

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

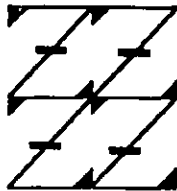
OBTENCION Y AISLAMIENTO DE FORMAS ATIPICAS DE V. cholerae

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: LIC. EN QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO P R E S E N T A

MANUEL GUADALUPE GALICIA RUIZ

V N A M F E S ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D. F.

JUNIO DEL 2000

7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

PRESIDENTE: Q.F.B. JOSE PONCE GUERRERO

VOCAL: Q.B.P. JAVIER ZAVALA GONZALEZ

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

SUPLENTE: Q.B.P. DORA ALICIA PEREZ GONZALEZ

SUPLENTE: Q.B.P. YOLANDA FLORES CABRERA

A Dios:

Por permitirme la realización de esta meta

A la U.N.A.M:

Forjadora de profesionistas comprometidos con la sociedad

A mis padres:

Ma. Concepción y Porfirio Manuel

A mi Tío:

Manuel Hidalgo.

A mis hermanos:

Arturo Fco., Ivette C. y Martha I.

A mi novia:

Ma. Magdalena

A mis amigos:

Andrés, Ma. Asunción, Luz María, Ricardo.... y en especial a Juana del Carmen (Chiapas)

A mi director de Tesis:

Q.B.P. Javier Zavala González.

Les expreso una palabra que guarda todos los sentimientos que por ustedes profeso y que es muy difícil (y a veces imposible) expresar con palabras:

GRACIAS

Por todo lo que han significado para mi en todos estos años.

Mi agradecimiento a:

Q.B.P. Lucina Gutiérrez Cogco (INDRE)

Dr. Cuauhtemoc Mancha Moctezuma (Coordinación de Vigilancia Epidemiológica-SSA)

Q.F.B. Edith Montiel Vázquez (INDRE)

Q.F.B. Pablo Aguilera Pérez (INDRE)

Biol.. Pedro Guzmán Can (INDRE)

Biol.. Carlos Rosete Moreno (INDRE)

Por su colaboración y sus acertados puntos de vista brindados a este trabajo.



Mi agradecimiento al Laboratorio Clínico del Hospital General Regional No. 25 del IMSS y en especial al Q.B.P. Javier Zavala González por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.



De la misma manera agradezco al Laboratorio de Bacteriología Entérica del INDRE por la asesoría teórico-práctica para la conclusión de este proyecto.



Finalmente, expreso mi gratitud a todos mis maestros a quienes debo mi formación profesional, así como a los sinodales de la presente tesis por sus atinadas observaciones con respecto al mismo.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. RESUMEN	2
III MARCO TEORICO	3
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
V OBJETIVOS	19
VI HIPÓTESIS DE TRABAJO	20
VII MATERIAL	21
VIII DISEÑO EXPERIMENTAL	22
IX METODOS	23
X RESULTADOS	34
XI ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
XII CONCLUSIONES	51
XIII RECOMENDACIONES	52
XIV ANEXO	53
XV REFERENCIAS	55

OBTENCION Y AISLAMIENTO DE FORMAS ATIPICAS DE *Vibrio cholerae*

I. INTRODUCCIÓN

El cólera es uno de los padecimientos que más han afectado a la humanidad y que se conoce desde hace ya varios cientos de años. Es causada por la acción de una toxina producida por una bacteria Gram negativa llamada ***Vibrio cholerae O1*** es de forma curvada que pertenece a la familia ***Vibrionaceae*** y afecta al intestino delgado de los seres humanos causando diarrea profusa en forma de agua de arroz.

En la actualidad se conoce que no solo el grupo O1 de la bacteria ***V.cholerae*** produce la enfermedad, sino que también la causa ***V.cholerae O139***, que posee el antígeno somático O (productor de la toxina colérica). De esta forma, se tiene que pueden aislarse ambas en el laboratorio clínico utilizando los medios de cultivo agar tiosulfato, citrato sales biliares y sacarosa (agar TCBS), y gelatina de telurito y taurocolato (TTG), aunque por su accesibilidad comercial se utiliza más el primero. Las colonias que se obtienen de ***V.cholerae*** son amarillas, redondas y de consistencia butirosa. Sin embargo se han aislado colonias de aspecto diferente que también corresponden a ***V.cholerae***. A ellas se les ha denominado como colonias rugosas.

Los primeros reportes acerca de las formas rugosas de la bacteria de ***V.cholerae*** se realizaron por Whitte Bruce en 1938, donde las describe como colonias producto de haber realizado previamente varios pases de la bacteria o como resultado de colonias de cultivos viejos. Su aspecto es reseco, algunas ocasiones aparecen con una coloración verdosa, con consistencia mucosa. De acuerdo a este autor estas bacterias están embebidas en una matriz extracelular de naturaleza quitinosa. Además, por observaciones al microscopio la bacteria aparece de menor tamaño y con una forma cocoide.

Debido a lo anterior, se presenta la problemática del diagnóstico de estas bacterias, ya que puede confundirse con colonias verdes de ***Vibrio parahaemolyticus*** en el medio de cultivo agar TCBS. Por ello, el presente trabajo buscó conocer el comportamiento del morfotipo rugoso frente a diferentes variables fisicoquímicas y una vez realizado lo anterior se pretendió diseñar un método que permita aislar tanto a morfotipos rugosos como lisos y obtener colonias características en el agar TCBS. El diseño de este método se basó en las características de las bacterias coléricas rugosas y en los principios de enriquecimiento y selectividad de los caldos y medios de cultivo utilizados en el laboratorio. De esta forma, se obtuvieron ambos morfotipos, aunque este trabajo puede dársele seguimiento para considerar la importancia de las colonias rugosas en el diagnóstico del laboratorio clínico.

II. RESUMEN

En virtud de la problemática que representa el aislamiento de morfotipos rugosos de *V.cholerae*, se buscó obtenerlos mediante el diseño de un método que empleara insumos de fácil acceso comercial. Lo anterior se realizó con un estudio previo del comportamiento del morfotipo colérico rugoso frente a variables fisicoquímicas. Con los resultados obtenidos se observó que la bacteria en su estado rugoso requiere de un enriquecimiento para que esta pueda formar colonias características en el agar TCBS.

Puede retomarse este proyecto contando con controles de rugosidad para darle una mayor validez a los resultados que se obtengan. La trascendencia de este trabajo radica que en posteriores trabajos con *V.cholerae* se considere que pueden existir alteraciones en la morfología colonial de la bacteria debida a previos estados de estrés, la forma en como actúan diversos factores fisicoquímicos en la viabilidad de esta bacteria, y finalmente, que debe considerarse el implementar en laboratorios clínicos un método de determinación de rugosidad para la bacteria de *V.cholerae*.

III. MARCO TEORICO

El cólera es un padecimiento causado por la acción enterotóxica de la bacteria *Vibrio cholerae* en las células del intestino delgado, observándose como signo patognomónico de la enfermedad la emisión de diarrea acuosa profusa en forma de "agua de arroz", además de una importante pérdida electrolítica donde el sodio es el ion que se pierde en mayor cantidad.

Esta enfermedad ha causado importantes epidemias y pandemias en países donde existe mal sistema de alcantarillado, deficiente sistema de agua potable y una higiene deficiente en la preparación de alimentos. Puede pensarse atinadamente, con respecto a lo anterior, que los países subdesarrollados son los más afectados.

DESCRIPCION DEL AGENTE ETIOLOGICO

Descubierta por Robert Koch, *Vibrio cholerae* es una bacteria Gram. negativa, en forma curva de 1.4 a 2.6 μm de longitud y de 0.5 a 0.8 μm de ancho (de hecho, puede presentar esta forma curva, bacilar o hasta una forma de huso, en función del medio ambiente en que se encuentre), dotada de un flagelo polar de 24-30 nm (y por tanto es muy móvil), afecta al intestino delgado, no pertenecen a la familia de las enterobacterias (tiene una reacción positiva a la prueba de la oxidasa) y se le ha agrupado en la familia *Vibrionacea*; tiene una afinidad importante por iones sodio para su crecimiento, realiza un metabolismo anaerobio facultativo, utiliza como nutriente glucosa catabolizada por la vía de Embden-Meyerhof produciendo ácido fórmico, láctico, acético, pirúvico y succínico. También utilizan la D-fructosa, la maltosa y el glicerol, con producción de ácido. Utilizan además, nitrógeno, azufre y fósforo.

CLASIFICACION Y COMPOSICION ANTIGENICA

Los vibriones se cuentan entre los microorganismos más comunes en las aguas de superficie en el mundo. Los dos tipos de vibrios patógenos principales son el *V.cholerae* y el *V.parahemoliticus*. La forma en la cual estos dos microorganismos producen diarrea es enteramente distinta; el *V.parahemoliticus* es una bacteria invasiva que afecta principalmente el colon, mientras que *V.cholerae*, como ya se mencionó anteriormente, desarrolla la enfermedad por otro mecanismo diferente al enteroinvasivo.

V.cholerae puede ser subdividido en serotipos basándose en los antígenos somáticos (antígenos O); el serotipo O1 es el más importante y se divide en dos biotipos: biotipo clásico y biotipo El Tor. Los vibriones de otros serogrupos pueden producir enfermedad en humanos en forma esporádica pero no se han asociado comúnmente con diarreas epidémicas. No obstante, algunos de ellos pueden producir una enfermedad similar al cólera.

Biotipo El Tor: Se le llama así por que en 1905 Gotschlich aisló seis cepas peculiares de *V.cholerae* en cadáveres de peregrinos que habían regresado de la Meca, en el campo de cuarentena de El Tor. Estas cepas producían hemolisinas. Sólo hasta 1961 este biotipo produjo una epidemia de proporciones considerables en Filipinas. En particular, sólo causa diarrea leve y produce una relación más alta entre portadores y enfermos que el cólera clásico; el estado de portador también es más prolongado y los microorganismos sobreviven mejor en el medio ambiente. El biotipo El Tor se ha extendido ahora por todo el mundo y ha desplazado en gran parte al biotipo clásico.¹

Vibrio cholerae tiene tres componentes antigénicos principales :

- La exotoxina, de naturaleza protéica y termolábil, que da lugar a la formación anticuerpos neutralizantes.
- El antígeno flagelar o "H" que es común a todos los biotipos
- El antígeno somático u "O", de naturaleza lipopolisacárida.

Sobre la base del antígeno "O" , *V.cholerae* se divide en serogrupos; como se mencionó anteriormente, el serogrupo O1 es el responsable del cólera epidémico o pandémico. Dentro de este serogrupo existen tres factores antigénicos A, B y C. El factor A es específico de grupo y los determinantes B y C lo son de tipo. Las distintas combinaciones de estos tres factores antigénicos que dan lugar a tres serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima.²

Serotipos	Factores O
Ogawa	A, B
Inaba	A, C
Hikojima	A, B, C

Tabla No.1 Combinaciones de los tres factores antigénicos que dan lugar a los tres serotipos de *V.cholerae* (Referencia 2).

De lo anterior, se desprende que de los diversos tipos de *Vibrios* existentes, el serogrupo O1 es el más patógeno debido a la severidad del cuadro diarréico; sin embargo, en 1992 en la India, específicamente en Bangladesh, se reportaron más de 150,000 casos de cólera causados por *V.cholerae* cuyo serovar no correspondía al O1 debido a la presencia de un azúcar en el lipopolisacárido constituyente en el antígeno somático del *Vibrio*; este azúcar (colitosa) no se encuentra presente en el lipopolisacárido de *V.cholerae* O1 ni en otras especies de la familia *Vibrionaceae* .³

A este vibrio se le denominó *Vibrio cholerae* O139 y se encontró, que se aislaba más frecuentemente en muestras de agua de Bangladesh, que el tipo O1, lo cual indica una mejor adaptación del serovar O139 al medio que el serovar O1.⁴

Lo anterior muestra que el vibrio causante del cólera, en una forma de resistir factores ambientales adversos, ha realizado cambios en su estructura que le brindan una mejor adaptación a su entorno.

MECANISMO PATOGENICO

Para que *V.cholerae* sea capaz de provocar la enfermedad infecciosa, se requiere que cumpla los cuatro puntos siguientes:

1. Penetración por vía oral.
2. Sobrepasar la barrera gástrica
3. Evitar la eliminación por el peristaltismo intestinal
4. Producir enterotoxina.

El microorganismo sólo ejerce su acción patógena cuando penetra por vía oral, a través de la ingestión de aguas o alimentos contaminados, y se requiere, así mismo para tal efecto, que la carga bacteriana presente sea de 10^8 .

La barrera defensiva más importante del huésped ante la penetración de esta bacteria es el estómago. Dada su sensibilidad al pH ácido, *V.cholerae* sucumbe rápidamente si el estómago está vacío. Para atravesar esta barrera, es necesario que el pH del jugo gástrico aumente por dilución al beber líquidos o bien por el efecto amortiguador que produce la ingestión de alimentos.²

Al llegar al intestino delgado, el microorganismo debe evitar la eliminación por el peristaltismo, lo que consigue por diversos mecanismos: producción de una adhesina y penetración en la capa mucosa que recubre las células intestinales mediante el movimiento activo proporcionado por su flagelo y por la acción de la neuraminidasa, mucinasa y proteasa. El microorganismo está, además, dotado de quimiotactismo por la mucosa intestinal. Una vez que el vibrión entra en contacto con las microvellosidades intestinales, produce la enterotoxina, que mediante su fracción B se une a los receptores específicos, constituidos por el gangliósido GM. Esta unión permite la actuación de la fracción A, cuya acción consiste en alterar la fisiología del mecanismo secretor de la membrana citoplasmática de las células del intestino delgado.²

La fracción hidroliza el NAD en niacín-difosforribosa, que transfiere la GTP-asa, reguladora de la actividad de la adenilciclasa, con lo que esta enzima se estimula. Como consecuencia de lo anterior, el ATP se transforma en AMP cíclico, y el aumento de este producto da lugar a una liberación activa de agua, cloro y por ello, de bicarbonato y potasio, y una inhibición de la absorción del sodio por las células intestinales. Esta alteración de la fisiología de las células intestinales es la responsable de los hechos más significativos del cólera: deshidratación y pérdida de electrolitos.

El período de incubación de la enfermedad va de 2 a 3 días y tiene una duración de hasta 7 días, en la cual existe una abundante diarrea y vómitos. La intensa diarrea acuosa no sanguinolenta puede producir la pérdida de un litro de líquido por hora y el desequilibrio electrolítico consiguiente, provocan deshidratación marcada, acidosis metabólica (pérdida de bicarbonato), hipopotasemia (pérdida de potasio) y shock hipovolémico con insuficiencia cardíaca. Si no hay tratamiento, la enfermedad produce una mortalidad del 40 al 60%.¹

EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD COLERICA

El cólera es una enfermedad infecciosa que desde el principio de los tiempos ha causado grandes devastaciones en poblaciones enteras. Hasta el momento, se han registrado 8 pandemias, la última de ellas se presentó en 1993 en Calcuta, India causada por un *Vibrio cholerae* NO 01 capaz de codificar la toxina causante del cuadro característico de la enfermedad. A este vibrio se le llamó *Vibrio cholerae* O139.⁵

La experiencia que han dejado estas pandemias a las autoridades sanitarias de diversas naciones, indican que las medidas implementadas para prevenir la diseminación de la enfermedad, tales como la preparación higiénica de los alimentos, higiene personal adecuada y promoción de la salud, no bastan para prevenir la diseminación de la enfermedad. Esto se debe a que el padecimiento presenta una "movilidad" igual a la del hombre, en virtud al estado de portador. Es importante mencionar que los sujetos infectados con el vibrión colérico, de no recibir un tratamiento antibacteriano, lo excretarán durante una o dos semanas y constituyen una importante fuente de diseminación de los microorganismos.

Se ha observado, además, que el vibrio está presente en mariscos cultivados con ausencia de contaminación fecal humana. Lo anterior indica que *V.cholerae* O1 tiene un ciclo de vida libre que no requiere la "inoculación" continua con heces humanas infectadas.

La enfermedad afecta principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico, con higiene deficiente y que no disponen de servicios sanitarios adecuados. Los varones suelen enfermar con más frecuencia, ya que están más expuestos a diversos factores de riesgo (consumo de agua de río y alimentos callejeros). Las mujeres enferman con menor frecuencia, y debido a la preparación de los alimentos para el resto de la familia, se propaga la enfermedad hacia cada uno de ellos. Los niños alimentados por lactancia materna son más resistentes a enfermar y a sufrir cuadros diarreicos graves.

Existen vacunas anticoléricas, sin embargo, estas no protegen contra la infección asintomática, además de que su efecto protector no dura más de seis meses.

Existen características epidemiológicas del cólera en zonas endémicas que varían entre países desarrollados y subdesarrollados que comprenden dichas zonas. En México el padecimiento se comporta como una epidemia.

CARACTERÍSTICAS	ZONAS EPIDEMICAS	ZONAS ENDEMICAS	
		País subdesarrollado	País desarrollado
Grupo etáreo de Riesgo	Preferentemente adultos	Menores de 15 años	Preferentemente adultos
Modos de Transmisión	Introducción única, diseminación oro-fecal	Introducción múltiple (agua, alimentos, diseminación oro-fecal)	Introducción única (por lo regular mariscos).
Reservorio	Ausente	Acuáticos*, portadores	Acuáticos
Portadores	Poco comunes	Muy frecuentes	Poco comunes
Diseminación Secundaria	Variable	Presente	Poco común

Tabla No.2. Características epidemiológicas en zonas endémicas de países desarrollados y subdesarrollados (Referencia 5).

* Estuarios, lagunas, lagos y moluscos bivalvos.

Actualmente en nuestro país el número de casos de cólera ha disminuido considerablemente, reportándose a los servicios de salud sólo nueve casos durante el año de 1999, y en ninguno de ellos existió defunción por la enfermedad. Los estados de la república donde mayor número se encontraron estos casos fueron Hidalgo y Tamaulipas (con tres cada uno). El grupo de edad en que se registró el padecimiento de la enfermedad fue de los 25 a los 44 años.

COMPORTAMIENTO DE *V.cholerae* EN EL AMBIENTE

Esta bacteria requiere encontrarse en un medio acuático ya que de lo contrario no es capaz de sobrevivir. Puede encontrarse en agua dulce o de mar, siempre y cuando en estas se encuentren condiciones que les permitan mantenerse en un estado viable en su medio.

La bacteria de *V.cholerae* es un habitante autóctono de la flora microbiana de aguas salinas o medianamente salinas, principalmente en aquellas que son típicas de los estuarios y donde existen pantanos costeros. También se ha demostrado la presencia de *V.cholerae* en agua de tipo dulce donde hay incluso ausencia de contaminación fecal humana.⁶

Anteriormente, se indicaba que la bacteria colérica era incapaz de persistir viable fuera del hospedero, en virtud a la deficiencia de factores propios para su sobrevivencia; pero debido a lo indicado anteriormente, se ha demostrado por trabajos en el laboratorio que *V.cholerae* puede mantenerse muy bien en el ambiente, incluso en condiciones desfavorables para su desarrollo y multiplicación. En respuesta a estas situaciones de estrés ambiental, *V.cholerae* adopta un estado viable que le permite realizar funciones metabólicas y formar colonias sin que sea posible cultivar. De aquí puede desprenderse un término propuesto por Valentine y Bradfield, que es el de viable no cultivable; este fenómeno representa un estado de latencia, supervivencia y persistencia en el medio ambiente al igual que la forma rugosa. Se propone que la forma viable no cultivable de *V.cholerae* es por la cual se mantiene y distribuye en la naturaleza.

De lo anterior puede comprenderse que la bacteria, como un ente vivo, ha manifestado cambios que le permiten resistir condiciones desfavorables (o condiciones de estrés) y que le permitan entrar en un estado de letargo y formar reservorios acuáticos que garanticen su supervivencia para que en el momento en que las condiciones de su entorno cambien a un medio favorable, realizar un nuevo cambio e iniciar funciones metabólicas que le permitan desarrollarse y multiplicarse.

Los trabajos de Huq, Colwell, Brayton P. y col.,⁷ mencionan que el estado de letargo, se logra cuando la bacteria interacciona con un reservorio acuático, y tienen la característica de no ser propagadas en medios de cultivo, los cuales si son capaces de aislar la bacteria colérica en muestras emitidas por el paciente. También indicaron que las bacterias de *V.cholerae* presentes en el medio acuático cuando éstas poseen las condiciones adecuadas para el desarrollo bacteriano, son de tipo cultivables, es decir, que dichas bacterias si pueden aislarse en el laboratorio clínico con el uso de medios de cultivo adecuados.

Sin embargo, tanto la forma no cultivable y la forma cultivable de la bacteria de *V. cholerae* tienen la capacidad de desarrollar el cuadro clínico típico de la enfermedad, según lo indicado por Colwell R. y col.³

De esta forma, y sobre la base de su capacidad de desarrollarse en medios de cultivo de laboratorio microbiológico, se ha descrito la presencia de dos tipos de bacterias coléricas capaces de desarrollar la enfermedad; es de este modo que se presenta la problemática de realizar el aislamiento de la forma no cultivable. Se han realizado métodos de Biología Molecular para mostrar la presencia de bacterias coléricas no cultivables en medios acuáticos, pero debido a su alto costo solo se han utilizado con fines de investigación.

FACTORES QUE FAVORECEN EL DESARROLLO Y VIABILIDAD DE *V.cholerae*

Ha existido gran interés por parte de los investigadores por conocer el comportamiento de la bacteria colérica cuando las condiciones nutricionales idóneas para ella no son las adecuadas, situación que se presenta en las estaciones climáticas diferentes al verano, cuando incluso la temperatura no es la adecuada para el desarrollo y la multiplicación bacteriana. A partir de lo anterior, los estudios realizados han arrojado los siguientes factores condicionantes de la viabilidad y desarrollo de la bacteria :

Agua: *V cholerae*, incluidas sus cepas toxígenas, ha sido aislado con frecuencia de ambientes acuáticos, tales como bahías, ríos, canales, zanjas y aguas subterráneas⁶.

Nutrientes: *V cholerae 01* es un anaerobio facultativo. Puede realizar respiración en presencia de oxígeno o realiza un proceso de fermentación en ausencia de

éste. Tiene la capacidad de crecer en medios que contienen carbohidratos (principalmente glucosa), así como nitrógeno, azufre, fósforo y sodio.^{3,6}

Iones: Tiene un requerimiento absoluto de Na^+ para el crecimiento. Cepas toxigénicas de *V.cholerae* biotipo El Tor requieren Na^+ para sobrevivir en ausencia de otros nutrientes y para crecer más rápido en presencia de ellos. El requerimiento de Na^+ no puede satisfacerse mediante la sustitución con los metales alcalinos Li^+ o K^+ . Sin embargo, la adición de los metales alcalinotérreos Ca^{2+} en presencia de Na^+ y Mg^{2+} , contribuyó a prolongar su supervivencia.^{6,8}

Salinidad: La bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en ausencia de nutrientes pero en presencia de salinidad. De acuerdo a los estudios de laboratorio de Miller y col. *V.cholerae* 01 toxígeno biotipo El Tor es capaz de sobrevivir en ausencia de nutrientes en aguas con una salinidad de 2.5 a 30 partes por 1000 (encontrándose una salinidad óptima de 20 partes por 1000).

La concentración salina más baja en la cual *V.cholerae* sobrevivía en forma estable en un tiempo de 70 días fue de 0.05%; la concentración salina más baja en la cual la bacteria sobrevivía por un tiempo estimado de 24 horas, fué de 0.01% (ref.12 y 25). Estos investigadores también encontraron que a concentraciones de 0.005% la bacteria cólerica tenía la capacidad de entrar a un estado de letargo, y en este caso requería de determinados niveles de nutrientes.

Por otra parte, Tamplin y Colwell⁶ han observado que el grado de salinidad óptimo para la producción de toxinas por *V.cholerae* 01 oscila entre 0.020 y 0.025%. No obstante, la bacteria tiene la capacidad de colonizar ecosistemas de agua dulce. Miller y col. encontraron que el microbio conservaba la capacidad de producir toxina después de 64 días de estar expuesto a condiciones de baja salinidad en el laboratorio.

Temperatura: La temperatura adecuada para el crecimiento de *V.cholerae* 01 toxígeno biotipo El Tor oscila entre 30 y 37 °C. En estudios realizados por Miller y col. encontraron que cepas de *V.cholerae* se desarrollaban bien en temperaturas de 25°C a concentraciones salinas de 0.1 y 1%, pero no a 0.001%. Utilizando estas mismas concentraciones salinas pero a temperatura de 4°C, encontraron que las concentraciones de 0.1 y 1% sobrevivían mejor que en la concentración salina de 0.001% a temperatura de 25°C, pero las bacterias suspendidas en las concentraciones salinas utilizadas a 4°C mostraban un gran decremento en su supervivencia, lo que no ocurría con las utilizadas a 25°C (a excepción de la concentración salina de 0.001%). Lo anterior indica que la salinidad aunada a la temperatura del entorno de la bacteria *V.cholerae*, influyen en gran medida en su supervivencia.

Acidez y Alcalinidad: *V.cholerae*, toxígeno biotipo El Tor puede tolerar ambientes alcalinos y es muy sensible a la acidez. De acuerdo a Miller y col.⁸, el pH óptimo para la supervivencia de la bacteria en el agua a 25°C es de 7 a 8.5 cuando la salinidad es moderada y de 7.5 a 9 cuando es baja.

Presencia de plantas y animales acuáticos: La bacteria de *V.cholerae* 01 toxígeno biotipo El Tor ha sido aislado de plantas macrófitas en aguas marinas y dulces, lo cual permite su supervivencia en ambientes acuáticos desfavorables. Islam y col. han sugerido que las plantas acuáticas pudieran ser reservorios ambientales del microorganismo, probablemente mediante una asociación inespecífica o entre comensales.⁶

V.cholerae serogrupo 01 se concentra en especies de fitoplancton y zooplancton de agua salina y dulce, a las cuales se adhiere. Huq y col. estudiaron la asociación ecológica entre *V.cholerae* 01 y copépodos planctónicos. Utilizaron dos cepas coléricas, una de origen clínico (biotipo 'clásico') y otra aislada de las aguas de un río en Dacca, Bangladesh (biotipo El Tor). Encontraron que la parte oral y el saco de huevos de los copépodos planctónicos fueron las áreas más colonizadas por *V.cholerae* 01. Los resultados de la investigación sugieren que la multiplicación de los vibriones tiene lugar en el saco de los huevos, el aparato digestivo y el exoesqueleto quitinoso de los copépodos. El agente patógeno secreta quitinasa, enzima que le permite utilizar la quitina como fuente de nutrientes. La adherencia a las superficies quitinosas le confiere mayor resistencia a la acidez del medio y a las bajas temperaturas. Los investigadores llegaron a la conclusión de que la ovipostura y la expulsión de materia fecal por copépodos planctónicos pueden facilitar la diseminación y multiplicación del microorganismo patógeno en ambientes acuáticos.

Además, *V.cholerae* se ha aislado de camarones, cangrejos, ostiones y de los intestinos de peces. Esto se debe a que la superficie quitinosa de los crustáceos provee un sustrato adecuado para la multiplicación de la bacteria. Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre la incidencia del cólera y el consumo de pescados y otros alimentos marinos crudos o mal cocinados.

VARIACIONES DE LAS CEPAS *in vitro* DEL ESTADO VIABLE CULTIVABLE

En la actualidad se emplean los medios de cultivo Agar Tiosulfato, Citrato Sales biliares y Sacarosa (agar TCBS) y Taurocolato Telurito Gelatina (TTG) para el aislamiento de *Vibrio cholerae* provenientes de heces diarreicas, y ambos medios proporcionan un excelente aislamiento del microorganismo, aunque se utiliza más frecuentemente el agar TCBS por su mayor accesibilidad comercial. Sin embargo, este medio no es recomendable para pruebas muy importantes como las serológicas debido a la presencia de carbohidratos que pueden causar resultados falsos positivos por la aglutinación entre estos y los anticuerpos del suero.¹⁰

Aislamiento selectivo de <i>Vibrio sp</i>	Excelente	Excelente
Uso para seguimiento de pruebas serológicas	Regular	Excelente
Uso para pruebas de oxidasa	Pobre	Excelente
Indicador de fermentación de sacarosa	Si	No
Zona de gelatinasa alrededor de la colonia	No	Si
Disponibilidad comercial	Si	No
Requerimiento de esterilización en autoclave	No	Si

Tabla 3. Características de los medios de cultivo agar TCBS y TTG (Referencia 10)



Fig.1 Aspecto de las colonias de *V.cholerae* en Agar TCBS

Actualmente existen variaciones en las cepas de *V.cholerae* de acuerdo a su morfología que presentan en el medio de cultivo utilizado para el aislamiento de especies de *Vibrio* (principalmente en agar TCBS). Estas variaciones presentan una coloración verdosa en las colonias y una consistencia mucosa en el medio de cultivo de agar TCBS. Algunos autores mencionan que estas variaciones se presentan en cultivos viejos y también in vivo y se les han denominado como formas rugosas de la bacteria de *V.cholerae*.



Fig.2 Se muestran dos tipos de colonias en la caja de la izq. las variantes rugosas en la de la derecha las lisas.

Esta variación fue descrita en una publicación realizada en 1938 por White P.B. ¹¹, y en dicho trabajo se menciona que la variante de tipo rugoso aparece en los medios de cultivo, una vez que se han realizado varios pases de colonias cuyo aspecto era diferente al de tipo liso (colonias amarillas de consistencia cremosa o butirosa). Este autor indica que las colonias con forma rugosa, están compuestas por bacterias que producen un material quitinoso.

White Bruce en el National Institute for Medical Research de Londres, realizó una descripción de las características de una forma rugosa, obtenida a partir de varias resiembras de cepas lisas de *V.cholerae*. De acuerdo a lo indicado por este investigador, las colonias rugosas se encuentran embebidas en una matriz extracelular amorfa, a la que llamó zooglea, y que son morfológica e inmunológicamente diferentes a las variantes lisas. Además por observaciones al microscopio, se ha encontrado que las bacterias rugosas son pequeñas y tienen una forma cocoide.

Con respecto a la presencia de colonias de tipo rugoso en los medios de cultivo, en diferentes publicaciones se ha mencionado como probable causa a la presencia de una capa lipopolisacárida en la célula bacteriana, como respuesta a condiciones desfavorables presentes en su entorno. Tales condiciones son: respuesta a la presencia de pH desfavorable a la viabilidad bacteriana colérica, temperatura, salinidad, concentración de iones cloro, baja concentración de nutrientes y exposición a rayos ultravioleta. Al existir condiciones desfavorables en el medio, es de esperarse que el número de bacterias presentes disminuyera considerablemente hasta desaparecer. Sin embargo, y como se mencionó antes, la bacteria desarrolló un mecanismo protector y/o de adaptación hacia las condiciones desfavorables en su entorno anteriormente indicadas, lo que le permitió mantenerse en cantidades suficientes para multiplicarse una vez que las condiciones fueran adecuadas para tal fin.

Como prueba de lo anterior, Miller C.J. y col. ¹² en un estudio en el que investigaban el efecto de la salinidad en la bacteria, encontraron que cepas que previamente habían estado sometidas a condiciones de estrés, soportaron mejor condiciones de baja salinidad que las bacterias no pre-estresadas, esto se reflejó en una menor disminución del número de bacterias estresadas en comparación con las bacterias no pre-estresadas. Además, Rice y col. encontraron que la variante rugosa se conserva viable en presencia de cloro. Muy probablemente este mecanismo de protección desarrollado por la bacteria explique la razón por la cual no desaparezcan del medio ambiente durante las estaciones climáticas de otoño, invierno y primavera, donde las condiciones no son las adecuadas para causar una multiplicación suficiente para lograr una infección en el ser humano. Recientemente, se ha propuesto, de un modo general para las bacterias y para los seres vivos, la presencia de moléculas de naturaleza protéica en el interior de la célula que son responsables de la reparación del material genético cuando la célula bacteriana ha sido expuesta a la acción de agentes mutágenos, y que se encuentran asociadas a ciertas regiones de proteínas recién sintetizadas ¹³.

En otras publicaciones, se ha indicado la presencia de proteínas denominadas "de choque"; las cuales reciben este nombre debido a que su síntesis está dada por ciertos genes que se activan cuando la célula bacteriana que los porta, sufre de un estado de estrés, tal como la temperatura, aunque también se menciona a agentes químicos tales como etanol o metales.¹⁴ Como ya se sabe, un choque térmico provoca el paro de la síntesis proteica en el citoplasma, además que dejan de expresarse los genes. Según lo indicado por los investigadores del tema, las células podrán regresar a un estado "normal" cuando se expresen los genes termoinducibles, es decir, se realice la síntesis de las proteínas de choque; una vez efectuado lo anterior la célula podrá recuperar el perfil habitual de síntesis proteica y su fisiología normal.¹⁴

De los dos planteamientos anteriores, puede mencionarse que la bacteria de *V.cholerae* puede de alguna manera realizar un mecanismo de adaptación similar sintetizando ciertas moléculas que tengan la capacidad de preservar parte de la integridad celular, cuando las condiciones que le rodean no favorecen un estado óptimo de fisiología celular.

VIRULENCIA GENICA DE *V.cholerae* 01

La bacteria de *V.cholerae*, como se comentó anteriormente, ejerce su patogenicidad debido a la acción de una toxina producida por la bacteria. Sin embargo, existen otros factores que contribuyen a que el desarrollo de la infección, colonización y producción de la toxina se lleven a cabo, de tal suerte que en ausencia de ellos puede verse mermada la actividad patogénica del *V.cholerae* 01.

Estos factores son esencialmente proteínas producidas por el genoma de la bacteria. Estas juegan un papel importante en la producción de la enfermedad a través de una interacción entre ellas, aunque su mecanismo no está bien definido.

La toxina del cólera es producida por los genes *ctxA* y *ctxB*, los cuales se encuentran en la región del core de *V.cholerae*. Dentro del mismo se encuentran otros grupos de genes que intervienen en la virulencia de la bacteria. Estos son los genes *zof* y *ace*. El primero realiza un rompimiento en las uniones estrechas de las células del intestino delgado y con ello no permite el balance iónico provocando diarrea. Se ignora si el gene *zof* interactúa con otros factores de virulencia o con el gene *ctx*, así mismo se desconoce si todas las cepas contienen este gen.

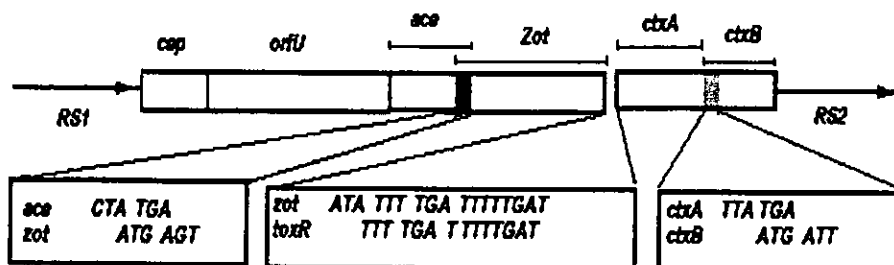
El gen *ace* produce una enterotoxina accesoria del cólera (*Ace*). Estos genes no están relacionados con la *ctx* ni con el gene *zof*. En animales la *Ace* produce diarrea, pero en humanos no está conocida su función.

Muchas cepas de *V.cholerae* producen más toxinas que otras y en muchos casos esto se debe a la duplicación de los genes *ctxAB*. La duplicación de la región *ctx* es conocida en la colonización de animales. El descubrimiento de que

los genes *ace* y *zot* son parecidos al gene *ctxAB* en el cromosoma, permite la posibilidad de que estos genes constituyan un cartucho (o cassette) de virulencia que puede ser amplificado durante la infección.

Además de los genes *zot*, *ace* y *ctxAB*, en esta región se encuentran los genes *cep* que codifica para un pili, *orfU* que codifica una proteína de función desconocida. Todos estos elementos se encuentran flanqueados por copias de una secuencia repetitiva llamadas *RS1*.

El arreglo de los genes en el core de *V.cholerae* es la siguiente:



Arreglo de los genes *ctxAB*, *zot* y *ace* en la región del core de *V.cholerae*

La producción de genes de virulencia por *V.cholerae* es regulada en múltiples niveles, los cuales incluyen:

- Duplicación de la región *ctxAB* de el cromosoma
- Regulación de la transcripción del gene de virulencia
- Traducción diferencial de *ctxA* y *ctxB* en el RNAm
- Activación de la subunidad A por rompimiento proteolítico.

La transcripción del operón *ctxAB* es afectado por un número de factores ambientales, incluyendo pH, ciertos aminoácidos, baja osmolaridad y temperatura. Existen genes que regulan la actividad de *ctxAB*, entre ellos se incluyen a los genes *tcp* y *acf*, también llamados *tag* (genes activadores de toxina), para los cuales su función no ha sido bien establecida. El hecho que genes reguladores similares a *ctxAB* están localizados en diferentes sitios en el cromosoma sugiere que esos genes son parte de un regulón. Existen tres proteínas involucradas en el control de la expresión del regulón. Estas proteínas son:

ToxR: Es una proteína de 32 kDa que atraviesa la membrana citoplásmica, aproximadamente 2 terceras partes de la porción amino terminal de *ToxR* es expuesta al citoplasma y esta porción contiene el DNA del dominio de enlace. Un modelo para saber cómo *ToxR* activan la transcripción de *ctxAB* se basa en la suposición que los monómeros de *ToxR* no se une al DNA, mientras que los dímeros de *ToxR* se enlazan a la región del operador de *ctxAB* y activan la expresión.

ToxS: Es una proteína periplásmica de 19 kDa, actúa para facilitar la formación del dímero de *ToxR*.

No está claro cómo este sistema (*ToxR/ToxS*) responda a señales ambientales. Presumiblemente los cambios en la conformación de *ToxS* debida a varias señales permitan la dimerización de *ToxR*, pero la naturaleza precisa de tal interacción no está bien determinada.

La expresión del operón *ToxRS* es también regulada en el nivel de transcripción. Arriba de este operón se encuentra un gene (*htpG*) que codifica una proteína de choque térmico. Estas se producen en altos niveles cuando la bacteria es expuesta a altas temperaturas u otras formas de estrés. Los genes *toxR* y *htpG* son transcritos en sentido contrario. Existe un mecanismo propuesto que pretende explicar la transcripción de *ToxR*. Este consiste en una RNA polimerasa sigma unida al promotor *ToxR*; el gene *toxR* se transcribe solo a bajas temperaturas, al elevarse ésta, la RNA polimerasa involucrada en la transcripción de los genes de termo-shock se unen al promotor de *htpG* y de esta forma reprimen al promotor de *ToxR*. Lo anterior puede explicar que los productos génicos CT y CTP se expresan in vitro a 30°C pero no a 37°C en el *V.cholerae* clásico.

ToxT: Es una proteína de 32 kDa codificada por el gen *toxT*; su secuencia aminoacídica es similar a una familia de activadores transcripcionales. La transcripción de *ToxT* es activada por *ToxR*; *ToxT* activa la expresión de otros genes incluyendo *tcpA*. El gen *toxT* se localiza dentro del grupo de genes *tcp*, entre *tcpF* y *tcpJ*. Varios genes, tales como *tcp* y *acf*, son activados directamente por *toxT*, pero no con *ToxR*. En otros genes, tales como *ctx* es activado directamente por *ToxR*. En el caso de *ctxAB*, *ToxT* participa junto con *ToxR* en la regulación de la transcripción; pero la forma en cómo esos dos activadores interactúan con la región operadora-promotora es desconocida ¹⁵.

DESCRIPCION DE OTRAS TOXINAS Y GENES PRESENTES EN *V.cholerae*

La bacteria causante del cólera en humanos, produce otras toxinas de naturaleza protéica además de la causante del desequilibrio iónico en el intestino delgado. En algunas de ellas no está bien definido su papel en la infección y desarrollo de la enfermedad. Así mismo, se presentan dentro del genoma de la bacteria ciertos genes que si bien es cierto no esta completamente claro su papel en el vibrio, si se conoce un poco de su interacción con otros elementos constitutivos de la bacteria.

Toxina Tcp: Se le conoce como toxina correguladora del pili y es codificada por el gene *tcp*. Su función en la infección no está claro, pero cepas mutantes que no codifican la toxina son avirulentas en el humano. Así mismo, no se ha identificado algun receptor en las células del epitelio del intestino delgado para el pili de *V.cholerae*. Una vez sintetizado el pili, este consta de dos subunidades: la subunidad A y la subunidad B. La primera es de mayor magnitud que la B. Los genes que las codifican son *tcpA* y *tcpB*, respectivamente. La subunidad mayor del pili (A), actúa como mediador en la vinculación entre el pili y la célula hospedera.

En la regulación de la expresión del gene del pili están involucrados tres genes, y para la secreción y ensamblamiento cuatro. Entre ellos se incluyen:

tcpC: Es un gene que codifica una proteína de la membrana externa con función desconocida.

tcpJ: Es un gene que codifica una peptidasa que rompe la señal de la secuencia amino terminal a partir de la secreción de *tcpA*.

tcpG: Localizado fuera del grupo de genes que puede codificar una proteína chaperona (la cual ayuda en el plegamiento adecuado de las proteínas secretadas).

Hemaglutinina: *V.cholerae* produce una proteína de superficie que aglutina eritrocitos. En otras bacterias patógenas esta proteína provee de adhesinas y puede contribuir a la adherencia de *V.cholerae*; sin embargo, no se conoce si tiene un papel directo en la colonización del intestino.

Genes acf: Existen posibles factores de colonización codificados por genes llamados factores accesorios de colonización (genes *acf*). Las proteínas producidas por estos genes se encuentran en la membrana externa de la bacteria

y parecen ser importantes en la colonización, debido a que bacterias mutantes que carecen de estos genes muestran una reducida capacidad para colonizar el tracto intestinal de animales. El mecanismo por el cual proteínas Acf contribuyen a la colonización, no está bien claro.

Gene hap: Este gene codifica una proteasa que posee actividad hemaglutinante. Esta proteasa es zinc y calcio dependiente, degrada un número diferente de tipos de proteína incluyendo fibronectina, lactoferrina y a la misma toxina del cólera. En bacterias de *V.cholerae* mutantes, las cuales no producían esta proteasa, se observó que fueron totalmente virulentas en conejos, lo cual indica que esta proteasa no realiza una mayor contribución a la colonización. Estos resultados indican, así mismo, que aunque la hemaglutininproteasa rompe también a la toxina colérica, ésta no es responsable de la activación de la toxina por separación de la misma en sus dos subunidades.

Genes zot: Algunas cepas de *V.cholerae* producen una toxina llamada Zot (zona occludens toxin), que rompe las uniones que mantienen la mucosa celular del intestino delgado unida y preservan la integridad de la membrana. Estas uniones actúan como una barrera que los iones no pueden atravesar. La toxina Zot destruye estas uniones y no solo permite la fuga del contenido luminal, también altera el equilibrio iónico y ocasiona diarrea. No está conocido si este gene interactúa con el gene ctx u otros factores de virulencia, o si todos los genes contienen el gene zot .^{15,16}

I V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al ser las bacterias uno de los organismos vivos que por su tiempo de generación ha experimentado y manifestado cambios en su respuesta hacia agentes físicos y químicos presentes en el medio ambiente, es de esperarse que en la actualidad dichos cambios adaptativos puedan alterar en alguna forma el patrón de diagnóstico de algunas de las pruebas realizadas para tal fin, complicándose así la labor del microbiólogo, al no poder identificar de forma adecuada determinadas bacterias de interés clínico.

En este sentido, la bacteria de *Vibrio cholerae* ha realizado este tipo de cambios que se manifiestan en los medios de cultivo más usuales en laboratorios clínicos, obteniéndose dos tipos distintos de morfologías coloniales, una de ellas de aspecto rugoso (colonias verdes, que en un momento dado puede confundirse con *V.parahemoliticus*), y otra de aspecto liso (colonias amarillas, que normalmente se obtienen en el medio TCBS). Clínicamente, ambas formas tienen la capacidad de desarrollar la enfermedad en el paciente (la forma rugosa desarrolla un cuadro clínico menos severo).¹¹

Con estos antecedentes, y tomando en cuenta también que ambas formas (rugosa y lisa) tienen capacidad de desarrollar la enfermedad, debe diseñarse un método diagnóstico que pueda aislar y recuperar tanto las formas lisas (colonias amarillas) y las formas rugosas (colonias verdes), ambas en el medio agar TCBS y una vez realizado lo anterior, poner de manifiesto las colonias lisas a partir de las colonias rugosas aisladas y obtenidas con el método diseñado.

El diseño de dicho método será de acuerdo a los alcances en materia de insumos presentes en el laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, para que tenga una mayor reproducibilidad para posteriores procesos diagnósticos en casos de cólera.

V. OBJETIVOS

- Obtener variantes rugosas a partir de formas lisas de la bacteria de *V.cholerae*
- Conocer el grado en que influye en la formación de variantes rugosas los factores: nutrientes, temperatura, pH, cloro y iones sodio.
- Revertir el proceso de obtención de una variante rugosa para aislar variantes lisas.
- Diseñar un método de diagnóstico que comprenda la identificación tanto de formas lisas como de variantes rugosas.

VI. HIPOTESIS DE TRABAJO

Tomando en cuenta que los factores: temperatura, pH, iones sodio, iones cloruro y concentración de nutrientes, influyen de manera decisiva en la formación de colonias de tipo rugoso en los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *V.cholerae*, por lo tanto, al crear condiciones desfavorables para el desarrollo de dicha bacteria por medio de la alteración de los factores fisicoquímicos mencionados anteriormente presentes en el medio de recuperación y aislamiento diseñado en el laboratorio, se obtendrán in vitro las variantes rugosas de la bacteria de *V.cholerae* .

VII. MATERIAL

1) SUSTANCIAS QUIMICAS Y REACTIVOS

- Acido clorhídrico (Merck)
- Acriflavina (Sigma)
- Agua destilada
- Agar hierro triple azúcar (medio TSI) (Bioxon)
- Agar MacConkey (Bioxon)
- Agar tiosulfato – citrato – sales biliares y sucrosa (agar TCBS) (Bioxon)
- Agua peptonada (AP) (Oxoid)
- Caldo arginina (Ca) (Bioxon)
- Caldo de enriquecimiento para gram negativos de Haffna (caldo GN) (Merck)
- Caldo Peptonado (Cp) (Bioxon)
- Caldo soya tripticaseina (CST) (Bioxon)
- Hipoclorito de sodio
- Medio base de agar sangre (BAB) (Bioxon)
- Medio de cultivo lisina arginina (medio LIA) (Bioxon)
- Medio de cultivo movilidad indol ornitina (medio MIO) (Bioxon)
- Papel indicador de pH (Bayer)
- Sodio, hidróxido de (Merck)

ANTISUEROS :

- Antisuero polivalente (anti-O) para *V.cholerae* (Difco)
- Antisuero anti Ogawa (Difco)
- Antisuero anti Inaba (Difco)

2) MATERIAL

- Agitador de vidrio
- Asas bacteriológicas
- Cajas de Petri (Pyrex)
- Cubrebocas
- Gasas estériles
- Gradilla de alambre para tubos de 18 x 150
- Guantes de látex estériles (Oilly)
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex)
- Mechero Fisher-Johns
- Perilla de succión (Brand)
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL (Pyrex)
- Portaobjetos (Fisher-Brand)
- Probeta graduada de 1000 mL (Pyrex)
- Puntas para micropipeta estériles (HT).
- Tubos de rosca con tapa de baquelita (Pyrex)
- Vasos de precipitado de 500 mL (Pyrex)

3) MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de *Salmonella sp* del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Cepa de *Shigella sp* del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Cepas de *V.cholerae* del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Cepa control de rugosidad positiva de *V.cholerae* (Cepa ID2)
- Muestra de materia fecal perteneciente a un paciente atendido en el hospital general regional No. 25 en el mes de agosto de 1988 con diagnóstico de *Escherichia coli*

4) EQUIPO

- Autoclave
- Incubadora (Precisión)
- Balanza semianalítica (Sartorius)
- Micropipeta 100 µL (HT)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss)
- Refrigerador (General Electric)

VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Población

Se utilizaron cepas de *V.cholerae* que formaban parte del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del IMSS, las cuales a su vez fueron aisladas de muestras de materia fecal de pacientes diagnosticados con cólera durante los años de 1991 y 1992.

Criterios de inclusión

Las cepas de *V.cholerae* que se utilizaron en el presente trabajo fueron aquellas que se encontraron viables y cultivables en los medios de cultivo de agar TCBS y agar MacConkey y cuyos resultados de identificación metabólica y por aglutinación correspondieron a *V.cholerae O1* serotipo Ogawa.

Criterios de exclusión

No se incluyeron en este trabajo experimental a aquellas cepas que no se desarrollaron en los medios de cultivo de agar TCBS y MacConkey y cuyos resultados de identificación metabólica y por aglutinación no correspondieron a *V.cholerae O1* serotipo Ogawa.

3) MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de *Salmonella sp* del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Cepa de *Shigella sp* del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Cepas de *V.cholerae* del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Cepa control de rugosidad positiva de *V.cholerae* (Cepa ID2)
- Muestra de materia fecal perteneciente a un paciente atendido en el hospital general regional No. 25 en el mes de agosto de 1988 con diagnóstico de *Escherichia coli*

4) EQUIPO

- Autoclave
- Incubadora (Precisión)
- Balanza semianalítica (Sartorius)
- Micropipeta 100 μ L (HT)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss)
- Refrigerador (General Electric)

VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Población

Se utilizaron cepas de *V.cholerae* que formaban parte del cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del IMSS, las cuales a su vez fueron aisladas de muestras de materia fecal de pacientes diagnosticados con cólera durante los años de 1991 y 1992.

Criterios de inclusión

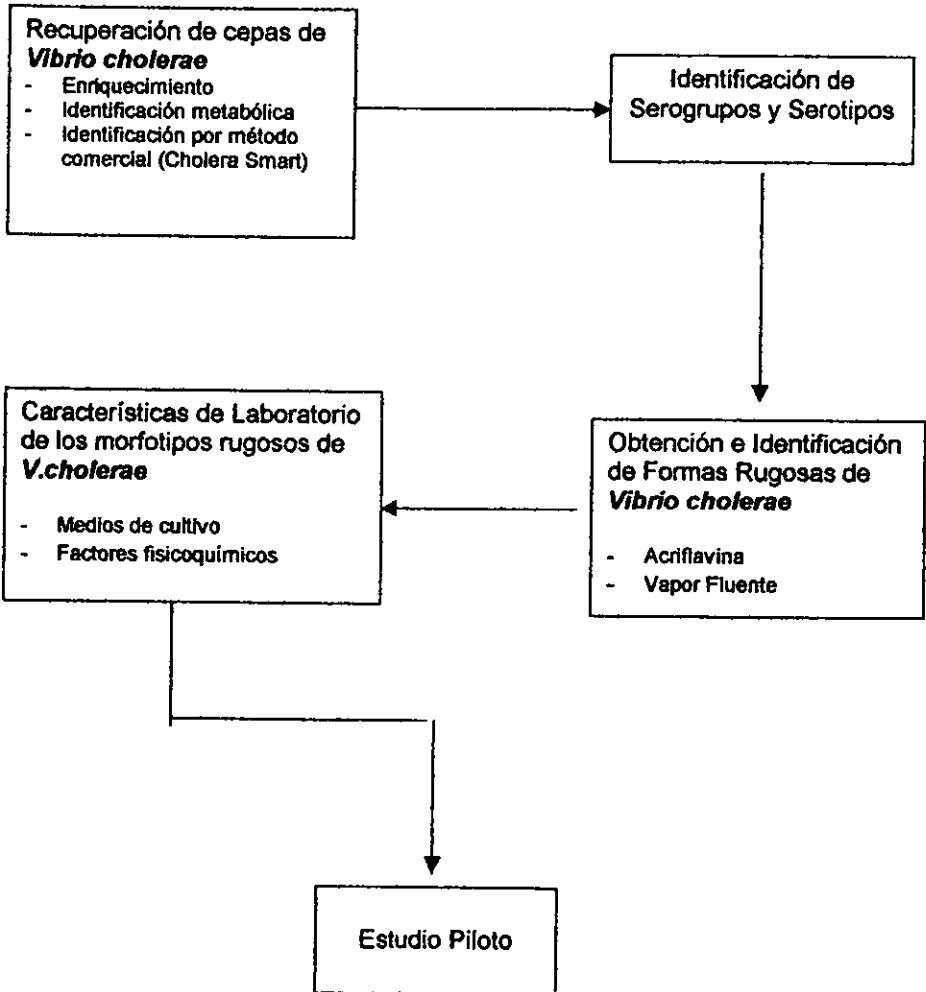
Las cepas de *V.cholerae* que se utilizaron en el presente trabajo fueron aquellas que se encontraron viables y cultivables en los medios de cultivo de agar TCBS y agar MacConkey y cuyos resultados de identificación metabólica y por aglutinación correspondieron a *V.cholerae O1* serotipo Ogawa.

Criterios de exclusión

No se incluyeron en este trabajo experimental a aquellas cepas que no se desarrollaron en los medios de cultivo de agar TCBS y MacConkey y cuyos resultados de identificación metabólica y por aglutinación no correspondieron a *V.cholerae O1* serotipo Ogawa.

IX. METODOS

DIAGRAMA DE FLUJO REALIZADO



METODOS

A. RECUPERACION DE CEPAS

A.a. Recuperación primaria:

1. Se seleccionaron los tubos con medio de cultivo base de agar-sangre que contienen a las cepas de *V.cholerae* provenientes de pacientes que padecieron la enfermedad durante el año de 1997 y que fueron atendidos en el hospital general regional No.25 del IMSS. Dichas cepas se encuentran en el cepario del laboratorio clínico del hospital.
2. Se mantuvieron en reposo hasta que alcanzaron la temperatura ambiente
3. Se inocularon cada una de las cepas en placas de agar TCBS aislando por estría cruzada. Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.
4. Se revisó el crecimiento en las placas.
5. Para el caso de cepas que no se desarrollaron de acuerdo al procedimiento anterior, se procedió al siguiente proceso.

A.b. Enriquecimiento de cepas

1. A cada cepa que no se desarrolló en el medio de cultivo de agar TCBS, se inoculó en tubos con agua peptonada alcalina (AP).
2. Se incubó a 37°C por 24 horas.
3. De los tubos con crecimiento, se sembraron placas de agar TCBS, aislando por estría cruzada.
4. Se incubó a 37°C por 24 horas.
5. Se revisó el crecimiento en las placas.

A.c. Identificación Metabólica de las cepas recuperadas

1. A las colonias recuperadas se procedió a realizar la identificación bioquímica mediante el uso de las siguientes pruebas: medio Caldo Peptonado, Caldo Arginina, medio MIO, medio TSI y medio LIA.
2. Se inocularon cada uno de los anteriores medios de identificación bioquímica mediante agitación en el medio (caldos peptonado y arginina), picadura (medio MIO), y picadura y estría en la superficie del agar (medios TSI y LIA).
3. Se inoculó también por estría un tubo de 13 x 100 con medio base de agar sangre.
4. Se incubaron a 37°C por 24 horas.
5. Se realizó la lectura de resultados.
6. Al crecimiento obtenido en los tubos con medio LIA, se realizó la prueba de oxidasa.
7. Se procedió a la identificación de la especie bacteriana recuperada para cada cepa.

A.d. Identificación de Cepas recuperadas mediante el método comercial CHOLERA SMART



Con un gotero de plástico desechable, se tomó una suspensión de bacterias coléricas y se depositó en un tubo de plástico para preparación de la muestra hasta llenar la mitad del tubo.

Se tapó el tubo de preparación con un tapón con filtro y se agitó vigorosamente hasta obtener una muestra homogénea.

Se añadieron con un gotero de plástico graduado, 0,5 mL de solución amortiguadora de extracción al tubo de preparación de la muestra



Se destapó el frasco de reacción que contenía el reactivo liofilizado. Se tomó el frasco con solución amortiguadora de reconstitución, se invirtió y se dejó caer libremente dos gotas dentro del frasco con reactivo liofilizado.



Se abrió el sobre metálico y se extrajo el dispositivo SMART para detección del cólera y el tubo de vidrio con el reactivo liofilizado.

Con un tapón con filtro se tapó el tubo de preparación de la muestra y se agitó vigorosamente hasta obtener una muestra homogénea.

(Continúa en la siguiente página)

A. d. Identificación de Cepas recuperadas mediante el método comercial CHOLERA SMART (Continuación)



Se tomó el tubo que contiene la muestra de suspensión bacteriana, se invirtió, se oprimió y se dejó caer 4 gotas dentro del frasco con el reactivo fertilizado. Se tapó con el tapón con filtro y se agitó para que el contenido se mezclara bien.



Se abrió el sobre que contenía un hisopo, se introdujo hasta el fondo de vidrio que contiene el reactivo y la muestra. Se agitó de 3 a 4 veces para lograr que se impregnara en el hisopo. Este se mantuvo dentro del tubo hasta completar el siguiente paso.



Se retiró el hisopo del tubo de vidrio de reacción haciendo un ángulo de aproximadamente 45 grados. Se colocó la punta del hisopo impregnada con el reactivo y la muestra en el pozo del dispositivo SMART. Se cerró firmemente la tapa del equipo y se presionó en la marca que aparece en el centro de la tapa.

Se tomó el dispositivo SMART para detección de cólera. Se abrió el compartimiento superior, seleccionando una de las esquinas marcadas con una flecha y se tiró de ellas hacia arriba sosteniendo con la otra mano el dispositivo SMART.



Se mantuvo por lo menos 10 minutos y no más de 6 horas. Transcurrido por lo menos el menor tiempo indicado, se abrió el compartimiento inferior del equipo SMART marcado con la palabra resultado para dejar visible el área de lectura de la prueba.

(Continúa en la siguiente página)

A.d. Identificación de Cepas recuperadas mediante el método comercial CHOLERA SMART (Continuación)



Para interpretar la prueba, se observó el círculo superior, cuando este fue de color rosa a morado, la prueba se consideró positiva.

Si tanto en el círculo superior, como en el inferior no hay marcados cambios de coloración, la prueba se consideró negativa.



Cuando se presentaba coloración en ambos circuitos, se humedeció un hisopo con solución amortiguadora de reconstitución y se frotó con él ambos circuitos reactivos para aclarar el resultado de la prueba.

B. IDENTIFICACION DE SEROGRUPOS Y SEROTIPOS MEDIANTE AGLUTINACION CON SUEROS POLIVALENTES Y MONOVALENTES ANTI-*V.cholerae*.

1. En un portaobjetos limpio, se colocaron gotas de solución salina y de los antisueros en el siguiente orden: solución salina (control negativo), suero anti-O1 (suero polivalente), sueros monovalente Ogawa, y suero monovalente Inaba.
2. Se tomo una asada de crecimiento colonial a partir del tubo de BAB y se mezcló con cada una de las gotas de los reactivos anteriores por separado.
3. Se realizó la lectura de resultados de aglutinación.
4. Se hizo la misma operación para cada cepa recuperada.

C. OBTENCION E IDENTIFICACION DE FORMAS RUGOSAS DE LA BACTERIA DE *V.cholerae*

1. Se inoculó y aisló por estría cruzada cada cepa de *V.cholerae* recuperadas por medio de los procesos anteriores en placas de agar-TCBS utilizando una placa por cada cepa. Se incubó a 37°C por 24 horas.
2. Se sometió a un proceso de estrés a las colonias obtenidas en cada placa y a su vez para cada cepa, a través de una disminución de la temperatura, introduciendo las placas de agar-TCBS con colonias desarrolladas en el refrigerador del Laboratorio Clínico (Temp. aprox. de 4°C).
3. Se mantuvo a estas condiciones por un tiempo no menor a 48-72 horas.
4. Se retiraron las placas del refrigerador y se realizaron las pruebas de identificación de morfotipos rugosos a las colonias presentes en el medio.

C.a. Identificación de morfotipos rugosos mediante aglutinación con colorante de Acriflavina

1. Se colocaron en un portaobjetos limpio dos gotas de solución de acriflavina.
2. Se tomó una asada de una colonia de *V.cholerae* y se mezcló con una de las gotas de solución de acriflavina.
3. Se observó la presencia o no de aglutinación en la suspensión obtenida a contra-luz en un tiempo no mayor a un minuto.
4. Se realizó lo anterior para cada cepa en estudio.

Interpretación de la prueba:

Prueba positiva: La presencia de grumos indica aglutinación positiva y rugosidad de la colonia para la cepa de *Vibrio cholerae* en estudio.

Prueba negativa: La ausencia de grumos indica aglutinación negativa y carácter liso de la colonia para la cepa de *Vibrio cholerae* en estudio.

C.b. Identificación de formas rugosas mediante aglutinación por Vapor Fluente.

1. Se realizó la inoculación por estria de aislamiento de las cepas estresadas en placas de BAB (una cepa por placa). A continuación se incubó a 37°C por 24 horas.
2. Se enriqueció en caldo de soya y tripticaseína (CST) contenida en tubos de 18x150, a tres colonias de cada cepa presente en las placas de BAB (una colonia por tubo) , por 24 horas a 37°C.
3. Los tubos con crecimiento se colocaron en la autoclave a las condiciones de 5 libras de presión y a aproximadamente 105 °C por dos horas.
4. Después se colocaron los tubos en refrigeración (4°C) durante un tiempo de 24 horas.
5. Se realizó la lectura de resultados y la posterior identificación de morfotipos rugosos (presencia de botón en fondo del tubo) o lisos (presencia de sedimento en el fondo del tubo).

Interpretación de la prueba:

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

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

D. CARACTERÍSTICAS DE LABORATORIO DE LOS MORFOTIPOS RUGOSOS DE *V.cholerae*

D.a. Condiciones óptimas de desarrollo de morfotipos rugosos de *V.cholerae* mediante utilización de caldos de enriquecimiento.

1. Se utilizaron cepas de *V.cholerae* en su estado rugoso.
2. Se etiquetaron tubos con AP con diferentes valores de pH (5.5 a 9), con los datos correspondientes para cada cepa.
3. Se realizó el mismo procedimiento con tubos de CST con los mismos diferentes valores de pH.
4. Para cada cepa, se tomó una asada de colonias en su estado rugoso y se inoculó en los tubos con AP y CST con diferentes valores de pH.
5. Se incubó a 37°C por 24 horas.
6. Se observó el crecimiento mediante la turbidez de los medios utilizados para cada cepa.
7. Se interpretó cuál medio y qué valor de pH fue el adecuado para favorecer el desarrollo de formas rugosas.

D.b. Efecto de factores fisicoquímicos en la adaptabilidad del morfotipo rugoso de ***V.cholerae***

- pH:

1. Se realizó una suspensión de una cepa rugosa de ***V.cholerae*** en solución salina de acuerdo a comparación con el tubo No. 2 de MacFarland.
2. Se preparó y etiquetaron tubos con AP con valores de pH 5 a 9.
3. Se inocularon 100 μ L de la suspensión salina del paso 1 en cada tubo
4. Se incubó a temperatura ambiente por 24 horas en ausencia de luz.
5. Al término de la incubación, se sembró en placas de agar TCBS una asada de cada tubo.
6. Se leyeron e interpretaron resultados.

- Temperatura y pH:

1. Se realizó una suspensión de una cepa rugosa de ***V.cholerae*** en solución salina de acuerdo a comparación con el tubo No. 2 de MacFarland.
2. Se preparó y etiquetaron 3 juegos de tubos con AP con valores de pH 5 a 9.
3. Se inocularon 100 μ L de la suspensión salina del paso 1 en cada tubo.
4. Se incubaron a diferentes temperaturas de la siguiente manera:

Primer juego de tubos con AP: Temperatura de incubación 5°C

Segundo juego de tubos con AP: Temperatura de incubación 25°C

Tercer juego de tubos con AP: Temperatura de Incubación 37°C

5. Se tomó una asada de cada tubo y se sembró por estría de aislamiento en agar TCBS a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.
6. Se leyeron e interpretaron resultados.

- Cloro:

1. Se realizó una suspensión de una cepa rugosa de ***V.cholerae*** en solución salina de acuerdo a comparación con el tubo No. 2 de MacFarland.
2. Se preparó y etiquetaron 5 juegos de tubos con AP con valores de pH 5 a 9.
3. Se realizaron diluciones de hipoclorito de sodio en agua estéril y desionizada (a partir de una solución comercial con un 6% de hipoclorito de sodio) a fin de obtener las siguientes partes por millón (ppm): 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125.
4. Se adicionaron 100 μ L de la suspensión del paso 1 a cada tubo con AP
5. Se adicionó el volumen suficiente de las diluciones realizadas hasta obtener una concentración de 50 ppm, a cada tubo de un primer juego de tubos con AP con diferentes valores de pH.
6. Se mantuvo en contacto la bacteria con el hipoclorito de sodio presente en los tubos con AP a diferentes valores de pH por un tiempo de 15 minutos.
7. Transcurrido este tiempo, se tomó una asada de cada tubo y se sembró en placas de agar TCBS.

8. Se repitió el mismo procedimiento a partir del paso 4 para las restantes ppm de hipoclorito de sodio referidas en el paso 3.
9. Se incubaron las placas por 24 horas a temperatura ambiente.
10. Se leyeron e interpretaron resultados.

- NaCl

1. Se seleccionó una cepa en estado rugoso (de acuerdo a resultados de pruebas de rugosidad descritas anteriormente) y se sembró por estría de aislamiento en una placa de agar TCBS.
2. Se incubó a 37°C por 24 horas.
3. Se tomó una asada de una colonia aislada y se inoculó en tubos de 13 x 100 con caldos peptonados a diferentes valores de concentración de NaCl.
4. Se incubaron los tubos a 37°C por 24 horas.
5. Se repitió el mismo procedimiento para cada cepa.

E. ESTUDIO PILOTO

Sección I: Enriquecimiento de formas rugosas de *V.cholerae* y de materia fecal

1. Se seleccionaron tres cepas de *V.cholerae* en estado rugoso.
2. A la muestra de materia fecal referida en el listado del material biológico, se enriqueció mediante adición de peptona alcalina.
3. Para cada cepa de *V.cholerae* en estado rugoso, se tomó una asada y se inoculó en CST a pH 9 y se incubó a 37°C por 24 horas.
4. Para los tubos que mostraron crecimiento, se les realizó una suspensión en solución salina (una suspensión por cada cepa) de acuerdo a comparación visual con el tubo No. 1 de MacFarland (suspensión A).
5. En tubos de rosca de 18 x 150 con tapa de baquelita estériles, se colocó 1 mL de materia fecal enriquecida.
6. Se agregaron 100 µL de la suspensión A de una cepa a un tubo estéril con la materia fecal.
7. Se repitió el procedimiento para cada cepa de *V.cholerae* utilizada (suspensiones B).
8. Se colocó cada tubo en un baño de hielo para inhibir multiplicación bacteriana por 15 minutos.
9. Se tomaron 100 µL de cada suspensión tipo B y se inocularon cada una en placas de agar TCBS (Placa A) y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Sección II: Inhibición microbiana ajena a *V.cholerae*

1. Se tomaron 100 μ L de cada suspensión tipo B y se inocularon cada una en tubos de CST + caldo GN con diferentes valores de pH de la siguiente manera:

Para cada cepa:

100 μ L en tubos de CST + caldo GN con valor de pH 7

100 μ L en tubos de CST + caldo GN con valor de pH 9

2. Se incubó a 37°C por 24 horas.

3. De los tubos que mostraron enturbiamiento del medio, se tomaron 100 μ L y se inocularon en placas de agar TCBS y agar MacConkey de la siguiente manera:

Para cada cepa y cada valor de pH:

- 100 μ L de tubo de CST + caldo GN sembrados por estría masiva en placa de TCBS (placa B)

- 100 μ L de tubo de CST + caldo GN sembrados por estría cruzada en placa de TCBS (placa C)

- 100 μ L de tubo de CST + caldo GN sembrados por estría cruzada en placa de Agar MacConkey

4. Se incubaron a 37°C por 24 horas.

6. Se leyeron e interpretaron resultados.

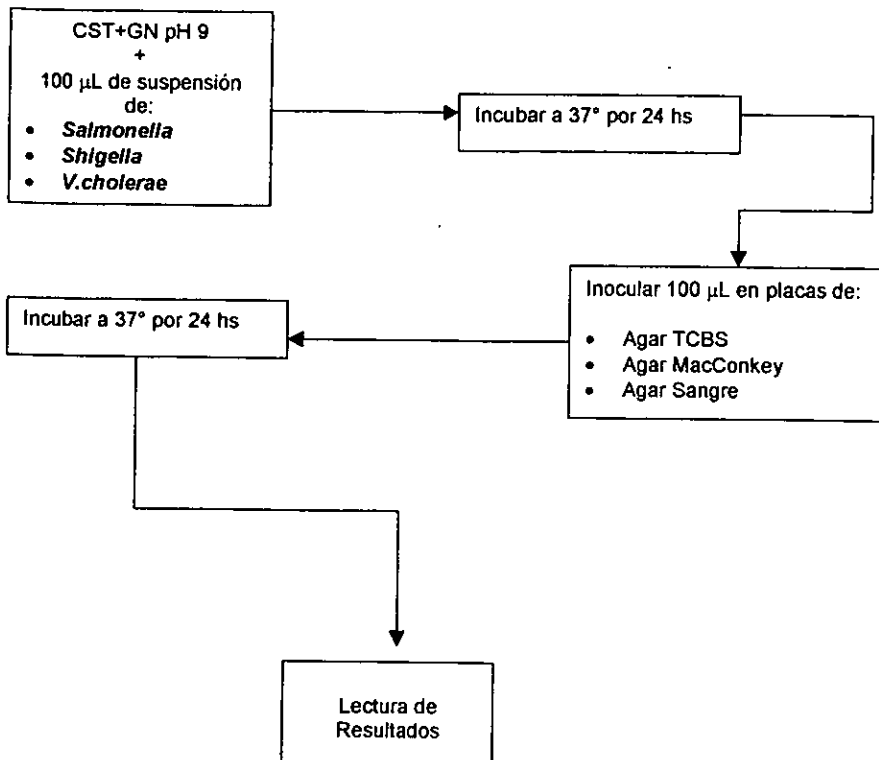
E.b. Recuperación de *V.cholerae* frente a Enterobacterias

1. Se realizó un enriquecimiento en tres tubos con CST pH 7 de las siguientes bacterias: *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *V.cholerae*.

2. Se incubó a 37°C por 24 hs

3. Se realizó una suspensión para cada tubo de cada bacteria en tres tubos estériles de 13 x 100 aproximada al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland.

4. Se realizó el siguiente diagrama:



X. RESULTADOS

A . Recuperación y enriquecimiento de las cepas a partir del cepario y cultivo en agar TCBS

Previo a este trabajo experimental en el cepario del laboratorio clínico del hospital general regional No. 25 del IMSS, existió una pérdida numerosa de bacterias de *V.cholerae* que formaban parte del mencionado cepario. La bacteria se encontraba en tubos de 13 x 100 con medio BAB guardados en refrigeración a 4°C. Cuando se intentaba la resiembra a partir de estos tubos no se aislaba en el agar TCBS a las colonias características de *V.cholerae* o no existía desarrollo colonial en las placas. La morfología que presentaban las colonias aisladas era de aspecto seco con consistencia áspera y que aglutinaba el suero polivalente del antígeno somático de *V.cholerae* O1.

Debido a lo anterior, se procedió a realizar un enriquecimiento con AP a todos los tubos con crecimiento en medio BAB identificados como "*V.cholerae* O1" y un número que correspondía al registro del laboratorio clínico. Existió una cepa que sólo aparecía identificada con una letra B, por lo que en los resultados de este trabajo se refirió de esta forma.

De un total de 175 tubos que conformaban el cepario de *V.cholerae* del laboratorio sólo se utilizaron 68 de ellos, ya que solo estas presentaban crecimiento característico en la superficie del agar. A éstas se les realizó un enriquecimiento con AP por 24 horas a 37°C, se tomaba una asada de la superficie del caldo con crecimiento, se sembraba por estría de aislamiento una placa de agar TCBS y se incubó ésta en las mismas condiciones de incubación referidas anteriormente. El procedimiento anterior sólo permitió obtener 24 cepas en condiciones de viabilidad. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

No. de cepa Recuperada	Medio de enriquecimiento	Desarrollo en agar TCBS	Período de incubación
4	AP	√	24 hs de incubación
7	AP	√	24 hs de incubación
8	AP	√	24 hs de incubación
10	AP	√	24 hs de incubación
11	AP	√	24 hs de incubación
12	AP	√	24 hs de incubación
14	AP	√	24 hs de incubación
15	AP	√	24 hs de incubación
16	AP	√	24 hs de incubación
17	AP	√	24 hs de incubación
18	AP	√	24 hs de incubación
19	AP	√	24 hs de incubación
20	AP	√	24 hs de incubación
21	AP	√	24 hs de incubación
22	AP	√	24 hs de incubación
23	AP	√	24 hs de incubación
24	AP	√	24 hs de incubación
25	AP	√	24 hs de incubación
27	AP	√	24 hs de incubación
28	AP	√	24 hs de incubación
29	AP	√	24 hs de incubación
43	AP	√	24 hs de incubación
142	AP	√	24 hs de incubación
B	AP	√	24 hs de incubación

√: Las colonias desarrolladas en este medio fueron características para *V.cholerae* (color amarillo, consistencia mucóide, redondas) después de 24 horas de incubación a 37°C.

Tabla No.4 Cepas de *V.cholerae* recuperadas por enriquecimiento con AP y posterior crecimiento en agar TCBS.

A.c. Identificación metabólica de cepas de *V.cholerae* recuperadas

Los datos obtenidos de las pruebas de funcionamiento metabólico fueron comparados con tablas de resultados para identificación de bacterias de importancia clínica ^{18,19}. De acuerdo a lo anterior, se identificó a cada cepa en estudio como *V.cholerae*. Los símbolos de positividad (+) bajo las letras M, I y O indican tal resultado para las pruebas de Movilidad Indol y Omitina, respectivamente. La apariencia de la forma en como se identifican los resultados para *V.cholerae* de las pruebas bioquímicas (MIO, TSI, LIA, Cp y Ca) son los siguientes, considerando que para esta bacteria puede obtenerse un resultado para el tubo de TSI de k/a (fermentación de glucosa positiva, fermentación de sacarosa y lactosa negativa) o a/a (fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa positiva).



Fig. 3



Fig.4

Fig.3 el orden de las pruebas bioquímicas es MIO; TSI, LIA, Caldo arginina y caldo peptonado. Los resultados de ambos juegos indican la identificación metabólica de *V.cholerae* son: MIO (+++), TSI (a/a), LIA (k/N), Ca (-), Cp (+) con positividad de indol para el primer juego (fig.3) Para el segundo juego (fig.4) los resultados son idénticos al primero, con excepción del tubo de TSI (k/a) los cuales identifican también a la bacteria colérica.

No. de cepa	M I O	TSI	LIA	Caldo peptonado	Caldo arginina	Oxidasa	
4	+	+	+	A/A	K/N	+	+
7	+	+	+	A/A	K/N	+	+
8	+	+	+	A/A	K/N	+	+
10	+	+	+	A/A	K/N	+	+
11	+	+	+	A/A	K/N	+	+
12	+	+	+	A/A	K/N	+	+
14	+	+	+	A/A	K/N	+	+
15	+	+	+	A/A	K/N	+	+
16	+	+	+	A/A	K/N	+	+
17	+	+	+	A/A	K/N	+	+
18	+	+	+	A/A	K/N	+	+
19	+	+	+	A/A	K/N	+	+
20	+	+	+	A/A	K/N	+	+
21	+	+	+	A/A	K/N	+	+
22	+	+	+	A/A	K/N	+	+
23	+	+	+	A/A	K/N	+	+
24	+	+	+	A/A	K/N	+	+
25	+	+	+	A/A	K/N	+	+
27	+	+	+	A/A	K/N	+	+
28	+	+	+	A/A	K/N	+	+
29	+	+	+	A/A	K/N	+	+
43	+	+	+	A/A	K/N	+	+
142	+	+	+	A/A	K/N	+	+
B	+	+	+	A/A	K/N	+	+

Tabla No.5 Resultados de pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *V.cholerae*

- Identificación de cepas de *V.cholerae* recuperadas mediante el método comercial Cholera Smart

En la siguiente tabla se indican los resultados obtenidos para las 24 cepas utilizadas en este trabajo; el total de ellas fueron positivas a *V.cholerae* . Esta prueba junto con el crecimiento de las cepas en el agar TCBS con las características de la morfología colonial y sus respectivos resultados de las pruebas bioquímicas apoyaron la identificación de cada una de ellas como *V.cholerae*.

No. de cepa	Resultado de la Prueba
4	+
7	+
8	+
10	+
11	+
12	+
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	+
20	+
21	+
22	+
23	+
24	+
25	+
27	+
28	+
29	+
43	+
142	+
B	+

Tabla No. 6 Resultados de la prueba diagnóstica por el método comercial Cholera Smart. El símbolo (+) indica positividad a *V.cholerae O1*

B. Identificación de serogrupos y serotipos mediante aglutinación con sueros poli y monovalente a *V.cholerae*

Los resultados que se obtuvieron mediante aglutinación inmunológica con los antisueros polivalente a *V.cholerae O1* y monovalentes, indican el grupo y serovar del vibrio colérico identificado en las pruebas anteriores. En la tabla que refiere los resultados de aglutinación, no se indica el serovar Hikojima, debido a que no se obtuvo ningún resultado de positividad de aglutinación de alguna cepa a los dos antisueros Ogawa e Inaba.

No. de cepa	Aglutinación al suero polivalente O1	Aglutinación al suero monovalente Ogawa	Aglutinación al suero monovalente Inaba
4	+	+	-
7	+	+	-
8	+	+	-
10	+	+	-
11	+	+	-
12	+	+	-
14	+	+	-
15	+	+	-
16	+	+	-
17	+	+	-
18	+	+	-
19	+	+	-
20	+	+	-
21	+	+	-
22	+	+	-
23	+	+	-
24	+	+	-
25	+	+	-
27	+	+	-
28	+	+	-
29	+	+	-
43	+	+	-
142	+	+	-
B	+	+	-

Tabla No.7. Resultados de aglutinación de las cepas de *V.cholerae* a los antisueros polivalente O1 y monovalentes Ogawa e Inaba.

C. Identificación de morfotipos rugosos de la bacteria *V.cholerae*

C.a. Identificación de morfotipos rugosos mediante aglutinación con acriflavina

En la siguiente tabla se indican los resultados de aglutinación de cada una de las cepas frente a una solución de colorante de acriflavina al 0.01% para indicar el posible carácter rugoso de la cepa.

Tabla No. 8 Resultados de aglutinación con solución de acriflavina al 0.01%

No. de cepa	Resultado de la prueba de Aglutinación
4	+
7	+
8	+
10	+
11	+
12	+
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	+
20	+
21	+
22	+
23	+
24	+
25	+
27	+
28	+
29	+
43	+
142	+
B	+

C.b. Identificación de morfotipos rugosos mediante aglutinación por vapor fuente

Se realizó la identificación de morfotipo rugoso en las cepas de *V.cholerae* solo a 6 cepas de las 24 comprendidas para este trabajo en virtud de que para el desarrollo de esta técnica, se emplean un gran número de tubos con caldo de enriquecimiento. La cepa identificada como ID2 pertenece al cepario del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E.) de la Secretaría de Salud, y es utilizada como cepa control de rugosidad positiva. A continuación se muestra la apariencia de los tubos con resultado positivo y negativo, posteriormente se indican los resultados obtenidos.

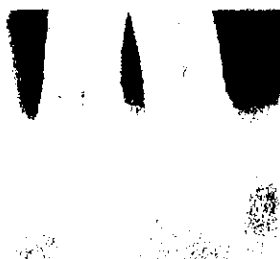


Fig.5 el tubo de la izq. Indica rugosidad negativa, y la de la derecha positiva

No. de cepa	Resultado de la prueba de Aglutinación
7	-
10	-
18	-
24	+
27	+
43	-
ID2	+

Tabla No. 9. Resultados de rugosidad mediante vapor fuente. La cepa ID2 corresponde a la cepa control positivo

D. Características de Laboratorio de los morfotipos rugosos de *V.cholerae*

D.a. Condiciones óptimas de desarrollo óptimo de morfotipos rugosos de *V.cholerae* mediante utilización de caldos de enriquecimiento.

Los datos correspondientes a los resultados de este proceso se indican a continuación (tablas No.10 y 11), indicándose con el símbolo (-) la ausencia de crecimiento y con (+) la presencia de éste en el tubo con su correspondiente caldo de enriquecimiento.

No. de tubo	pH				
	5	6	7	8	9
20	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-
3/2	-	-	-	+	+
B	-	-	-	+	+

Tabla No.10. Resultados de crecimiento de morfotipos rugosos en caldo de enriquecimiento AP a diferentes valores de pH.

No. de tubo	pH				
	5	6	7	8	9
20	-	-	+	+	+
27	-	-	+	+	+
3/2	-	-	+	+	+
B	-	-	+	+	+

Tabla No.11. Resultados de crecimiento de morfotipos rugosos en caldo de enriquecimiento CST a diferentes valores de pH.

D.b. Efecto de Factores Fisicoquimicos en la adaptabilidad del morfotipo rugoso de *V.cholerae*.

- pH

Los resultados de este proceso se presentan en la tabla No.12 de la siguiente forma: la letra n indica crecimiento nulo en el tubo, la letra e indica crecimiento escaso con respecto al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland, las letras ad indican crecimiento adecuado con respecto al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland.

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
Cepa 18	n	e	e	ad	ad	ad	ad	ad

Tabla No. 12 Resultados de crecimiento de la bacteria colérica a diferentes valores de pH

- Temperatura y pH

Los resultados que se presentan en las tres tablas (13-15) corresponden a la cepa No.18 para los tiempos de incubación 24, 48 y 72 horas. Para la interpretación de estos se utilizaron: la letra n indica crecimiento nulo en el tubo, la letra e indica crecimiento escaso con respecto al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland, y finalmente las letras ad indican crecimiento adecuado con respecto al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland.

Temperatura	pH						
	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	9.0
4°C	e	e	e	e	e	e	n
22°C	e	e	e	ad.	ad.	ad.	n
37°C	n	ad.	ad.	ad.	ad.	ad.	n

Tabla No. 13. Resultados correspondientes a efecto del pH y temperatura para la cepa No. 18 a las 24 horas de incubación.

Temperatura	pH						
	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	9.0
4°C	e	e	e	n	n	e	n
22°C	e	e	e	ad.	ad.	ad.	n
37°C	n	ad.	ad.	ad.	ad.	ad.	n

Tabla No. 14. Resultados correspondientes a efecto del pH y temperatura para la cepa No. 18 a las 48 horas de incubación.

Temperatura	pH						
	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	9.0
4°C	n	e	n	n	n	n	n
22°C	e	e	e	ad.	ad.	ad.	n
37°C	n	ad.	e.	ad.	ad.	ad.	e

Tabla No. 15. Resultados correspondientes a efecto del pH y temperatura para la cepa No. 18 a las 72 horas de incubación.

- Cloro

Se presentan los resultados en la tabla No. 16 indicándose las partes por millón (ppm) de la sal de hipoclorito de sodio (NaHClO). Se indica con el símbolo (+) el crecimiento positivo o similar al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland; con el símbolo (-) se indica el crecimiento negativo o nulo con respecto al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland.

ppm de NaHClO	pH					
	5.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
50	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-
6.25	-	+	+	+	+	+
3.125	+	+	+	+	+	+

Tabla No. 16. Resultados del efecto de la acción germicida del hipoclorito de sodio en la bacteria de *V.cholerae* (NaHClO= Hipoclorito de sodio).

- Presencia de NaCl:

Los datos obtenidos de este estudio se indican a continuación. Se indica con el símbolo (+) el crecimiento positivo o similar al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland; con el símbolo (-) se indica el crecimiento negativo o nulo con respecto al tubo No. 1 del nefelómetro de MacFarland.

No. de cepas	1% m/v de NaCl	3% m/v de NaCl	6% m/v de NaCl	10% m/v de NaCl
4	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	+	+	+	-
10	+	+	+	-
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
14	+	+	+	-
15	+	+	-	-
16	+	+	+	-
17	+	+	-	-
18	+	+	-	-
19	+	+	-	-
20	+	+	-	-
21	+	+	-	-
22	+	+	-	+
23	+	+	-	+
24	+	+	+	+
25	+	+	+	-
27	+	+	+	+
28	+	+	+	+
29	+	+	-	-
43	+	+	-	-
142	+	+	-	+
B	+	+	-	+

Tabla No.17 Resultados de efecto del NaCl en la bacteria de *V.cholerae* .

E. Estudio Piloto

Los resultados se presentan después de 48 horas de iniciado al proceso y comprende el primer enriquecimiento y la inhibición microbiana ajena a *V.cholerae*. En la tabla No. 18 se indican los datos obtenidos con respecto al desarrollo del estudio piloto con las bacterias presentes en la materia fecal. Con respecto a la aplicación del método diseñado con bacterias entéricas (*Salmonella* y *Shigella*), los resultados se presentan en la tabla No. 19, y se refiere sólo a las placas de agar MacConkey, ya que para las placas de agar TCBS sólo se recuperaron colonias amarillas.

No. de cepa utilizada	Resultado del proceso de recuperación
18	+
19	+
20	+
21	+
B	+
27	+
28	+
29	+

Tabla No. 18. Resultados obtenidos después de 48 horas de iniciado el proceso de recuperación

Colonias Bacterianas	Recuperación
<i>V.cholerae</i> (colonias negras puntiformes)	+++
Enterobacterias (colonias incoloras puntiformes)	+

Tabla No. 19. Resultados de recuperación de colonias bacterianas de *V.cholerae* y Enterobacterias. Las tres cruces (+++) indican presencia de aproximadamente el 75% de las colonias presentes en la placa de agar MacConkey. Una cruz (+) indica aproximadamente el 25% de recuperación.

XI. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

De acuerdo con el número de cepas recuperadas de *V.cholerae* que se encontraban en refrigeración, se observó que esta bacteria es muy lábil al efecto de la temperatura por lo cual la cantidad de cepas recuperadas fue muy bajo (tabla No.4). Se requirieron realizar procesos de enriquecimiento para lograr recuperar otras cepas, debido a que no produjeron crecimiento en agua peptonada alcalina, el cual es un caldo de enriquecimiento adecuado para bacterias coléricas, ni tampoco desarrollaron colonias amarillas en placas de agar TCBS, que se utiliza como medio selectivo para crecimiento de *V.cholerae*. De esta forma y para cada cepa, se inoculaba una asada del crecimiento presente en el tubo con agua peptonada o caldo de soya tripticaseína en una placa de agar TCBS, para obtener las colonias amarillas características de *V.cholerae*. Sin embargo, hay bacterias que también desarrollan colonias amarillas con una consistencia diferente en este medio por lo que se realizaron pruebas bioquímicas que permitieron la identificación del vibrio colérico con base a su capacidad de fermentar la glucosa, sacarosa y lactosa (medio TSI), movilidad, producción de Indol y descarboxilación de la ornitina (medio MIO), la descarboxilación del aminoácido lisina en anaerobiosis (medio LIA), y la descarboxilación de la arginina en anaerobiosis (caldo arginina). Con excepción de la prueba anterior, el resto de los medios dan una positividad a las descarboxilaciones y fermentaciones (tabla No.5). Sin embargo la producción de Indol no puede observarse en forma adecuada en el tubo con medio MIO, por lo que se realiza una inoculación del vibrio en caldo peptonado para observar la producción de indol. Una vez interpretadas las pruebas bioquímicas se obtuvieron 24 cepas de *V.cholerae*. Además de la identificación mediante las pruebas de comportamiento bioquímico, se utilizó una prueba comercial de identificación del antígeno colérico O para contar con una mayor certeza de identificación del vibrio colérico. Este método comercial que se basa en una reacción antígeno (grupo O del *V.cholerae* O1) anticuerpo (de tipo monoclonal presente en la preparación de este método), y la positividad fue manifiesta para 24 cepas (tabla No. 6). Es importante mencionar que a pesar de la rapidez diagnóstica de esta prueba, y por recomendación de los fabricantes, el resultado definitivo debe apoyarse con la interpretación de pruebas bioquímicas y pruebas de aglutinación con los antisueros polivalente y monovalentes correspondientes. Una vez identificadas bioquímicamente las cepas coléricas, se procedió a realizar la identificación del antígeno O1 que le confiere a la cepa la capacidad de producir la toxina que desencadena el padecimiento diarreico. Para ello se utilizó un antisuero anti-O1 de marca comercial, obteniéndose una positividad para todas las 24 cepas recuperadas del cepario (tabla No.7). A continuación se realizó la determinación del serovar mediante la utilización de antisueros monovalentes Ogawa (con factores antigénicos del grupo O anti-A y anti-B) e Inaba (con factores antigénicos del grupo O anti-A y anti-C). Para esta prueba se obtuvo una positividad en las 24 cepas recuperadas para los factores antigénicos del grupo O anti-A y anti-B, y por tanto el serovar para el total de las cepas fue Ogawa (tabla No.7).

Una vez que se identificaron las cepas de *V.cholerae*, se procedió a conocer si éstas tenían un estado rugoso o liso. Puede realizarse lo anterior mediante una observación macroscópica de las colonias desarrolladas en las placas de agar TCBS, el aspecto de las colonias rugosas es seco, no cremosas como las de tipo liso. Esta característica puede ponerse de mejor manifiesto en placas de Petri con medio base de agar sangre (BAB), o en placas de medio de Muller-Hinton, donde debido a la capacidad este medio de permitir una difusión de partículas, es posible una mejor apreciación de la característica rugosa de la bacteria al desarrollarse en la superficie de este medio. Sin embargo, la observación de las colonias desarrolladas en estos medios no es muy recomendable, debido a que debe considerarse que los morfotipos rugosos de la bacteria colérica no son la totalidad de las bacterias presentes en un caldo de enriquecimiento o en una colonia presente en una placa de Petri. Es por esto que se utilizaron dos métodos de determinación de morfotipos lisos o rugosos. Uno de ellos es la aglutinación con colorante de acriflavina. Los resultados de esta prueba indican que el total de las cepas recuperadas contenía un morfotipo rugoso (tabla No.8), lo cual puede considerarse como un resultado normal debido al estado desfavorable en que se conservaban (la temperatura baja del refrigerador). El inconveniente de esta prueba radica en que debido a la coloración amarilla del reactivo, la apreciación de la aglutinación no es muy adecuada, y es de tipo cualitativo. El otro procedimiento utilizado fue el de aglutinación con vapor fluente. Este método permite un estudio semicuantitativo, debido a que contempla utilizar 5 o 10 cepas para considerar que porcentaje de estas cepas utilizadas es de tipo rugoso, además de que permite una mejor observación de la aglutinación en el fondo de los tubos de 18 x 150 que se utilizan. Sin embargo, se realizó este proceso sólo con 6 cepas y un control positivo de rugosidad debido a la gran carga de tubos con CST que se requieren, y a la poca disponibilidad para utilizar la autoclave requerida (se utiliza en el laboratorio para la esterilización de reactivos, medios de cultivo y equipo para uso del personal que labora en el mismo) encontrándose una positividad para dos cepas en estudio como se indica en la tabla No. 9. Es importante mencionar que estos resultados se deben a que se realizaron previamente a este método, varios enriquecimientos de las cepas recuperadas con CST para realizar el método de recuperación de morfotipos rugosos a partir de muestras de materia fecal, lo que produjo una conversión del estado rugoso a liso en las cepas. Sin embargo se considera que el método de determinación de morfotipos rugosos por vapor fluente es más adecuado debido a que es de tipo semicuantitativo y a que utiliza 5 colonias de una misma cepa presentes en una placa de BAB. El inconveniente de este método es la cantidad de tubos utilizados durante el desarrollo de este, lo que no permite el estudio de un mayor número de cepas. Debe indicarse que no pudo contarse con cepas patrón o control de rugosidad positiva o negativa, debido a que cuando se realizó la búsqueda de estas, en centros de estudio que utilizan bacterias de *V.cholerae*, éstos no contaban con dichos controles o no realizaban pruebas de rugosidad para esta bacteria. Solo en el INDRE contaban con una bacteria colérica utilizada como control positivo, sin embargo solo pudo tenerse acceso a ésta para realizar la prueba de aglutinación por vapor fluente.

Lo que se refiere al estudio de la viabilidad de *V.cholerae* en diversas concentraciones de NaCl en caldo peptonado, se encontró que todas las cepas recuperadas desarrollan crecimiento en el caldo a las concentraciones de 1 y 3% m/v de NaCl, 14 de las 24 cepas utilizadas no se desarrollaron en el caldo a una concentración de la sal de 6%, el resto (10 cepas) lo hizo adecuadamente (la turbidez era semejante al tubo No.1 del nefelómetro). Esto indica que cuando la concentración de NaCl aumenta en el medio, la bacteria colérica no se desarrolla adecuadamente o bien no lo hace; lo cual de acuerdo a lo consultado en la ref.19, *V.cholerae* se desarrolla bien in vitro o in vivo a pequeñas concentraciones de esta sal. Esto se aprecia mejor en la siguiente concentración de NaCl; teniéndose un 10% m/v sólo 9 cepas de 24 utilizadas causaron crecimiento en el tubo con caldo (turbidez) de acuerdo a comparación visual con el tubo No. 1 del Nefelómetro; el resto de las cepas no mostró crecimiento a esta concentración de NaCl (tabla No.17).

Se estudió, así mismo, el comportamiento de la cepa rugosa No. 18 (con resultado positivo en las pruebas de aglutinación con acriflavina y aglutinación por vapor fluente) frente a las variables fisicoquímicas temperatura y pH, y de acuerdo a lo observado en los resultados (tablas 13-15), puede mencionarse que la temperatura de 4°C fue letal para el desarrollo del vibrio, aún en valores de pH alcalino después de 72 horas de conservación en estas condiciones. De acuerdo a los resultados obtenidos, durante las primeras 24 horas, existió un pequeño desarrollo bacteriano en el caldo peptonado que pudo deberse a que durante el tiempo en que se alcanzó un equilibrio entre la temperatura del refrigerador y el caldo peptonado, que dio lugar a presencia de turbidez inferior al del tubo No. 1 de MacFarland. Sin embargo, conforme se transcurrió el tiempo hasta completar las 72 horas, este crecimiento se vio afectado por efecto de la baja temperatura, de manera tal que al final del tiempo por el cual duró este estudio, el caldo no presentó crecimiento, sólo un pequeño sedimento en el fondo del tubo. Finalmente, se tomó una asada de cada uno de estos tubos y se sembró en placas de agar TCBS y no existió desarrollo colonial para ningún valor de pH a la temperatura de estudio (4°C). Lo contrario ocurrió con las siguientes temperaturas de estudio a los mismos valores de pH utilizadas en el parámetro anterior, encontrándose resultados adecuados de crecimiento en valores de pH de 7 a 8.5 a temperaturas ambiente (aproximadamente 25°C) y 37°C (tablas 13-15). A los valores de pH inferiores a 7 utilizados en el estudio, los resultados de crecimiento en el caldo son influenciados por el valor ácido presente en el medio, lo cual se evidencia mejor al final del tiempo utilizado en el estudio (72 horas) ya que para los tubos incubados a 37°C, los valores ácidos del caldo no presenta crecimiento o bien este es nulo. Para el caso de la temperatura ambiente, el crecimiento fue deficiente (inferior al tubo No.1 de MacFarland) y al inocular una asada en el agar TCBS, posterior a su incubación, no existió el desarrollo de colonias en el medio. Puede observarse también que para valores de pH de 9 para las tres temperaturas, no se registró turbidez del caldo, debido a que esta condición de pH fue muy agresiva para la bacteria.

En lo que respecta al método de recuperación diseñado para *Vibrio cholerae* morfotipo rugoso, se pretendió que las condiciones del procesado de la muestra fueran las más similares desde el momento que la misma se recibe en el laboratorio clínico. Por ello se incluyó a la bacteria colérica en una muestra de heces fecales diarreicas, donde el *V.cholerae* se encontraría con otras bacterias entéricas con lo cual el entorno del vibrión se vería alterado y su recuperación in vitro estaría influenciada por su capacidad de adaptarse a ese entorno. De tal forma, se logró la recuperación de las cepas rugosas utilizadas (tabla No. 18), aún en presencia de otras enterobacterias de importancia clínica (tabla No.19) presentes en la muestra (las cuales se agregaron también a la muestra fecal diarreica). Este proceso se repitió por tres veces y brindó el mismo resultado, las cepas utilizadas se recuperaron en las placas de agar TCBS, después de que la materia fecal fué enriquecida con una combinación de CST y caldo GN de Hafna a pH de 9. Los resultados indican que el pH alcalino limitó considerablemente el desarrollo de la enterobacteria presente en la muestra de materia fecal (*E.coli*) y en cambio provocó un enriquecimiento de *V.cholerae*, además de las características de enriquecimiento de los caldos utilizados. Otro de los resultados que se obtuvieron en este método fue la recuperación de formas lisas a partir de sus correspondientes rugosos, lo cual se debió a los dos enriquecimientos incluidos en la metodología y a las repeticiones de ésta. En lo que respecta a la recuperación del vibrio colérico frente a *Salmonella* y *Shigella*, se logró recuperar a *V.cholerae* en mayor proporción, considerando el aspecto de las colonias aisladas en agar MacConkey y la presencia de sólo colonias lisas en agar TCBS, por lo que puede mencionarse que el empleo del método diseñado para aislar al morfotipo rugoso tuvo una aceptable recuperación de *V.cholerae* rugoso y una adecuada limitación de otras especies bacterianas presentes junto con el vibrio.

XII. CONCLUSIONES

- Se determinó la forma en como influyen los factores fisicoquímicos temperatura, pH, presencia de NaCl y efecto bactericida del hipoclorito de sodio en la viabilidad de ***V.cholerae***.
- Por medio del método diseñado, fue posible obtener tanto a los morfotipos rugosos y lisos de la bacteria de ***V.cholerae***.
- Se realizó este trabajo sin contar con controles positivos y negativos de rugosidad debido a que no existe una prueba específica que determine morfotipos rugosos o lisos en ***V.cholerae***.
- Se considera que el morfotipo de las cepas de ***V.cholerae O1*** que eliminan los pacientes afectados son de tipo liso, debido a que al aislarlas en el laboratorio éstas poseen las colonias amarillas en el agar TCBS.

XIII. RECOMENDACIONES

Debe tenerse en cuenta que las cepas de *V.cholerae* deben conservarse en condiciones que garanticen la inalterabilidad en sus características fenotípicas manifiestas en las condiciones de trabajo del laboratorio, de tal suerte se debe mantener a la bacteria el menor tiempo posible en las placas de agar TCBS. Una vez que se hayan obtenido las colonias características del *V.cholerae*, realizar las pruebas de identificación y funcionamiento metabólico lo más pronto posible y sembrar a la vez un tubo de 13 x 100 con medio base de agar sangre en pico de flauta; con el crecimiento obtenido en las pruebas mencionadas anteriormente, se realiza su identificación de serovar y prueba de oxidasa, y finalmente, si los resultados indican la identificación de *V.cholerae*, debe colocarse una película de papel parafilm en el borde del tubo y el tapón, para evitar al máximo una posible contaminación. Finalmente se conservarán las cepas en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Deben realizarse las pruebas de identificación y funcionamiento metabólico con colonias jóvenes, con no más de 24 horas de desarrollo e incubación, así como evitar el conservar en refrigeración a las placas con colonias bacterianas.

También es recomendable que cada laboratorio dedicado a estudios de diagnóstico de bacteriología entérica, realice pruebas de aglutinación con colorante de acriflavina para registrar la posible presencia de colonias de tipo rugoso, y que con lo anterior se evalúe la frecuencia de la presencia de aislamiento de este tipo de morfotipos.

XIV. ANEXO

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

- Agua Peptonada

1. Se añadieron 15 g de la peptona de caseína a 1 litro de agua destilada.
2. Se mezcló bien.
3. Se dividió el medio preparado en 4 partes (250 mL cada una)
4. A cada parte dividida se fijó un valor de pH (desde 6 a 9) por medio de adición de solución de ácido clorhídrico al 10% y/o por adición de solución de hidróxido de sodio 1 M, a fin de obtener los siguientes resultados:

250 mL de Agua Peptonada con valor de pH de 6

250 mL de Agua Peptonada con valor de pH de 7

250 mL de Agua Peptonada con valor de pH de 8

250 mL de Agua Peptonada con valor de pH de 9

5. Se realizó la distribución de cada parte en tubos con tapa de rosca de baquelita de 18 x 150 (3 mL en cada tubo).
6. Se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

- Caldo Soya Trypticaseína (CST)

1. Se realizó una suspensión con 30 g de caldo soya tripticaseína en 1 L de agua destilada
2. Se mezcló bien.
3. Se dividió el medio preparado en 4 partes (250 mL cada una)
4. A cada parte dividida se fijó un valor de pH (desde 6 a 9) por medio de adición de solución de ácido clorhídrico al 10% y/o por adición de solución de hidróxido de sodio 1 M, a fin de obtener los siguientes resultados:

250 mL de Caldo Soya Trypticaseína con valor de pH de 6

250 mL de Caldo Soya Trypticaseína con valor de pH de 7

250 mL de Caldo Soya Trypticaseína con valor de pH de 8

250 mL de Caldo Soya Trypticaseína con valor de pH de 9

5. Se distribuyó cada parte en tubos con tapa de rosca de baquelita de 18 x 150 (3 mL en cada tubo).
6. Se esterilizó a 121°C 15 libras de presión de vapor por 15 minutos.

- Caldo de Enriquecimiento GN (Merck)

1. Se disolvieron 39 g del caldo de enriquecimiento GN en 1 L de agua recién destilada
2. Se distribuyó en tubos con tapa de rosca de baquelita de 18 x 150 (3 mL en cada tubo)
3. Se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

- Caldo de Enriquecimiento CST + caldo de enriquecimiento GN

1. Se prepararon ambos medios hasta el paso previo a la esterilización.
2. Se realizó la dosificación en tubos de 18 x 150 con tapa de rosca de baquelita para ambos medios de la siguiente manera:

Para cada tubo

1.5 mL de CST con valor de pH de 7 + 1.5 mL de GN con valor de pH de 7

3. Se realizó el mismo procedimiento para valores de pH de 8 y 9 ajustando el pH de la solución final con solución de NaOH 1 M.
4. Se esterilizó a 121°C 15 libras de presión de vapor por 15 minutos.

- Solución de Acriflavina al 0.01%

1. Se pesaron 0.1 g de colorante de acriflavina
2. Se disolvieron en 10 mL de agua desionizada
3. Se conservó en un recipiente ámbar

XV. REFERENCIAS

1. Mims CA, Playfair J, Roitt M. Microbiología médica. España: Mosby/ Doyma Libros, 1995: 18.8-18.12, 25.8-25.10.
2. Pumarola A, Rodríguez T, García R, Piedrola A. Microbiología y parasitología médica. 2a ed. Barcelona: Salvat, 1987: 413-418, 456-460.
3. Tanja P, Fields P, Olsvic O, Wells J. Molecular subtypic of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh 1992-1993. JID 1995; 171:122-127
4. Waldor M, Mekalanos J. Emergence of a new cholera pandemic: molecular análisis of virulence in *Vibrio cholerae* O139 and development of a live vaccine prototype. JID 1994; 170: 278-283.
5. Rodríguez S E, Ruiz R A, Pineda R M, Murgía M P, Valtierra R A. Manual para vigilancia epidemiológica del cólera. México. Coordinación de Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología, 1999: 9-48.
6. Barroto R.J. La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 en ambientes acuáticos. Rev. Panam. Salud Pública 1997;1: 3-8.
7. Colwell I R, Huq A. Vibrios in the environment: viable but non culturable *Vibrio cholerae*. Am Soc Microbiol 1994: 117-133
8. Miller C, Drasar B, Feachem R., Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physicochemical stresses in aquatic environmente. J Hyg 1984; 93: 475-495.
9. Singleton F, Atwell R, Jangi S, Colwell R. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. App Env Microbiol 1982; 44: 1047-1058.
10. Corry J L Media for *Vibrio* species. quality assurance and quality control of microbiological culture media. Proceedings of the simposium Hela on 6th and 7th september in Calias de Mallorca. 1979.
11. Morris G, Sztein M, Rice E W, Nataro J, Losonsky G. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. JID 1996; 174: 1364-1368.
12. Miller C, Drasar B, Feachem R, Hayes R. The impact of physicochemical stress on the toxigenicity of *Vibrio cholerae*. J Hyg 1986: 49-57.
13. Mirelle T. Una proteína para proteger la célula. Mundo Científico 1997; 4: 432-434.
14. Morange M, Bensuade M. Para qué sirven las proteínas de choque térmico. Mundo Científico 1997; 5: 336-337.
15. Shah M, Mekalanos J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1301-1311.

16. Salyers A, Bacterial patogénesis a molecular approach. Wasington: Asm-Press, 1994: 141-156
17. Power D, McCuen P. Manual of BBL products and laboratory procedures. 6a ed. Estados Unidos: Beckton Dickinson Microbiology Sitems, 1988: 180, 181, 189, 200, 201, 256, 269, 274-276.
18. Giono S, Escobar A, Valdespino J, Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: INDRE 1994: 309-345.
19. Brock TD, Madigan MT, Microbiología. 6a ed. México: Prentice Hall Hispanoamericana, 1993: 276, 424, 427-429, 432, 435-437, 484, 515, 518, 520, 558, 582, 593-596, 821.
20. Gennaro A, Hart A, James J, Stander J, Weiss L. Diccionario enciclopédico de las ciencias médicas. 4a. ed. Nueva York: McGraw Hill, 1985: 301, 401, 402, 487, 1024.
21. Giono S, Gutiérrez L, Valdespino L, Rodríguez G. Caracterización fenotípica y genotípica de *Vibrio cholerae* O1. Rev Lat Amer Microbiol. 1994; 36: 243-251.
22. Giono S, Gutiérrez L, Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. México: INDRE 1991: 2-47.
23. Gunhild J, Svennerholm A, Holmgren. *Vibrio cholerae* expresses cellsurface antigens during intestinal infection which are not expresed during in vitro culture. Infect Immun, 1989; 57: 1809-1815.
24. Lezama-Basulto L, Mota-Hernández F. Cólera en Pediatría. Biol Med Hosp Infant Mex, 1993; 50: 671-676.
25. Lynch MJ, Mellor L, Spare P., Inwood M. Métodos de laboratorio. 2a ed. Barcelona: Editorial Interamericana, 1977: 925, 1249, 1250.
26. Secretana de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA2-1994 para la vigilancia, control, manejo y tratamiento del cólera. Diario Oficial de la Federación. 3 abril 1995. 72-82
27. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín de Epidemiología. diciembre de 1999 a enero del 2000