).

De Agosto a Noviembre de 1991 el cólera alcanzó gran parte de la República (ver tabla 4).

En resumen, trece países de América Latina reportaron casos de cólera en el año 1991, cuya forma de transmisión fué endemo-epidémica para el caso de Perú; para Ecuador, Colombia, Guatemala, Panamá y México fué de forma epidémica; Brasil, Chile, El Salvador y Bolivia en forma de brotes; Honduras y Estados Unidos como casos aislados, incluso muchos de ellos no tienen relación con la epidemia en Sudamérica. El último país que se incorporó a esta situación fué Nicaragua presentando para el 11 de Noviembre un caso de *Vibrio cholerae* O1.(22, 23)

Nueve meses después del inicio de la epidemia se registraron 327,108 casos de cólera con 3,486 defunciones y más de 107 provincias afectadas, dentro del Continente Americano (24).

TABLA 4.

**NUMERO DE CASOS DE COLERA REPORTADOS EN LA
REPUBLICA MEXICANA DURANTE 1991**

	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE
CAMPECHE	0	6	1	16
COLIMA	0	0	0	4
CHIAPAS	31	20	29	16
D.F.	0	21	0	14
EDO. MEXICO	5	0	0	0
GUERRERO	0	0	0	29
HIDALGO	70	12	10	20
JALISCO	0	0	1	0
MICHOACAN	0	0	23	23
MORELOS	0	0	8	12
OAXACA	0	2	8	11
PUEBLA	61	66	4	0
TABASCO	0	21	123	171
VERACRUZ	39	49	35	18
YUCATAN	0	0	42	47
	206	197	284	381
TOTAL				1068

A semejanza de otras enfermedades infecciosas el cólera presenta variaciones estacionales características, aunque la estación varía según las regiones, como por ejemplo, en Dacca se inicia después de las lluvias del monzón y desaparece en los meses cálidos y secos; en cambio, en Calcuta, al otro lado del Delta del Ganges - Brahmaputra, el cólera se inicia en la estación cálida y termina en las lluvias del Monzón. Aun no se conoce la causa de estas variaciones estacionales. (15)

Las epidemias pueden ser de dos tipos:

- explosivas.- tienen una fuente común o un vehículo común y puede reconocerse rápidamente por la aparición de un número elevado de casos en una colectividad durante un periodo corto (1 a 5 días).(15)

- lentas.- se manifiestan por un pequeño número diario o semanal de casos, en estos brotes no está claro el modo de transmisión. En muchos casos la contaminación del agua puede infectar una elevada proporción de la población, o bien, puede deberse a la propagación por contacto.(15, 17)

El cólera ataca a personas de bajo nivel socioeconómico, no se conoce ningún factor nutricional o gastrointestinal que predisponga a la infección o a la enfermedad. El sexo parece ejercer cierta influencia ya que los primeros casos en los que se observa son varones adultos, debido a la mayor movilidad.(17)

La morbilidad por edades varía según sea el cólera (endémico o epidémico), es decir, en zonas indemnes ataca sobre todo a personas adultas, en cambio en zonas endémicas la incidencia es en la población infantil.(17)

El periodo de incubación es variable, aunque en general, oscila entre 1 a 5 días. En un brote causado por una fuente común, el periodo de incubación fué de 48 horas. (17, 25)

El reservorio natural conocido es el hombre, siguiendo un ciclo de transmisión hombre - medio ambiente - hombre. Aunque por lo general el sujeto infectado excreta vibriones por pocos días, la elevada proporción de infecciones asintomáticas hace que el ciclo de transmisión se mantenga (25, 15, 17).

DIAGNOSTICO

La identificación de *Vibrio cholerae* O1 causante del cólera, en el laboratorio se lleva a cabo a partir de las muestras de materia fecal o vómito del paciente, se inoculan directamente o se transfieren a medio de transporte Cary-Blair (en donde se conservan por varios días) (27, 13).

El caldo de enriquecimiento recomendado tanto para muestras directas como para el Cary-Blair es el agua peptonada alcalina (pH 9.0) incubando de 6 a 8 horas a 37°C. (13)

De aquí se siembran placas de Agar TCBS por estría cruzada, y se incuban por 18 - 24 horas a 37°C. Las colonias típicas en este medio son amarillas, un poco convexas. Las colonias sospechosas se pasan a una placa de Agar Base para Sangre (BAB) para realizar serología y prueba de oxidasa. De esas mismas colonias se siembran las pruebas bioquímicas, incubando de 18 a 24 horas a 37°C (13).

Las pruebas bioquímicas empleadas son:

MEDIO MIO

Es un medio semisólido, se siembra por picadura. Sirve para leer la movilidad, producción de Indol y descarboxilación de la ornitina, la cual se lleva a cabo en anaerobiosis.(13)

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR (TSI)

Es un medio sólido, se siembra por picadura y estría. Sirve para determinar la fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa, además de la producción de gas a partir de glucosa y la producción de ácido sulfhídrico que precipita como sulfuro férrico al reaccionar con el hierro.(13)

AGAR DE HIERRO Y LISINA (LIA)

Es también un medio sólido, se siembra por estría y picadura, sirve para determinar la descarboxilación de la lisina que se lleva a cabo en anaerobiosis y la desaminación de la lisina en aerobiosis.(13)

CALDO ARGININA

Es un medio líquido, el cuál puede demostrar la descarboxilación de la arginina en anaerobiosis. Después de inocularse este caldo, debe sellarse con vaselina líquida o aceite mineral estéril para evitar contacto con el aire, (se incuba de 1 a 4 días).(13)

PRUEBA DE OXIDASA

Esta prueba se realiza en una tira de papel filtro colocado sobre una caja petri, se ponen 2 a 3 gotas del reactivo de oxidasa (N,N,N,N, tetrametil parafeniléndiamina). Se coloca un pequeño inóculo con un asa de platino (no de níromo) o un palillo de madera sobre el papel impregnado con el reactivo.(13)

Si después de incubar las bioquímicas, los resultados concuerdan con los de *Vibrio cholerae* (ver cuadro No. 1), realizar la prueba de oxidasa y si es positiva, se confirma con serología, esto por medio de aglutinación en placa con los antisueros polivalentes O1, Ogawa e Inaba (13, 30).

Existen otras pruebas de diferenciación como puede ser:

- Sensibilidad a la polimixina B
- Sensibilidad al Fago del grupo IV
- Hemólisis
- Susceptibilidad a antimicrobianos
- Pruebas inmunoenzimáticas para detección de toxina

En total para la identificación completa de un cultivo de *Vibrio cholerae* se requieren por lo menos 3 días, por lo tanto es importante el desarrollo de técnicas rápidas por medio de las cuales se puedan dar resultados bastante confiables. (13)

Entre otras técnicas que se han desarrollado para la detección rápida de enterobacterias, existe el método de diagnóstico por COAGLUTINACION.(1)

LA TECNICA DE COAGLUTINACION para la detección de *V. cholerae* O1 ha sido ensayada por varios autores que reportan resultados alentadores de sensibilidad y resultados en menos de 10 horas. Esta técnica es lo contrario al método de aglutinación pasiva, pues anticuerpos específicos son unidos a un acarreador que al ser combinados con el antígeno homólogo, forma agregados macroscópicos (6, 12, 20).

Para este procedimiento se aprovecha la capacidad del *Staphylococcus aureus* Cowan I para fijar proteínas a su pared. Se ha encontrado que la proteína A es principal en la pared del *Staphylococcus* y que tiene la habilidad de unirse con gran afinidad y especificidad a la región cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas de varias especies animales, dejando libre la región que reacciona con los antígenos, es decir, el sitio de combinación del anticuerpo (Fab) (2, 6, 1).

Cuando el antígeno apropiado se combina con los sitios de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo, se forman grandes agregados que indican la interacción específica Antígeno - Anticuerpo (figura 1).

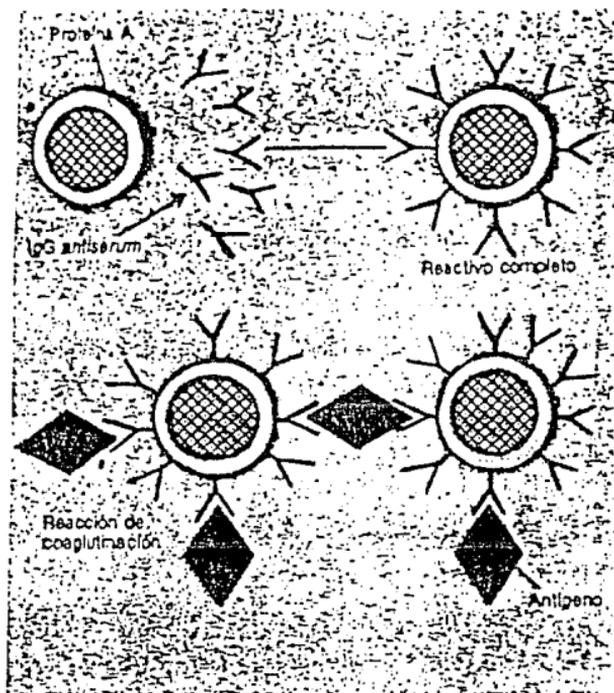


Figura 1. REACCIÓN DE COAGULACIÓN.

TRATAMIENTO

En la mayoría de los casos de cólera, se puede manejar mediante la administración oral de soluciones de sales de rehidratación oral (SRO), cuyo contenido de agua y electrolitos deberá aproximarse a la pérdida de agua y electrolitos en la heces diarreicas. Las soluciones endovenosas se utilizan sólo en caso de rehidratación inicial, en casos gravemente deshidratados o en caso de shock; dicho tratamiento se realiza cuando el volumen de las heces excede los 7 lt / día en una persona de 70 Kg de peso.(17)

En general el tratamiento consiste en aplicar soluciones de rehidratación con equipos desechables, como la solución de Ringer con lactato de sodio, a razón de un litro en los primeros 15 minutos y después otro litro cada 30 ó 45 minutos. La solución salina normal o solución salina con glucosa al 5 % son menos eficaces y la glucosa simple en agua es ineficaz.(17)

En otros casos, los antibióticos pueden reducir el volumen y duración de la diarrea, y acortar el período de excreción del *Vibrio Cholerae*. Los antibióticos deberán administrarse por vía oral tan pronto como el vómito cese.(17,27)

La tetraciclina es el antibiótico de elección pues inhibe la síntesis protéica, su vida media es de aproximadamente 8 horas, con concentraciones terapéuticas a las 4 horas; debe ser administrada por vía oral, se elimina por vía renal, atraviesa barrera placentaria y se excreta por leche materna. La dosis en niños es de 250 mg / día y adultos de 500 mg 4 veces al día durante 3 días.(27)

La doxiciclina, antibiótico de acción prolongada se administra en una sola ocasión en dosis de 300 mg a mayores de 5 años. Otros antibióticos utilizados son la eritromicina y el cloranfenicol.(17, 27)

No. deberán utilizarse antidiarreicos, antieméticos, antiespasmódicos, cardiotónicos o corticosteroides ya que detienen la eliminación del microorganismo en la heces (13, 17, 27, 30).

OBJETIVO ESPECIFICO

- Obtener un reactivo de coagulación a partir de cada uno de los sueros y con la cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan I.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cuatro sueros polivalentes para la identificación de *Vibrio cholerae* O1, siguiendo diferentes esquemas de inmunización en conejos blancos Nueva Zelanda de 3 kg de peso, sangrando a diferentes tiempos.

- Evaluar el reactivo con cultivos de referencia de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Vibrio cholerae* NO O1 y *Vibrio cholerae* O1 (Ogawa e Inaba).

- Probar el reactivo con muestras clínicas de heces y aguas de monitoreo, comparar su especificidad con la técnica de aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 por cultivo.

M A T E R I A L

- Asa bacteriológica (platino)
- Baño María
- Bulbos para pipeta
- Centrífuga
- Gradillas
- Lámpara de luz blanca
- Matraces Erlen Mayer
- Mechero
- Pipetas de 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Placas petri de metal (15 cm de diámetro)
- Portaobjetos
- Potenciómetro

- Probeta
- Termómetro
- Tripie
- Tela de asbesto
- Tubos de ensaye
- Tubos de centrífuga (polipropileno)
- Viales 50 ml
- Vortex

MATERIAL BIOLÓGICO

- Conejos blancos Nueva Zelanda (3 Kg de peso)
- Cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan I (proveniente del INDRE)
- Cepas de Referencia:
 - 2 *Salmonella*
 - 2 *Shigella*
 - 10 *E. coli*
 - 1 *Aeromonas*
 - 1 *Plesiomonas*
 - 2 *Proteus*
 - 10 *V. cholerae* NO O1
 - 5 *V. cholerae* NO O1 (referencia CDC)
 - 3 *V. cholerae* O1 Inaba (VC13, 226, Inaba)
 - 4 *V. cholerae* O1 Ogawa (VC12, 6041, 299, 310)
- 150 muestras de heces de casos de cólera, provenientes de diferentes estados de la república.
- 10 muestras de aguas negras, provenientes del estado de México.

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- Agar de Hierro y Lisina (LIA), BIOXON
- Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI), BIOXON
- Agar Infusión Corazón (HIA), BIOXON
- Agua destilada
- Base Agar Sangre (BAB), BIOXON
- Benzal
- Buffer de fosfatos salino (PBS) pH= 7.3
- Caldo Infusión Corazón (HI), BIOXON
- Caldo Soya Trypticasina (TSB), BIOXON
- Caldo Arginina
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Formol
- Fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4)
- Fosfato diácido de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

- Hipoclorito de sodio
- Peptona de caseína, (reactivo)

Todos los reactivos se preparan de acuerdo con las indicaciones especificadas por el proveedor.

PRODUCCION DEL REACTIVO DE COAGLUTINACION

I. METODO DE OBTENCION DEL ANTIGENO

- Inocular una asada de la cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan I en viales de 50 ml con caldo soya tripticaseína (TSB), incubar a 37°C por 18 horas.
- Del caldo de cultivo anterior, pasar 10 ml a cada una de las 10 placas (15 cm diámetro) de Agar Base para Sangre (BAB), incubar 18 horas a 37°C.
- Cosechar el cultivo con aproximadamente 10 ml de solución buffer de fosfatos (PBS) de pH= 7.3, colocar en tubos de centrifuga (polipropileno) y centrifugar 30 minutos a 3000 rpm. Obtener el paquete celular.
- Hacer 3 lavados más con solución buffer de fosfatos (PBS) durante 30 minutos a 3000 rpm; descartar el sobrenadante.
- Después del último lavado, agregar al paquete celular una solución preparada de PBS - Formol al 0.5 %, resuspender perfectamente y dejar 3 horas a temperatura ambiente (volumen a volumen).
- Centrifugar, eliminar el sobrenadante y hacer 3 lavados más con solución buffer de fosfatos (PBS), centrifugando 30 minutos a 3000 rpm.
- Adicionar PBS, resuspender perfectamente el paquete celular durante 1 hora a 80°C en baño maría .
- Realizar nuevamente 3 lavados con PBS descartando el sobrenadante; y al último paquete adicionar PBS en una proporción de 1:10 para su conservación.

II. PRODUCCION DEL ANTISUERO DE *Vibrio Cholerae* O1 POLIVALENTE

II.1 OBTENCION DEL INMUNOGENO:

- Todas las cepas de *Vibrio cholerae* O1 (Inaba y Ogawa) en placa deben ser lisas y no autoaglutinar en solución salina.

- Inocular 2 placas de Agar Infusión Corazón (HIA) por cepa. Incubar a 37°C por 24 horas. Hacer tinción de Gram.

- Inocular en un matraz de 2 litros conteniendo 200 ml de Caldo Infusión Corazón (HIB) con el cultivo anterior.

- Checar la pureza de los cultivos mediante la tinción de Gram. Centrifugar el cultivo a 3000 rpm por 30 min., resuspender en solución salina 0.85 %. Calentar en baño maría a 100°C por 2 horas.

- Centrifugar el cultivo anterior y resuspender en aproximadamente 50 ml de alcohol al 95 %. Dejar toda la noche a 37°C.

- Repetir el paso anterior.

- Centrifugar, decantar el sobrenadante y resuspender las células en 50 ml de acetona.

- Repetir el paso anterior.

- Resuspender las células en una pequeña cantidad de acetona y rápidamente vaciar en una caja petri estéril para secar. Cuando la acetona se ha evaporado (alrededor de 1 hora), raspar las células de la caja y dejar secar de 3 a 4 horas y después toda la noche a 37°C.

- Después de que están secas, pulverizar en un mortero estéril y vaciar en un recipiente hermético estéril. El polvo resultante se guarda indefinidamente a temperatura ambiente para su posterior uso como inmunógeno.

II.2 CALENDARIO DE INMUNIZACION

- Para el antisuero polivalente, mezclar las 2 vacunas Ogawa e Inaba (obtenidas por el procedimiento anterior) en cantidades iguales, suspender en solución salina 0.85 % hasta obtener las densidades mencionadas abajo (de acuerdo con el nefelómetro de Mc Farland).

- Inocular conejos intravenosamente en la vena marginal de la oreja de 4 a 5 días en intervalos, de la siguiente manera:

1a	inoculación	0.25 ml	Mc Farland	# 2	600 x 10 ⁶ bac/ml
2a	0.5 ml		# 3	900 x 10 ⁶	
3a	1.0 ml		# 4	1200 x 10 ⁶	
4a	2.0 ml		# 5	1500 x 10 ⁶	
5a	4.0 ml		# 5	1500 x 10 ⁶	
6a	4.0 ml		# 6	1800 x 10 ⁶	

- Realizar sangría de prueba a los animales una semana después de la última inoculación.

- Determinar el título por aglutinación en placa (ver método) usando antígenos vivos. Sangrar los conejos si el antisuero da 4+ de aglutinación en un minuto a una dilución de 1:10 o mayor.

- Si los conejos no dan una buena respuesta inocular 2 veces más con 4 ml cada una. Sangrar de prueba una semana después de la última inoculación.

- Esterilizar los antisueros por filtración y agregar un volumen igual de glicerol.

II.2 CALENDARIO DE INMUNIZACION

- Para el antisuero polivalente, mezclar las 2 vacunas Ogawa e Inaba (obtenidas por el procedimiento anterior) en cantidades iguales, suspender en solución salina 0.85 % hasta obtener las densidades mencionadas abajo (de acuerdo con el nefelómetro de Mc Farland).

- Inocular conejos intravenosamente en la vena marginal de la oreja de 4 a 5 días en intervalos, de la siguiente manera:

1a	Inoculación	0.25 ml	Mc Farland	# 2	600 x 10 ⁶ bac/ml
2a		0.5 ml		# 3	900 x 10 ⁶
3a		1.0 ml		# 4	1200 x 10 ⁶
4a		2.0 ml		# 5	1500 x 10 ⁶
5a		4.0 ml		# 5	1500 x 10 ⁶
6a		4.0 ml		# 6	1800 x 10 ⁶

- Realizar sangría de prueba a los animales una semana después de la última inoculación.

- Determinar el título por aglutinación en placa (ver método) usando antígenos vivos. Sangrar los conejos si el antisuero da 4+ de aglutinación en un minuto a una dilución de 1:10 o mayor.

- Si los conejos no dan una buena respuesta inocular 2 veces más con 4 ml cada una. Sangrar de prueba una semana después de la última inoculación.

- Esterilizar los antisueros por filtración y agregar un volumen igual de glicerol.

II.3 EVALUACION

- Evaluar el antisuero por aglutinación en placa utilizando cultivos frescos de varios aislamientos de *V. cholerae* serotipos Ogawa e Inaba y con varias cepas de Vibrios no coléricos. El antisuero no debe reaccionar con ningún cultivo que no corresponda a *V. cholerae* O1, además se evalúa con cultivos de referencia de *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

- El título del antisuero es la mayor dilución que da 4+ de aglutinación al minuto.

III. METODO DE AGLUTINACION EN PLACA

- Colocar en una placa de aglutinación una gota de muestra (de la superficie del tubo) con una pipeta pasteur.

- Añadir una gota del reactivo y mezclar por agitación durante un minuto.

- Observar las placas bajo una lámpara de luz blanca.

- Dar un resultado positivo cuando existan grumos o aglutinación; reportar desde 4 + hasta trazas (tr). Reportar negativo cuando no exista aglutinación.

4 + grumos grandes y sobrenadante claro

3 + grumos grandes con sobrenadante ligeramente turbio

2 + grumos moderados y sobrenadante turbio

1 + grumos pequeños y sobrenadante turbio

Tr aglutinación muy fina

(-) permanece sin cambio

- Correr la prueba junto con el control negativo, pero sin observarse aglutinación.

IV. SENSIBILIZACION DEL REACTIVO

- Mezclar una alícuota del reactivo de *Staphylococcus* con cada uno de los antisueros, mezclar durante 2 horas y media a temperatura ambiente; colocando 1 ml de reactivo con 0.5 ml de antisuero.

- Agregar a la mezcla anterior aproximadamente 9 ml de PBS y centrifugar 30 minutos a 3000 rpm.

- Descartar el sobrenadante para eliminar el exceso de antisuero, y al paquete celular obtenido agregarle 5 ml de PBS.

- Lavar 3 veces a 3000 rpm por 30 minutos.

- Resuspender en 2 ml de PBS, agitar y usar.

- Además preparar un reactivo con antisuero normal de conejo y otro con antisuero de *Escherichia coli*. (testigos negativos).

V. EVALUACION DEL REACTIVO CON CEPAS DE REFERENCIA

- De un cultivo en BAB tomar una asada de cada cepa
- Inocular en agua peptonada alcalina (pH=9), las cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *V. cholerae* NO O1 y *V. cholerae* O1 (Ogawa e Inaba).
- Incubar de 4 a 6 horas a 37°C.
- Aglutinar en placa con el reactivo de coagulación; tomando de la superficie del agua peptonada.
- Observar las placas bajo la lámpara de luz blanca.
- Dar resultado positivo o negativo en base a la presencia de aglutinación. (No debe haber reacciones cruzadas).

VI. EVALUACION DEL REACTIVO CON MUESTRAS CLINICAS

- Inocular muestras de heces fecales de casos de cólera en agua peptonada alcalina (pH=9).
- Incubar de 4 a 6 horas a 37°C.
- Aglutinar en placa con el reactivo de coaglutinación; tomando de la superficie del agua peptonada.
- Observar las placas bajo la lámpara de luz blanca.
- Dar resultado positivo o negativo en base al grado de aglutinación.

Se prepararon 4 antisueros con diferentes calendarios de inmunización, iniciándose con 6 inoculaciones a intervalos de 3 días en cada inoculación y variando la concentración del antígeno; la sangría de prueba se realizó una semana posterior a la última inoculación y después la sangría en blanco. Para el último antisuero se dejó al conejo descansar por dos meses y se le realizó una reinmunización, obteniéndose la sangría en blanco tres meses después de la fecha de inicio.

Una vez obtenidos los antisueros se probaron con cepas de referencia como son : *V. cholerae* (ogawa, inaba y NO O1), *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*; para evaluar el título y observar si existe o no cruce antigénico con otros microorganismos.

De aquí se prepararon los reactivos de coagulación sensibilizando con los 4 antisueros; se probaron con las mismas cepas de referencia (ATCC) y se eligió el más sensible y en el cual no se observaron reacciones cruzadas.

Ya seleccionado el reactivo se probó con las muestras clínicas y a la vez se le realizó el aislamiento por cultivo (como lo indica el manual de técnicas (13).) para comparar resultados.

Todas las evaluaciones tanto de los antisueros como de los reactivos de coagulación se realizaron por el método de aglutinación en placa.

RESULTADOS

TABLA 1 Y 2

En la tabla 1 se muestran los títulos obtenidos en los 4 antisueros producidos en conejos contra *Vibrio cholerae* O1 polivalentes y realizados con diferentes calendarios de inmunización, es decir, que las fechas en que se obtuvieron los sueros no son las mismas, ya que el primer suero tiene 2 meses de diferencia con el último suero; de aquí que el antisuero de mayor título (suero 4) se evaluó con otras cepas de *Vibrio cholerae* O1 tanto Inaba como Ogawa para rectificar su título, como se muestra en la tabla 2. Las cepas de *Vibrio cholerae* NOO1, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, no aglutinan con el suero, por lo que no existe ninguna reacción cruzada.

RESULTADOS

TABLA No. 1

EVALUACION DE LOS ANTISUEROS POLIVALENTES DE *Vibrio cholerae* O1 CON CEPAS DE REFERENCIA

SUERO 1 (5 de Julio de 91)

	D	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
VC-12		4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	—	—
VC-13		4+	4+	4+	4+	3+	2+	—		
Aeromonas		—								
Plesiomonas		—								

SUERO 2 (25 de Julio de 91)

	D	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
VC-12		4+	4+	4+	4+	3+	3+	1+	—	
VC-13		4+	4+	4+	4+	3+	2+	—		
Aeromonas		—								
Plesiomonas		—								

SUERO 3 (8 de Agosto de 91)

	D	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
VC-12	4+	4+	4+	3+	3+	—				
VC-13	4+	3+	3+	2+	1+	—				
Aeromonas	—									
Plesiomonas	—									

SUERO 4 (9 de Septiembre de 91)

	D	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
VC-12	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	—
VC-13	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	—
Aeromonas	—									
Plesiomonas	—									

TABLA No. 2

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE *V. cholerae* O1 CON CEPAS DE *V. cholerae* INABA Y OGAWA OBTENIDAS POR AISLAMIENTO

ANTISUERO 4 (9 de Septiembre de 91)

	D	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
OGAWA											
6041	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-
299	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	—
310	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	—
INABA											
226	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	—	
INABA	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	—

TABLA 3

Una vez obtenidos los sueros, se prepararon los diferentes reactivos de coagulación con los mismos, de aquí se seleccionó el reactivo de coagulación con mayor sensibilidad y se probó con diferentes cepas tanto homólogas como heterólogas en las cuales no se observó ningún cruce antigénico como se muestra en la tabla 3.

Los otros 3 reactivos de coagulación poseían también sensibilidad y especificidad pero en menor grado, por lo que únicamente se trabajó con el reactivo sensibilizado con el antisuero 4.

TABLA 3.

EVALUACION DEL REACTIVO DE COAGLUTINACION CON
DIFERENTES CEPAS DE REFERENCIA

		REACTIVO DE COAGLUTINACION	TESTIGO NEGATIVO
<i>V. cholerae</i>	(Ogawa)	++++	-
<i>V. cholerae</i>	(Inaba)	++++	-
<i>V. cholerae</i>	NO O1	-	-
<i>V. cholerae</i>	NO O1 (CDC)	-	-
<i>E. coli</i>		-	-
<i>Salmonella</i>		-	-
<i>Shigella</i>		-	-
<i>Proteus</i>		-	-
<i>Aeromonas</i>		-	-
<i>Plesiomonas</i>		-	-

Todas las cepas fueron inoculadas en agua peptonada alcalina (pH = 9) e incubadas durante 6 a 8 horas.

TABLA 4

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del reactivo con las muestras clínicas de humanos ; haciendo una comparación con la técnica de aislamiento por cultivo, observando que las muestras que resultaron positivas por coagulación, son las mismas que por aislamiento corresponden al *Vibrio cholerae* O1; de las muestras negativas por coagulación, pero por aislamiento se detectaron como *Vibrio cholerae* O1; son muestras en las cuales el crecimiento en agua peptonada alcalina posiblemente no fué detectado, por lo que se pudiera incubar un mayor tiempo al sugerido o bien trasladar a otro tubo de agua peptonada para su doble enriquecimiento.

TABLA 4.

EVALUACION DEL REACTIVO DE COAGLUTINACION
CON MUESTRAS CLINICAS DE HUMANOS

AISLAMIENTO DE
V. cholerae O1

K5

		+	-	TOTALES
COAGLUTINACION	+	17	0	17
	-	16*	117	133
	TOTALES	33	117	150

** FALSOS (-)

*** FALSOS (+)

DISCUSION

Podemos decir que todos los sueros obtenidos tenían un título satisfactorio considerando que los sueros con títulos mayores de 1:4 son aceptables según el manual del CDC de Atlanta. Después de realizar pruebas con antígenos homólogos y heterólogos, el suero de mejor título fué el antisuero 4 con un calendario de inmunización más prolongado debido a que el contenido de IgG probablemente es más elevado en la reinmunización, ya que estas inmunoglobulinas son las que se fijan con mayor afinidad a la proteína A del *Staphylococcus aureus*; por tal motivo se evaluó con otras cepas de referencia tanto de Inaba como de Ogawa, obteniéndose un título final de 1:64.

De la tabla 4 se observó que existe una especificidad del 100% ya que no se detectaron ningún otro tipo de microorganismos, aunque su sensibilidad no fué muy elevada pues se aislaron 16 casos por la técnica de aislamiento, no siendo detectados por el reactivo de coagulación; sin embargo, la sensibilidad se puede aumentar haciendo un doble enriquecimiento, pues se cree que aún a las 6 horas no se logran desarrollar en un número considerable que se pueda detectar con el reactivo, por lo que se transfiere el hisopo a otro tubo de agua peptonada alcalina pH 9, para lograr incrementar el crecimiento del microorganismo en el medio y este pueda ser detectado mediante la técnica de coagulación.

El reactivo de coagulación se produjo para utilizarse como un método de diagnóstico, por tal motivo se consideró que para ser una buena metodología, debía compararse con otras técnicas como la de aislamiento por cultivo por mencionar alguna; además se evaluó mediante ciertos criterios los cuales se deben cumplir para que un método de diagnóstico sea bueno. Inicia con que la técnica de coagulación debe ser sensible, es decir, que no debe detectar falsos negativos por lo que en este caso se tiene que aumentar pues es necesario que el reactivo tenga más sensibilidad que especificidad; aunque es importante la especificidad pues no se deben detectar falsos positivos, la técnica como

método de diagnóstico rápido requiere que la sensibilidad sea mayor ya que así se descartarían con mayor facilidad los negativos.

Otro de los criterios que se incluyen es que debe ser una técnica rápida donde se pueda dar un diagnóstico presuntivo en el menor tiempo posible, punto donde se considera satisfactorio pues solo requiere de 8 horas para dar un posible resultado. Además debe ser una técnica fácil de realizar y que no requiere de un gran equipo o material muy sofisticado como pueden ser otras técnicas; además de que el personal que la realiza no requiere de un gran entrenamiento para realizarla, solamente se requiere un poco de experiencia en la lectura de la aglutinación, pues es importante para poder dar un resultado correcto.

Finalmente se requiere que sea una técnica barata lo cual se cumple pues el material necesario no es caro y determinando un posible costo no sobrepasan los 500 pesos por prueba, además de que puede realizarse tanto en el laboratorio como en el campo, pues el equipo es muy simple y de fácil adquisición.

Dentro de las posibles fallas que pudiera tener la técnica, se involucra la producción tanto del reactivo como del antisuero, para lo cual muchas veces se obtiene un antisuero con un título por debajo de 1:64 el cual, al sensibilizar el reactivo no se logra tener mucha sensibilidad en el mismo y por eso exista quizá la detección de falsos negativos, para lo cual es necesario checar el título del antisuero antes de sangrar el conejo y así tener un reactivo de aglutinación lo mejor posible.

Considero que los probables problemas que pueden existir con la técnica, se pueden afinar y lograr que esta sea una técnica de diagnóstico rápido pues como se menciona anteriormente, esta técnica cumple con los criterios que son: sensibilidad y especificidad (probable no del 100%), rápida, fácil de realizar y barata; por lo que se sugiere como una posible técnica de diagnóstico rápido presuntivo para la detección de *Vibrio cholerae*.

CONCLUSIONES

En ocasiones es necesario realizar una reinmunización en los conejos posteriores a la sangría de prueba para obtener un título suficientemente bueno para requerir una cantidad mínima de antisuero para sensibilizar el reactivo. La pared del *Staphylococcus aureus* tiene una gran cantidad de proteína A fijadora de anticuerpos. Se requiere una cantidad mínima de antisuero para preparar el reactivo, ya que solo se necesitan 0.5 ml de antisuero para 1 ml de reactivo. Se pueden detectar cantidades pequeñísimas de *Vibrio cholerae* O1 en medios de enriquecimiento como es el agua peptonada alcalina pH 9, y en un lapso no mayor a 8 horas de incubación; de tal forma que un resultado presuntivo se puede dar en alrededor de 6 horas posteriores al procesamiento de la muestra. Es un reactivo de muy bajo costo, ya que un volumen aproximado para 100 pruebas daría alrededor de 400 pesos por prueba. La técnica para utilizar o identificar el *Vibrio cholerae* O1 a partir de agua peptonada es simple y sencilla que puede aplicarse como rutina, pues no requiere de equipo sofisticado ni personal especializado, ya que únicamente se necesita material para aglutinación.

BIBLIOGRAFIA

1. Mahbubur, R., D. Sack, S. Mahmood, A. Hossain; 1987. RAPID DIAGNOSIS OF CHOLERA BY COAGGLUTINATION TEST USING 4-H FECAL ENRICHMENT CULTURES. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 2204-2206.
2. M. Jesudason, C.P. Thangavelu, M. Lalitha, 1984, RAPID SCREENING OF FECAL SAMPLES FOR *Vibrio cholerae* BY A COAGGLUTINATION TECHNIQUE; *Journal of Clinical Microbiology*; 19: 712-713.
3. J. Carlson, L. McCarthy; 1979, MODIFIED COAGGLUTINATION PROCEDURE FOR THE SEROLOGICAL GROUPING OF STREPTOCOCCI; *Journal of Clinical Microbiology*; 9: 329-332.
4. A. Macone, G. Araakere, J. Letourneau, D. Goldmann; 1985, COMPARISON OF A NEW RAPID ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WITH LATEX PARTICLE AGGLUTINATION FOR THE DETECTION OF *Haemophilus Influenzae* TYPE B INFECTIONS; *Journal of Clinical Microbiology*; 21: 711-714.
5. G. Whinberg, G. Storch; 1985, PREPARATION OF URINE SAMPLES FOR USE IN COMMERCIAL LATEX AGGLUTINATION TEST FOR BACTERIAL ANTIGENS; *Journal of Clinical Microbiology*; 21: 899-901.
6. P. Guzzetta, G. Toews, J. Robertson, A. Pierce; 1983, RAPID DIAGNOSIS OF COMMUNITY- ACQUIRED BACTERIAL PNEUMONIA; 461-464.

7. J. Bailey, E. Sada, C. Brass, J. Bennelt, 1985, DIAGNOSIS OF SYSTEMIC CANDIDIASIS BY LATEX AGGLUTINATION FOR SERUM ANTUGEN; *Journal of Clinical Microbiology*; 21: 749-752.
8. Z. Tabbarah, J. Wheat, R. Kohler, A. White; 1980, THERMODISSOCIATION OF STAPHYLOCOCCAL IMMUNE COMPLEXES AND DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ANTIGEN IN SERUM FROM PATIENTS WITH *Staphylococcus aureus* BACTEREMIA; *Journal of Clinical Microbiology*; 11: 703-709.
9. G. Quash, A. Roch, A. Niveleau, J. Grange, T. Keolooangkhot, 1978, THE PREPARATION OF LATEX PARTICLES WITH COVALENTLY BOUND POLYAMINES, IgG AND MEASLES AGGLUTININS AND THEIR USE IN VISUAL AGGLUTINATION TESTS; *Journal of Immunological Methods*; 22: 65-174.
10. H. González, R. López, 1980, PROTEINA A EN *Staphilococcus aureus* CUANTIFICACION POR MICROHEMAGLUTINACION, Departamento de biología Celular, CINVESTAV; 11: 497-506.
11. P. Baumann, R. Schubert, 1965. *Vibrionaceae*, FACULTATIVELY ANAEROBIC GRAM-NEGATIVE RODS, 517-538
12. G. Kronvall, 1973, A RAPID SLIDE-AGGLUTINATION METHOD FOR TYPING PNEUMOCOCCI BY MEANS OF SPECIFIC ANTIBODY ABSORBED TO PROTEIN A - CONTAINING Staphilococci, *J. Med Microbiol*, 6:187-190
13. JL. Valdespino, J Sepúlveda, 1991 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *Vibrio cholerae* O1, INDRÉ, DGE 2-43

14. I. Wachsmuth, J. Feeley, W. Dewitt, C. Young, 1987, INMUNOLOGIA BACTERIANA, MICOTICA Y PARASITARIA, 528-536.

15. J. Holmgren, 1982, PATHOGENESIS AND PREVENTION OF CHOLERA, Scand J. Infect. Dis. Suppl. 36: 58-64.

16. J. Martin, J. Washintong, 1980, ENTEROBACTERIACEAE, Manual of clinical microbiol. 195-219.

17. R. Tapia, O. Velázquez, 1991, MANUAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DEL COLERA EN MEXICO, Secretaría de Salud D.G.E., 11-43

18. JL Valdespino, J. Sepúlveda, 1991, EPIDEMIA DE COLERA EN SUDAMERICA, INDRE, D.G.E. 1-30

19. JL Valdespino, J. Sepúlveda y cols., 1991, boletín quincenal, COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS, INDRE, No. 1-4.

20. E. Edwards, J. Coonrod, 1980, COAGGLUTINATION AND COUNTERIMMUNOELECTROPHORESIS FOR DETECTION OF PNEUMOCOCCAL ANTIGENS IN THE SPUTUM OF PHNEUMONIA PATIENTS, J.Clinical Microbiol. 1980 11: 488-491.

21. M.C. Thinimoorthi, A.S. Dajani; COMPARISON OF STAPHYLOCOCCAL COAGGLUTINATION LATEX AGLUTINATION AND COUNTERIMMUNOELECTROPHORESIS FOR BACTERIAL ANTIGEN DETECTION, J. Clinical Microbiol; 1979, 9: 28-32.

22. J.L. Valdespino, J. Sepúlveda y cols., 1991, boletín quincenal, COLERA/ DIARREAS INFECCIOSAS, INDRE, No. 5-8.

23. J.L. Valdespino, J. Sepúlveda y cols., 1991, boletín quincenal, COLERA/ DIARREAS INFECCIOSAS, INDRE, No. 9-12.

24. J.L. Valdespino, J. Sepúlveda y cols., 1991, boletín quincenal, COLERA/ DIARREAS INFECCIOSAS, INDRE, No. 13-16.

25. G.R. de la Cruz, LA PRUEBA DE COAGLUTINACION INFECTOLOGIA 1981, 2: 171-174.

26. N. Hirschhorn, B. William, Creenough, 1971, CHOLERAE SCIENTIFIC AMERICAM, 225: 15-21

27. J.K. Onoki, G. Wauters, CAPSULAR TYPING OF KLEBSIELLA BY COAG-GLUTINATION AND LATEX AGGLUTINATION, J. Clin. Microbiol 1981, 13: 609-12.

28. Gentry L.O., I.D. Wilkinson, A.S. Lea and M.I. Price, LATEX AGGLUTINATION TEST FOR DETECTION OF CANDIDA ANTIGEN PATENT WITH DISSEMINATED DISEASE, (1988), J.Clin Microbiol. 2:122-128.

29. Fung J.C., and R.C. Tilton. DETECTION OF BACTERIAL ANTIGENS BY COAGGLUTINATION AND LATEX AGGLUTINATION, Manual of clin. Microbiol. (1985) 883-890.

30. Lesmana M., R.C., Rockhill, D. Sutanti, and A. Sutomo., A COAGGLUTINATION TEST TO DETECT *Vibrio cholerae* IN FECES ALKALINE PEPTONE WATER CULTURES., *J. trop. Med. Public Health*, (1982) 13: 377-379.

31. Sanborn, W.R., M. Lesmana, and E.A. Edwards., ENRICHMENT CULTUREE COAGGLUTINATION TEST FOR RAPID, LOW COST, DIAGNOSIS OF SALMONELLOSIS, *J. Clin. Microbiol.*, (1980) 12:151-155.

32. Selina Y., and S. Lam., A RAPID TEST FOR IDENTIFICATION OF *Vibrio cholerae* IN STOOLS., *J. Diarrhoeal Dis, Res.*- (1983) 1 (2):87-89.

33. Edwards E.A., and G.L. Larson, NEW METHOD OF GROUPING BETA HEMOLITIC STREPTOCOCCI DIRECTLY ON SHEEP BLOOD AGAR PLATES BY COAGGLUTINATION OF SPECIFICALLY SENSITIZED PROTEIN A CONTAINING STAPHYLOCOCCI, *Appl. microbiol*, (1974), 28: 972-976.

34. Gunnemar S., O. Gotze, N.R. Cooper, et. al., CONSUMPTION OF HUMAN COMPLEMENT COMPONENTS BY COMPLEXES OF IgG WITH PROTEIN A OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS, *Immunochem.*, (1973), 10: 501-507.