

24139



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" Z A R A G O Z A "**

IMPRESA EN MÉXICO
DISEÑO Y MAQUETADO EN ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

**PRODUCCION DE UN ANTISUERO POLIVALENTE
PARA IDENTIFICAR A VIBRIO CHOLERAEE 0:1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ELIZABETH RIVERA GONZALEZ

México, D. F.

Diciembre, 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Capítulo I.	
Introducción.	1
Capítulo II.	
Generalidades.	
II.1 Etiología de las enfermedades diarreicas.	3
II.2 Epidemiología.	6
II.3 Clasificación del género vibrio.	10
II.4 Antígenos.	18
Capítulo III.	
III.1 Objetivos.	21
III.2 Hipótesis.	22
Capítulo IV.	
IV.1 Material biológico.	23
IV.2 Aparatos.	24
IV.3 Reactivos y material en general.	25
Capítulo V.	
V.1 Cultivos.	27
V.2 Preparación de antígenos.	28
V.3 Programa de vacunación.	37
V.4 Evaluación.	45
V.5 Envase del suero.	47

Capítulo VI.

Resultados. 50

Capítulo VII.

VII.1 Discusión de resultados. 58

VII.2 Conclusiones. 61

Capítulo VIII.

Bibliografía 64

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

Las enfermedades infecciosas han constituido, sin duda alguna, uno de los principales azotes para la humanidad. Su impacto social ha sido mayor de lo que pueda indicar su importancia numérica entre las causas de muerte, lo cual es debido a que muchas de las enfermedades infecciosas causan la muerte tanto de jóvenes como de los individuos de edad avanzada. Estas enfermedades por su carácter epidémico, han desorganizado y aterrorizado con frecuencia comunidades enteras. El descubrimiento de las causas originarias de las enfermedades infecciosas y el desarrollo de métodos adecuados para su control se incluyen entre los logros más importantes de la ciencia médica (24).

La identificación de los agentes causantes de varias enfermedades infecciosas condujo al uso de algunos métodos para su control:

1ª. Los países técnicamente más avanzados han alcanzado un nivel tan elevado en todos los aspectos sanitarios, que los han conducido a una gran reducción en la frecuencia de ciertas enfermedades, y a veces, incluso a su erradicación, particularmente en lo referente a las enfermedades cuyo contagio se hace por medio del agua o los alimentos (por ejemplo, tifoidea o cólera) o por medio de los insectos (por ejemplo,

fiebre amarilla o tífus). Sin embargo, aún es esencial el -- conocimiento de estas enfermedades para el médico puesto que pueden ser introducidas por viajeros.

2ª. Las vacunaciones han reducido enormemente la frecuencia de ciertas enfermedades epidémicas graves (por ejemplo. vi-- ruela, difteria, poliomielitis, tosferina), han sido muy --- útiles para disminuir el índice de enfermedades que se trasmiten por gotitas de saliva (tos o estornudo), puesto que -- este medio de transporte es muy difícil de controlar. No --- obstante, la vacunación es ineficaz o bien no es factible -- para muchos organismos.

3ª. El desarrollo de una quimioterapia antibacteriana eficaz han reducido considerablemente la gravedad de muchas enferme dades infecciosas y ha disminuido la frecuencia de algunas - de ellas (25).

II.1 ETIOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES DIARREICAS.

La etiología de las enfermedades del tracto digestivo es muy amplia, y el síntoma común suele manifestarse en diarrea.

La diarrea es causada por un gran número de agentes genéricamente agrupados en: bacterias, virus, parásitos, agentes químicos. En ocasiones este síntoma ocurre como consecuencia de alteraciones orgánicas y fisiológicas del tubo digestivo y sus anexos, o bien es debido a anomalías inmunológicas o a ciertas características psicológicas inherentes al huésped (19).

Existen 3 mecanismos básicos en la producción de diarrea:

- A) Disminución en la absorción.
- B) Secresión aumentada.
- C) Exudación.

A) Disminución en la absorción.- Se produce vía tres mecanismos diferentes: diarrea osmótica, diarrea por aumento en la movilidad, y mala absorción específica.

1) La diarrea osmótica resulta de ingesta de solutos pobremente absorbibles tales como carbohidratos o iones divalentes (Mg , SO_4) o bien de nutrientes mal digeridos.

2) La diarrea por aumento en la movilidad la cual también

puede ser secundaria a tres diferentes mecanismos: a) Aumento en el tránsito intestinal, b) Disminución en la peristalsis y c) Vaciamiento colónico prematuro.

a) En el caso de aumento en el tránsito intestinal, se observa una disminución del contacto de la mucosa y el contenido luminal, con la consecuente mala absorción.

b) Con la disminución en la peristalsis, se condiciona -- estasis y se favorece la sobrepoblación bacteriana y estas -- últimas lesionando las microvellosidades o dañando la mucosa.

c) El vaciamiento colónico prematuro, se produce por anormalidad del contenido o por irritabilidad colónica, con la -- consecuente disminución en el contacto del líquido luminal -- y la mucosa, y por lo tanto disminución en la absorción.

3) Mala absorción específica, como en el caso de la clo-- rhidrorrea congénita, entidad en donde el paciente es incapaz de absorber cloro activamente, lo que da como resultado disminución en la acidificación, disminución en la absorción de líquidos y aumento en la concentración de cloro, por lo que los pacientes cursan con alcalosis metabólica y diarrea crónica.

B) Secresión aumentada.- La diarrea secretora resulta de una variedad de circunstancias; el mecanismo incluye un agente estimulador, que puede ser toxinas bacterianas, hormonas,

o bien otros agentes como ácidos biliares y laxantes.

A nivel celular existen receptores que se encuentran ligados a complejos enzimáticos (adenilciclasa) que producen un incremento en los niveles de AMP o GMP cíclicos o de calcio intracelular que constituyen los segundos mensajeros que --- actúan mediante dos mecanismos: aumentando o disminuyendo la absorción.

C) Mecanismo exudativo.- La inflamación y la ulceración de la mucosa tiene como consecuencia la pérdida de proteínas, sangre, detritus celulares y moco hacia la luz del intestino.

Este mecanismo es el implicado en procesos infecciosos -- como los causados por enterobacterias invasivas, protozoarios y virus, aunque estos últimos es menor cuantía.

II.2 EPIDEMIOLOGIA.

Aún en la actualidad las diarreas siguen ocupando un lugar preponderante como causa de enfermedad y muerte entre lactantes y niños de corta edad, sobre todo en países en vías de desarrollo. Los trastornos diarreicos, están sujetos a factores tales como el nivel socioeconómico de la población el disponer de agua potable, deshechar de modo adecuado las aguas residuales y disponer de alimentos balanceados (23).

Una de las enfermedades, entre muchas, es el cólera que es exclusiva del ser humano y que causa diarrea, la cual puede ser severa, ya que un paciente puede perder hasta 30 litros de agua en las deyecciones en un día. El ser humano y sus abastecimientos de agua contaminados son los principales reservorios de infección. El cólera es una enfermedad muy antigua, conocida desde hace miles de años, ha sido endémica en Asia por siglos enteros y su mayor frecuencia se registra en los bordes de los ríos Ganges y Brahmaputra en el oriente de la India y Bangladesh.

Durante el siglo XIX ocurrieron varias epidemias de cólera en el mundo occidental; cada una cobró un elevado tributo de vidas humanas.

A fines del siglo XIX y principios de XX, se originó una serie de 6 pandemias con focos de infección endémica que aso

larón áreas tales como Asia, Europa, Africa y América. De 1923 a 1960 se produjeron epidemias temporales dentro de la India y Bangladesh con extensiones ocasionales a los países cercanos.

En 1961, el Biotipo El Tor se vió implicado en la séptima pandemia, este desde 1937 se ha identificado también como agente etiológico del cólera, se propagó a todos los países del sureste de Asia en 1961 y 1962; en Malasia de 1963 a 1969, y casi reemplazó al biotipo Clásico. Más tarde invadió Africa, Europa y sur de Rusia, y en menor extensión Canadá y Australia. Se han presentado casos esporádicos de cólera en áreas no endémicas, debido al paso de viajeros. Aunque el cólera no se había presentado en forma significativa en el mundo occidental desde 1900, la reaparición de una pandemia en Filipinas en 1958 y su diseminación subsecuente a través del medio oriente y Asia durante los años que siguieron fueron un recordatorio de que la enfermedad todavía está presente.

Es de notar que el V. cholerae Clásico no ha intervenido en las infecciones posteriores a 1961, pues el biotipo El Tor se ha identificado como el agente causal en todos los países invadidos durante la séptima pandemia. Esta variante causa enfermedad idéntica a la producida por el vibrión Clásico, pero hay marcadas diferencias epidemiológicas. En comparación con el biotipo Clásico, el biotipo El Tor prolifera rápida-

mente, es más resistente a las condiciones ambientales y --- produce mayor número de casos, de portadores, y como conse-- cuencia nuevos focos de infección (11,29).

Durante las migraciones humanas masivas como resultado de la guerra Indopasquistaní de 1971, ocurrierón miles de muertes por cólera. En 1973 se presentó un brote epidemico en Italia y otro en Portugal. En Agosto de 1973, se registro en Texas, Estados unidos, un caso aislado: un hombre que no habfa ---- hecho viajes fuera de aquél país y no habfa tenido contacto con gente que hubiera viajado (20).

En Agosto y Septiembre de 1978 se registraron 11 casos de cólera entre los residentes de la costa de Louisiana. La --- mayoría de los casos estuvieron relacionados con la ingesta de cangrejos cocidos al vapor. En estos casos se aislo Vibro cholerae, biotipo El Tor, seretipo Inaba (10).

El agua es el medio de transporte más frecuente de los -- vibriones fuera del cuerpo humano. El tipo de provisión de - agua (como los pozos), la velocidad de los rios y la calidad de la misma, especialmente su acidez o alcalinidad, se consi-- deran elementos de gran importancia para explicar el movi--- miento y la distribución del cólera en diferentes áreas geo-- gráficas. Los desiertos y las zonas pobres en agua se soslayan en gran parte durante las migraciones del cólera. La influen-- cia de las estaciones indica que el frio, la nieve y la es--

carcha son factores inhibitorios de la enfermedad (28,29).

II.3 CLASIFICACION DEL GENERO VIBRIO.

El genero Vibrio es un grupo amplio de microorganismos -- que abundan en el medio ambiente, especialmente en aguas --- superficiales y marinas; las especies reconocidas en la actualidad se mencionan en la tabla 1. El género Vibrio se clasifica dentro de la familia Vibrionaceae (Tabla II) junto con otros tres géneros: Photobacterium, Aeromonas y Plesiomonas.

Vibrio cholerae es un bacilo gram negativo ligeramente -- curvo y enrollado; mide 1.5 - 3 micras de longitud por 0.4-0.6 micras de ancho. Puede presentarse aislado o en cadenas con aspecto de espirales cortas en forma de "S" (dos celulas)

Los vibriones tienen movilidad activa mediante un solo -- flagelo polar más corto que los fagelos de la mayor parte de las bacterias; no tiene cápsula ni forma esporas.

Actualmente se conocen dos grupos de Vibrio cholerae: --- serogrupo O:1 y No O:1 (18).

Vibrio cholerae O:1 se ha aislado de casos de cólera, en el cual se produce diarrea severa por la acción de la enterotoxina colérica que estimula a la adenilato ciclasa en las - células del epitelio intestinal. Vibrio cholerae No O:1 puede causar una enfermedad parecida al cólera pero que se caracte - riza por producir un rango mayor de enfermedades, incluyendo -

TABLA I. Clasificación del genero Vibrio y algunos organismos relacionados.

Especies de Vibrio encontradas en muestras clínicas humanas.

<u>V. alginolyticus.</u>	<u>V. hollisae.</u>
<u>V. cholerae.</u>	<u>V. metschnikovii.</u>
<u>V. damsela.</u>	<u>V. mimicus.</u>
<u>V. fluvialis.</u>	<u>V. parahaemolyticus.</u>
<u>V. furnissii.</u>	<u>V. vulnificus.</u>

Especies de Vibrio y Photobacterium las cuales no se encuentran en muestras clínicas humanas.

<u>V. aestuarianus.</u>	<u>V. natriegens.</u>	<u>P. angustum.</u>
<u>V. anguillarum.</u>	<u>V. nereis.</u>	<u>P. leionathi.</u>
<u>V. campbellii.</u>	<u>V. nigripulchritudo.</u>	<u>P. phosphoreum.</u>
<u>V. costicola.</u>	<u>V. ordalli.</u>	
<u>V. diazotrophicus.</u>	<u>V. orientalis.</u>	
<u>V. fisheri.</u>	<u>V. pelagius.</u>	
<u>V. gazogenes.</u>	<u>V. proteolyticus.</u>	
<u>V. harveyi.</u>	<u>V. splendidus.</u>	
<u>V. logei.</u>	<u>V. tubiashii.</u>	

TABLA II. Propiedades de los cuatro géneros de la familia --
Vibrionaceae.

	<u>Propiedad del género.</u>			
	<u>Vibrio</u>	<u>Photobacterium</u>	<u>Aero-</u> <u>monas</u>	<u>Plesio</u> <u>monas.</u>
Contenido				
guanina - citosina de DNA (mol %)	38-51	40-44	57-63	51
Asociado con infec ciones humanas.	+	-	+	+
Requerimiento de -- sodio para crecer (o estimular su -- crecimiento).	+	+	-	-
Lipasa.	+	V	+	-
Fermentación de D-Manitol.	+	-	+	-
Flajelo polar.	+	-	-	-

infecciones extraintestinales tales como en heridas e infecciones del oído, la sangre y el SNC (2,6).

Cuando los vibriones han sido ingeridos y sobreviven al pH ácido del estómago pasan al intestino delgado multiplicándose rápidamente, con la consiguiente autólisis y disolución de las células, liberándose la enterotoxina (24).

La enterotoxina (peso molecular de 84,000) está compuesta por una subunidad A1 (peso molecular 7,000), una subunidad A2 (peso molecular 7,000), y cinco subunidades B (cada una con un peso molecular de 10,000). La subunidad B de la toxina del cólera se une al receptor específico, gangliósido G1, que se encuentra sobre la membrana celular del tejido del huésped. La subunidad A1 de la toxina del cólera activa entonces a la enzima adenilato ciclasa en las células, la cual incrementa el nivel de AMP cíclico y la hipersecreción de electrolitos y agua. El resultado neto es la aparición repentina de hiperemesis (abundantes vómitos) y una excreción masiva de heces acuosas en las que hay flóculos blanquecinos semejantes a granos de arroz. Se produce hipotermia y deshidratación (típica del cólera) que es causa frecuente de muerte (7).

El examen bioquímico de las heces excretadas en el cólera ha demostrado que la aparición líquida se parece al plasma, pero no tiene proteínas, es un trasudado en el que la mucosa

intestinal actúa como membrana semipermeable.

La composición de la porción líquida es de aproximadamente 135 mEq de sodio, 15 mEq de potasio, 105 mEq de cloruros y 45 mEq de bicarbonato por litro, en adultos. En niños la composición de electrolitos durante la diarrea es diferente y contiene un promedio de 100 mEq de sodio, 25 mEq de potasio, 75 mEq de cloruros y 32 mEq de bicarbonato por litro. Estas diferencias se deben a que los niños no responden como los adultos, ellos tienen frecuentemente fiebre, convulsiones generalizadas y edema pulmonar (29).

Las colonias de V. cholerae en agar TCBS (agar tiosulfato citrato, sales biliares) son frecuentemente grandes (1.0 - 1.5 mm de diámetro), enteras y translúcidas; V. parahaemolyticus forma colonias de 0.5 - 2.0 mm de diámetro, son verde azuladas, enteras y translúcidas. En agar HIA (agar infusión de corazón), V. cholerae forma colonias blanquizas, enteras y translúcidas. (foto 0). (9,14).

La identificación de Vibrio cholerae puede hacerse en base a las pruebas bioquímicas de laboratorio (Tabla 3).

TABLA 3.- Diferenciación de *Vibrio* y miembros de otros generos

Género, especie o familia.	Indofenol oxidasa.	O-F (glucosa)	.Descarbo .			.Movi .	.Malo- lidad.nato
			.xilación de	.L	.A		
<u>V. cholerae</u>	+	F	+	-	+	+	-/+
Especies de vibrio	+	F	+	-	+	+	-/+
<u>A. hydrophila.</u>	+	F	-	+	-	+(-)	-
Enterobacteriaceae.	-	F	d	d	d	+/-	d
pseudomonas.	-	F	(NC	NC	NC)	+(-)	+(-)

d = reacción variable.

NC= no hay cambio.

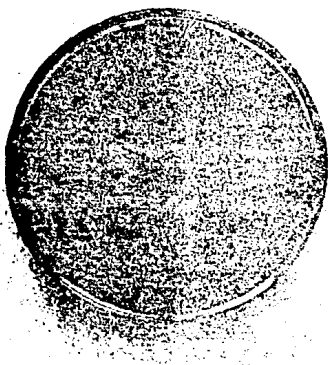


Foto 0.- Colonias verde azuladas de *Vibrio parahaemolyticus*
en agar TBCS (tiosulfato citrato sales biliares) -
despues de 24 horas a 37° C.

Utiliza la fermentación de la sacarosa produciendo una --
 reacción (K/A) en KIA; la sacarosa también es fermentada ---
 produciendo una reacción (A/A) en TSI y (K/K) o (K/N) en LIA.

Vibrio cholerae incluye los serogrupos Ogawa, Inaba o ---
 Hikojima; incluye los biotipos Clásicos y El Tor. Dentro de
 cada biotipo, las cepas de vibriones pueden diferenciarse --
 por las pruebas enumeradas en la Tabla 4. (18).

TABLA 4.- Diferenciación de los biogrupos Clásico y El Tor de
 V. cholerae 0:1

P R U E B A	BIOGRUPO	
	Clásico	El Tor
Sensibilidad a la polimixina B. (5001)	+	-
Sensibilidad a bacteriografo IV.	+	-
Aglutinación de eritrocitos de pollo.	-	+
Prueba de Voges- Preskauer.	-	+
Hemólisis de eritrocitos.	-	+

II.4 ANTIGENOS.

Pero para conocer con certeza al verdadero Vibrio cholerae organismo causante del cólera pandémico, se requiere reconocer el antígeno somático O:1 por aglutinación con antisuero específico O:1, siendo este uno de los criterios de mayor -- validez para su identificación.

V. cholerae posee dos tipos de antígenos: somático (O) y flagelar (H). El antígeno específico es el somático O, el cual se compone de tres fracciones que son: A, B, C las cuales dan lugar a los tres serotipos que conocemos como: Ogawa (AB), -- Inaba (AC) e Hikojima (ABC).

Los antígenos O somáticos termoestables están compuestos de complejos de fosfolípido-polisacárido. El análisis de los antígenos O generalmente revelan polisacáridos (60%), lípidos (20 a 30%) y hexosamina (3.5 a 4.5%). Es la naturaleza de los grupos terminales y el orden en el cual ellos se encuentran en las unidades respectivas de la cadena de polisacárido que confiere especificidad a las numerosas especies de antígenos O. Estos antígenos son resistentes al alcohol y ácido diluido por lo que provoca la desnaturalización de los flagelos: los antígenos somáticos O de ls superficies de los bacilos adyacentes pueden unirse por los anticuerpos anti-O. La aglutinación resultante determina la formación de conglomerados granulares pequeños y difícilmente desociables por agitación.

Los antígenos H flagelares termolábiles se encuentran --- en los flagelos de la bacteria. Son de naturaleza proteica y se componen de flagelinas. El aminoácido contenido y el orden en el cual estos se encuentran en las flagelinas determina la especificidad de los antígenos H flagelares.

En la aglutinación flagelar se forma un precipitado, dando lugar a elementos grandes, algodonosos y fácilmente disociables por agitación.

Actualmente se han realizado esquemas de tipificación serológica por laboratorios de referencia, tanto para Vibrio cholerae 0:1, Vibrios no coléricos, Vibrio parahaemolyticus, así como otras especies de vibrios, incluso Aeromonas y Plesiomonas. Uno de estos esquemas es el descrito por Sakazaki y Shimaida, donde el antígeno 0 se determina por aglutinación y que comprende el reconocimiento de más de 60 antígenos. En el esquema descrito por Smith el antígeno 0 se determina por aglutinación en placa con cultivos vivos, se reconocen más de 72 antígenos diferentes en él (4). La serotipificación de Vibrios no coléricos se hace únicamente como en el caso de Vibrio parahaemolyticus.

Desgraciadamente en nuestro país este tipo de investigación es limitada debido a la poca accesibilidad y al alto costo de los antiseros importados. Es necesario el -----

desarrollo de la tecnología en el área de producción de antiu sueros, con el objeto de disminuir la dependencia y aumentar el número de estudios que nos ayuden al conocimiento de la - epidemiología de enfermedades que son verdaderos problemas - de salud pública.

CAPITULO III.

III.1 OBJETIVOS.

- 1.- Obtener las cepas de referencia del Centro para el control de las enfermedades (CDC); de Atlanta, Georgia.

V. cholerae subgrupo O-Ogawa.

V. cholerae subgrupo O-Inaba.

- 2.- Preparar los antígenos para inmunización a partir de ---
V. cholerae (Ogawa) y V. cholerae (Inaba)
- 3.- Obtener un antisuero polivalente para la identificación de V. cholerae 0:1
- 4.- Evaluar el antisuero obtenido por la prueba de aglutinación en placa, con cepas vivas de referencia tanto de --
vibrios coléricos como de vibrios no coléricos.

III.2 HIPOTESIS DEL TRABAJO.

Si un conejo se inmuniza con antígeno elaborado a partir de Vibrio cholerae 0:I y que tiene cantidades equivalentes - de los serogrupos Ogawa e Inaba, se obtendrá un antisuero -- polivalente para la identificación de Vibrio cholerae sero-- grupo 0:I:

CAPITULO IV.

IV.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

4 conejos blancos Nueva Zelanda de 3 Kg de peso.

Sueros de referencia del CDC, de Vibrio cholerae O:I serogrupo Ogawa e Inaba.

Cepas de referencia del CDC, de Vibrio cholerae O:I serogrupo Ogawa e Inaba.

Cepas de referencia de los Laboratorios Nacionales de la SSA:

V. anguillarum.

V. costicola.

V. alginolyticus.

V. mimicus.

V. parahaemolyticus. O:4

V. parahaemolyticus. O:5

V. parahaemolyticus. O:11

IV.2 APARATOS.

Balanza analítica (Hoffman-Pinther; modelo H80).

Microscopio (Rossbach; modelo sin asignación).

Centrifuga (Solbat; modelo BM).

Autoclave.

Super - Mixer; marca: Curtin Scientific CO. (115 volts) (50/60 CY).

Shaker - Bath; marca: Lab - Line

IV.3. REACTIVOS Y MATERIAL EN GENERAL.

Agar bacteriológico; Bioxon.

Agar infusión corazón; DIFCO.

Caldo infusión corazón; DIFCO.

Peptona de carne; BIOXON.

Base agar sangre; Merck.

Agar tiosulfato citrato sacarosa sales biliares; Becton ---
Dickinson and Company.

Cloruro de sodio. Análisis; Merck.

Acetona. Reactivo; Sigma de México, S.A.

Cloroformo. Reactivo; Sigma de México, S.A.

Hidróxido de sodio. Análisis; Baker Analyzed.

Etanol. Análisis; Baker analyzed.

Acriflavina. Reactivo; Sigma de México, S.A.

Glicerina. Reactivo; Sigma de México, S.A.

Benzal; Gasa, S.A. de C.V.

Reactivos para la tinción de Gram.

Azida de sodio. Reactivo; Si-ma de México, S.A.

Pipetas pasteur.

Bulbos para pipetas pasteur.

Placas de aglutinación.

Asas bacteriológicas.

Pipetas graduadas de: 1 ml, 5 ml, 10 ml.

Vasos de precipitado de: 100 ml, 250 ml, 500 ml.

Probetas de: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

Matraces Erlenmeyer de: 500 ml, 1000 ml.

Jeringas de: 1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml.

Agujas del 18 para sangría.

Tubos de ensaye de 13 X 100.

Tubos de polipropileno de 50 ml fondo cónico para centrifuga.

Morteros de pistilo.

Cajas petri de 88 mm X 15 mm.

Portaobjetos.

Viales tipo antibiótico transparentes de 5 ml de capacidad.

Tapones de hule para viales de 5 ml.

Retapas de aluminio.

Engargoladora.

Etiquetas autoadheribles.

Cajas de cartón para viales de 5 ml.

Tripié / tela de asbesto.

Mechero Bosen.

Mechero Fisher.

Gradillas.

Termómetro (-10°C a 110°C).

Caja para inmunizar conejos.

Tabla para sangría.

CAPITULO V.

METODOLOGIA.

Preparación de un antisuero polivalente de V. cholerae --
0:I.

V.1 CULTIVOS.

Las cepas de referencia de V. cholerae 0:I serogrupo ----
Ogawa e Inaba que se recibieron del CDC se hallaban conserva
das en tubos con agar inclinado.

- 1.- Mantener los cultivos de referencia en sangre de carnero -
desfibrinada y esteril a -60°C.
- 2.- Inocular dos tubos de agar infusión corazón (HIA) con las
cepas de referencia de V. cholerae serogrupo Ogawa e ---
Inaba respectivamente.
- 3.- Incubar a 37°C por 24 horas.
- 4.- Suspender el crecimiento en 0.5 ml de agua peptonada.
- 5.- Vaciar en dos tubos estériles de 6 mm X 150 mm.
- 6.- Adicionar 1 ml de sangre de carnero a cada uno de los --
tubos y homogenizar.
- 7.- Guardar los cultivos en el congelador a una temperatura -
de -60°C.

V. 2 PREPARACION DE ANTIGENOS.

Para preparar los antígenos se deben de seleccionar colonias lisas las cuales no deben de autoaglutinar con solución salina al 0.85%, ni con acriflavina, y aglutinar 4⁺ con el suero de referencia de cada serogrupo.

SELECCION DE LAS COLONIAS.

- 1.- En cuatro placas de agar infusión corazón (HIA), sembrar por estria cruzada V. cholerae serogrupo Ogawa e Inaba respectivamente (2 y -2).
- 2.- Incubar a 37°C por 24 horas.
- 3.- Revisar la morfología colonial en el microscopio estereoscópico. Foto 1,2
- 4.- Seleccionar tres colonias lisas (bordes enteros, brillantes, traslúcidas, cremosas, ligeramente convexas), de cada una de las placas y de ambos serogrupos (Foto 1,2). Se escogen colonias lisas porque tienen sus antígenos superficiales completos.
- 5.- Se coloca una gota de solución salina al 0.85% en cada una de las tres divisiones de una placa de aglutinación y se toma una asada de la colonia seleccionada tratando de obtener una suspensión homogénea en cada una de las tres gotas (Foto 3).
- 6.- Cerca de cada gota se agrega una gota de solución salina al 0.85% una gota de acriflavina y una gota de suero ---

homólogo de referencia Ogawa (foto 4).

- 7.- Las dos gotas de cada división se mezclan bien con la -- ayuda de una asa (Foto 4).
- 8.- La placa se oscila suavemente con la mano durante 1 minu-- to.
- 9.- Se busca aglutinación colocando la placa sobre una lám-- para.
- 10.- Realizar el mismo procedimiento con las otras dos colonias seleccionadas del serogrupo Ogawa (del paso 5 al 9), (Foto 5).
- 11.- Realizar los pasos 5 a 9 con las colonias seleccionadas - serogrupo Inaba.

Reacciones de aglutinacion.

4⁺ = 100% de los microorganismos aglutinan.

3⁺ = 75% de los microorganismos aglutinan.

2⁺ = 50% de los microorganismos aglutinan.

1⁺ = 25% de los microorganismos aglutinan.

Tr = Trazas.

- = No aglutinan.

- 12.- Sembrar tres tubos de HIA, por cada serogrupo, a partir de las colonias lisas seleccionadas.
- 13.- Incubar a 37°C por 24 horas.
- 14.- Sembrar de cada tubo por estría cruzada, en placas de HIA.
- 15.- Incubar a 37°C por 24 horas.

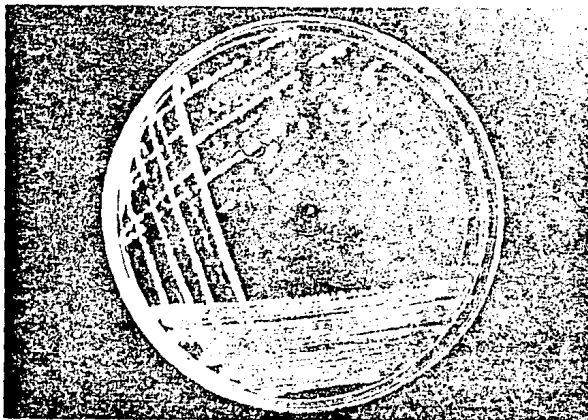


Foto 1. Morfología colonial de *Vibrio cholerae* serogrupo ---
Ogawa, en medio HIA (agar infusión corazón).

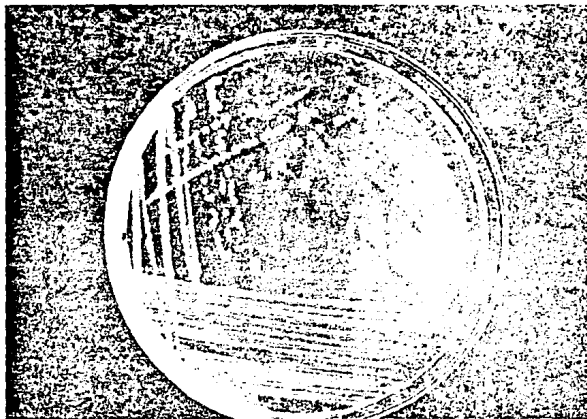


Foto 2. Colonias de *Vibrio cholerae* serogrupo Inaba en la --
superficie de una placa de HIA (agar infusión corazón)
Obsérvese las colonias lisas.

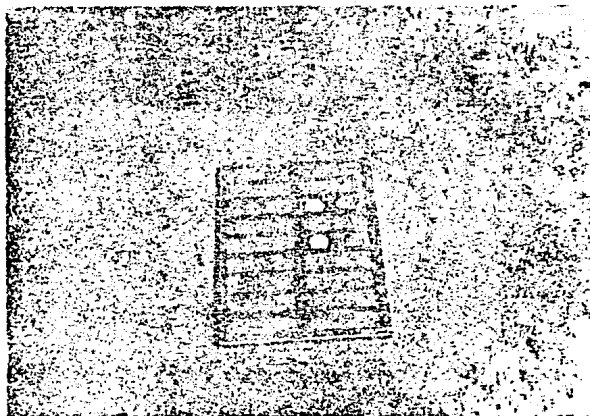


Foto 3. Forma de colocar las muestras de la suspensión homogénea con solución salina y acriflavina.

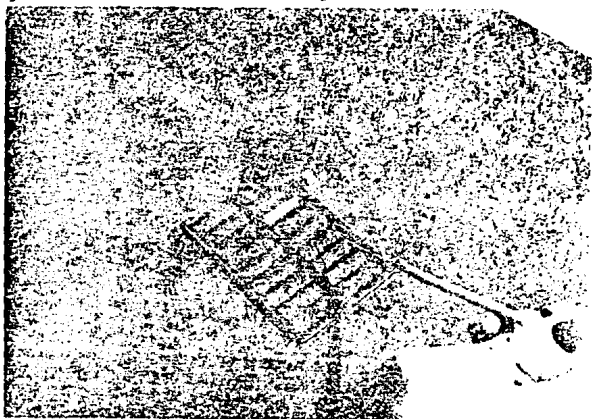


Foto 4. Mezcla de las muestras en cada una de las divisiones con la ayuda de una asa.

- 16.-Revisar la morfología colonial en el microscopio estereoscópico.
- 17.-Seleccionar colonias lisas (bordes enteros, brillantes, translúcidas, cremosas, ligeramente convexas), de cada una de las placas de ambos serogrupos (Foto 6).
- 18.-Colocar una gota de solución salina al 0.85% en cada una de las tres divisiones de una placa de aglutinación, y se toma una asada de la colonia seleccionada tratando de obtener una suspensión homogénea en cada una de las tres gotas.
- 19.-Cerca de cada gota, se coloca una gota de suero homólogo de referencia, Ogawa, una gota de solución salina al 0.85% y una gota de acriflavina.
- 20.-Las dos gotas de cada división se mezclan bien con la ayuda de una asa.
- 21.-La placa se oscila suavemente con la mano durante 1 minuto.
- 22.-Se observa el grado de aglutinación colocando la placa sobre una lámpara.
- 23.-Realizar los pasos 18 a 22 para el serogrupo Inaba.
- 24.-Seleccionar un tubo del serogrupo Ogawa e Inaba respectivamente que tengan una aglutinación de 4⁺ con su suero homólogo, que no aglutinen con solución salina al 0.85% ni con acriflavina.
- 25.-De los tubos seleccionados de ambos serogrupos, sembrar 6 tubos de HIA inclinando su superficie.
- 26.-Incubar a 37°C por 24 horas.

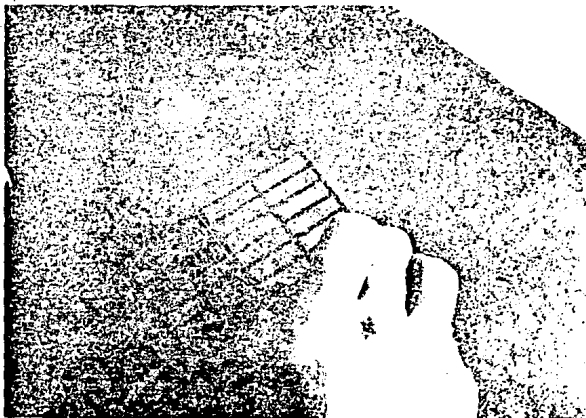


Foto 5.- En esta fotografia la aglutinación con solución --- salina al 0.85% y acriflavina con una cepa lisa de Vibrio cholerae. es negativa.

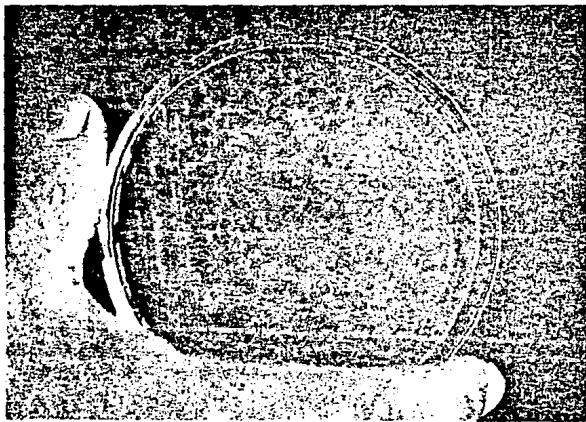


Foto 6.- Colonias lisas de Vibrio cholerae serotipo Inaba en una placa de HIA (agar infusión corazón) después de incubar a 37°C por 24 horas.

- 27.-Resuspender en 1 ml de solución salina estéril al 0.85% cada uno de los cultivos.
- 28.-Inocular el contenido de cada tubo, en matraces erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de caldo infusión corazón (HIB).
- 29.-Poner en agitación los matraces por 24 horas a 37°C.
- 30.-Comprobar la pureza de los cultivos por la tinción de -- Gram
- 31.-Centrifugar los cultivos a 3500 rpm por 40 minutos en -- tubos cónicos de polipropileno de 50 ml. Vertir el sobrenadante de cada uno de ellos y mezclar el paquete celular de varios tubos en uno solo, resuspendiéndolo en aproximadamente 50 ml de solución salina.
- 32.-Someter los cultivos a vapor fluente durante 2 horas (en autoclave con la válvula abierta a 2 lb de presión y --- aproximadamente a 100°C.
- 33.-Centrifugar los cultivos una vez fríos a 3500 rpm por 40 minutos.
- 34.-Vertir el sobrenadante de cada uno de ellos y resuspender el paquete celular en aproximadamente 50 ml de alcohol - al 95% e incubar a 37°C por 18 horas.
- 35.-Repetir los pasos 33 y 34.
- 36.-Centrifugar los cultivos a 3500 rpm durante 40 minutos; vertir el sobrenadante de cada uno de ellos y resuspender el paquete celular en aproximadamente 50 ml de acetona - centrifugando a 3500 rpm por 40 minutos.
- 37.-Repetir el paso 36.

- 38.-Vertir el sobrenadante de los tubos y resuspender las --
células en una pequeña cantidad de acetona.
- 39.-Vertir rápidamente dentro de un mortero el paquete celu-
lar del serogrupo Ogawa.
- 40.-Realizar el mismo procedimiento para el paquete celular
del serogrupo Inaba.
- 41.-Dejar que la acetona de ambos morteros se evapore (aproximadamente 24 horas).
- 42.-Raspar suavemente las células de los morteros y dejar --
secar por 3 o 4 días a 37°C.
- 43.-Después que el paquete celular se ha secado, pulverizarlo
y colocarlo en un recipiente hermético por separado cada
uno de los serogrupos (Foto 7).
- 44.-Repetir el procedimiento cuantas veces sea necesario, --
hasta obtener la cantidad de antígeno somático "O" necesario para inmunización.

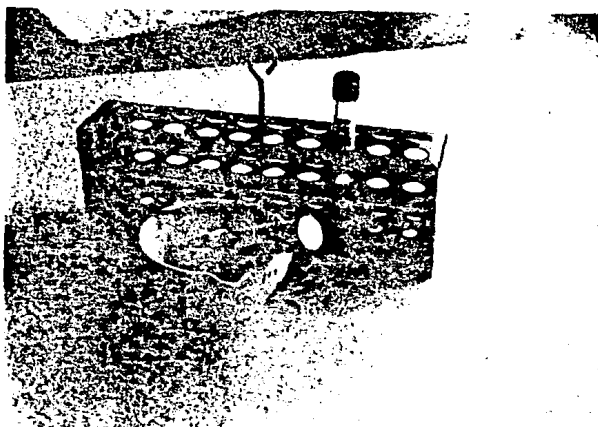


Foto 7.- Antígeno pulverizado de Vibrio cholerae.

V.3 PROGRAMA DE VACUNACION.

- A) Para preparar el antisuero polivalente, mezclar los dos -
antígenos pulverizacos (los dos serotipos: ogawa e Inaba)
en cantidades iguales obteniendo una sola vacuna poliva--
lente.

Suspender la vacuna en solución salina estéril agregando
la mezcla de antígenos pulverizados a la solución salina
estéril hasta obtener la densidad adecuada como se mencio
na abajo (Foto 7'):

- B) Inocular intravenosamente 4 conejos blancos Nueva Zelanda
de 3 Kg de peso, en la vena marginal de la oreja a inter-
valos de 4-5 días, como sigue: (Foto 8).

1^a inoculación 0.25 densidad igual a Mc Farland #2

2^a inoculación 0.5 densidad igual a Mc Farland #3.

3^a inoculación 1.0 densidad igual a Mc Farland #4.

4^a inoculación 2.0 densidad igual a Mc Farland #5.

5^a inoculación 4.0 densidad igual a Mc Farland #5.

6^a inoculación 4.0 densidad igual a Mc Farland #6.

Mc Farland = concentración bacteriana (ml).

- C) Hacer sangría de prueba en los cuatro conejos 4 días ----
después de la última inoculación estrayendo aproximada---

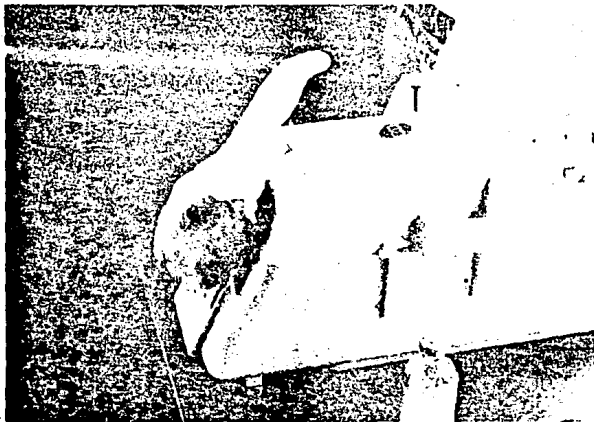


Foto 7'.- Vacuna polivalente de Vibrio cholerae, la cual presenta una densidad igual a Mc Farland # 5.



Foto 8.- Inoculación intravenosa del antígeno, en la vena --
marginal de la oreja del conejo. Observese la dila-
tación de la vena.

mente 5 ml de sangre de la arteria central de la oreja -
de cada uno de los 4 conejos.

D) Separar los sueros por centrifugación durante 10 minutos
a 2500 rpm.

E) Previamente se han sembrado masivamente las cepas de am-
bos serogrupos en 1/4 de placa de HIA e incubado a 37°C
por 24 horas.

F) En un tubo de vidrio de 13 x 100 depositar 0.5 ml de ---
solución salina al 0.85% y con una asa recoger el creci-
miento de la placa de HIA proveniente del serogrupo Ogawa
hasta obtener una suspensión bacteriana pesada, agitar -
vigorosamente en un vortex hasta que la suspensión sea -
homogenea.

G) Repetir el paso anterior con los serogrupos Inaba!

H) Se separan diluciones de los sueros obtenidos como sigue:
1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 (Foto 9).

I) Se coloca una gota de una de las suspensiones en cada una
de las 7 divisiones de la placa (una placa por cada suero)

J) Cerca de cada gota, se agrega una gota de cada una de las
diluciones del suero.

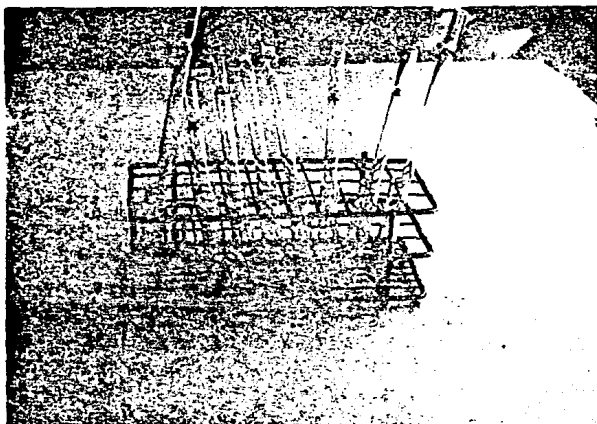


Foto 9.- Dilución seriada de uno de los sueros obtenidos en la sangría de prueba como sigue: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64; el primer tubo de la izquierda -- contiene una suspensión bacteriana con la que se va a probar el suero.

- K) Las dos gotas de cada división se mezclan bien con la ayuda de una asa.
- L) La placa se oscila suavemente con la mano durante 1 minuto
- M) Se busca aglutinación colocando la placa sobre una lámpara
- N) Si el título es satisfactorio, se sangran los conejos por vía intracardiaca (esto se especifica en la siguiente página) una semana después de la última inoculación, si los antisueños dan una aglutinación de 4^+ dentro de 1 minuto.
- N) Si los conejos no dan una respuesta adecuada, dar dos --- inoculaciones adicionales de 4 ml cada una.
- O) Sangrar una semana después de la última inoculación.
- P) El suero se separa del coágulo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, y se transfiere con pipetas pasteur a recipientes adecuados.
- Q) Esterilizar el antisuero por filtración y adicionar azida de sodio al 0.01% como preservador

Sangría por vía intracardiaca.

En un recipiente se coloca una porción de algodón humedecido con cloroformo.

Se sujeta fuerte al conejo del lomo con las dos manos y se procede a anestesiarlo con el cloroformo por unos segundos. En una tabla de sangría, se acuesta al conejo boca arriba y se procede a sujetarlo de las patas con los lazos que se encuentran en los cuatro extremos de la tabla. (Ver foto 10).

Se localiza el esternón del conejo que está arriba del diafragma, y aproximadamente en la parte media del lado izquierdo del conejo se encuentra el corazón. Se limpia con un algodón humedecido en alcohol la parte donde se va a puncionar. Una vez que se ha localizado, se introduce una jeringa de 20 ml con una aguja del 18 de tal manera que no roce hueso de las costillas y se empieza a succionar la sangre, una vez llena la jeringa esta se gira y se desprende cambiándose rápidamente por otra vacía (no hay que sacar la aguja) y así sucesivamente tratando de extraer la mayor cantidad de sangre posible. (Ver foto 11).

Una vez terminado se le deja permanentemente el cloroformo al conejo, para que este muera rápidamente.



Foto 10.- Localización del corazón en el conejo para realizar la punción intracardiaca.



Foto 11.- Punción intracardiaca en el conejo, el cual se ha anestesiado con cloroformo.

V.4 EVALUACION.

- A) Evaluar el antisuero por la prueba de la aglutinación en placa.
- B) Usar células vivas de ambos serogrupos y algunas cepas -- de vibrios no coléricos.
- C) Cada una de las cepas a probar sembrarlas en 1/4 de placa de HIA e incubar a 37°C por 24 horas.
- D) Cosechar cada uno de los cultivos en 0.5 ml de solución - salina al 0.85% en tubos de ensaye, agitar vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea.
- E) Realizar diluciones del antisuero como sigue:
1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. (Ver foto 12)
- F) Para cada una de las suspensiones: colocar en una placa - 1 gota de cada una de las diluciones del antisuero y una gota de la suspensión de cultivo a probar, mezclar con una asa y agitar manualmente hacia delante y hacia atrás por un minuto.
- G) Se busca la presencia de aglutinación colocando la placa sobre una lámpara y anotar el grado de aglutinación.

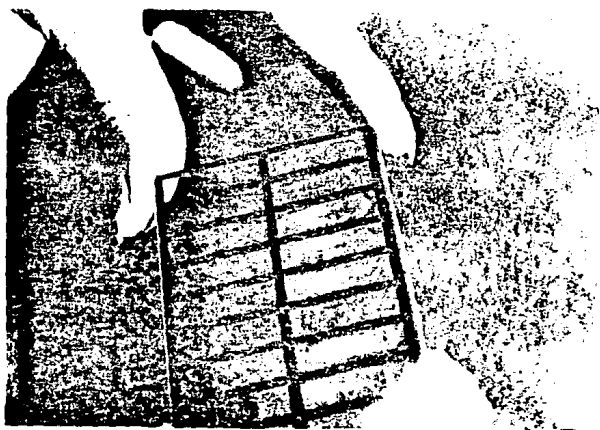


Foto 12.- Evaluación del antisuero de *V. cholerae*. 0:1, sero grupo Ogawa. De izquierda a derecha se dan las reacciones de aglutinación como sigue:

4⁺, 4⁺, 4⁺, 3⁺, 1⁺, 1⁺, 1⁺.

V.5. ENVASE DEL SUERO.

- A) Envasar el antisuero con glicerina estéril al 50%.
- B) Colocar en viales tipo antibiótico 2 ml de antisuero en condiciones asépticas y sellarlos.
- C) Rotular los viales con las etiquetas.
- D) Mantener los viales en refrigeración a una temperatura de 2-6°C hasta su uso. (Ver foto 13).

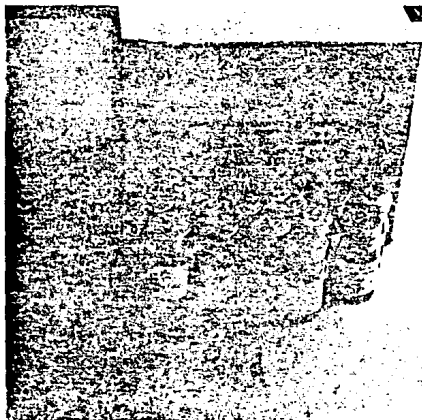


Foto 13.- Producto terminado para la identificación serológica de Vibrio cholerae 0:1.

Técnica del sulfato de bario del nefelómetro de Mc Farland
(18).

- 1.- Preparar soluciones acuosas al 1% de cloruro de bario y ácido sulfúrico.
- 2.- Agregar las cantidades indicadas en el cuadro de abajo a ampollitas secas y limpias. Estas últimas deben tener el mismo diámetro del tubo de ensayo para usar en determinaciones subsiguientes de densidad.
- 3.- Sellar y rotular las ampollitas.

Preparación del estándar de sulfato de bario en el nefelómetro de Mc Farland.

Tubo	Cloruro de bario (1 %) (ml)	Acido sulfúrico (1 %) (ml)	Densidad de bacterias, que corresponde (millones/ml)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

AGUA PEPTONADA.

(Enriquecimiento para Vibrio cholerae)

PEPTONA.....10 g.

CLORURO DE SODIO..... 5 g.

AGUA DESTILADA.....1000 g.

Disolver por calentamiento.

Ajustar el pH a 8.0 - 8.4, con NaOH (IN).

Esterilizar a 115°C/ 20'.

CAPITULO VI.

RESULTADOS.

TABLA I

Aglutinación de V. cholerae 0:1

	Serotipo Ogawa	Serotipo Inaba
Solución salina 0.85%	-	-
Acriflavina.	-	-
Suero homólogo.	4 ⁺	4 ⁺

Se observa una reacción de aglutinación de 4⁺ en ambos -- serotipos con su suero homólogo de referencia y no hay reacción de aglutinación con acriflavina ni con solución salina al 0.85%.

TABLA II

Aglutinación de las capas de *V. cholerae* 0:1 y selección de las mismas para preparar los antígenos de Roshcka.

	a	b	c	D	E	F
Solución salina 0.85%	-	-	-	-	-	-
Acriflavina.	-	-	-	-	4 ⁺	-
Suero homólogo (Ogawa).	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	-	-	-
Suero homólogo (Inaba).	-	-	-	4 ⁺	-	4 ⁺

Donde: a,b,c (Cepas del serogrupo Ogawa)
D,E,F (Cepas del serogrupo Inaba)

Las cepas a,b,D,F fueron las elegidas para presentar los antígenos puesto que presentaron una aglutinación de 4⁺ con su suero homólogo y no aglutinaron con acriflavina ni con -- solución salina 0.85%.

Los frotis que se realizaron para comprobar la pureza de los cultivos todos fueron satisfactorios, esto es: se identificaron bacilos gram negativos ligeramente curvos y cortos.

En ninguno de los frotis y por consiguiente en los cultivos, no hubo contaminación alguna.

Cantidades obtenidas de los antígenos preparados:

Serogrupo Ogawa.....784,7 mg

Serogrupo Inaba.....433,0 mg

TABLA III

Resultados obtenidos en la sangría de prueba con V. cholerae 0:1

Conejo	Cepa	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
1	0	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	1 ⁺	-	-
	1	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	Tr	-	-
2	0	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	2 ⁺	Tr	-	-
	1	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	2 ⁺	1 ⁺	-
3	0	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	2 ⁺	1 ⁺	-
	1	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	Tr	-	-
4	0	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	2 ⁺	1 ⁺
	1	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	3 ⁺

Donde: 0 = Serotipo Ogawa.
1 = serotipo Inaba.

Se evaluó los sueros de los conejos, cada uno por separado el suero del conejo 1 presentó un título de 1:16 mientras que los sueros de los conejos 2 y 3 fué de 1:32. Por lo que se dejó pasar 5 días más para que el nivel de anticuerpos llegara hasta un título óptimo de 1:64 como en el suero del conejo 4.

TABLA IV

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE VIBRIO CHOLERA

0:1 CON VIBRIOS NO COLERICOS.

CEPA	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
<u>V. anguillarum.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. costicola.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. alginolyticus.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. mimicus.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. parahaemolyticus</u> 0:4	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. parahaemolyticus</u> 0:5	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. parahaemolyticus</u> 0:11	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01(7255)	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01(7696)	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01 (A)	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01 (B)	3 ⁺	3 ⁺	Tr	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01 (C)	3 ⁺	2 ⁺	1 ⁺	-	-	-	-

Aquí se realizó la evaluación del antisuero polivalente - con vibrios no coléricos de los cuales la mayoría no aglutino excepto por las dos últimas cepas que si presentan reacción de aglutinación hasta un título de 1:4.

TABLA V

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE VIBRIO CHOLERAE

0:1 CON VIBRIOS COLERICOS Y NO COLERICOS.

CEPA	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
<u>V. anguillarum.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. costicola.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. alginolyticus.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. mimicus.</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. parahaemolyticus</u> 0:4	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. parahaemolyticus</u> 0:5	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. parahaemolyticus</u> 0:11	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01 (A)	-	-	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01 (B)	2 ⁺	2 ⁺	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> No-01 (C)	3 ⁺	2 ⁺	-	-	-	-	-
<u>V. cholerae</u> 0:1 (Ogawa)	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	1 ⁺	1 ⁺	1 ⁺
<u>V. cholerae</u> 0:1 (Inaba)	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺	Tr	Tr	Tr

En este cuadro se dan los resultados obtenidos de la evaluación del antisuero con vibrios coléricos y no coléricos -- Ogawa e Inaba presentan reacción de aglutinación hasta un -- título de 1:64. En los no coléricos la mayoría no aglutino -- salvo V. cholerae No-01 (A) y V. cholerae No-01 (B), ambos -- presentarán un título de 1:2.

El volúmen que se obtuvo fué de 160 ml del antisuero poli
valente.

Se usaron 50 ml de suero para envasarlo, obteniéndose 50-
viales con 2 ml cada uno. El antisuero restante se guardó --
sin envasarse para uso posterior, manteniéndose en refrigeraci
ón a una temperatura de aproximadamente 2 - 6°C.

TABLA VI

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE VIBRIO CHOLERAE

0:1 CON GLICERINA AL 50%.

CEPA	1:2	1:3	1:4
<u>V. cholerae</u> 0:1 (Inaba)	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺
<u>V. cholerae</u> 0:1 (Ogawa)	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺
<u>V. cholerae</u> No-01 (B)	-	-	-
<u>V. cholerae</u> Np-01 (C)	-	-	-

Se realizó la evaluación final del antisuero con el conservador (glicerina) para determinar la dilución a la cual se va a utilizar. Como en ninguna de las tres diluciones realizadas disminuyó el título, se usará a una dilución de 1:4 y como ya tiene glicerina al 50% esto implica que una vez -- envasado se usará diluyéndolo 1:2.

CAPITULO VII.

VII.1 DISCUSION DE RESULTADOS.

Antes de preparar los antígenos, se procedió a probar los sueros homólogos de referencia para ver el grado de aglutinación de las cepas de referencia de Vibrio cholerae 0:1. Los resultados se dan en la tabla I.

De la tabla II se descartó la cepa "c" que presentó 3^+ , - ya que esta cepa tenía menor proporción de antígeno específico que las cepas "a" y "b" con 4^+ .

La cepa "E" se descartó porque autoaglutinó 4^+ con acriflavina y las cepas que autoaglutinan con solución salina o con acriflavina se descartan por ser cepas rugosas ya que no tienen antígenos de virulencia (26).

Por otro lado, los antígenos "O" están sujetos a presentar variaciones y ser capas lisas o rugosas, siendo algunos de - conversión lisa génica. De ahí que las cepas: a, b, D, F fueran las seleccionadas para la preparación de los antígenos - respectivos pues eran cepas lisas (27).

Durante la producción de los antígenos se realizaron frotis y se tiñeron por la tinción de Gram de los cuales todos resultaron satisfactorios sin encontrarse contaminación alguna en ellos.

Las cantidades de antígeno que se obtuvieron fueron diferentes para cada serotipo, pues se realizó 3 veces el ciclo de producción para el serotipo Ogawa y 2 veces el ciclo de producción para el serotipo Inaba. Una vez obtenidos los antígenos se llevó a cabo el esquema de inmunización en el cual no fué necesario dar inoculaciones adicionales, y una vez -- terminado se realizó la sangría de prueba evaluándose el --- suero obtenido de cada uno de los cuatro conejos, llegando - a los resultados que se dan en la tabla III. En el conejo 1 el título del suero es 1:16, en los conejos 2 y 3 fué de 1:32 y en el conejo 4 el título fué de 1:64 que ya era óptimo; de acuerdo a esto se dejó pasar 5 días más para el conejo 1 --- aumentara la capacidad de respuesta inmune (24).

Llegado el momento de la sangría total de los conejos se procedió a separar los sueros en condiciones de esterilidad y antes de proceder a la evaluación del suero este se dejó - en "reposo" durante una semana para que se estabilizara el - nivel de anticuerpos presentes (26). Una vez pasado este lapso se evaluó con las cepas de referencia de vibrios no colé- ricas que se especifican en la tabla IV en la cual se observa que en dos cepas de *V. cholerae* No-01 ambas presentan un --- título de 1:4 que realmente es bajo (12) ya que la cepa "b" - presenta solo trazas y la cepa "c" presenta 1⁺ mientras que la cepa "a" no muestra ningún grado de aglutinación.

Después se realizó otra evaluación final en la que se ---

incluyen vibrios coléricos y no coléricos tabla V. Nuevamente se observa que las cepas de V. cholerae No-01 presentan reacción de aglutinación hallándose un título de 1:2 en ambas especies ("b" y "c") esto quizá se deba a que las cepas presentan poca especificidad (no están tipificadas) en cuanto a -- su composición antigénica o algún factor inespecífico que se encuentra en bajas concentraciones y se eliminó a través de la dilución del suero (26); mientras que en los serotipos -- Ogawa e Inaba se encontró un título bastante óptimo que es -- de 1:64 y habiendo llegado a estos resultados se procedió a evaluar el antisuero con el conservador (24) que es glicerina al 50%, para ver a que dilución se va a usar y así mismo --- observar si se diluye o pierde las reacciones cruzadas y establecer la dilución más alta en la cual aglutine 4⁺ con las cepas antígenos homólogos (tabla VI), efectuándose tres diluciones: 1:2, 1:3, 1:4 que son las diluciones finales con las que trabaja un antisuero y porque hasta estas diluciones nos dá una reacción de 4⁺ con el antisuero, por lo cual se -- manejará a esta dilución. Una vez evaluado el antisuero con glicerina se procedió a esterilizar el antisuero por filtración, se envasó y así estar en condiciones de uso.

VII. 2 CONCLUSIONES.

La identificación de Vibrio cholerae 0:1 podrá hacerse -- sin dificultad apoyándose en las características bioquímicas y de aglutinación con el antisuero polivalente de V. cholerae 0:1 obtenido, donde se reconocerá al antígeno somático "O". (12).

Así pues aquellas colonias, las cuales tengan apariencia típica de vibrios cólera sobre medios sólidos (específicos - para el crecimiento de vibrios), se probarán con antisuero - polivalente de V. cholerae 0:1. Si ocurre aglutinación, --- puede hacerse una identificación presuntiva. La identifica- ción final requerirá de pruebas confirmatorias bioquímicas y probarse análogamente con antisueros monoespecíficos Inaba y Ogawa, para determinar el serotipo y descartar otros micro- organismos que causan enfermedades diarreica (29,28).

El antisuero obtenido tiene la suficiente potencia ya que aglutinó bien a V. cholerae 0:1, aunque le falta un poco de especificidad ya que aglutinó a dos cepas de vibrios no colé- ricos aunado a este el antisuero no se absorbió puesto que - no se evaluó con todas las cepas conocidas de vibrios, que - son aproximadamente 34 especies (18), esto último no se rea- lizó completamente porque no se contaba con todas las cepas de vibrios no coléricos, sin embargo en el presente trabajo de Tesis se pudieron incluir vibrios representativos con ---

significancia clínica en humanos; tales como V. parahaemolyticus (que causa gastroenteritis), V. mimicus (implicado en casos de diarrea) o V. alginolyticus (relacionado con infecciones extraintestinales) (2.18).

Por otro lado no se puede hacer una comparación del antisuero que se obtuvo con uno del CDC ya que este último está diluido y listo para usarse directamente además de que tiene también conservador y con el inconveniente de que ya no se contaba con antisuero estándar producido en el CDC.

Y aunque el propósito culmina en evaluar el antisuero --- obtenido en el I.S.E.T., el Laboratorio de Producción de --- Antisueros ha optado por mandar alcuotas de sus antisueros producidos al CDC para que allá los verifiquen, y hasta la fecha los resultados han sido satisfactorios lo que ha ayudado a perfeccionar poco a poco las técnicas con las que trabaja este laboratorio; en el caso del antisuero polivalente -- para la identificación de V. cholerae 0:1 como es la primera vez que se produce se mandará a corto plazo al Centro de --- Referencias de Atlanta, Georgia en un lote en conjunto con otros antisueros. Por consiguiente, el antisuero producido dentro de las instalaciones del I.S.E.T. (Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales) es uno de los primeros aquí en México.

La aglutinación en placa se prefiere debido a la facilidad

con que se lleva a cabo, obteniéndose el resultado de inmediato. Esta prueba serológica va a servir de mucho dentro del diagnóstico del cólera, enfermedad que se ha detectado ya en México (1,10,20), más específicamente en las costas porque ahí es su hábitat de los vibriones, particularmente se tienen datos de que las personas con esta enfermedad diarreaica habfan consumido mariscos de aguas mexicanas, con esto aunque el cólera geográficamente no debería de existir en México se intuye que este se ha extendido a nivel mundial (18,28) y lo más probable es que tenga ya varios años de existencia por estas aguas territoriales pero sin detectarse, y esto no descartaría la posibilidad de una epidemia a corto plazo (20).

Es por eso, que se ha requerido producir este antisuero para tenerlo como arma de diagnóstico y con esto ayudar a la formación de Laboratorios de Referencia aquí en México y no tener que depender completamente de los sueros que se obtienen de otro u otros países, como es el caso de E.U.A. específicamente del CDC (Centro para el control de las enfermedades Atlanta, Georgia).

Debido a que es un proceso que lleva mucho tiempo, esto es pedir oficialmente los sueros a dicho centro, que los envíen oportunamente y en buenas condiciones y sobre todo que se puedan rescatar de las aduanas, para que lleguen a los Laboratorios donde se requieran.

CAPITULO VIII.

- B I B L I O G R A F I A -

- 1.-Martin D.L. et al.(1985). Clinical and laboratory features of an out break of V. cholerae 0:1 infection in the United States. *Diagn Microbiology Infect Dis*, 3:159-165.
- 2.-Tacket C.O.(1982). V.cholerae infection. *JAMA*, 248:2972
- 3.-Morris G.K. et al.(1979). Assay method for V. cholerae. *J Clin Microb*, 9:79-83.
- 4.-Smith H.L.(1979). Serotyping of non-cholerae vibrios. *J Clin Microb*, 10:85-90.
- 5.-Barret T.J.(1980). Use of more swabs for aislation V. cholerae from sewage. *J Clin Microb*, II:385-388.
- 6.-cash R.A.(1974). Response of man to infection with V. cholerae I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a know inoculum. *J Infect Dis*, 129:45-52.
- 7.-Heyningen S.V.(1976). The subunits of cholerae toxin: stoichiometry and function. *J Infect Dis*, 133 Supplement: S5 - S12.
- 8.-Raziuddin S.(1979). Structure-function relationship: Biological activities of the lipopolysaccharides and lipid a from V. cholerae. *J Infect Dis*, 140:590.
- 9.-Rennels M.B.(1980). Selective vs Nonselective media and direct plating vs enrichment technique in isolation of V. cholerae: Recomendation for clinical laboratories. *J Infect Dis*, 142:328-331.

- 10.-Snyder J.D.(1981). Serological studies of naturally ----
acquired infection with V. cholerae: serogrup O:1 in -
the United States. J Infect Dis, 142: 182-187.
- 11.-Glass R.I.(1985). Seroepidemiological studies of El Tor-
cholerae in Blangadesh: Association of serum antibody --
levels with protection. J Infect Dis, 151:236-242.
- 12.-Donovan T.J.(Furniss A.L.1982). Quality of antisuero used
in the diagnosis of cholerae. Lancet, 2:866-868.
- 13.-Yaniv A.(1980). Improved procedure for the rapid diagno-
sis of cholerae. Scientific Meeting in Israel, 16:870-875.
- 14.-Gangarosa E.J.,Dewitt W.E.(1968). Laboratory methods in
cholerae: Isolation of V. cholerae (El Tor and Classical)
on TCBS medium in minimally equiped laboratories. Trans
R Soc Trop Med Hyg; 62: 693-699.
- 15.-Ewing B.R.,Davis and Martin W.J. Outline of methoda for
the isolation and identification of V. cholerae .U.S. --
DEPARTAMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. ATLANTA, --
GEORGIA (1979).
- 16.-Specification and evaluation methods for laboratory ----
immunological and microbiological reagents. 4th Ed. ----
(1973(. DHEW, PHS, HSMHA, CDC.
- 17.- Bioxon de México.S.A. Medios de cultivo y reactivos de
diagnóstico
- 18.-Lennet, E.H., Ballows A., Hausler W.J., Truant J.P.;----
Manual of clinical microbiology. (1985): 282-301.
- 19.-Vega F.L.(1984). Clasificación de síndromes diarreicos en
niños. Bol Med Hosp Infant Mex, 41:685-688.

- 20.- Blake P.A. et al (1983). Toxigenic V, cholerae 0:1 ---- strain from México identical to United States isolated, Lancet, 2:912.
- 21.-Olarte J.(1985). Etiopatogenia de las diarreas infecciosas. Bol Hosp Infan Mex. 42:66-71.
- 22.-Ramos R.P., Torres B.G., Uribe M. et al. Síndromes diarréicos. 1^a Ed (1987). La prensa médica mexicana.S.A., 11-26
- 23.-Youmans P.G., Patersos Y.P., Sommers M.H., Infectología clínica 2^a Ed(1984). Ed interamericana; 28-34,139-160, 592,604-609.
- 24.-Davis B.D., Dulbeco R.,Einsen H.N., Ginsberg H.S. Tratado de microbiología 3^a Ed(1985) Salvat editores España.
- 25.-Fuerst R.; Microbiología de Frobisher y Fuerst. 14^a Ed. (1981) Ed Interamericana. México, D.F.
- 26.-Morilla G.A.; Bautista G.C.R.; Manual de Inmunología 1^a Ed (1986) Ed Diana.
- 27.-Edwars P.R., Ewing W.H;"Identification of enterobacteria ceae" 3^aEd (1972) Ed Burgess Publishilg Co. Minneapolis
- 28.-Braude A.I.; Enfermedades Infecciosas. Vol II; 2^a Ed---- (1984); Ed Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina.
- 29.-Kelmer, John A., Clinical immunology bioterapy and ---- chemoterapy in the diagnosis, prevention and tretment -- of disease. 4^a Ed (1979), Wingaarden.