

6
2aj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ENFERMERIA Y OBSTETRICIA

IMPORTANCIA DE Vibrio cholerae NO-01 EN LA ETIOPATOGENIA DE LA DIARREA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN ENFERMERIA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A N :

ARROYO OROZCO MARGARITA

GARDUÑO SICILIANO NORMA ROCIO



MEXICO, D. F.

U. N. A. M.
ESCUELA NACIONAL DE ENFERMERIA Y OBSTETRICIA
COORDINACION DE SERVICIOS SOCIALES Y OPCIONES TERMINALES DE TITULACION

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.

INDICE

I.	Introducción	2
II.	Justificación	14
III.	Objetivos	
	a) General	16
	b) Específicos	16
IV.	Metodología	
	a) Material y Método	17
	b) Preparación de Antígenos	17
	c) Inmunización	19
	d) Titulación y Absorción de Sueros	20
	e) Identificación Bioquímica y Serológica ...	23
V.	Resultados	26
	a) Cuadros	29
VI.	Discusión	36
VII.	Conclusiones	41
VIII.	Anexos	46
IX.	Referencias Bibliográficas	48

INTRODUCCION.

Existen discrepancias con respecto a la antigüedad y el origen del cólera. De (1), notable investigador de la India, señala que el cólera desde sus inicios no fué una enfermedad exclusivamente asiática, afirmaba que el padecimiento estuvo presente en el mundo clásico, en Arabia y Europa en los siglos 17 y 18. Howard-Jones sin embargo, manifestó su desacuerdo a este respecto, refiriendo que el término "cólera" aparece en escritos Hipocráticos 2,400 años antes de Cristo, y persistió hasta finales del siglo 19, probablemente por no existir un acuerdo nosológico, razón por la que se aplicó para todos los tipos de enfermedad gastrointestinal esporádica, con diferente etiología, sin tener estos cuadros relación con el verdadero cólera de la India o el Asiático (2). La importancia de éstos planteamientos como lo ha señalado Greenwood, radica en que los casos clínicos del "cólera " Europeo pudieron haber sido muy similares a los casos del cólera Asiático, sin embargo los epidemiólogos en general, concluyeron que las manifestaciones particulares del cólera que se observaron en Europa después de Waterloo, fueron diferentes epidemiológicamente de cualquier otra que se hubiese visto con anterioridad (1).

La historia del cólera es única, pues de su lecho

ancestral en el Delta del Ganges, de repente se difundió explosivamente a todo el mundo como una ola gigantesca que abarcó los 5 continentes, esto sucedió en varias ocasiones durante el siglo 19. (3,4).

Con la actual se han presentado siete pandemias del padecimiento. La primera se inició en 1817 en la India diseminándose rápidamente primero a través del país y afectando posteriormente China, Japón y Siria bordeando el Mediterráneo. Se diseminó también en Armenia y la porción Europea de Rusia en Austrakhan sin extenderse mayormente (5,6). Posteriormente inicia un largo recorrido de 20 años por el oriente desde China hasta Filipinas, siguiendo al oeste por Arabia, subiendo a Rusia hasta llegar finalmente a Inglaterra en 1823, de donde se embarcó para ir a Canadá en 1832, país en el que comienza su avance hacia el sur del continente Americano (3).

El cólera significó un cambio en el pensamiento de la patología infecciosa de las naciones afectadas y del mundo entero. La antigua patología biológica fué reemplazada por una patología biosocial. La segunda pandemia mostró por primera vez el problema de la insanidad y la miseria mundial a la que estaba encadenada gran parte de la población del mundo, obligando a los gobiernos sin importar su ideología política a tomar medidas sanitarias (3,7).

En nuestro país el cólera se ha presentado durante la segunda (1833), tercera (1853), cuarta (1866) y séptima (1991) pandemias (8).

La importancia del cólera en México, en especial de la pandemia de 1833 radicó en el carácter de ésta. No fué una pandemia con la cual la población mexicana hubiera estado acostumbrada a convivir. Era algo nuevo que no respetó grupos, clases sociales ni condición económica y estableció un verdadero corte en la historia de la patología (3).

El primer caso de cólera en México se presentó en junio de 1833 en Saltillo Coahuila, propagandose a partir de ese momento a la mayor parte del país. Durante esta epidemia murieron aproximadamente 200 mil personas. El último caso notificado hasta antes del actual brote se dió en Juchitan Oaxaca en 1883 (8).

El arribo del cólera a nuestro continente durante la actual pandemia se debió probablemente, a la llegada de individuos infectados o a alimentos contaminados procedentes de países de Asia y/o Africa. El primer país afectado fué Perú, iniciandose la epidemia a finales de enero de 1991. De gran magnitud, por su elevada morbilidad y gran extensión geográfica (4,9). A partir de este país el cólera se difundió a Ecuador, Colombia, Chile, Brasil, Estados Unidos, México y Guatemala.

En junio de 1991 se reportó el primer caso de la actual pandemia de cólera en nuestro país. Esto se dió en Sultepec, Edo. de México. A partir de éste se presentaron diferentes brotes, viendose afectados los Estados de: Hidalgo, Puebla, Tabasco, Chiapas, Guerrero, Veracruz, Yucatán, Distrito Federal y presentandose casos aislados en otros estados de la República. (9)

Desde el inicio del brote y hasta Abril de 1993 se han notificado un total de 11 685 casos, con 146 defunciones registradas, relacionadas con el padecimiento. La mayoría de los casos se han presentado en individuos del sexo masculino. Del total de casos la mayor proporción se ubica en los grupos de 25 a 44 años y en menor proporción en los grupos de 5 a 14 años, de 45 a 64 años, de 14 a 24 años y en el de 1 a 4 años en orden decreciente. La región sur que comprende los estados de Yucatán, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, y Campeche acumula el mayor número de casos, con un porcentaje de 40.73% en conjunto suman en los tres años 4 760 casos con 32 defunciones, siendo las entidades más afectadas Campeche y Yucatán. La región centro oriente compuesta por Morelos, Veracruz, Puebla, Edo. de México, Guanajuato, Tlaxcala, Quintana Roo, Hidalgo y Querétaro, acumula 3 553 casos con un porcentaje de 30.40%, con 74 defunciones, resultando Veracruz, Morelos y Puebla los Estados más afectados. La región centro occidente que comprende: Guerrero, Michoacán, Colima, San Luis Potosí, y

Sinaloa han presentado 2 458 casos acumulados, 21.03% con 49 defunciones siendo Guerrero el más afectado. La Región Norte comprende los Estados de Nuevo León, Chihuahua, Tampico, Zacatecas, Coahuila, Baja California Sur y Sonora. Acumulando 569 casos (4.86%) de esto el Estado más afectado es Tamaulipas con 4 defunciones. El D.F. ha presentado 345 casos acumulados (2.95%) con 10 defunciones. Nuestro País se encuentra en el número 13 en términos de tasas de morbilidad con respecto al resto de los países de América que han registrado casos de cólera. (10, 11)

En la actualidad se reconoce la existencia de dos variedades o biotipos de Vibrio cholerae del grupo serológico O1 como responsables del cólera epidémico, el Clásico y El Tor. De éstos existen tres serotipos Inaba, Ogawa e Hikojima de los cuales los más comunes son los dos primeros (6,12).

La séptima pandemia se distingue radicalmente de las anteriores por ser causada por una variedad de V. cholerae conocida como El Tor. (2)

Entre 1959 y 1960, Dutta, De y otros investigadores (7,6) identificaron una enterotoxina como la responsable fundamental de la patogénesis del padecimiento. Se trata de una protefina termolábil que el microorganismo secreta, constituyendo el mecanismo básico de su virulencia. Es un

activador de la adenilciclase del epitelio intestinal dando origen a alteraciones de la función intestinal. La absorción de sodio y agua se ve afectada por este proceso, al mismo tiempo que se estimula la pérdida en gran escala de agua y electrolitos presetandose diarrea de tipo secretor. La infección presenta dos fases, la colonización del intestino delgado mediante la adherencia del germen a la mucosa, seguida de la producción de la enterotoxina (6).

El período de incubación de la enfermedad es corto pudiendo ser de pocas horas hasta un máximo de 5 días. La duración del padecimiento es variable y va a depender por un lado de las características del paciente y por otro del manejo terapéutico. La excreción del germen puede prolongarse varios días o semanas, razón por la cual esta indicado el uso de antimicrobianos (7).

V. cholerae se multiplica en la luz del intestino e invade la mucosa, sin embargo no produce lesiones histológicas por acción directa. En ocasiones se observan ciertas alteraciones tisulares debidas a factores secundarios como la deshidratación o el choque hipovolémico (6).

V. cholerae es un bacilo aerobio, gramnegativo, curvo, de extremos redondeados, en uno de los cuales tiene un flagelo que lo hace sumamente móvil (7,12). Pertenece a la

familia Vibrionaceae, filogenéticamente cercana a las enterobacterias. Tiene más de 90 serogrupos, pero sólo el serogrupo O1 puede ocasionar la enfermedad. V. cholerae sobrevive por períodos de hasta 7 días fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos y templados. En el agua puede vivir de unas cuantas horas hasta algunas semanas, preferentemente si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica, y tiene un pH entre 6 y 8. El sodio es requerimiento absoluto para el crecimiento de la bacteria, la mayoría de las especies toleran las condiciones alcalinas, es susceptible a la desecación, ebullición, al cloro, y a otros desinfectantes, así como a las tetraciclinas y en menor grado a la estreptomycinina y las sulfonamidas.

El pH ácido menor de 5.0 les causa la muerte, motivo por el cual el jugo gástrico disminuye su viabilidad (7,13). Por tal motivo una defensa importante contra la infección por éste germen es la acidez gástrica (6,13). Si ésta se neutraliza o disminuye por cualquier medio, como ocurre en la desnutrición es más fácil que se presente la infección y establezca la enfermedad a menos de que el número de microorganismos que se ingiera no sea muy elevado. La dosis infecciosa mínima del V. cholera, determinada experimentalmente, es del orden de 10^{8-9} microorganismos.

En el cólera, al igual que en muchas otras infecciones se observan fenómenos de defensa específica o protección inmunológica derivada de infecciones previas. Sin embargo también se han observado mecanismos de protección natural tal es el caso sin que se conozca el fundamento científico de las personas con grupo sanguíneo diferente al O que tienen menor predisposición a adquirir el padecimiento (6,13).

Durante la actual epidemia nos hemos podido dar cuenta, que además de V. cholerae del serotipo O1 responsable de la epidemia, se han aislado cepas de V. cholerae de serotipo NO-O1, de éstos se sabe pueden ser agentes etiológicos de diferentes padecimientos incluida la diarrea (9).

Hasta recientemente, el nombre "Vibrio cholerae", y el término "Vibrios cholerae", estaban generalmente restringidos a los microorganismos responsables del cólera epidémico, y términos tales como "vibrios no aglutinantes (NAGs)" y "vibrios no coléricos (NCVs)", se utilizaban indistintamente para describir a todos los demás, incluyendo los vibrios halofílicos y el grupo de vibrios que son bioquímicamente idénticos a las cepas de cólera epidémico (14,15).

Los taxonomistas tratando de clarificar la nomenclatura del género Vibrio, incluyeron todos los vibrios que bioquímicamente y por homología del DNA fueron similares en una sólo especie: V. cholerae. Las cepas epidémicas fueron entonces clasificadas como V. cholerae del grupo O1, y las otras como diferentes serotipos de la misma especie, denominándoseles V. cholerae NO-O1 (14).

Las cepas de V. cholerae son bacterias de origen marino ampliamente distribuidas en la naturaleza, algunas de estas carecen de genóforo productor de la toxina colérica. (16). Hemolizan eritrocitos de cordero, dan la reacción de VP positivas, y son resistentes a polimixina B en concentración de 50 U.I. (13). Algunas cepas son productoras de varias toxinas y otras substancias toxicas incluyendo la hemaglutina/proteasa. (17).

Los microorganismos pertenecientes al grupo NO-O1 de V. cholerae, se han relacionado con brotes epidémicos y casos esporádicos de padecimientos gastrointestinales. Cuando se identifican en casos esporádicos es difícil establecer plenamente su participación en el padecimiento. En el caso de brotes epidémicos, las características clínicas varían probablemente reflejando diferentes características de las cepas responsables (1).

V. cholerae NO-01 se ha aislado de heces de personas con enfermedad diarreica en varios países de los diferentes continentes. En México existen varios reportes de aislamiento de estos microorganismos (18,19). Sin embargo la frecuencia de infección con estas bacterias no ha sido estudiada plenamente.

Se conoce poco con respecto a la asociación entre aislamiento del microorganismo y época del año. En los Estados Unidos por ejemplo la mayoría de las infecciones ocurren durante los meses calurosos. En Bangladesh, la mayoría de los casos se presenta en la primavera y verano, antes de que se pueda presentar el incremento anual de los casos por V. cholerae en el otoño. La transmisión de estos microorganismos como en la mayoría de los agentes responsables de diarrea es por el agua y alimentos contaminados (7,3)

Las cepas de V. cholerae NO 01 se distribuyen ampliamente en el medio ambiente. Se han encontrado en drenajes, aguas superficiales contaminadas con aguas del drenaje, aguas de estuarios, alimentos marinos y en animales. Por tal motivo se considera a estos microorganismos como acuáticos y de vida libre. Sin embargo no se ha establecido si estas cepas de vida libre son las responsables de causar enfermedad en el hombre, o si la patogenicidad se restringe a cepas adaptadas a colonizar el intestino humano.

Se han identificado en este grupo de microorganismos como mecanismos de patogenicidad, la producción de enterotoxinas semejantes a la de V. cholerae O1, así como una toxina termoestable y cuadros de enteritis no relacionados con la elaboración de algún factor tóxico. (12). Sin embargo algunas cepas de V. cholerae tanto O1 como NO-O1 pueden causar diarrea por mecanismos en los que no interviene la enterotoxina (13).

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica compleja. Los tres principales grupos de antígenos son el O (somático) el H (flagelar) y el K o Vi (capsular) (20). En lo que se refiere a V. cholerae bacteria posee dos antígenos principales: el somático (O) y flagelar (H). (12).

El antígeno O se ubica en la parte más externa del lipopolisacárido de la pared celular, constituido éste de unidades repetitivas de polisacáridos (20). El análisis de los antígenos O generalmente revelan la presencia de polisacáridos (60%), lípidos (de 20 hasta 30%) y deoxihexosas (3.5% hasta 4.5%). Los anticuerpos producidos contra antígeno O son predominantemente de tipo IgM, éstos tienden a aglutinar al antígeno en masas granulares, la aglutinación es relativamente lenta y se denomina poliaglutinación. La presencia del antígeno O es responsable de dar variaciones en las cepas de lisa a

rugosa así como variación en la forma (21,20). Son termoestables, no se destruyen al calentarlos a 100⁰ C por 2 horas además de ser resistentes al alcohol y al ácido diluido.

Los flagelos son apéndices filiformes compuestos en su totalidad por proteína. Son los órganos de locomoción para las bacterias que los poseen. Un flagelo esta compuesto de una sola clase de subunidad proteica, denominada flagelina, el flagelo esta formado por la agregación de subunidades que forman una estructura cilíndrica hueca (20). El antígeno H se localiza en el flagelo y se desnaturaliza o destruye con calor o alcohol (es inactivado al ser calentado a 100⁰ C por algunos minutos (12)). Los determinantes antígenicos del antígeno H están en función de la secuencia de aminoácidos de la flagelina. (21,20). La aglutinación flagelar ocurre siempre rápidamente y en forma de floculo suelto o masas plumosas (21). La tipificación serológica de las bacterias gram negativas se realiza identificando el antígeno somático "O", lo que permite establecer el serogrupo bacteriano. Cuando son móviles se realiza también la identificación del antígeno flagelar. La identificación tanto del antígeno somático como del flagelar nos permite establecer el serotipo de la bacteria.

El antígeno H en V. cholerae tiene poca importancia en la determinación del serotipo de la bacteria, dado que la mayoría de las especies comparten éste antígeno.

JUSTIFICACION

La actual epidemia de cólera en nuestro país ha dado lugar, a que el grupo de bacterias pertenecientes a la familia Vibrionaceae recupere el interés perdido en estas durante tantos años. Durante los diferentes brotes observados en el transcurso de los dos años anteriores y los primeros meses del presente, un gran número de cepas pertenecientes a los serotipos NO-01 de Vibrio cholerae han sido aisladas. Esto abre una gran perspectiva para iniciar su estudio y entender más en relación a la importancia médica y epidemiológica de estas bacterias.

El desarrollo de biológicos, como son sueros específicos para cada uno de los diferentes serotipos de éstas bacterias reconocidas en el mundo, resulta de la mayor trascendencia en este momento. El contar con estos, ayudara de forma definitiva para entender la epidemiología de Vibrio cholerae NO-01 y poder identificar los serotipos que estan relacionados con la etiopatogenia de la diarrea.

Las enfermedades infecciosas constituyen un importante problema de salud en países como el nuestro, el papel de la Enfermera en el manejo de éstos padecimientos es fundamental para evitar complicaciones en el paciente y para el control de la transmisión del padecimiento. Sin embargo para poder realizar las actividades antes

mencionadas es primordial que la Enfermera tenga un conocimiento más amplio en relación con las propiedades y características de los microorganismos como es el caso de sus mecanismos de virulencia y de transmisión de éstos agentes responsables de enfermedades infecciosas. También es importante que entienda la relación hospedero-parásito y la asociación Salud-Enfermedad. El conjunto de éstos conocimientos le proporcionará las bases para comprender la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Y poder ejercer medidas correctas para el manejo y control del padecimiento.

La actual epidemia de cólera en nuestro país nos ha dado una lección con respecto a la falta de conocimientos a microorganismos como Vibrio cholerae que de repente desapareció y dejó de tener importancia médica. Sin embargo su aparición repentina permitió entender que sólo el trabajo en conjunto de todos los responsables del sector salud podría ayudar al control de este padecimiento.

La Enfermera, no obstante sus características de atención directa al paciente, también debe abordar otros aspectos del proceso Salud-Enfermedad, como es el conocer y manejar los microorganismos directamente para que pueda aplicar estos conocimientos en el manejo diario del paciente.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la importancia de Vibrio cholerae NO 01 en relación a su participación en la etiopatogenia de la diarrea.

Desarrollar la metodología para la elaboración de los productos biológicos necesarios para la caracterización de Vibrio cholerae.

Conocer los serotipos NO-01 de Vibrio cholerae más frecuentes en nuestro país.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Preparar antígenos de cada uno de los 85 tipos antigénicos de Vibrio cholerae.

Inmunizar conejos para obtener los antisueros de cada uno de los 85 tipos antigénicos de Vibrio cholerae.

Establecer la especificidad y los títulos de cada uno de los antisueros obtenidos.

Caracterizar bioquímica y serológicamente cepas de Vibrio cholerae que han sido enviadas al laboratorio de serología del Departamento de Salud Pública, durante la actual epidemia.

METODOLOGIA.

MATERIAL Y METODO

El presente trabajo constó de dos fases, la primera incluyó la preparación de antígenos con 85 cepas de referencia de Vibrio cholerae O1 y NO-O1, proporcionadas por el Laboratorio Central Salud Pública de Londres Inglaterra. Con los antígenos se inmunizaron conejos para obtener sueros específicos contra cada uno de los diferentes tipos antigénicos de V. cholerae.

La segunda fase comprendió la identificación bioquímica y serológica de 90 cepas enviadas al Laboratorio del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, aisladas de pacientes, aguas residuales y agua para consumo humano durante los brotes epidémicos que se presentaron en nuestro país durante 1992.

PREPARACION DE ANTIGENOS.

Antígeno Somático.

Para obtener los antígenos de las 83 cepas de referencia primeramente se rehidrataron las cepas que se encontraban liofilizadas. Estas se hidrataron con agua peptonada incubandose a 37^o C durante 24hrs. Se corroboró la pureza de éstas sembrandolas en Agar sangre y Agar

MacConkey. De estas siembras se obtuvieron colonias únicas las cuales se emplearon para su caracterización mediante pruebas bioquímicas.

Confirmada la pureza e identidad de las cepas, de cada una se seleccionaron colonias lisas y se sembraron en un tubo de caldo biotriptasa incubándose 4hrs a 37 °C. De cada cultivo se inocularon 4 gotas en cajas de Agar soya tripticasefina (Casoy) distribuyendo el inóculo con rastrillos de cristal para obtener un cultivo confluyente. Las cajas con las siembras se incubaron a 37° C durante toda la noche. Transcurrido este lapso el cultivo se cosechó en tubos con solución salina isotónica estéril. La cosecha se hizo por duplicado para obtener antígenos tanto para inmunizar como para realizar la tipificación serológica posterior. Los tubos de los diferentes cultivos bacterianos se calentaron a 100 ° C por 2 hrs. utilizando vapor fluyente con el fin de inactivar el cultivo bacteriano. La suspensión bacteriana calentada se centrifugó a 10 000 RPM durante 10', el paquete bacteriano obtenido se lavó y centrifugó en 3 ocasiones, finalmente se resuspendió con solución salina isotónica estéril. Empleando viales estériles se ajustó la suspensión bacteriana con 10ml. de solución salina estéril, a una concentración bacteriana de 3×10^9 . La suspensión se conservó agregando formaldehído al 0.6%. Los frascos se etiquetaron, sellaron y refrigeraron a 4 ° C. hasta su uso en la inmunización. La

suspensión bacteriana para la identificación de los antígenos somáticos (O) se conservó a temperatura ambiente (18 a 22 ° C) con formalina al 0.6%.

Copias de las colonias aisladas se conservaron en Caldo casoy con glicerol al 15% en crioviales y mantenidas en congelación a -20 ° C, para su uso posterior.

INMUNIZACION

Se utilizó un conejo Nueva Zelanda blanco de aproximadamente 3kg para la obtención de cada uno de los 83 sueros. Se inocularon en la vena marginal de la oreja cinco dosis del antígeno cada 4-5 días. Las dosis fueron crecientes inoculando en la primera 0.5 ml., 1.0 ml. en la 2a. y 3a., y 2.0 ml. en la 4a. y 5a. Al término del esquema de inmunización se realizó sangría de prueba para conocer los títulos de los sueros. Si los títulos eran entre 1:1200 a mayores los conejos se sangraban a blanco, de tener el título menor se aplicaba una dosis de refuerzo.

La obtención del suero se realizó separando el coágulo sanguíneo por centrifugación. El sobrenadante se transfirió a tubos y en caso de tener eritrocitos se centrifugo nuevamente. Cada suero se etiquetó de acuerdo al serotipo correspondiente. Para su conservación se les agregó thimerosal 1:10 000 y se congelaron a - 20 ° C.

TITULACION Y ABSORCION DE SUEROS

Con el propósito de obtener sueros específicos cada suero se absorbió con un cultivo de V. cholerae rugoso. Para esta absorción se utilizó la cepa de V. cholerae rugoso (VOR). Esta cepa al igual que a las de referencia se rehidrató y cultivó en agua peptonada con pH 8.6. El inóculo rehidratado se creció en agar sangre y agar MacConkey para seleccionar colonias únicas. Estas colonias se inocularon en caldo biotriptasa incubándose durante 3 a 4 hrs, a 37 ° C, de éste cultivo se sembraron de 4 a 5 gotas en cajas de agar Casoy distribuyéndose con un rastrillo de cristal sobre toda la superficie incubándose a 37 ° C por 24hrs. Se cosecharon tres cajas de VOR por cada suero a ser absorbido. En frascos de 25 ml. con rosca, se colocó el paquete bacteriano y se calentó a 100 ° C durante 30 min. a vapor fluente. Al término del tiempo se dispensaron en cada frasco 18 ml de cada uno de los sueros, se resuspendieron por agitación y se incubaron en baño maría 50 ° C por 2 hrs. Después de incubar se centrifugaron a 6 000 RPM durante 15 min. y por decantación se separó el suero del paquete bacteriano. Cada antisuero absorbido con la cepa VOR se dispensó en dos frascos viales para su uso posterior.

Con los sueros absorbidos con la cepa VOR se procedió a determinar la existencia de reacciones cruzadas de éstos

sueros contra cada uno de los 85 tipos antigénicos de V. cholerae.

Utilizando placas de 96 pozos se distribuyeron 50 microlitros de cada uno de los antígenos más 50 microlitros del suero diluído 1:100. Se incubó a 50 °C toda la noche. Utilizando el aglutinoscopio se realizó la lectura de las placas valorando la existencia de masa granular en los pozos considerando ésta como reacción positiva.

Los criterios de evaluación de la aglutinación fueron: 100% (4+), 75% (3+), 50% (2+) y 25% (1+), sin aglutinación (Negativo) de acuerdo a lo establecido en el Laboratorio.

En caso de presentar reacción cruzada contra alguno o algunos de los diferentes 83 tipos antigénicos, el suero fué absorbido contra aquellos con los que reaccionó siguiendo un procedimiento similar al descrito para el caso de las cepas rugosas.

Se sembraron de una a cuatro cajas de agar Casoy por cada cepa que dió cruce, dependiendo ésto del título de aglutinación que presentaron. El cultivo bacteriano se cosechó en tubos de centrifuga con 9 ml. de solución salina, se calentaron a 100 ° C durante 30 min a vapor fluente, dejando enfriar. Una vez fría la suspensión bacteriana se le agregó 1 ml. del suero. Se incubó en baño

maría a 50 ° C durante 2 hrs. y el suero se separó del paquete bacteriano centrifugando a 6 000 RPM por 15 min. El suero se tituló con su antígeno homólogo y contra los antígenos con los que había dado reacción cruzada, si aglutinaba sólo con el homólogo se consideraba específico y apto para su empleo.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA Y SEROLOGICA DE CEPAS DE Vibrio cholerae.

Se realizó la identificación bioquímica y serológica de 72 cepas de Vibrio cholerae enviadas de diferentes lugares de la República Mexicana, así como 18 E. coli procedentes de San Luis Potosí, aisladas de heces y orina de humanos.

De las cepas, 56 fueron enviadas del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas (INDRE), todas ellas aisladas de casos humanos; 4 del Centro de Investigación Biomédica, del Instituto de Investigación Bioméd. a de la Universidad Autónoma de Estado de Campeche, aisladas de muestras de agua de diferentes pozos; 9 del Laboratorio Regional de Salud Pública de Villahermosa, Tabasco, aislada de casos humanos; 3 de la Facultad de Química de la UNAM, aislada de alimentos.

A cada una de las cepas se les determinó pureza, creciendolas previamente en agar sangre y agar McConkey. Con los cultivos puros, se realizó la caracterización bioquímica y posteriormente la tipificación serológica.

Utilizando colonias únicas, se inocularón en agua peptonada alcalina, a partir de éste crecimiento se inocularón en diferentes medios para pruebas bioquímicas y así conocer la identidad de las bacterias.

El grupo de pruebas bioquímicas empleado incluyó los siguientes substratos: Craigie, Glucosa (A), Glucosa (G), Lactosa, Mannitol, Rafinosa, ONPG, Citrato de Simmons, Urea, Indol, Arginina, Lisina, Ornitina, Celobiosa, TSI (H₂S), KCN, Malonato, P.P.A, Gluconato, Melibiosa, Esculina, Sacarosa, Salicina, Dulcitol, Inositol, Adonitol, Sorbitol, Arabinosa, Xylosa, Trehalosa, Maltosa, Manosa, O.F, Oxidasa, Discos del agente vibriostático 0/129 de 10 y 150mg (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine), Polimixina B 50, Vib VP (Voges-Proskauer).

Determinada la identidad de las bacterias se realizó la tipificación serológica de éstas utilizando la prueba de aglutinación en laminilla, con suero polivalente O1 para conocer si las cepas pertenecían o no al serotipo de V. cholerae O1. Para ésta prueba se pusieron dos gotas de solución salina isotónica en los extremos de la laminilla.

Con asa bacteriológica se tomó un inóculo pesado de las cepas cultivadas en tubos con agar Casoy con crecimiento de un día para otro, se homogenizaron en la solución salina, se agregó una gota del suero polivalente, se homogenizó la suspensión y se observó la reacción de aglutinación. Las cepas que aglutinaron con los sueros polivalentes se consideraron como O1 positivos, determinandose posteriormente con sueros específicos si eran Ogawa o Inaba. Las cepas que no aglutinaron con los antisueros O1 se tipificaron en placas de 96 pozos con los 83 restantes sueros previamente obtenidos.

Para éste propósito se obtuvo el antígeno de la bacteria en estudio, de acuerdo al procedimiento ya descrito. Utilizando placas de 96 pozos se colocaron 50 microlitros de cada uno de los 83 sueros NO-01 a una dilución 1:100. Posteriormente se agregaron a cada pozo 50 microlitros del antígeno de la cepa de V. cholerae. Esta mezcla se incubó a 50 ° C durante la noche, cubriendo la placa (con papel ega pack) para evitar la desecación. Pasado éste período se determinó el grado de aglutinación en cada uno de los pozos de acuerdo al criterio mencionado anteriormente. Con los sueros en los cuales se observó aglutinación se realizó la titulación. Para la titulación se pusieron 50 microlitros de solución salina en todos los pozos. El suero preparado en una dilución 1:100, se colocó en el primer pozo y a partir de éste se realizaron

diluciones seriadas 1:2 siendo la primera dilución del suero 1:100 y la última 1:12800. A cada pozo se le agregaron 50 microlitros del antígeno. Se incubó toda la noche a 50 ° C y al día siguiente se realizó la lectura de aglutinación. El título más alto del suero en el cual se observa reacción positiva se considero el título de aglutinación. El serotipo del cultivo se consideró como aquel en que la reacción de aglutinación se presenta con la mayor dilución de los sueros. En caso de existir títulos muy cercanos con diferentes sueros se utilizaron sueros específicos.

RESULTADOS.

Obtención de sueros.

Se obtuvieron 83 sueros contra los 83 antígenos de Vibrio cholerae NO-01 preparados. Los sueros que dieron reacción cruzada requirieron entre una a dos absorciones. Los títulos de los sueros al final de todos los tratamientos se encontraron entre 1:3 200 el más alto y 1:200 el más bajo. Los sueros preparados contra los antígenos V057, V063, V037, V074, V065, V010 y V053 fueron los que presentaron en mayor número de reacciones cruzadas. Sesenta y dos de los sueros (75%) dieron reacción cruzada y 21 (25%) sueros fueron específicos desde un principio.

Aislamiento e Identificación Bioquímica.

De las 90 cepas enviadas identificadas previamente como probables Vibrio cholerae, 66 fueron de éste género, 63 Vibrio cholerae y 3 Vibrio Metschnikovii. El resto de las cepas identificadas fueron, 4 Aeromonas sp. y 1 Pseudomonas sp. y las 18 cepas de E. coli. (Cuadro 1)

La caracterización bioquímica de las cepas de Vibrio cholerae NO-01 reportó que 11 de las 63 no presentaban un patrón bioquímico característico al descrito como clásico del género. Las diferencias observadas en éste sentido fueron en Citrato de Simmons negativo, Celobiosa y Esculina

positivas, y sensibilidad a la Polimixina B50 y resistencia al 2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine (O/129). (Cuadro 2)

Grupos Heiberg.

Para conocer los biotipos de éstas cepas se siguió el esquema de tipificación propuesto por Heiberg encontrándose que las cepas de Vibrio identificadas incluídas las 3 cepas de Vibrio Mestchnikovii dieron solamente características de los grupos I y II de Heiberg, observándose una distribución homogénea en ambos grupos (Cuadro 3).

Identificación Serológica.

La tipificación serológica de las 63 cepas de Vibrio cholerae identificadas con los 85 diferentes sueros estandarizados permitió identificar 9 cepas de Vibrio cholerae O1, 8 de Inaba y 1 Ogawa. De las 54 cepas de Vibrio cholerae NO-O1 30 de ellas fueron tipificadas con los sueros obtenidos y las 24 restantes no aglutinaron con ninguno de los sueros preparados. (Cuadro 4)

Tratando de conocer si existe correlación entre los grupos Heiberg I y II con las características bioquímicas clásicas y las diferentes encontradas, se observó que la distribución de las cepas con bioquímicas "clásicas" fué en

una proporción mayor (65%) en el grupo II y las de patrón bioquímico diferente con frecuencia más alta (64%) en el otro grupo (Cuadro 5).

Así mismo se quizo observar la posible relación entre serotipo y los grupo Heiberg encontrándose que a excepción de algunos serotipos que se encuentran en ambos grupos la mayoría tiene una distribución independiente. Con respecto a las cepas no tipificables se observó que el 71% de éstas se incluyeron en el grupo II y las restantes en el grupo I (Cuadro 6).

Finalmente al realizar la correlación entre cepas que dieron resistencia al O/129 y grupo serológico se observó que no existe correlación entre ambas características (Cuadro 7).

CUADRO No. 1

Géneros y Especies de Bacterias Identificadas

Género	No.	%
V. cholerae O1	9	10.0
V. cholerae NO-O1		
con serotipo	30	33.33
V. cholerae NO-O1 con		
serotipo no determinado	24	26.66
V. Metschnikovii	3	3.33
A. Hydrophila	3	3.33
Aeromonas sp.	1	1.11
Pseudomonas sp.	1	1.11
Escherichia coli	18	20.00
Cepa no creció	1	1.11
Total	90	100.00

Fuente: Resultados obtenidos de bioquímicas utilizadas en las diferentes cepas del estudio.

CUADRO No 2

Características Bioquímicas observadas en las diferentes cepas de Vibrio cholerae NO-01

Bioquímica	Reacción	Bioquímica	Reacción
Craigie	Positiva	Melibiososa	Negativa
Glucosa (A)	Positiva	* Esculina	Negativa
Glucosa (G)	Negativa	Sacarosa	Positiva
Lactosa	Negativa	* Salicina	Negativa
Manosa	Positiva	Dulcitol	Negativa
Rafinosa	Negativa	Inositol	Negativa
ONPG	Positiva	Adonitol	Negativa
* C.Simmons	Positiva	Sorbitol	Negativa
Urea	Negativa	Arabinosa	Negativa
Indol	Positiva	Xylosa	Negativa
Arginina	Negativa	Trehalosa	Positiva
Lisina	Positiva	OF	Positiva
Ornitina	Positiva	Nitrato	Positiva
Control	Negativa	Oxidasa	Positiva
* Celobiososa	Negativa	* O/129/10	Sensible
TSI (H ₂ S)	Negativa	* O/129/150	Sensible
KCN	Negativa	* PB50	Resistente
Malonato	Positiva	Vib VP	Positiva
PPA	Negativa	Manosa	Negativa
Gluconato	Positiva	Poli O1	Negativa

Fuente: Misma del Cuadro No 1.

* Pruebas bioquímicas con resultado diferente al establecido que presentaron algunas cepas de Vibrio cholerae

CUADRO No. 3

Grupos Heiberg Identificados en las cepas de Vibrio cholerae estudiadas

Grupo Heiberg	No.	\bar{x}
I	34	51.51
II	32	47.49
Total	66	100.00

Fuente: Misma del Cuadro No 1.

Cuadro No 4

Serotipos más frecuentemente identificados en las cepas de Vibrio cholerae identificados

Serotipo	No.	%
VO1	* 9	14.28
VO5	5	8.00
VO6	2	3.17
VO7	2	3.17
VO8	1	1.58
VO9	1	1.58
VO26	1	1.58
VO30	1	1.58
VO31	2	3.17
VO35	2	3.17
VO39	2	3.17
VO43	1	1.58
VO44	1	1.58
VO53	2	3.17
VO62	1	1.58
VO64	3	4.80
VO68	1	1.58
VO76	1	1.58
VO79	1	1.58
VO ?	24	38.10
Total	63	100.00

Fuente: Resultados obtenidos y registrados en libreta de serología del Laboratorio.

* 8 INABA y 1 OGAWA

CUADRO No. 5

Correlación entre Bioquímicas clásicas y diferentes de cepas de Vibrio cholerae con los Grupos I y II de Heiberg.

Patrón Bioq.	Grupos		Heiberg	
	I	%	II	%
Clásica	15/43	(38)	28/43	(65)
No Clásica	7/11	(64)	4/11	(36)
V. cholerae O1	9/9	(100)	-----	
V. Metchnikovii	3/3	(100)	-----	
Total	34/66	(52)	32/66	(48)

Fuente: Misma del Cuadro No 1.

CUADRO No. 6
Correlación entre Serotipo y Grupo Heiberg de diferentes
cepas de Vibrio cholerae

Grupo Heiberg	Serotipo	No.	%
I	VO5	1	1.59
I	VO7	2	3.17
I	VO8	1	1.59
I	VO26	1	1.59
I	VO31	1	1.59
I	VO35	2	3.17
I	VO39	1	1.59
I	VO44	1	1.59
I	VO53	2	3.17
I	VO62	1	1.59
I	VO64	1	1.59
I	VO68	1	1.59
I	VO ?	7	11.11
I	O1 Inaba	8	12.69
I	O1 Ogawa	1	1.59
II	VO5	4	6.34
II	VO6	2	3.17
II	VO9	1	1.59
II	VO30	1	1.59
II	VO31	1	1.59
II	VO39	1	1.59
II	VO43	1	1.59
II	VO64	2	3.17
II	VO76	1	1.59
II	VO79	1	1.59
II	VO ?	17	27.98
Total	----	63	100.00

Fuente: Misma del Cuadro No 1 y No 4.

CUADRO No. 7

Resistencia al Agente Vibrioestatico O/129 en las bacterias Investigadas

Cepas	No.	%
Con serotipo	4	44.44
Sin Serotipo	5	55.55
Total	9	99.99

Fuente: Misma del Cuadro No 1.

DISCUSION.

La repentina aparición de la epidemia de Cólera en Latinoamérica incluido nuestro país dió lugar a que se iniciara la capacitación de personal para la identificación del microorganismo. Un aspecto de mayor trascendencia al presentarse el brote epidémico, lo constituyó la falta de reactivos biológicos, en particular sueros para la caracterización final del microorganismo. Esta situación obligó a que se recurriera a los Laboratorios de Referencia en el extranjero para solicitar se proporcionaran éstos sueros necesarios para la tipificación de Vibrio cholerae.

Sin embargo al iniciar el aislamiento de las bacterias responsables del brote, un gran número de aislamientos correspondían a cepas de Vibrio cholerae de los serotipos NO-O1. El no contar con los sueros para realizar la tipificación serológica de estos Vibrio cholerae repercutía en la imposibilidad para conocer la importancia epidemiológica de serotipos de la bacteria.

En el Laboratorio de serología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, se ha venido desarrollando desde hace varios años la metodología para la obtención de sueros e identificación de enterobacterias. El Laboratorio Central de Salud Pública de Colindale en Londres a través de un convenio con la Facultad de Medicina

proporcionó las 85 cepas de referencia existentes para que se procediera a la obtención de los sueros correspondientes. Esta parte del estudio desarrollado permitió que se contara con recursos biológicos para conocer la distribución en nuestro país de Vibrios de serotipos diferentes al O1.

Aunque un porcentaje elevado de los antisueros preparados tuvieron que absorberse (75%) todos los que se tuvieron presentaron características óptimas para su empleo. La identificación bioquímica de las cepas empleando el esquema propuesto por el Laboratorio Central de Salud Pública de Londres mostró que el 17% de las cepas estudiadas presentaban un patrón bioquímico diferente al señalado como clásico del género. Resultados similares han sido descritos por otros autores (22,23,24,25) en cepas de Vibrio cholerae NO-O1 aisladas en zonas endémicas de cólera. En estos trabajos se menciona exclusivamente la resistencia de las cepas al agente vibriostático O/129. Las cepas identificadas en el laboratorio además de resistencia a éste compuesto resultaron sensibles a Polimixina B50 y respondieron de manera diferente ante algunos substratos (Cuadro 2). Debido al escaso conocimiento que se tenía en nuestro país de estas bacterias hasta antes de la epidemia es que no podemos ubicar el origen de estos microorganismos, tampoco sabemos como se a propuesto en los trabajos mencionados (22,23,24,25) la participación de material genético extracromosómico. Es importante por lo

tanto iniciar un estudio más profundo de estos microorganismos.

En un trabajo publicado en junio de 1992 (24) de una cepa de Vibrio cholerae NO-01, aislada de un paciente Norteamericano que regresaba de una visita a nuestro país, se identificó en ésta cepa características metabólicas diferentes a las descritas como clásicas. Al comparar los resultados obtenidos en éste reporte con los observados en las cepas aisladas en éste estudio se encontro similitud en el comportamiento bioquímico de las cepas. Esto habla de la importancia que tiene este grupo de Vibrio cholerae NO-01 como responsables de infección intestinal, ya que el paciente del que fué aislada la cepa presentó un cuadro de diarrea severa.

En el caso de las cepas identificadas en el laboratorio no obstante saberse que proceden de casos clínicos se desconoce la severidad de éstos.

La caracterización de las cepas utilizando los biotipos descritos por Heiberg (15) permitió establecer que el comportamiento de las cepas no era diferente a los descritos para las cepas de Vibrio cholerae. Esta observación corrobora que las cepas identificadas en el laboratorio pertenecen al grupo de Vibrio cholerae las que probablemente corresponden a biotipos existentes en nuestro

país.

La tipificación serológica reportó que el 26.6% de las cepas no pudieron ser caracterizadas con ninguno de los 85 sueros preparados. Esta observación sugiere la existencia en nuestro país de serotipos diferentes a los descritos en áreas endémicas. Sin embargo esto debe probarse con otros esquemas de tipificación existentes.

Recientemente en Bangladesh se mostró el aislamiento de una cepa de Vibrio cholerae NO-01 de un serotipo descrito como O/139 (26,27) responsable de un brote epidémico severo. La tipificación de éstas cepas se realizó de acuerdo al Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan. Este antecedente refuerza lo mencionado anteriormente sugiriendo la importancia de establecer si algunos de los Vibrios que no pudieron ser tipificados en el trabajo pudieran corresponder a éste serotipo. Por otro lado conocer si el serotipo O139 corresponde a alguno de los identificados previamente es de la mayor importancia ya que de ser así nos permitiría estar alertas ante la aparición de brotes epidémicos no relacionados con Vibrio cholerae O1.

El estudio de Vibrio cholerae se ha reiniciado en nuestro país teniéndose en éste momento la ventaja de contar con reactivos biológicos que ayuden para la

caracterización de éstos microorganismos.

No obstante que causa controversia el que pasantes de Enfermería se involucren en el trabajo de Laboratorio, participar en un proyecto de éste tipo abre perspectivas en cuanto a la importancia que éste tiene para ampliar el panorama de conocimientos que debe poseer cualquier profesional en el área de la Salud. Conocer procedimientos y técnicas de laboratorio, permite entender más claramente la importancia de éste para el diagnóstico oportuno y el mejor manejo del paciente hospitalizado, así como para la prevención de la enfermedad. Esto no implica que se desvíe la atención de un profesionalista hacia campos que no son específicos de su área de formación, por el contrario es importante evaluar esta experiencia para un futuro y contemplar la posibilidad de un entrenamiento más amplio para la formación de Enfermeras.

CONCLUSIONES.

La formación de recursos humanos de calidad en el área de la salud es de la mayor importancia, sobre todo en países como el nuestro.

México a pesar de su situación actual, continúa siendo un país del llamado tercer mundo, en el que los padecimientos infecciosos ocupan los primeros lugares como causa de enfermedad y muerte principalmente de niños pequeños.

A consecuencia de la aparición del Cólera en las Américas, durante la actual 7a. pandemia, el problema de la infecciones intestinales se agravó, ya que ahora no sólo los niños se ven afectados por el Síndrome diarreico, sino que éste padecimiento se presenta preferentemente en adultos jóvenes.

Debido a la aparición brusca del Cólera en el Continente Americano incluido nuestro país, después de más de 100 años de haberse presentado el último caso, los conocimientos al respecto del padecimiento por el personal de salud y los procedimientos y recursos para la identificación del microorganismo causal eran escasos, por lo que fué necesario al inicio del brote epidémico, recurrir a fuentes externas del país para que se nos

proporcionara asesoría y recursos para iniciar el aislamiento e identificación de Vibrio cholerae.

En el presente trabajo se implantó la metodología para la obtención de sueros necesarios para la tipificación de Vibrio cholerae. El contar con éstos permite tener un mejor conocimiento sobre la epidemiología del padecimiento, con lo cual se podrán implementar las condiciones sanitarias adecuadas.

La obtención y uso de reactivos biológicos permitió la caracterización de las cepas enviadas para determinar la presencia de serotipos de Vibrio cholerae diferentes al O1.

Las cepas de Vibrio cholerae NO-O1 que presentaron patrón bioquímico no característico como clásico del género, son similares a las cepas que se aislaron en zonas endémicas del padecimiento.

Es necesario estudiar más a fondo las propiedades de resistencia al O/129 y la sensibilidad a la polimixina B50, encontradas en algunas cepas ya que mundialmente estos dos compuestos han sido determinantes para conocer el patrón común de identificación de cepas de Vibrio cholerae.

Vibrio cholerae NO-O1 probablemente es responsable de

infección intestinal e incluso de diarrea severa.

Es deseable realizar un estudio más profundo al grupo de cepas de Vibrio cholerae NO-01 con bioquímicas no clásicas, para conocer su capacidad de elaboración de toxinas y establecer definitivamente su importancia epidemiológica.

La caracterización de las cepas, según los biotipos descritos por Heiberg, mostró que éstas pertenecen al género de Vibrio cholerae.

En nuestro país existen serotipos de Vibrio cholerae diferentes a los descritos en áreas endémicas de cólera.

Es recomendable investigar si el serotipo O/139 identificado recientemente y agrupado de acuerdo al Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan, corresponde a otro serotipo identificado previamente o es alguno de los encontrados como no tipificables en éste estudio.

Durante el desarrollo del trabajo hemos podido darnos cuenta de la importancia que tiene el ampliar los conocimientos, y el papel tan trascendente que ocupa el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades. El hacer investigación requiere tiempo y dedicación, pero vale

la pena comprometerse e intentarlo ya que constituye un reto para cambiar la práctica y la imagen de la Enfermera ante la Sociedad. Para ello debe integrarse más al equipo multidisciplinario de salud para poder cuestionarse problemas y emprender la solución por medio de la investigación, y así contribuir con una mayor participación para las desiciones de manejo del paciente.

ANEXO

MATERIAL.

Peptona de caseína
Base para Agar Sangre
Sangre de cordero
Agar MacConkey
Agar soya tripticaseína.
Cloruro de sodio
Formaldehído
Ethanol
Agua destilada
Glicerol
Acido pícrico
Thimerosal
Azida de sodio
Biotriptasa
Medios para identificación bioquímica
Discos con resistencia al vibriostático O/129 10mg, 50mg. y a la Polimixina B50
Suero polivalente O1 Crioviales de 1.8ml
Estufa incubadora con temperatura graduable
Autoclave, Balanza granataria
Mecheros Fisher
Centrifuga refrigerada
Parafilm
Tubo No. 3 de Mac Farland
Tubos de 13 x 100 con rosca
Tubos de 18 x 150 con tapón de algodón
Tubos de 16 x 150 con rosca
Tubos de 12 x 75 con y sin rosca
Gradillas
Espátula
Cajas petri desechables
Asas bacteriológicas
Matraces Erlenmeger de 25, 50, 100, 500 y 1000 ml.
Pipetas de Pasteur, micropipetas, micropipetas multicanales
Puntas para micropipetas de 10 a 100 microlitros y de 100 a 1000 microlitros
Tubos para centrifuga de policarbonato de 50 ml.
Frascos viales de 30 y 100 ml.
Conejos Nueva Zelanda blancos de 3kg aprox.
Jeringas para insulina y de 20cc.
Estuche de disección
Placas de 96 pozos
Aglutinoscopio
Rastrillos de cristal
Baño María
Laminillas

Clave _____

Inóculo	0.5 ml	1.0 ml	1.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	1er sangrado	2º sangrado	Sangrar a blanco
Fecha								

ESQUEMA DE INMUNIZACION

No. de Frascos _____

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Van Heyningen, W.E. and Seel, J.P. Cholera the American Scientific Experience. Westview Press. Boulder, Colorado. (1983).
2. Howard-Jones, N. Cholera nomenclature and nosology A. Historical note. Bull. WHO 51:317. (1974).
3. Malvido, E., Cuenya, M.A. El cólera en Puebla en el siglo XIX. Ciencias. México. (24):51-52. (1991).
4. Mostey, W.H. Epidemiología del Cólera. En Guía para la prevención y control del cólera. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Quito. (1991).
5. Creighton, C. From The Extinction of Plague to the present Time. A. History of Epidemics in Britain. University Press. Cambridge, London. 2. (1894).
6. Olarte, J. El germen del cólera. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. México. 49(2):73-78. (1992).
7. Secretaria de Salubridad y Asistencia. Epidemiología. Manual para la vigilancia epidemiológica del Cólera en México. Secretaría de Salud. México. 1:17-19. (1991).
8. Valdespino Gomez y Cols. Manual sobre Cólera para Personal de Salud. Publicación Técnica del INDRE. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. (1). (1991).
9. Cholera and other vibrio-associated diarrhoeas. Bull WHO 58:353-374. (1980).
10. INDRE. Boletín quincenal/Cólera/Diarreas Infecciosas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. México. 12:206. (1992).
11. INDRE. Boletín Mensual/Cólera/Diarreas Infecciosas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. México. 4:276. (1993).
12. Sakazadi, R. and Donovan, T.J. Serology and Epidemiology of Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. A. Methods in Microbiology. Academic Press. London. 16:271-289. (1984).

13. Cfr. Lee, J.V. Vibrio cholerae: The species and the characteristics of the strains causing epidemic cholera. West, P.A. The ecology and survival of Vibrio cholerae in natural aquatic environments. A. Cholera Update. PHLS Microbiology Digest. London. 9 (1):14-23. (1992).
14. Feeley, J. C. Classification of Vibrio cholerae including El Tor vibrios, by infrasubspecific characteristics. Journal Bacteriology. 89:665-670. (1965).
15. Furniss A.L., Lee J.V., Donovan T.J. The Vibrios. Monograph series. Public Health Laboratory Service. London. (11):1-58. (1978).
16. Valdespino, J.L., Aguilera, P. Boletín quincenal/Cólera/Diarreas Infecciosas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. México. 1. (1991).
17. Honda, T., Hata-Naka, A., Lertpocasombat, K. and Miwatani, T. Production of monoclonal antibodies against a hemagglutinating/protease of Vibrio cholerae NO-01. Microbiology Letters. 78:227-230. (1991).
18. Merson, M.H. Morris, G.K., Sack D.A., et. al. Travelers Diarrhea in México. A prospective study of physicians and family members. Attending a Congress. Journal Medical. N. England. 294:1299-1305. (1976).
19. Finch M.J., Valdespino, J.L., Wells, J.G, Pérez, G.P, Arjona, F., Sepúlveda, J., Bessudo, D. and Blake, P.A. Non O1 Vibrio cholerae infections in Cancún, México. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36:393-397. (1978).
20. Jawetz, E. Manual de Microbiología Médica. 6a. Ed. El Manual Moderno. México. p. 631. (1975).
21. Ewing, W.H. Edwards and Ewing's. Identification of enterobacteriaceae. Fourth Edition. Elsevier. Sc. Pub. Co. New York. N.Y. (1986).
22. Sundaram, S., and K.V Murthy. Occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine (O/129) resistance in human isolates of Vibrio cholerae. FEMS Microbiology Letters. 19:115-117. (1983).
23. Ramamurthy, T., A. Pal, S.C. Pal, and G.B. Nair. Taxonomical implications of the Emergence of high frequency of occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine resistant strains of Vibrio cholerae from clinical cases of cholera in Calcutta, India. Journal of Clinical Microbiology. 30:742-743. (1992).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

24. Matsushita, M., Y. Kudoh, and M. Ohashi. Transferable resistance to the vibriostatic agent 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine (O/129) in Vibrio cholerae. Microbiology and Immunology. 28:1159-1162. (1984).
25. Huq, A., M. Alam, S. Parveen, and R.R. Colwell. Occurrence of resistance to vibriostatic compound O/129 in Vibrio cholerae O1 isolated from clinical and environmental samples in Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology. 30:219-221 (1992).
26. I.C.D.D.R.B. Recent Diarrhoea Epidemic in Bangladesh caused by a new strain of Vibrio cholerae Non O1. Glimpse 15:1-3. (1993).
27. O.M.S. Epidemic Diarrhoea Due to Vibrio cholerae Non -O1 Weekly Epidemiological Record. 20:141-142. (1993).