



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Instituto Politécnico de la Salud
“Luis Felipe Moncada”
Departamento de Bioanálisis Clínico

Seminario de graduación para optar al título de:
Licenciatura en Microbiología

TEMA:

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

SUB TEMA:

VIBRIO CHOLERAE

Autores:

- Br. Indira Sidelsky Chamorro Sequeira
- Br. Carolina Maria Gutierrez Rocha

Tutora: Lic. Kenia García Rosales

Licenciada en microbiología.

Managua, abril 2019.

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador, por darnos sabiduría entendimiento y darnos la fuerza necesaria para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser sus hijas, son los mejores padres.

A nuestros familiares más cercanos por estar siempre estar presentes, acompañándonos y por el apoyo moral, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos infinitamente a Dios por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a nuestros padres: Ana María Sequeira Ortega, Wilfredo Gutiérrez y Lina Rocha, por ser los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

Agradecemos a nuestros docentes de la Universidad Nacional de Nicaragua UNAN-Managua, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, a la Licenciada Kenia tutora de nuestra investigación quien ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente.

Managua 21 de febrero del 2019

Valoración del tutor

El presente trabajo contiene información científica actualizada, considero es un valioso aporte bibliográfico dada la relevancia de la temática en la actualidad. Elaborado con mucho entusiasmo y esfuerzo de sus autores.

Por lo antes expuesto, a través de la presente y en calidad de tutora hago constar que el trabajo documental con el **Tema: “Diagnostico microbiológico de las enfermedades infecciosas”** y **Subtema: “*Vibrio Cholerae*”** presentado por las bachilleras *Indira Sidelsky Chamorro Sequeira* y *Carolina María Gutiérrez Rocha*, reúne los requerimientos establecidos para ser presentado al comité de evaluación.

Lic. Kenia García Rosales
Departamento de Bioanálisis Clínico
Tutora

RESUMEN

Vibrio cholerae es el agente etiológico de la enfermedad diarreica aguda conocida como cólera, este agente ha sido clasificado en numerosos serogrupos, de los cuales sólo el O1 y el O139 han causado epidemias y pandemias de cólera. La importancia del cólera en la salud pública en el mundo por la amenaza que representa a los países que actualmente se encuentran libres o lo mantienen bajo control epidemiológico, cabe señalar que este control depende en gran medida de un diagnóstico eficiente que evite el resurgimiento de los casos de cólera por cepas ya existentes. La presente investigación documental tuvo como objetivo exponer las generalidades de *Vibrio cholerae*, describir las principales fuentes de contaminación por *Vibrio cholerae*, detallar los métodos diagnósticos utilizados para la identificación de *Vibrio cholerae* y explicar la importancia de las medidas preventivas en la transmisión del Cólera. La información fue recolectada de fuentes secundarias como artículos de revista científica, páginas web, libros y monografías que estuvieran relacionados con *Vibrio cholerae*. Las principales fuentes de contaminación por *Vibrio cholerae* juega un papel importante, debe tomarse en cuenta la contaminación del agua como consecuencia del arrastre de materias fecales así mismo los alimentos, la contaminación del ambiente como consecuencia del calentamiento global, la contaminación de persona a persona. En el diagnóstico de *Vibrio cholerae* se utilizan métodos convencionales en los que se necesita una etapa de pre enriquecimiento, sub cultivos, siembra en agares, bioquímica etc. Con el avance de la tecnología se han implementado otros métodos no convencionales. Estos métodos permiten llegar a un diagnóstico certero de cólera, las pruebas microbiológicas rápidas actualmente desarrolladas ofrecen la detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos más cortos con metodologías más sencillas. La prevención y control son fundamentales el saneamiento básico (pro-visión de agua segura y eliminación sanitaria de excretas) y la educación para la salud referida a los hábitos higiénicos personales y en la manipulación de alimentos.

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Justificación	2
III. Objetivos	3
IV. Desarrollo del subtema	4
4.1. Generalidades	4
4.1.1. Características del género vibrio.....	4
4.1.2. El genoma de vibrio cholerae	6
4.1.3. Patogenia.....	7
4.2. Factores de virulencia	8
4.2.1. Hemaglutinina / proteasa	8
4.2.2. Toxina MARTX de vibrio cholerae.....	8
4.2.3. Hemolisina	9
4.2.4. Toxina colérica	9
4.3. Fisiopatología	11
4.3.1. Cuadro clínico	13
4.4. Principales fuentes de contaminación por vibrio cholerae	14
4.4.1. Agua.....	14
4.4.2. Alimentos	14
4.4.3. Transmisión de persona a persona.....	15
4.4.4. Vibrio cholerae en ambientes	16
4.5. Métodos diagnósticos utilizados para la determinación de Vibrio cholerae ..	17
4.5.1. Métodos convencionales	17
4.5.2. Identificación bioquímica <i>vibrio cholerae</i>	23
4.5.3. Métodos no convencionales	32
4.5.4. Importancia de las medidas preventivas en la transmisión del cólera	36
V. Diseño metodológico	43
VI. Conclusiones	44
VII. Bibliografía	46

I. Introducción

Vibrio cholerae es el agente etiológico de una enfermedad diarreica aguda conocida como cólera, este agente ha sido clasificado en numerosos serogrupos, de los cuales sólo el O1 y el O139 han causado epidemias y pandemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a los serogrupos no-O1 y no-O139 han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde una diarrea leve hasta la deshidratación grave. La patogénesis de *V. cholerae* epidémico depende de la producción de toxina colérica (CT) y del pilus co-regulador de toxina (TCP) las cuales son reguladas por el gen regulador de virulencia toxR.

Entre 2009 y 2010, el número de casos de cólera reportado globalmente aumentó un 18 % comparado con los casos reportados en el 2008. La última epidemia de Cólera surgió en Haití en el 2010. Cepas de *Vibrio cholerae* toxigénicas y no toxigénicas persisten en ambientes acuáticos debido a la formación de biopelículas en superficies biológicas y el uso de quitina como fuente de carbono.

Muchas epidemias de cólera se han originado a partir de ambientes acuáticos los cuales presentan un ecosistema óptimo para la supervivencia de este agente. Estudios realizados en aguas superficiales procedentes de ríos destinados al consumo y recreación humana han evidenciado la presencia moderada de este agente. La metodología convencional estándar para el aislamiento de *Vibrio cholerae* en aguas de recreación es el aislamiento en placa a partir de un pre-enriquecimiento en agua peptonada alcalina sin embargo esta metodología es laboriosa y tarda de 4 a 5 días para brindar un reporte final, por otra parte el desarrollo de técnicas moleculares como el PCR en tiempo real permite el monitoreo de este agente en menos de 24 horas; además esta técnica molecular también es capaz de detectar la presencia de células viables capaces de producir patogenia en el humano y que no pueden ser cultivadas por métodos convencionales.

II. Justificación

El cólera sigue representando una amenaza mundial para la salud pública. Se ha observado el resurgimiento de esta enfermedad en paralelo con el aumento incontenible de los grupos de población vulnerables que viven en condiciones de falta de higiene. Afecta principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico, con higiene deficiente y que no disponen de servicios sanitarios adecuados. Estas poblaciones estarán expuestas a los diversos factores de riesgo como el consumo de agua de río, consumo de alimentos callejeros, mal manejo de alimento en los hogares etc.

En Nicaragua se controló el cólera a partir del año 2000, a pesar de que no se han reportados nuevos casos el Ministerio de Salud de Nicaragua a través del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia ha mantenido como política oficial la vigilancia de *V. cholerae*.

La importancia del cólera en la salud pública en el mundo y, la amenaza que representa a los países que actualmente se encuentran libres de este padecimiento o lo mantienen bajo control epidemiológico, hace necesario el fortalecimiento de las acciones de vigilancia epidemiológica con énfasis en el monitoreo de las tendencias de enfermedad diarreica aguda y la notificación e investigación inmediata de todo caso probable de cólera que orienten la toma de decisiones hacia el control de este padecimiento, cabe señalar que este control depende en gran medida de un diagnóstico eficiente que evite el resurgimiento de los casos de cólera por cepas ya existentes en el país o, por la introducción de nuevas variantes como la que circula en Haití. Es por esto que con esta investigación documental además de aportar información actualizada y sintetizada sobre los aspectos fundamentales del *Vibrio cholerae*, permita enriquecer el conocimiento de los estudiantes y profesionales de la salud con el propósito que dicho trabajo pueda servir como documento de consulta.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Conocer el comportamiento de *Vibrio cholerae*.

3.2 Objetivos específicos

1. Exponer las generalidades de *Vibrio cholerae*.
2. Describir las principales fuentes de contaminación por *Vibrio cholerae*.
3. Detallar los métodos diagnósticos utilizados para la identificación de *Vibrio cholerae*.
4. Explicar la importancia de las medidas preventivas en la transmisión del Cólera.

IV. Desarrollo del subtema

4.1. Generalidades

Vibrio es un género de bacterias Gram negativas con forma de bastón (bacilo) anaerobios facultativos, no producen esporas, presentan un diámetro entre 0,5 a 0,8 mm y entre 1,4 a 2,4 mm de largo, poseen flagelación polar que les otorga una movilidad máxima soportan bien los medios alcalinos, así como las concentraciones salinas, su metabolismo es fermentativo pueden fermentar, entre otros sustratos, la glucosa.

Bioquímicamente se caracterizan por dar positivo en las pruebas de la catalasa y oxidasa, y presenta negatividad en la adenina dihidrolasa, y positivo en la ornitina descarboxilasa. *Vibrio cholerae* concretamente es sacarosa, manitol positivo y nitrato reductasa positivo. (Fernandez, 2009, pág. 2)

4.1.1. Características del género *Vibrio*

En la actualidad, se reconocen 78 especies de *Vibrio* las especies del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, de forma recta o curva, no producen esporas, presentan un diámetro entre 0,5 a 0,8 mm y entre 1,4 a 2,4 mm de largo. La mayoría de las especies patógenas son móviles por medio de un único flagelo polar. Cerca de la tercera parte de las especies del género *Vibrio* son patógenas para el humano y la enfermedad es por lo general, el resultado de la ingestión de agua o alimentos contaminados o por la exposición de heridas a ambientes acuáticos donde las especies de *Vibrio* están presentes. Las especies *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los patógenos humanos más importantes. (Fernandez, 2009, pág. 5)

Vibrio cholerae

Vibrio cholerae es una especie bien definida en base a pruebas bioquímicas y estudios de ADN. Sin embargo, esta especie no es homogénea con relación a potenciales patogénicos. Especialmente, distinciones importantes dentro de esta especie están hechas en la base a la producción de toxina colérica, serogrupos y potencial para causar epidemias. Existen dos serogrupos O1 y O139 que han sido asociados con brotes epidémicos pero también hay cepas de esos serogrupos que no producen toxina colérica y no son capaces de producir epidemias. Por otra parte existen cepas diferentes a O1 y O139 que son claramente patogénicos ya sea

por la producción de toxina colérica o por tener otros factores de virulencia pero estos serogrupos no han sido capaz de causar grandes epidemias. Desde el punto de vista de salud pública en un aislamiento de *V. cholerae* existen dos propiedades críticas para determinar la identificación bioquímica de especies de *V. cholerae*, la primera es la propiedad de producir toxina colérica la cual es la responsable de la enfermedad colérica severa en epidemias y formas esporádicas, la segunda propiedad es la posesión del antígeno O1 y O139, los cuales son los determinantes actuales de potencial epidemias o pandemias. (Mendez, 2010)

La presencia de antígenos somáticos termoestables O, ha permitido determinar más de 200 serogrupos de *V. cholerae*. Solamente dos de ellos se reconocen como responsables de las epidemias de Cólera. En el agua sobrevive unas cuantas horas y algunas semanas si ésta se encuentra contaminada con material orgánico al cual se adhiere, Produce una enterotoxina que es la causa de una severa diarrea que puede rápidamente llevar a una deshidratación aguda y la muerte si no se proporciona tratamiento de inmediato (La toxina liberada por la bacteria causa mayor secreción de iones de cloruro y agua a la luz del intestino lo cual puede producir diarrea intensa, Sobrevive a la congelación, aunque es más difícil la proliferación, (Mendez, 2010, pág. 11)

En el artículo publicado por la Dirección General de Epidemiología de México se detalla que las cepas de *V. cholerae* que causan brote son los serogrupos O1 y el O139. El O1 causa la mayor parte de los brotes, mientras que el O139, que se identificó por vez primera en Bangladesh en 1992, está confinado al Asia Sudoriental. (Miranda, 2012, pág. 17)

V. cholerae O1

V. cholerae del serogrupo O1 que produce toxina colérica (CT) ha sido asociado con cólera epidémico y pandémico. Algunos aislamientos no producen CT y no poseen genes que codifican CT. Cepas ambientales son usualmente CT negativas y son consideradas de ser no patogénicas en base a estudios con humanos voluntarios. Sin embargo, cepas de *V. cholerae* O1 CT negativas han sido aisladas de casos ocasionales de diarrea y de infecciones extra intestinales. Este serogrupo se subdivide en 3 serotipos Ogawa, Inaba e Hikojima. *V. cholerae* O1 también puede ser dividido en 2 biotipos, Clásico y El Tor. Todas las combinaciones pueden ser encontradas, aislamientos clásicos con Inaba u Ogawa y aislamientos El Tor con Inaba u Ogawa. (Kaper J, Morris G, Levine M, 1995, pag 9)

V. cholerae non-O1/non-O139

Las cepas de *V. cholerae non-O1/non-O139* han sido clasificadas en base al antígeno somático lipopolisacárido (LPS), a la fecha actual existen más de 200 serogrupos de *V. cholerae*. La gran mayoría de estas cepas no producen CT y no están asociadas con diarreas epidémicas. Estas cepas son ocasionalmente aisladas de casos de diarrea (usualmente asociadas al consumo de moluscos) y han sido aisladas de una variedad de infecciones extra intestinales incluyendo heridas, infecciones óticas, esputo, orina, y fluidos cerebrospinales. Estas cepas son encontradas regularmente en ambientes acuáticos y las infecciones debido a estas cepas son comúnmente de origen ambiental. Mientras la gran mayoría de estas cepas no producen CT, algunas cepas pueden producir otras toxinas; Sin embargo, para muchas cepas de *V. cholerae Non-O1/non-O139* aisladas de casos de gastroenteritis, los mecanismos patogénicos son desconocidos aún. (Kaper J, Morris G, Levine M, 1995, pag 9)

Vibrio cholerae O139 Bengal

La simple distinción entre *V. cholerae O1* y *V. cholerae non-O1* fue completamente obsoleta en 1993 cuando apareció el primer reporte de una nueva epidemia emergente de enfermedad colérica severa en el este de la India y Bangladesh. Al principio, el organismo responsable de este brote fue referido como *V. cholerae non-O1* porque este no aglutinaba con antisuero O1. Sin embargo, fuertes investigaciones revelaron que este organismo no pertenecía a los serogrupos O previamente descritos sino que se trataba de una nueva variante y se designó O139 con un sinónimo de Bengal en reconocimiento al origen de donde se aisló esta cepa. En general, este organismo aparenta ser un híbrido de una cepa O1 con una cepa non-O1. En características de virulencia importante, especialmente, toxina colérica y pilus co-regulador de toxina (TCP), *V. cholerae O139* es indistinguible de *V. cholerae O1 El Tor*. Sin embargo, este organismo no produce el LPS O1 y carece al menos del material genético necesario para la producción del antígeno O1. (Kaper J, Morris G, Levine M, 1995, pag 9)

4.1.2. El genoma de *Vibrio cholerae*

En el año 2000 se publicó la determinación y análisis de la secuencia genómica completa de *V. cholerae El Tor*. El genoma consiste en dos cromosomas circulares de 2.961.146 pb (cromosoma 1) y 1.072.314 pb (cromosoma 2). Existe una pronunciada asimetría en la

distribución de los genes conocidos entre los dos cromosomas. La mayoría de los genes que codifican la replicación y reparación del ADN, transcripción, traducción, biosíntesis de la pared celular, y una variedad de vías centrales de catabolismo y biosíntesis, están codificados en el cromosoma 1. La mayoría de los genes esenciales para la patogenicidad, como la toxina colérica, el pilus co-regulador de toxina, los polisacáridos y la maquinaria de secreción de proteínas extracelulares, también están localizados en el cromosoma 1. En contraste, el cromosoma 2 contienen una gran parte (59%) de marcos abiertos de lectura (ORFs) hipotéticos y ORFs de los que se desconoce su función. La secuencia genómica confirma la presencia de un gran sistema de captura de genes, conocido como isla de integrones. Los casetes de este súper integron aparentemente codifican funciones adaptativas y se ha determinado una gran diversidad entre las cepas toxigénicas y no toxigénicas. Recientemente se identificó el primer gen de virulencia funcional en el súper integron (entero toxina termo estable), lo cual sugiere que el súper integron es un mecanismo por el cual los miembros de esta especie pueden importar genes exógenos.

Varias evidencias sugieren que este cromosoma 2, fue originalmente un mega plásmido, capturado por una especie ancestral de *Vibrio*. La estructura de los dos cromosomas se encuentra en otras especies de *Vibrio*, sugiriendo que los genes contenidos en el mega plásmido quizás proveyeron al *Vibrio* una ventaja evolutiva en el ecosistema acuático. Los elementos SXT parecen ser una adición reciente al genoma de *V. cholerae*, pues no están presentes en los aislamientos de la séptima pandemia, como puede ejemplificarse por su ausencia en el genoma de la cepa de *V. cholerae* N16961, la cepa tipo utilizada para la determinación de la secuencia genética completa del cromosoma por el Institute for Genome Research. (Fernandez, 2009, pág. 8)

4.1.3. Patogenia

El humano adquiere la infección por *V. cholerae* O1 al ingerir agua o alimentos contaminados con dicho agente. La dosis mínima de inóculo de *V. cholerae* O1 es del orden de 1 000 000 de microorganismos. En comparación con otros patógenos como *Shigella* (dosis infectante de 1-10 microorganismos), el inóculo que se requiere para infectar a un huésped humano es extremadamente alto. Además de requerir un inóculo muy alto, *V. cholerae* O1 debe superar diversas barreras fisiológicas para poder colonizar e infectar exitosamente a un

humano. Dichas barreras se dividen en inespecíficas y específicas. Dentro de las primeras se encuentran la acidez gástrica, la peristalsis intestinal y las secreciones intestinales. Las barreras específicas incluyen los anticuerpos secretorios (IgA), los anticuerpos antitoxina y vibriocidas. (Fernandez, 2009, pág. 10)

4.2. Factores de virulencia

A nivel molecular, la patogénesis del cólera es un proceso multifactorial que involucra varios genes que codifican factores de virulencia que ayudan al patógeno para la colonización y la expresión coordinada de la toxina. La diarrea masiva inducida por *V. cholerae* es causada por la toxina colérica (CT), aun cuando se ha reportado que cepas que pierden los genes que codifican para la CT, todavía pueden causar diarrea (Fernandez, 2009, pág. 12)

4.2.1. Hemaglutinina / proteasa

V. cholerae produce una Hemaglutinina/proteasa (HapA), codificada por hapA, también involucrada como factor de virulencia. HapA puede degradar proteolíticamente varias proteínas de importancia fisiológica para el hospedero, incluyendo la mucina. HapA perturba la barrera paracelular en los cultivos de células de epitelio intestinal, por la acción en las proteínas asociadas a la zona ocludens y se ha demostrado que se requiere la expresión de hapA para que *V. cholerae* penetre un gel de mucina in vitro. Aunque el análisis de los efectos de mutantes del gen hapA en conejos infantiles y ratones lactantes no ha provisto evidencia que HapA es un factor esencial de virulencia, se ha probado que la proteasa HapA contribuye a la reactividad en las vacunas de cólera de cepas atenuadas en humanos. La pérdida de HapA no afecta la colonización en el modelo de ratones lactantes, sin embargo la motilidad y HapA son necesarios para la expresión total de la entero toxicidad en asa ileal de conejo.

4.2.2. Toxina MARTX de Vibrio cholerae

La secuencia de nucleótidos del genoma de *V. cholerae* y su análisis con técnicas informáticas, ha revelado la presencia de otras toxinas desconocidas, entre ellas, la Toxina RTX multifuncional auto procesada de *Vibrio cholerae* (multifuncional, autoprocessing RTX toxina, MARTXVc). Esta proteína es homologa a los miembros de la familia de las toxina RTX (Repeats in toxin), que contienen un motivo de repetidos ricos en GD. Esta codificada por un elemento genético situado muy cerca del lugar de inserción del genoma del

bacteriófago CTX, aunque su actividad es independiente del elemento CTX. El gen *rtxA* es el marco abierto de lectura más largo en el genoma de *V. cholerae*, y se encuentra tanto en los aislamientos clínicos como los ambientales. La MARTXVc es secretada por un sistema T1SS atípico, compuesto por cuatro componentes. Esta toxina rompe los filamentos de actina del cito esqueleto de un amplio rango de tipos celulares. Esta disrupción se produce por la inactivación de las GTPasas pequeñas, Rho, Rac y Cdc42. Adicionalmente esta toxina posee otro dominio responsable del entrecruzamiento (actin cross-linking domain, ACD), el cual utiliza G-actina como sustrato.

4.2.3. Hemolisina

La mayoría de los aislamientos de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor y no-O1/no-O139 producen una exotoxina hemolítica, llamada El Tor Hemolisina o *V. cholerae* citolisina (VCC), codificada por el gene cromosomal *hlyA*. Se ha reportado que VCC es capaz de causar severos efectos citotóxicos, tales como: lisis celular, vacuolización e incremento de la apoptosis en células del epitelio intestinal. Esta hemolisina se puede encontrar como monómero con actividad hemolítica y como oligómeros que aglutinan eritrocitos. Estas diferentes formas conducen a las células inmunes a diferentes direcciones, los oligómeros inducen la expresión de IgM e IgA, sin embargo, la mayoría de las células tratadas con monómeros resultan en apoptosis.

4.2.4. Toxina colérica

Cada molécula de CT, está compuesta por cinco subunidades B (de enlace) y una subunidad A (activa). Las subunidades B se unen a los receptores del gangliósido GM1 en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Después de la unión, se separan la subunidad A1 y el componente A2, lo cual facilita la entrada del componente A1 en la célula. El componente A1 de la toxina colérica estimula la producción de la enzima adenilciclase, involucrada en la producción del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). Las altas concentraciones intracelulares de AMPC alteran el transporte activo de los electrolitos a través de la membrana celular, lo cual impide la adsorción de líquido y conduce a su secreción en el intestino delgado.

La enterotoxina de *V. cholerae* está codificada por los genes *ctx*. El gen *ctxA* codifica la subunidad A de la toxina, y el gen *ctxB* codifica la subunidad B. Los genes son parte del mismo operon *ctxAB*. El transcrito (ARNm) del operon *ctx* tiene dos sitios de unión a ribosoma (RBS), uno en el gen A y otro en el gen B. Este último es, por lo menos, siete veces más fuerte que el sitio de la región A. De esta forma el organismo es capaz de traducir más proteínas B que A, lo cual se requiere para ensamblar la toxina en la proporción apropiada (1A:5B). Los componentes son ensamblados en el periplasma después de la traducción. Cualquier subunidad B extra puede ser excretada por la célula, pero la subunidad A debe estar adherida a 5 subunidades B, para poder salir de la célula. La subunidad A intacta no es activa enzimáticamente, y se debe fraccionar en los fragmentos A1 y A2, los cuales están unidos por un puente disulfuro.

El operón *ctxAB*, forma parte del genoma del bacteriófago filamentoso CTX, lisogenizado en la bacteria. Este genoma fagico está compuesto por dos dominios funcionalmente distintos, la región central o "core" y la región RS2. En la región central se encuentran, entre otros, los genes de la toxina colérica (*ctxAB*), los genes implicados en la morfogénesis del bacteriófago (*psh*, *cep*, *orfU*, y *ace*) y un gen que codifica una proteína necesaria para el ensamblaje del virion (*zot*). Antes de conocer este origen fagico, algunos de estos genes se consideraban que codificaban otras toxinas relacionadas con la patogénesis del Cólera, ya que se había detectado, por ejemplo que el *zot* (zonula occludens toxin) aumentaba la permeabilidad de la mucosa intestinal y el *ace* (accessory cholera enterotoxin) era capaz de inducir la acumulación de líquidos. La región RS2 incluye los genes necesarios para la replicación (*rstA*), integración (*rstB*) y regulación (*rstR*) de CTX, también contiene dos regiones intergenicas *ig-1* y *ig-2*. Dentro de las células de *V. cholerae*, el genoma de CTX puede existir como la forma replicativa o como profago integrado dentro del cromosoma. Bajo condiciones apropiadas, las cepas toxigénicas de *V. cholerae* pueden ser inducidas para producir partículas extra-celulares de CTX. Las cepas ambientales no toxigénicas pueden convertirse por transducción con CTX.

El profago de CTX esta usualmente flanqueado por un elemento genético relacionado conocido como RS1, similar genética y funcionalmente a la región RS2 del CTX.. No se han identificado en aislamientos naturales de O1 El Tor y O139 profagos solitarios, no

flanqueados por RS1 u otro profago. El elemento RS1 porta un ORF denominado rstC que no está presente en RS2. RstC es un anti represor que controla la producción de partículas de CTX y la expresión de la toxina colérica. Todo esto sugiere una interrelación entre los profagos RS1 y CTX que promueve una diseminación más eficiente de los genes ctx, mientras, simultáneamente, aumenta el desempeño en virulencia de aquellas cepas de *V. cholerae* que portan los genes de TCP. (Fernandez, 2009, pág. 16)

4.3. Fisiopatología

V. cholerae no es un microorganismo invasor, por lo que nunca ingresa realmente a los tejidos del organismo. Este patógeno es ingerido y pasa a través del medio ácido del estómago hasta alcanzar y colonizar un medio apropiado proporcionado por el intestino delgado. Para lograr esto el microorganismo posee factores de virulencia como la motilidad, quimiotaxis, factores de adherencia, así como la producción de varias toxinas, entre las que sobresale la toxina del cólera. Una vez establecido en el intestino delgado el microorganismo, secreta la toxina del cólera la cual se une a sus receptores conteniendo gangliósidos GM1. Se cree que la fuente principal de secreciones intestinales son las células de las criptas del intestino delgado aunque es muy probable que todos los niveles del intestino se encuentren afectados por la toxina del cólera (Stuart, 1999)

El cólera es una enfermedad aguda que resulta de la colonización del intestino delgado por el *Vibrio cholerae* cuya patogenicidad se debe básicamente a la producción de toxina colérica y diarrea secretoria. Ya en los escritos de Susruta, Hipócrates y Galeno, se reconocen cuadros de diarrea y vómitos que causan la muerte. Sin embargo, existe duda desde cuando el cólera fue descrito por primera vez en su forma epidémica.

Según (Cieza C, 1995) es un estudio muy exhaustivos de hace algunos años atrás aseguro que esta enfermedad se caracteriza principalmente por comportamiento epidémico, una alta tasa de casos asintomáticos (portadores), u oligosintomáticos (Enfermedad Diarreica Aguda atípica (EDA) y la producción en los casos más severos de diarrea secretoria masiva con rápida depleción de fluído extracelular y electrolitos. Es en estos casos de grandes pérdidas digestivas, que una pronta intervención terapéutica es decisiva, ya que estos pacientes pueden llegar en pocas horas a shock hipovolémico y muerte.

El tiempo de incubación puede ser desde 12 horas a 5 días, y si el *Vibrio* sobrevive al pH gástrico (un pH < 2.4 es vibriocidas), penetra la mucosa intestinal, se adhiere a los receptores y se multiplica. En el borde en cepillo el microorganismo produce toxina colérica. Parece que la neuramidasa, producida por el microorganismo, actúa sobre los gangliósidos GT1 y GD1 del intestino transformándolos en GM1 con lo que el número de receptores para la toxina aumenta. Una vez que la toxina está unida al receptor, la fracción A1 se trastoca dentro de la célula, dando como producto final un aumento del adenosin-monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. El aumento de AMPc conlleva a un aumento de la liberación activa de cloro y por ello de bicarbonato y potasio con inhibición de la absorción de sodio por las células intestinales. (Cieza C, 1995)

Un grupo de expertos de la dirección general de epidemiología de México publicó un artículo para la estandarización de un manual de procedimientos para la Vigilancia Epidemiológica de Cólera clasificó las alteraciones fisiopatológicas de la siguiente manera

Alteraciones fisiopatológicas primarias

Deshidratación: La pérdida de agua y electrolitos por vía fecal y vómito ocasiona deshidratación que puede ser leve, moderada o grave. Aquellos pacientes que desarrollan formas severas de la enfermedad y que no reciben tratamiento de reposición hidroelectrolítica desarrollarán choque hipovolémico, acidosis y alteraciones del equilibrio electrolítico. La deshidratación que presenta el paciente afectado por el cólera es isotónica; esto es que la pérdida de agua y electrolitos es similar. (Miranda, 2012)

El organismo responde a la pérdida hidroelectrolítica con diversas respuestas fisiológicas como:

- El aumento de la frecuencia cardíaca
- La redistribución del volumen sanguíneo
- La vasoconstricción periférica y central
- El incremento en la reabsorción renal de agua y electrolitos, y
- El aumento en la secreción de mineral o corticoides y hormona antidiurética.

Alteraciones fisiopatológicas secundarias

Choque hipovolémico: Conforme empeora la pérdida hidroelectrolítica el paciente desarrolla un estado de choque; la tensión arterial cae; el pulso se vuelve filiforme y puede ser indetectable; el sujeto presenta sudoración fría y pegajosa y acrocianosis distal. El paciente exhibe facies hipocrática y puede estar estuporoso o incluso comatoso; es frecuente que manifieste dolor abdominal y en las extremidades debido a calambres musculares. Si el paciente no recibe una adecuada “reanimación” hidroelectrolítica, el estado de choque se profundizará y eventualmente se hará irreversible.

Azoemia prerrenal e insuficiencia renal: La deshidratación provoca que el aporte sanguíneo a los riñones disminuya; la respuesta fisiológica del organismo incluye la secreción de aldosterona con lo que se retiene sodio y agua.

En los estadios iniciales el paciente presenta oligoanuria y a nivel sérico se observa elevación de urea y creatinina. Si la isquemia renal se prolonga se producirá necrosis de túbulos renales distales y el paciente desarrollará una franca insuficiencia renal. (Miranda, 2012)

4.3.1. Cuadro clínico

En un estudio realizado en Cuba explica que existen 4 formas clínicas: Forma asintomática, el paciente actúa como portador, está infectado, pero no presenta manifestaciones clínicas. (Mendez, 2010, pág. 11)

Formas leves: cuadro clínico de un síndrome diarreico que remeda cualquier diarrea de otra causa, con pesadez epigástrica, anorexia, borborigmo, diarrea biliofecal, con algo de moco algún dolor opresivo mesogástrico, pueden aparecer vómitos, cefalea y fiebre no muy elevada, la evolución es favorable y el proceso cura en un periodo de 2 a 4 días.

Forma menos grave: pueden establecerse súbitamente, con trastornos del estado general y numerosas deposiciones líquidas blanquecinas que pueden llegar a ser 20 o más por día; dichas diarreas pueden acompañarse de vómitos biliosos que luego toman un aspecto semejante al de las heces, de cefalea intensa, sed y pulso débil.

Forma grave: se ajusta al cuadro clínico clásico.

4.4.Principales fuentes de contaminación por *Vibrio cholerae*

V. cholerae requiere una dosis de inóculo del orden de 10^6 microorganismos para infectar exitosamente al ser humano. Sin embargo, se sabe que un sujeto enfermo de cólera puede eliminar 10^7 microorganismos por mililitro de evacuación y que puede evacuar hasta 20 litros en un solo día.

Esto significa que un solo enfermo de cólera puede excretar 10^{11} vibriones por día, lo que representa una enorme contaminación potencial tanto para las fuentes de agua como para los alimentos.

4.4.1. Agua

- Debe tomarse en cuenta que la contaminación del agua como consecuencia del arrastre de materias fecales hacia los mantos freáticos y aguas superficiales, no es el único mecanismo por el que *V. cholerae* O1 llegue a dichos cuerpos; también el mal manejo doméstico del agua para beber juega también un papel importante en la transmisión del padecimiento.
- La contaminación ambiental de los cuerpos de agua puede prevenirse mediante la disposición adecuada de las excretas humanas y animales, la protección de las fuentes de agua y la adecuada desinfección.
- Al nivel doméstico es importante educar a la población para la correcta desinfección del agua, sea por medios físicos o químicos; su adecuado almacenamiento y manejo.

En términos generales los casos y brotes asociados a la ingesta de agua aparecen en forma explosiva y están relacionados a una fuente común.

4.4.2. Alimentos

La posibilidad de que los alimentos integren un importante modo de transmisión está cimentada en estos tres elementos:

- La facilidad de contaminación de diversos alimentos con *V. cholerae* O1.
- El potencial de *V. cholerae* O1 para sobrevivir y multiplicarse en los mismos, ocasionando que la dosis de inóculo sea muy grande.

- El efecto amortiguador de los alimentos sobre la acidez gástrica que permite que el microorganismo logre rebasar la barrera gástrica.

Algunas especies de peces pueden contener al *V. cholerae* O1 en sus branquias o en el contenido intestinal pero la forma más frecuente de contaminación de estos productos es a través del manejo inadecuado de los mismos.

Se han identificado a diversos mariscos, en especial los moluscos bivalvos, como alimentos de riesgo para la adquisición del padecimiento si son consumidos crudos o inadecuadamente cocidos.

Desde 1970 se ha reconocido el potencial que tienen los vegetales irrigados con aguas negras y que son consumidos crudos para transmitir el padecimiento.

Se han implicado a otros alimentos en la ocurrencia del padecimiento tales como arroz, agua de coco, puerco crudo, etc. Sin embargo, quizá sea oportuno recordar que el riesgo de que un alimento sea vehículo del *V. cholerae* O1 está dado en función de la acidez del alimento, pero sobre todo por las condiciones que favorecen el crecimiento del microorganismo.

Las condiciones de preparación de los alimentos, su almacenamiento a temperaturas ambientales y su incompleta cocción o recalentamiento son factores que favorecen la contaminación microbiana, incluyendo al *V. cholerae* O1, y la ulterior aparición de casos.

4.4.3. Transmisión de persona a persona

Este modo de transmisión implica la ingesta directa del agente etiológico mediante los dedos contaminados con materia fecal de individuos afectados. En Bangladesh se ha demostrado que las madres jóvenes pueden infectarse de este modo, una vez que han cambiado los pañales de sus hijos infectados y no se han lavado las manos.

Algunos autores refieren la ocurrencia de brotes nosocomiales de la enfermedad, aunque es más frecuente la aparición de brotes de cólera entre los asistentes a banquetes funerarios realizados después de una defunción por cólera.

4.4.4. *Vibrio cholerae* en ambientes

Los patógenos asociados con las enfermedades transmitidas por el agua, como es el caso de la infección por *Vibrio* tiene una gran dependencia de los factores físicos-químicos y biológicos del medio ambiente que van a modular su presencia y abundancia mediante un equilibrio entre crecimiento y depredación. Variaciones en condiciones ambientales y ecológicas del medio van a repercutir sobre la dinámica de este microorganismo favoreciendo o limitando su abundancia y promoviendo la aparición de infecciones cuando las condiciones ambientales permiten alcanzar altas cargas de organismo en alimentos de consumo.

Se ha podido demostrar que cambios en los niveles de temperatura y salinidad del agua de mar tienen una asociación directa con la aparición de brotes infecciosos causados por patógenos de origen acuático en diferente parte del mundo. La salinidad es un factor crítico que regula la distribución de las distintas especies de *Vibrio* en función de afinidad u óptimo osmótico de esta forma se conoce que *V. cholerae* tiene afinidad por aguas más salinas.

Se conoce que la temperatura es un factor fundamental para entender la dinámica poblacional de los *Vibrio*, ya que aumentos estacionales de temperatura del agua de mar induce de forma directa la proliferación de estos organismos en el medio, alcanzando mayores densidades en las épocas de mayor temperatura, siempre y cuando los niveles de salinidad en esas épocas sean los óptimos para su expansión demográfica. Estos factores serán fundamentales para entender la dinámica epidémica y el riesgo de infección por *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Estos patógenos son dosis dependiente en su transmisión ambiente-hombre, lo que significa que deben estar presentes en altos niveles en el medio para ser capaces de causar infección.

Esta estrecha relación, entre el medio ambiente y las epidemias, va hacer que estos patógenos y sus enfermedades sean uno de los más sensibles a los cambios asociados con el calentamiento global. El patrón de calentamiento observado tiene un impacto directo y de gran magnitud en las zonas costeras, causando un calentamiento de aguas a nivel local y un descenso de salinidad debido al drástico cambio del régimen de lluvia. Aguas más templadas

y menos salina generadas por un incremento en las lluvias, proporcionar aun medio ambiente más propicio para la expansión de las poblaciones de *Vibrio* en zonas costeras. Cualquier cambio en el equilibrio ecológico del medio marino, bien causado por fenómenos naturales o debido a la acción del hombre, van a tener un impacto de dimensiones desconocidas en la dinámica población de los *Vibrio* patógenos. Conocer las conexiones entre el medio marino y la aparición de enfermedades nos va a permitir predecir el impacto de estos cambios y anticiparnos a la aparición de los casos de infección, minimizando el impacto epidemiológico de estos importantes patógenos en la población.

4.5. Métodos diagnósticos utilizados para la determinación de *Vibrio cholerae*.

El diagnóstico de *Vibrio cholerae* se realiza a partir de muestras Biológicas y muestras ambientales esto va a depender de la clínica que presente el paciente o del objetivo en estudio.

4.5.1. Métodos convencionales

En el diagnóstico de *Vibrio cholerae* se utilizan métodos convencionales en los que se necesita una etapa de pre enriquecimiento, sub cultivos, siembra en agares, bioquímica etc. sin embargo con el avance de la tecnología se han implementado otros métodos no convencionales los cuales abordaremos más adelante

Los esquemas tradicionales de identificación bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación.

4.5.1.1. Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de muestras biológicas

Las muestras biológicas que se necesitan para el aislamiento de *Vibrio cholerae* son Heces fecales recién evacuadas (líquidas o tipo agua de arroz). Vómitos, hisopado rectal, sangre (suero). Las muestras deben obtenerse en el periodo agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento de antibiótico esto porque si se recolecta después, el crecimiento de las bacterias no se podrá dar y se obtendrían resultados falsamente negativos. (CNDR, 2004, pag 225)

En la recolección de las muestras heces, vómitos, hisopado rectal, sangre (suero) del paciente esta debe ser en un frasco de vidrio o plástico de boca ancha, limpio y seco. Basta coleccionar el equivalente a 1/4 de taza de las deposiciones.

Para el transporte de la muestra se debe transportar en un frasco estéril y de ser posible en un ambiente frío. Si la muestra demora más de 2 horas en llegar al laboratorio, debe transferirse a un medio de transporte de Cary Blair y transportarla a temperatura ambiente la importancia de esto es que de esta forma, el *V. cholerae* permanece viable hasta 30 días a temperatura ambiente. Si la muestra es transportada en medio de transporte Cary Blair introducir 2 hisopos en el medio, uno para procesamiento de cólera y el otro para búsqueda de *Salmonella spp*, *Shigella spp* y *E. coli* O157

El primer medio utilizado para el transporte de muestras para estudios microbiológicos fue el medio de Stuart. En 1964 Cary y Blair describieron un nuevo medio para el transporte de muestras fecales. Los medios de transporte empleados con mayor frecuencia son Stuart, Amies y Carey-Blair. Estos medios son esencialmente soluciones amortiguadoras (buffers) con hidratos de carbono, peptonas y otros nutrientes, sin factores de crecimiento, diseñados para mantener la viabilidad de las bacterias durante su transporte pero sin permitir su multiplicación. Se les agrega tioglicolato de sodio como reductor para mejorar el aislamiento de las bacterias anaerobias y la pequeña cantidad de agar les proporciona una consistencia semisólida que evita la oxigenación y el derrame durante el transporte. (Mendoza, 2014, pág. 2)

El medio de AMIES es una modificación del medio de Cary Blair, que a su vez lo es del de Stuart. Básicamente, cambia el glicerofosfato por un fosfato inorgánico y el azul de metileno por carbón vegetal neutro farmacéutico. Además, añade iones Calcio y Magnesio, que ayudan a conservar la permeabilidad de la célula bacteriana. Permite la supervivencia de muchos microorganismos, entre los que podemos citar a *Neisseria spp.*, *Haemophilus sp.*, *Corynebacterium spp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacterias, spp.*, etc.

Crecimiento en caldo de enriquecimiento agua peptonada alcalina (APA). El enriquecimiento en este caldo favorece al aislamiento de *Vibrio cholerae* cuando hay pocos microorganismos, como en muestras de personas convalecientes y de portadores asintomáticos. Contiene nutriente Peptona, Inhibidor Cloruro de Na, pH: 8.4 a 8.5 su temperatura de incubación 35 -37°C Tiempo de incubación de 6 a 8 horas

Crecimiento en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (tcbs) este medio es utilizado para el aislamiento y cultivos selectivos de *v. cholerae* y otros vibriones entero patógenos (*v. parahaemolyticus*). Está compuesto nutriente, peptonas, sustrato, sacarosa, inhibidores: bilis de buey, indicador de pH: azul de bromotimol y azul timol. Su temperatura de incubación: 35 -37 °C tiempo de incubación: 18-24 horas

Al analizar los métodos y según la opinión de (Cevallos, Guillén, Gamarra & Roque, 2002) Se analizó el tiempo de permanencia de *Vibrio cholerae* O1 en los medios de transporte Amies, Amies con carbón y Stuart. Las heces diarreicas de trece pacientes con síntomas clínicos de cólera fueron recolectadas en dichos medios incluyendo el medio Cary-Blair. Luego de realizar los coprocultivos quincenales de cada muestra, *V. cholerae* O1 fue aislado hasta el día 30 en el medio Stuart ($p = 1.00$), hasta el día 45 en el medio Cary-Blair ($p = 0.0956$) y hasta el día 60 en el medio Amies con Carbón ($p.0.1992$). Estos resultados indican que *V. cholerae* O1 puede ser transportado en los medios evaluados, excepto en el medio Amies. En los restantes medios, *V. cholerae* ha sido recuperado bajo su forma viable y cultivable durante el periodo de estudio.

4.5.1.2. Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de muestras ambientales

Para la detección de *Vibrio cholerae* en muestras ambientales se analizan en alimentos específicamente en vegetales, pescados y mariscos, en agua se analizan muestras de mar, pozo y aguas residuales.

4.5.1.2.1. Agua

El aislamiento e identificación de *V. cholerae* en agua se basa en su rápido crecimiento en condiciones alcalinas en presencia de oxígeno. Normalmente en matrices de agua este microorganismo se encuentra en bajos niveles por lo que se recomienda utilizar

técnicas de concentración. Se ha indicado que, en medio acuático, *V. cholerae* adopta un estado viable pero no cultivable, debido sobre todo a las bajas temperaturas.

4.5.1.2.2. Técnica de cultivo directo

La selección del método depende de la naturaleza de la muestra. Las Muestras de origen marino y estuario que contienen numerosos otros *Vibrios* se recomiendan diluir y utilizar la técnica del Número Más Probable incubándose la muestra a 42°C. Para muestras de agua claras, sin lodo o sedimento y que contienen una baja densidad de *Vibrios* se recomienda la técnica de Filtración por Membrana. Un método para el aislamiento del *Vibrio cholerae* O1 a partir de aguas contaminadas es mediante el uso de una Tórula de Moore en un torrente de aguas servidas por un periodo de hasta 1 semana, seguido por una etapa de enriquecimiento y posterior identificación.

Medio de enriquecimiento

Agua Peptonada Alcalina: La viabilidad de *Vibrio spp.* Se mantiene intacta a pH alcalino y el uso de agua peptonada alcalina ha sido recomendado para incrementar la recuperación de *Vibrio spp.* De materia fecal y de otras muestras.

Medios de cultivos de aislamiento

Agar TCBS (Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa-agar) Es un medio selectivo para el aislamiento de *Vibrio cholerae*. Este medio contiene: peptona de caseína, peptona de carne, extracto de levadura, citrato de sodio, citrato de hierro, cloruro de sodio, tiosulfato de sodio, sales biliares y sacarosa y está disponible comercialmente. Se prepara según las indicaciones del fabricante. No se debe autoclavar, pH 8,6± 0,2 a 25°C. Por su doble indicador (azul de timol y azul de brotimitol) vira al amarillo con pequeñas variaciones de pH por la acidificación de la sacarosa. (Ver tabla.1)

Tabla 1. Medio de cultivo de enriquecimiento y de aislamiento		
Apariencia de colonias	Microorganismo	Desarrollo
Planas de 2 a 3 mm de diámetro, amarilla	<i>Vibrio cholerae</i>	Muy bueno
Pequeñas (azul-verdosa)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Muy bueno
Largas y amarillas	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Muy bueno

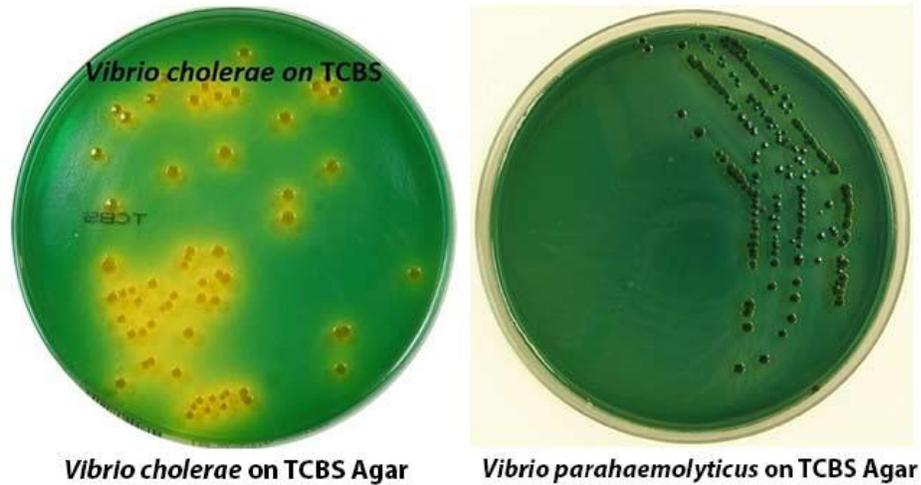


Imagen. 1 Izquierda agar TCBS con colonias características de *Vibrio cholerae*, a la derecha agar TCBS con colonias características de *Vibrio parahaemolyticus*. Fuente: (Fabiola, 2011)

Medios de cultivos de aislamiento adicional

CHROM agar Vibrio: Para el aislamiento y detección de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* colonias de colores diferentes claros e intensos. Gracias a su potente tecnología cromogénica. Fácil de leer, especialmente si se compara con el medio convencional TCBS basado en la fermentación de sacarosa y revelado con un indicador de pH, práctico, *V. alginolyticus* permanece incolora en CHROMagar Vibrio, evitando cualquier interferencia con la detección de otras especies. Diferenciación clara entre *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ambos sacarosa (-) en TCBS, Medio sin igual en el campo de los medios cromogénicos. Recuperación excelente de Vibrio, mayor que con el agar TCBS, incluso si se usa un caldo de enriquecimiento menos falsos negativos que con agar TCBS.

4.5.1.2.3. Técnica del filtro de membrana

Los filtros de membrana son filtros de superficie, que muestran una estructura micro porosa precisa durante la filtración las partículas mayores de los poros de la membrana son retenido de forma fiable en la superficie de la misma. Las partículas más pequeñas pueden pasar con mayor facilidad por el filtro.

La técnica de filtración por membrana es altamente reproducible, puede utilizarse para estudiar volúmenes relativamente grandes de muestra y proporciona resultados numéricos más rápidos que el método de tubos múltiples (APHA, 1992)

4.5.1.2.4. Técnica hisopo de moore

Este método es útil para buscar *Vibrio cholerae* en aguas residuales (domiciliarias, hospitalarias, industriales, de puertos, aeropuertos, plantas de tratamiento de aguas residuales, terminales de buses, etc.) y de aguas superficiales de ríos. (OPDS, 2010)

4.5.1.3. Alimentos

El cólera es una infección intestinal aguda causada por el *Vibrio cholerae* O1 y O139, que se transmite al hombre por la ingesta de agua y alimentos contaminados por este microorganismo. La enfermedad se presenta en personas de cualquier edad y se caracteriza por diarrea abundante y vómito que puede llegar a la deshidratación, la cual puede evolucionar hasta el choque hipovolémico y causar la muerte. Los principales alimentos contaminados por *Vibrio cholerae* son los mariscos, las mojarras crudas, el pescado crudo y el repollo crudo. (LESP de Tabasco 2003)

Aún no se ha desarrollado un buen caldo de enriquecimiento selectivo para *V. cholerae*. Debido a su rápido tiempo de generación, cortos períodos de incubación son efectivos.

APA es un buen medio de enriquecimiento para períodos cortos de incubación, pero en ciertos tipos de muestras la flora competitiva de *V. cholerae* puede crecer en exceso por períodos más largos de incubación. Si el producto ha sido sometido a etapas de proceso como: calentamiento, congelación, deshidratación o bien una baja densidad del microorganismo es esperada, una incubación prolongada es recomendada para una buena resucitación de las células dañadas. Algunos autores como Hwang y De-Paola encontraron que la incubación del enriquecimiento por 18 a 21 h en lugar de 6 a 8 h permite una mayor recuperación de *V. cholerae* O1 cuando bajos inóculos son usados.

4.5.2. Identificación bioquímica *Vibrio cholerae*

Debido a que la confirmación de *V. cholerae* 01 requiere tan solo la identificación de los antígenos del serotipo 01 por aglutinación en lámina, la confirmación bioquímica rara vez es necesaria. En el Cuadro se presenta una breve lista de pruebas bioquímicas que se pueden utilizar para confirmar aislamientos de *V. cholerae*. Si los resultados de las pruebas con un aislamiento son los mismos que se muestran en el Cuadro la identificación del aislamiento se confirma como *V. cholerae*. Sin embargo, si el aislamiento no da los resultados que se muestran en el cuadro, será necesario aplicar pruebas adicionales para la identificación. Ver tabla 2.

Prueba	% positivo
Oxidasa	100
Hilo mucoide	100
Agar hierro de Klige KIA.	Sin gas, sin H, S
Agar hierro de tres azucares NA,	Sin gas, sin H, S
Glucosa' (producción de ácido)	100
Glucosa (producción de gas)	0
Sacarosa (producción de ácido)	100
Lisina	99
Arginina	0
Ornitina	99
Crecimiento en 0% de NaCl b	100
Crecimiento en 1 % de NaCl b	100
Voges-Proskauer'	75'

Nota: KIA = alcalinidad/acidez; AIA = acidez/acidez. Modificada mediante la adición de 1 % de NaCl. En mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* serotipo 01, biotipo EI Tor, dan positiva la prueba de Voges-Proskauer, mientras que las cepas del biotipo clásico la dan negativa.

(Freeyle, 1965, pág. 56)

4.5.2.1. Bioquímica convencional

4.5.2.1.1. Prueba de la oxidasa

La prueba de la oxidasa se lleva a cabo con colonias aisladas recientemente en agar de infusión de corazón (HIA) con plano inclinado 0 en cualquier otro medio que no contenga carbohidratos. No se utilizarán colonias aisladas en agar TCBS. Se colocan dos o tres gotas del reactivo de oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina al 1%) sobre un pedazo de papel filtro en una caja de Petri. En una reacción positiva, el cultivo se torna de color morado oscuro en 10 segundos.

4.5.2.1.2. Hilo mucoide

La prueba de hilo mucoide se puede realizar en un portaobjetos o en una caja de Petri de plástico, donde se suspenden colonias (obtenidas por cultivo durante 18 a 24 horas en agar de infusión de corazón u otro medio no inhibitorio) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%.

Si el resultado es positivo, las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato, con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado de las células lisadas ocasionará que la mezcla se haga viscosa, al retirar lentamente de la suspensión el asa, se forma un "hilo" mucoide

4.5.2.1.3. Agar hierro de Kligler (KIA) o agar hierro de tres azúcares (TSI)

Son medios selectivos que contienen carbohidratos las reacciones de *V. cholerae* en KIA, que contiene glucosa y lactosa, son similares a las de los miembros de la familia Enterobacteriaceae que no fermentan la lactosa (KIA, y no producen gas ni H₂S) TSI, que contiene sacarosa además de glucosa y lactosa, presenta reacciones de A/A y no produce gas ni H₂S.

Los tubos de KIA o TSI con plano inclinado se inoculan mediante picadura y estriación. Los tubos se incuban a una temperatura de 35" a 37 "C y se examinan después de 18 a 24 horas. Las tapas de todos los tubos de las reacciones bioquímicas deben mantenerse poco apretadas antes de la incubación. Si las tapas están demasiado apretadas y existen condiciones anaerobias en dichos tubos, las reacciones características de *V. cholerae* quizá no se presenten y puede ocurrir una reacción inapropiada.

4.5.2.1.4. Carbohidratos

Los caldos de glucosa y sacarosa deben inocularse ligeramente con cultivos recién obtenidos. Los caldos se incuban a una temperatura de 35° a 37°c y se observan a las 24 horas. Si las pruebas de fermentación son negativas a las 24 horas, hay que incubarlo hasta 7 días. Cuando se utiliza indicador de andrade en el medio de cultivo, la producción de ácido se pone de manifiesto por la aparición de color rosado. *V. cholerae* fermenta la glucosa y la sacarosa, pero no produce gas a partir de ellas.

4.5.2.1.5. Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa

Los caldos para las pruebas de arginina, lisina, ornitina y testigo (sin aminoácidos), modificados por la adición de 1% de NaCl, se inoculan ligeramente a partir de un cultivo recién obtenido. Al caldo en cada tubo se agrega una capa superficial de aceite mineral estéril de 4 a 5 mm de espesor. Se incuba a una temperatura de 35° a 37°C y se lee a las 24 y 48 horas, pero si la prueba es negativa se incuba hasta 7 días.

Cuando se utilizan como indicadores el púrpura de bromocresol y el rojo de cresol, una reacción alcalina (positiva) da color morado, en tanto que una reacción negativa o ácida se indica por un color amarillo. La prueba es válida solamente si el tubo testigo permanece negativo (amarillo). *V. cholerae* es típicamente positivo para la descarboxilasa de Lisina. *V. cholerae* es típicamente negativo para la dihidrolasa de arginina, en tanto que *Aeromonas*, *Plesiomonas* y ciertas especies de *Vibrio* son positivos. *V. cholerae* es positivo para la descarboxilasa de ornitina.

4.5.2.1.6. Prueba de Voges-Proskauer

La prueba de Voges-Proskauer que aumenta la sensibilidad con los vibriones. Según esta modificación, en el medio (caldo de Voges-Proskauer con rojo de metilo [MR-VP]) se incorpora 1% de NaCl; además, el reactivo A consiste en 5% de alfa naftol en etanol absoluto, y el reactivo B es una solución de 0,3% de creatina en 40% de hidróxido de potasio (KOH). El microorganismo de prueba se incuba en el caldo de MR-VP durante 48 horas antes de que se agreguen los reactivos A y B. Un color rojo cereza indica una reacción positiva.

4.5.2.1.7. Galería api

La batería de pruebas API20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram (-). Básicamente consta de 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 micro tubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta.

El micro tubos se inoculan con una suspensión de microorganismos, en agua o solución salina, que rehidrata los medios. Las tiras o galerías se incuban a 37°C y por efecto del metabolismo bacteriano se producen cambios de color espontáneos o bien por la adicción de reactivos. La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura donde se indica si los microorganismos deben considerarse positivos o negativos para cada reacción según el color aparecido.

En el caso de los laboratorios que emplean API 20E, el inóculo bacteriano se debe preparar en solución salina 0.85%. Posteriormente, inocular manualmente 50 µl de esta suspensión en cada uno de los pocillos. Para una correcta identificación pueden requerir de la realización de pruebas complementarias, para lo que se recomienda revisar los manuales de la prueba.

4.5.2.1.8. GN/ VITEK2

Las tarjetas de identificación de VITEK2 le permiten analizar e identificar de forma sencilla y segura una amplia gama de organismos clínicamente relevantes. Diseñadas para los instrumentos automatizados, garantizará unos resultados precisos y relevantes de forma rápida.

Ofrecen un avance innovador que es económico, fácil de usar y flexible. Cada tarjeta VITEK2 tiene el tamaño y la forma de un naípe y contiene micro pocillos con sustratos de identificación. Al utilizarse con la familia VITEK2 de instrumentos automatizados, mejoran el flujo de trabajo del laboratorio, su estandarización y el tiempo de resultado. (biomerieux 1999)

4.5.2.1.9. Sistema MicroScan

Es un sistema que permite realizar la identificación y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana simultáneamente, con procedimientos manuales, semi automatizados o automatizados.

Su Principio paneles deshidratados, tipo de lectura colorimétrica de paneles. Identificación de gérmenes Gram positivos y Gram negativos fermentadores y no fermentadores. Variada gama de pruebas bioquímicas: Crecimiento. Cambio de color por disminución de pH. Utilización de sustratos (colorimetría y fluorometría), con un amplio rango de antibióticos en distintas configuraciones, paneles cromogénicos rápidos para la identificación de levaduras, anaerobios estrictos, *Neisseria*, *Haemophilus* en sólo 4 horas. Antibiograma estandarizado. Miniaturización del método de dilución. Interpretado por turbidez. Mayor precisión y especificidad. Valoración mínima de 18 antibióticos por panel (Siemens Healthcare Diagnostics, 2008)

4.5.2.2. Identificación serológica de *V. cholerae* O1 y O139

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación del *Vibrio cholerae* O1 (Inaba, Ogawa, Hikojima) y O139. Las cepas de *V. cholerae*, No O1 también causan enfermedad, pero las cepas O1 están relacionadas con epidemias. Para conservar recursos, el laboratorio puede probar primero con los antígenos somáticos O1 de *V. cholerae* y después, con el antisuero O139 solo en caso de que el aislamiento no dé una reacción de aglutinación positiva con el antisuero O1.

4.5.2.2.1. Identificación presuntiva usando los antisueros O1 y O139

Para la prueba de aglutinación en láminas con los antisueros polivalentes O1 u O139, se debe usar crecimiento fresco con sospecha de ser *V. cholerae* en medio de agar no selectivo. El uso de crecimiento de agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (ATCBS) puede dar una reacción falsa negativa. Después de 5 a 6 horas de incubación, el crecimiento en la superficie de la cuña es casi siempre suficiente para realizar la prueba de aglutinación en lámina con el antisuero; si no, incube por un período más largo. Si el aislamiento no aglutina con el antisuero O1, pruebe con el antisuero O139. Si la reacción con el polivalente O1 o con el antisuero O139 es positiva, el aislamiento puede ser notificado presuntamente como de *V.*

cholerae O1 u O139. Estos aislamientos presuntivos de *V. cholerae* O1 pueden probarse con antisueros monovalentes de Ogawa e Inaba (métodos que se presentarán a continuación). Una vez que una colonia de una placa ha sido identificada como *V. cholerae* O1 u O139, no es necesario seguir probando otras colonias de la misma placa.

4.5.2.2. Confirmación de *V. cholerae* O1 con antisueros Inaba y Ogawa

El serogrupo O1 de *V. cholerae* se ha dividido en otros tres serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima (el cual es muy raro). La identificación de serotipos se hace por aglutinación en antisueros monovalentes por tipo específico de antígenos O. Una reacción positiva con cualquiera de los antisueros Inaba u Ogawa es suficiente para confirmar la identificación de un aislamiento de *V. cholerae* O1. Los aislamientos cuya aglutinación es débil o lenta con el antisuero del serogrupo O1 y que no aglutinan con el antisuero de Inaba u Ogawa, se consideran que no pertenecen al serogrupo O1. La identificación con estos antígenos es válida solamente para los aislamientos del serogrupo O1. Por esta razón, los antisueros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas que son negativas con el antisuero polivalente O1.

4.5.2.3. Identificación serológica de *V. cholerae* O1

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación de *V. cholerae* O1. Aunque para el tratamiento del cólera no es necesario identificar el serogrupo y el serotipo de los aislamientos de *V. cholerae*, esta entonación puede ser de importancia en epidemiología y en salud pública. Ver anexo. 5

4.5.2.3.1. Serogrupo de *V. cholerae* O1

Con base en la presencia de antígenos somáticos o, se ha determinado que existen más de 130 serogrupos de *V. cholerae*. Sin embargo, solo el serogrupo O1 se relaciona con el cólera epidémico y pandémico. Otros serogrupos se pueden vincular con diarrea grave, pero no poseen el potencial epidémico de los aislamientos O1 y no aglutinan con antisueros O1. Es común el aislamiento de *V. cholerae* distinto de O1 en muestras tomadas de fuentes ambientales, a pesar de la ausencia de casos de diarrea.

4.5.2.3.2. Serotipos de *V. cholerae* 01

Los aislamientos del serogrupo 01 de *V. cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (muy raro). La identificación del serotipo se basa en la aglutinación con antisueros dirigidos contra antígenos tipo específicos.

La identificación de estos antígenos es válida solamente con aislamientos de serogrupos 01. Por esta razón, los antisueros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas que son negativas frente a los antisueros polivalentes 01. Los aislamientos que aglutinan débil o lentamente con los antisueros del serogrupo 01 pero no aglutinan con los antisueros Inaba ni Ogawa no se consideran del serogrupo 01.

Las cepas de un serotipo frecuentemente reaccionan en forma cruzada, lenta y débilmente con el antisuero de otro serotipo, lo cual depende de cuan bien sean absorbidos los antisueros específicos para el serotipo. Las reacciones de aglutinación con antisueros Inaba y Ogawa se examinarán de manera simultánea, y la reacción más intensa y más rápida dará la pauta para identificar el serotipo. Si los antisueros están absorbidos adecuadamente, son raras las cepas que aglutinan con una reacción vigorosa e igual con los antisueros Ogawa e Inaba. Si se sospecha de tales reacciones, las cepas se enviarán a un laboratorio de referencia para examen más a fondo, designándolas como "posible serotipo Hikojima".

Tabla 3. Identificación serológica del vibrión cholerae

Identificación serológica del Vibrión cholerae		
<i>V. cholerae</i> serotipo 01	Antisuero Ogawa	Antisuero Inaba
Ogawa	Positivo	Negativo
Inaba	Negativo	Positivo
Hikojima	Positivo	Positivo

Fuente: (Ulloa flores, 2011)

4.5.2.4. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae*

Dado que la resistencia a los antimicrobianos está en aumento en muchas partes del mundo, la importancia del monitoreo de la susceptibilidad de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139 a los antimicrobianos es también creciente. El método de difusión en disco presentado en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido estandarizada cuidadosamente por el NCCLS, 33 y que si se desarrolla estrictamente siguiendo el protocolo que más adelante se detalla, proporcionará datos que pueden realmente predecir la efectividad in vivo del fármaco estudiado. Por tanto, cualquier desviación de los métodos de la prueba puede invalidar sus resultados. Los métodos específicos para determinar los patrones de susceptibilidad de *V. cholerae* se presentan en el manual; no obstante, hay algunos lineamientos generales que cumplir antes de proceder, a saber: analizar los aislamientos desde el inicio del brote; probar los agentes antimicrobianos apropiados; proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública y monitorear periódicamente la epidemia por si surgen cambios en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. (OMS, 2004)

Agentes antimicrobianos recomendados para usar en la prueba de susceptibilidad de aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 y O139 (ver tabla.4)

Tabla 4.

Agentes antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de aislamiento de *V. cholerae*

Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)
Furazolidona
Tetraciclina(a)
Ácido nalidíxico (b)

(a) Los resultados a partir de discos de tetraciclina se usan también para predecir susceptibilidad a doxiciclina.

(b) Si el aislamiento es resistente al ácido nalidíxico, debe someterse a prueba de susceptibilidad a ciprofloxacino, y es probable que exhiba susceptibilidad reducida a dicho antibiótico.

Los agentes antimicrobianos para prueba de susceptibilidad recomendados por la (OMS, 2002) para la prueba de *V. cholerae*

4.5.2.4.1. Método de difusión de disco en agar

Debido a que la resistencia antimicrobiana ha sido un problema que va en aumento en algunas partes del mundo, la sensibilidad de las cepas de *V. cholerae* O1 a los antimicrobianos debe vigilarse periódicamente. Aunque la técnica de difusión de disco es el método más corriente para efectuar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, no se han establecido criterios interpretativos para *V. cholerae* O1 y se desconoce la confiabilidad del método para este microorganismo. Se deben utilizar los métodos de difusión en agar o en caldo para obtener resultados exactos de sensibilidad de *V. cholerae* O1.

Estos criterios, que se han estandarizado para la familia *Enterobacteriaceae*, pueden servir provisionalmente como pautas sobre el tamaño de la zona de inhibición para detectar la resistencia a los antimicrobianos de *V. cholerae* O1 hasta que se validen los criterios de interpretación. Al hacer la selección con el método de difusión de disco, cualquier aislamiento que encaje en la categoría de resistencia o sensibilidad intermedia se debe someter a prueba con un método de dilución para determinar la concentración inhibitoria mínima del fármaco.

Las variaciones en los medios de cultivo, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores influyen en las pruebas de sensibilidad. Para obtener resultados confiables es importante incluir microorganismos testigo con cada prueba y seguir el procedimiento con precisión. Una disminución en la potencia de los discos atribuible al almacenamiento puede ponerse de manifiesto por una disminución en el tamaño de la zona de imbibición alrededor de la cepa testigo.

En un estudio realizado en Lima Perú en 1998 durante un brote epidemiológico con el objetivo de realizar un seguimiento periódico para la vigilancia de cepas resistente se analizaron 32 cepas de *V. cholerae* O1, de las cuales 30 eran Ogawa y 2 Inaba, todas aisladas entre enero y marzo de 1998 y pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM (Ibarra et al., 1999)

Se utilizó el método de Bauer y col. (Bauer et al., 1966). Se emplearon discos comerciales de Ampicilina (A) (10 µg), Cloranfenicol (C) (30 µg), Sulfatrimetoprim (Sx) (25

µg), Tetraciclina (T) (30 µg), Estreptomina (S) (10 µg), Acido Nalidíxico (M) (30 µg), Furazolidone (Fz) (100 µg), Ciprofloxacina (Cip) (5 µg), Doxiciclina (Dxs) (30 µg) y Eritromicina (EM) (5 µg). Se midieron los halos de inhibición en milímetros y la interpretación se realizó según las normas establecidas por el NCCLS para Enterobacteriaceae (NCCLS 1992).

Los aislados fueron cultivados en 10 mL de Caldo Triptosa por 18 h. Luego se centrifugaron a 4500 rpm por 15 min suspendiéndose el sedimento en 1mL de agua bidestilada. Se mezcló 100 µL del cultivo con buffer de carga y se calentó en baño María por 10 min. Las mezclas fueron sometidas a electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) usando geles de 12%. Como marcador de corrida se utilizó una proteína de amplio rango SIGMA (C3437) (Bollag y Edelstein 1991). Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron graficando en papel semi logarítmico las distancias de migración frente a los pesos moleculares de la proteína marcadora (Walker, 1984).

La resistencia a agentes antimicrobianos exhibida por las cepas de *V. cholerae*O1 estudiadas se muestra en la Tabla 1. Los antibióticos frente a los cuales la bacteria muestra mayor resistencia fueron T, Sx y S (12,5%), lo cual indica una diferencia con respecto a lo reportado en 1991, donde se determinó la sensibilidad de *V. cholerae* O1 El Tor Inaba a la mayoría de antibióticos de uso farmacéutico (Tolmos, 1992). Se encontraron 4 cepas multirresistentes, destacando un aislado que presentó resistencia a T S C Sx M y Fz (3,1%). Se hallaron 7 antibióticos siendo los más frecuentes: TSSx y EM (6,3%) (Tabla 2). Estos resultados muestran claramente la necesidad de realizar evaluaciones periódicas del espectro antimicrobiano; los hallazgos coinciden con estudios realizados previamente en Italia y Albania (Falbo et al., 1999).

4.5.3. Métodos no convencionales

4.5.3.1.Pruebas rápidas CHOLERA SMART Y PDK

(Bhuiyan, Qadri, Faruque, Malek, Salam, 2003, pag 7) Permiten llegar a un diagnóstico certero de cólera en poco tiempo, no requieren de instrumental complejo ni de personal técnico altamente calificado y funcionan satisfactoriamente en condiciones de campo. Mediante la estrategia propuesta se pueden aumentar la especificidad y la sensibilidad de estos sistemas y se reducen los costos del diagnóstico, lo que permite recomendar su

empleo para la vigilancia del cólera en áreas con escasos recursos, donde esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública. El desarrollo de métodos diagnósticos rápidos, específicos, sensibles y económicos es de suma importancia para la detección temprana de patógenos como *V. cholerae* O1, ya que no solo permiten suministrar oportunamente el tratamiento específico, sino también iniciar de manera ágil y racional las medidas de control epidemiológico

En un estudio de campo que realizaron (Bhuiyan, Qadri, Faruque, Malek, Salam, 2003,pag 9) se comprobó que los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para el SMART directo en muestras consideradas de alta probabilidad son similares a los informados en el estudio de campo realizado por el International Centre for Diarrhoeal Disease Research en Bangladesh, en el que 22 de las 23 muestras (95,6%) de heces de pacientes con síntomas de cólera fueron positivas, tanto por SMART directo como por cultivo, mientras que las restantes 22 muestras fueron negativas por ambos procedimientos.

4.5.3.2.Pruebas inmuno enzimáticas

(Hernandez, 2015)Las pruebas microbiológicas rápidas actualmente desarrolladas ofrecen la detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos más cortos con metodologías más sencillas, comparadas con las utilizadas tradicionalmente. Con este tipo de tecnología es posible optimizar los recursos disponibles ya que se requiere menos material de laboratorio y escaso personal técnico, lo que trae como resultado una mayor productividad.

En el laboratorio de Inmuno-epidemiología del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba se implementó la técnica de inmuno-fluorescencia directa para la determinación de *Vibrio cholerae* O1/O139 en aguas. Con estos fines se utilizó el paquete diagnóstico para *Vibrio cholerae* O1 y O139 de la New Horizons Diagnostics Corporation, EUA que utiliza un anticuerpo monoclonal específico del antígeno A del lipopolisacárido O1 de la membrana externa del *Vibrio cholerae* O1 (Cholera DFA) y un anticuerpo monoclonal específico de *Vibrio cholerae* O139 conjugado a FITC (Bengal DFA) los cuales han sido conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FICT) para la detección rápida y simple de *Vibrio cholerae* O1/O139 en aguas. La técnica implementada es capaz de

detectar concentraciones de *Vibrio cholerae* O1/ O139 tan pequeñas como 10 000 organismos/ mL.

La mayor ventaja que ofrece el método implementado además de lo rápido del resultado y de la optimización de recursos materiales y humanos, resulta en la posibilidad de detectar la presencia de *Vibrio cholerae* en estado viable no cultivable (VBNC, en inglés, -viable but non-culturable-). Este estado representa una forma que permite la supervivencia de bacterias no formadoras de esporas en un ambiente adverso. En respuesta a situaciones de estrés ambiental en reservorios acuáticos, tales como la salinidad, poca disponibilidad de nutrientes y bajas temperaturas, *Vibrio cholerae* O1/ O139 adoptan este estado que le permite realizar funciones metabólicas y formar colonias, sin que se le pueda cultivar. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, puede revertir al estado cultivable. *Vibrio cholerae* O1 en estado VBNC ha producido síntomas clínicos de cólera en voluntarios, hecho que confirma que mantiene su patogenicidad en el ambiente acuático, aunque las células no sean cultivables.

Algunas bacterias patógenas mantienen su virulencia en el estado VBNC, entre ellas *Vibrio cholerae*. Los métodos convencionales de cultivo resultan inefectivos cuando las bacterias se encuentran en dicho estado. La detección de *Vibrio cholerae* en estado VBNC cobra vital importancia en los períodos inter epidémicos por lo cual la implementación de esta técnica resulta de gran importancia para el desarrollo de la vigilancia ambiental de *Vibrio cholerae*.

4.5.3.3. Aglutinación en látex

Para la detección del microorganismo directamente en muestras fecales, se ha empleado un estuche comercial de aglutinación en lámina (Denka Seiken, Tokio, Japón), preparado para la serotipificación de los aislamientos de *V. cholerae* O1. El estuche utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos A, B y C de *V. cholerae* O1. Durante la investigación de una epidemia de cólera, se valoró la capacidad de dicho equipo para confirmar el diagnóstico de cólera hallado del paciente utilizando hisopados rectales. La prueba de aglutinación en látex detectó 63% de los pacientes con cultivo positivo a partir de hisopados rectales, pero dio resultados positivos

falsos en 12% de los pacientes con cultivo negativo. No se han determinado la sensibilidad ni la especificidad de esta prueba con muestras de heces líquidas

4.5.3.4. Coaglutinación

En el método de coaglutinación, los anticuerpos contra *V. cholerae* O1 se ligan a la superficie de células de *Staphylococcus aureus*, sin perder su capacidad de unión al antígeno ni su especificidad. Cuando la reacción es positiva, las células estafilocócicas se unen entre sí formando una trama reticular debido a la formación de enlaces entre los anticuerpos que se encuentran en su superficie y las células de *V. cholerae*.

Los problemas con la usa de esta técnica se atribuyen a sustancias que se encuentran en las heces y que inhiben, de manera no específica, la aglutinación y la formación de trama o red de células estafilocócicas. Recientemente apareció en el comercio una prueba de coaglutinación basada en anticuerpos monoclonales (CholeraScreen, New Horizons Diagnostics, Columbia, Maryland) que al parecer supera los obstáculos mencionados. Son alentadores los informes de las evaluaciones del producto con muestras obtenidas de cultivos en los Estados Unidos y con muestras clínicas en Guatemala y en Bangladesh

4.5.3.5. Pruebas moleculares

4.5.3.5.1. PCR en el diagnóstico de *v. cholerae*

La aplicación de PCR en el diagnóstico de *V. cholerae* presenta numerosas ventajas, ya que permite:

- Identificar la presencia del microorganismo y/o sus genes asociados a virulencia en muestras clínicas, ambientales y de alimentos (agua, plancton, mejillones). Especialmente útil para detección de formas no cultivables y como tamizaje screening rápido- en el flujograma de aislamiento de formas cultivables de *V. cholerae*.
- Caracterizar rápidamente aislamientos para: confirmar especie, determinar presencia de genes asociados a virulencia y genes que codifican los antígenos somáticos de los serogrupos epidémicos O1 y O139. La identificación de estos últimos genes por PCR es de particular utilidad para la resolución de cepas rugosas, autoaglutinantes o que presentan reacciones débiles con los antisueros. Las etapas de aplicación de PCR para el aislamiento, identificación y detección de serogrupos O1 y O139 y genes asociados a virulencia *ctxA* (codifica la toxina

de cólera) y tcpA alelo El Tor (codifica la proteína estructural de la fimbria TCP, alelo El Tor),

4.5.4. Importancia de las medidas preventivas en la transmisión del cólera

El cólera, enfermedad transmitida por el agua y estrechamente vinculada a la insalubridad de las condiciones ambientales y a la falta de higiene personal, La carencia o escasez de agua potable y de instalaciones inadecuada de saneamiento, contribuyen a la propagación de esta enfermedad.

Las medidas de prevención del cólera consisten principalmente en proporcionar agua salubre para consumo humano la cual deben reunir ciertas características físicas, químicas y bacteriológicas para evitar peligro en la salud de las personas, saneamiento a las poblaciones que todavía no tienen acceso a servicios básicos.

4.5.4.1. Educación higiénica sanitaria

Es un proceso dirigido a promover estilos de vida saludables (hábitos, costumbres, comportamientos) a partir de las necesidades específicas del individuo, familia o comunidad. Desde este punto de vista, la educación sanitaria comprende un conjunto de actividades educativas desarrolladas en procesos formales e informales, que ejecutan permanentemente educación continua.

La educación sanitaria es un componente muy importante para:

- Fortalecer y/o mejorar estilos de vida (hábitos, costumbres y comportamientos) saludables en hombres y mujeres.
- Garantizar el adecuado uso y mantenimiento a los Sistemas de Agua Potable e instalaciones para la disposición de excretas y basuras.
- Promover la organización comunal, de manera que la población asuma un papel más activo en el cuidado de su salud y en la gestión de su desarrollo.
- Ampliar el espacio de relación actual entre la comunidad e instituciones de salud.

Mejorar las condiciones de salud de la población un adecuado abastecimiento de agua y saneamiento en una población con hábitos adecuados de higiene puede reducir en buen porcentaje las enfermedades infecto-contagiosas.

Es de gran importancia recordar los comportamientos higiénicos básicos, como el lavado sistemático de las manos con agua y jabón después de defecar y antes de comer o de manipular alimentos, o la preparación y conservación adecuadas de los alimentos. Protección de alimentos comer sólo comida que haya sido bien cocinada y que esté aún caliente se debe evitar comer verduras o vegetales crudos que no hayan sido desinfectados, Evitar la comida de vendedores ambulantes, Evitar consumo de mariscos crudos.

Los medios de información, como la radio, la televisión o los periódicos, deben participar en la difusión de los mensajes educativos. Los líderes comunitarios también deben participar en las campañas de movilización social. En donde pueden implemente charlas para las medidas de prevención del cólera.

4.5.4.2. Vigilancia epidemiológica

El reforzamiento de la vigilancia particularmente en lugares sobrepoblados, pero también en zonas rurales y en las riberas de ríos y lagos. La alerta temprana también ayuda mucho a detectar los primeros casos y a poner en práctica las medidas de control. En cambio, el tratamiento sistemático de la comunidad con antibióticos (*quimioprofilaxis masiva*) no tiene efectos beneficiosos en la propagación del cólera, sino que puede tener efectos negativos al aumentar la resistencia a los antibióticos y crear una falsa sensación de seguridad.

La vigilancia del cólera debería formar parte de un sistema integrado de vigilancia de enfermedades que incluya la recogida de datos en el ámbito local y el intercambio de información en el ámbito mundial.

La detección de los casos de cólera se basa en la sospecha clínica en pacientes con diarrea acuosa grave y aguda, sospecha que se confirma posteriormente mediante la identificación de *V. cholerae* en las heces de los pacientes afectados.

La capacidad local para detectar (diagnosticar) y monitorear (recabar, compilar y analizar datos) los casos de cólera son fundamental para un sistema de vigilancia eficaz y para la planificación de medidas de control.

Se alienta a los países vecinos a zonas afectadas por el cólera a que refuercen la vigilancia de la enfermedad y la preparación nacional para detectar brotes y responder a ellos en caso de que el cólera se propague más allá de las fronteras.

4.5.4.3. Vigilancia Internacional

Productos alimenticios La OMS no recomienda la implementación de embargos o restricciones similares en el comercio relacionado con los países afectados por brotes de cólera. Los alimentos producidos con buenas prácticas de fabricación presentan un riesgo insignificante de transmisión del cólera y actualmente no hay ninguna prueba de que los alimentos importados comercialmente de países afectados estén implicados en brotes de cólera en los países importadores. Los casos aislados de cólera relacionados con alimentos importados han estado asociados a alimentos que algunos viajeros llevaban consigo. Por consiguiente, se aconseja a los países donde haya brotes de cólera que se cercioren de que los viajeros que salgan del país estén plenamente informados de la recomendación de la OMS de no llevar consigo alimentos que no estén procesados, a fin de ayudar a prevenir la propagación del cólera a otros países. En consecuencia, se desecharán los productos alimenticios no procesados que lleven los viajeros procedentes de lugares donde haya brotes de cólera.

4.5.4.4. Cuarentena y restricciones similares al desplazamiento de viajeros

La OMS no aconseja someter a los viajeros procedentes de zonas afectadas por el cólera a exámenes de detección sistemáticos ni ponerlos en cuarentena. Las restricciones sistemáticas del desplazamiento de personas, entre ellas las medidas de cuarentena y los “cordones sanitarios”, han resultado ineficaces para el control del cólera y, por consiguiente, se consideran innecesarias.

4.5.4.5. Medidas a aplicar como país no afectado

Siguiendo recomendaciones de la OMS para los países que reciben viajeros o flujos comerciales de un área afectada por el cólera

- Mejorar los preparativos nacionales, regionales y locales para responder rápidamente a un brote y limitar sus consecuencias si el cólera se propaga a través de las fronteras.
- Inspeccionar y destruir los productos alimenticios que los viajeros lleven consigo y que puedan estar contaminados.
- Informar a los viajeros sobre los riesgos del cólera, las precauciones para evitar la infección, los síntomas del cólera, y a dónde dirigirse y cuándo si presentan esos síntomas.
- La OMS no considera que exigir un comprobante de vacunación para ingresar a un país sea útil para prevenir la propagación internacional del cólera y, por consiguiente, tal requisito se considera como una interferencia innecesaria en los viajes internacionales.
- La OMS no aconseja exigir la administración profiláctica de antibióticos o comprobante de ello, a los viajeros cuyo destino o procedencia sea un país afectado por el cólera

4.5.4.6. Condiciones ambientales

Está relacionada con todos los factores físicos, químicos y biológicos externos de una persona. Es decir, que engloba factores ambientales que podrían incidir en la salud y se basa en la prevención de las enfermedades y en la creación de ambientes propicios para la salud.

Entre las medidas que se pueden tomar son las siguientes:

- la instalación de sistemas de canalización de agua con tratamiento de aguas (cloración)
- Intervenciones en el ámbito doméstico (filtrado del agua, desinfección solar o química del agua, depósitos de agua seguros)
- construcción de letrinas y sistemas de eliminación de aguas residuales.

Los principales instrumentos para controlar el cólera consisten en: tratar los casos adecuadamente y a tiempo en centros específicos de tratamiento del cólera; ofrecer formación específica sobre el tratamiento de los casos, y en particular sobre cómo evitar las infecciones nosocomiales; disponer de suministros médicos suficientes in situ para el tratamiento de los casos; mejorar el acceso al agua, a un saneamiento eficaz, a la gestión adecuada de los desechos y al control de los vectores; mejorar la higiene, y en particular de la higiene alimentaria y mejorar la comunicación y la información de la población.

Saneamiento ambiental

ACRÓNIMOS		
P	=	Previo a la presencia de casos de Cólera
D	=	Durante la epidemia de Cólera
R	=	Recursos requeridos
A	=	Actividades mínimas que se deben realizar
R	=	responsables de la actividad

- a. Cloro residual libre en toda la red de distribución de los sistemas que ya cuentan con desinfección.
 - P. Mantener el cloro residual mínimo en 0.5 miligramos /litro.
 - D. Aumentar el cloro residual a 0.8 miligramos/litro.
 - R. Personal capacitado para uso de los comparadores de cloro manuales y los equipos de laboratorio portátiles. (Operadores de acueductos de los prestatarios del servicio de agua potable, técnicos de saneamiento ambiental y de calidad de agua.)
 - A. Verificación diaria del cloro residual en los sistemas de distribución y registro de la actividad.
- b. Instalar y operar equipos para desinfección en los sistemas de agua donde hagan falta.
 - P. Reforzar el programa de instalación de clorinadores de agua, instalando en donde no existan.

- Capacitar a técnicos y personal de la comunidad en la operación de los mismos. D. Verificar el funcionamiento correcto de los equipos para la desinfección del agua en los sistemas existentes.
- R. Personal técnico de calidad de agua, nuevos equipos de cloración, insumos y logísticos. A. Verificación diaria de la eficiencia de los equipos.
- c. Aumentar la vigilancia y monitoreo de la calidad del agua potable.
 - P. Definir los parámetros y frecuencia para la vigilancia de la calidad del agua potable.
 - Capacitar personal para reforzar la actividad de muestreo.
 - Adquirir insumos suficientes para el muestreo y reactivos para los laboratorios de análisis de Adquirir insumos suficientes para el muestreo y reactivos para los laboratorios de análisis de agua.
- Agua.
 - D. Ejecutar la vigilancia de acuerdo a lo programado en la fase previa (monitoreo y registro). R. Personal técnico para muestreo, personal de laboratorio, insumos para muestreos y transporte expedito.
 - A. Ejecutar muestreos y exámenes de acuerdo a lo programado.

4.5.4.7. Protección de alimentos

Fortalecer las buenas prácticas de manipulación de los alimentos y condiciones higiénicas sanitarias de los establecimientos procesadores y expendedores de alimentos.

Plan de higiene de los alimentos en locales comerciales

- a. Matanzas de urgencia en área de difícil acceso y sin agua y donde no hay matadero.
 - El médico veterinario deberá exigir que los carniceros mantengan una buena limpieza y desinfección de su área de trabajo.
 - La desinfección de acuerdo a la exigencia del MINISTERIO DE SALUD, en prevención de cólera, y se aplicará cloro a superficie a una concentración de 200 ppm.
 - El agua a utilizar se le aplicará cloro al 5.25% a razón de ½ botella en ½ tanque de agua.
- b. Recomendación higiénica para los restaurantes de hoteles:
 - Inspección diaria del médico veterinario del Centro de salud.

- Educación mediante charla a los cocineros y ayudantes de cocina – prevención de enfermedades.
 - Mantener la comida a temperatura de 65° - 70°C (baño María).
 - Los rellenos de carne de cerdo deben tener una temperatura de 66°C.
 - A los manipuladores de alimentos se les exigirá cumplir con medidas higiénicas de lavarse las manos frecuentemente durante la jornada de trabajo.
- c. Medidas de higiene en el mercado de abasto
- Toda legumbre y frutas deberán limpiarse con agua potable exponiéndola durante 3 (tres) minutos.
 - Las legumbres deberán pasarse por una solución de desinfectante y dejar en reposo por tres minutos; colocarse en superficies limpias.
 - Prohibir el uso de toalla humedecidas con agua para transmitir frescura.
 - El manipulador tiene que cumplir con las medidas higiénicas personales, lavarse las manos frecuentemente y uso de vestimenta apropiada.
 - Charla a las manipuladoras de alimentos.
 - Inspección y vigilancia diaria para corregir las faltas sanitarias.
- d. Medidas de higiene para mercados de mariscos, granjas acuícolas, Puerto de Vacamonte y otros.
- Limpieza y desinfección con cloro comercial al 5.25% de todos los módulos antes y después de trabajo.
 - Lavar con agua y jabón las manos de los manipuladores.
 - Adicionar cantidad suficiente de hielo al marisco que está a la venta.
 - Limpiar y desinfectar el cuarto frío con solución de cloro al 5.25% a razón de una botella pequeña en 50 galones de agua.
 - Cuidar que el hielo que se elabora sea con agua potable.
 - Recogido de la basura dos veces al día y evitar proliferación de moscas.

V. Diseño metodológico

5.1. Tipo de estudio

Se realizó una investigación documental sobre el diagnóstico microbiológico de *Vibrio cholerae*, basado en la consulta de documentos, libros, revistas, páginas web, artículos, cuyo compromiso es analizar de forma descriptiva y explorativa un tema.

5.2. Área de estudio

Área de bacteriología, aguas y alimentos, uno de los aspectos de bacteriología es el estudio de bacterias y la detección de estas a partir de métodos convencionales y métodos no convencionales como los métodos moleculares que están relacionados con el tratamiento y la prevención de las enfermedades causadas.

5.3. Recolección de la información

La información fue recolectada de fuente secundaria, se utilizaron publicaciones de páginas web, revista científica, libros, seminarios relacionados con esta bacteria, una vez revisada la información recolectada se organizó la información y se esquematizó todo el material documental útil para cumplir con los objetivos planteados en dicha investigación.

5.4. Instrumento de recolección

Para la recolección de la información se realizó un bosquejo del sub tema acorde de los objetivos planteados para proceder a la búsqueda y análisis de la información.

5.5. Presentación de la información

La información fue procesada en el programa Microsoft Office Word 201, para la presentación del trabajo se utilizó el programa Microsoft Power Point 2016.

5.6. Ética y confidencialidad de los datos

Para la realización del estudio no se utilizó ninguna técnica de recolección o intervención o modificación que afecte directamente a una persona u organización, ni que violaran los principios éticos en investigación.

VI. Conclusiones

1. *Vibrio cholerae* es un género de bacterias Gram negativas, perteneciente al orden de los Vibrionales, de las gamma-proteobacterias, con forma de bacilos curvados. Posee factores de virulencia como adhesinas poseen Pili TCP, co-regulados con la toxina, Antígeno somático O, un pirógeno del lipopolisacárido, antígeno H, del flagelo. Bioquímicamente se caracterizan por dar positivo en las pruebas de la catalasa y de la oxidasa, también dan negativo en la adenina dihidrolasa, y positivo en la ornitina descarboxilasa. *Vibrio cholerae* concretamente es sacarosa, manitol positivo y nitrato reductasa positivo.
2. Las principales fuentes de contaminación por *Vibrio cholerae* juega un papel importante, Debe tomarse en cuenta la contaminación del agua como consecuencia del arrastre de materias fecales hacia los mantos freáticos y aguas superficiales, La facilidad de contaminación de diversos alimentos con *V. cholerae*, la ingesta directa del agente etiológico mediante los dedos contaminados con materia fecal de individuos afectados y la estrecha relación, entre el medio ambiente y las epidemias, va hacer que estos patógenos y sus enfermedades sean uno de los más sensibles a los cambios asociados con el calentamiento global.
3. En el diagnóstico de *Vibrio cholerae* se utilizan métodos convencionales dentro de los cuales tenemos las pruebas bioquímica, técnica de filtro de membrana, en los que se necesita una etapa de pre enriquecimiento, sub cultivos , siembra en agares, bioquímica etc. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección permite el aislamiento del microorganismo implicado su identificación, sin embargo con el avance de la tecnología se han implementado otros métodos no convencionales dentro de los cuales sobre salen la PCR, pruebas inmuno enzimáticas, entre otras. Estos métodos permiten llegar a un diagnóstico certero de cólera, las pruebas microbiológicas rápidas actualmente desarrolladas ofrecen la detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos más cortos con metodologías más sencillas, comparadas con las utilizadas tradicionalmente. Con este tipo de tecnología es posible optimizar los recursos disponibles ya que se requiere menos material de laboratorio y escaso personal técnico, lo que trae como resultado una mayor productividad.

4. Las Medidas de prevención y control son fundamentales el saneamiento básico (provisión de agua segura y eliminación sanitaria de excretas) y la educación para la salud referida a los hábitos higiénicos personales y en la manipulación de alimentos.

VII. Bibliografía

- (Cholera Screen®, Bengal Screen®, Cholera SMART®, Bengal SMART®). . (2010).
Centro Nacional de referencia en Bacteriología del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Salud. (1996). pruebas Rápidas Cólera SMART y Sistema PDK.
- Cieza C, J. (1995). Fisiopatología de los trastornos hidroelectrolíticos y del equilibrio ácido base.
- Diagnostico%20y%20confirmacion%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf
- Fernandez. (2009). Colera y *Vibrio cholerae*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Range*.
- Freyle, J. (1965). Clasificación de *Vibrio Cholerae*. *J,Bacteriol*.
- Hernandez F & Menocal, L. (2015). implementación de la técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de *V. cholerae* en agua.
- Hernandez, H. &. (2015). Implementación de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de *V. cholerae* en muestras de agua.
- https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Muestreo_ambiental_V_cholerae.pdf?ua=1
- <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Revision%20de%20procedimientos%20de%20deteccion%20de%20Vibrio%20cholerae.pdf>
- <https://www.redalyc.org/pdf/487/48710206.pdf>
- <http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/LabV/API/api.html>
- http://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza_documentos/taller_colera/conferencias%20taller%208-11-2013/4-
- <https://www.ins.gov.co/buscador,eventos/Informacion%20de%20laboratorio/Guía%20para%20la%20vigilancia%20por%20laboratorio>
- https://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHOCDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf

Javier, C. Z. (1995). Fisiopatología de los trastornos hidroelectrolíticos y del equilibrio ácido-base, en la diarrea aguda coleriforme.

Mendez. (2010). El colera una enfermedad prevenible.

Miguel, Z. p. (2013). EL CÓLERA, UNA ENFERMEDAD PREVENIBLE. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA . *Red ENSI* .

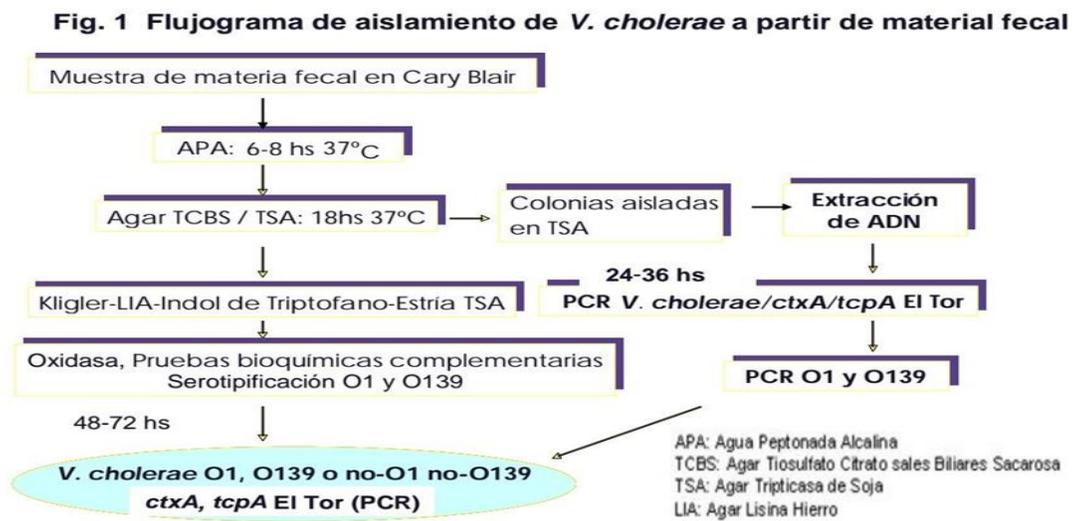
Miranda, P. (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Cólera. 17.

Romero F, C. M. (Julio 2013). PCR en tiempo real para la detección de *Vibrio cholerae* en aguas superficiales procedentes de balnearios públicos de Nicaragua.

Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología ISBN en trámite. (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Cólera.

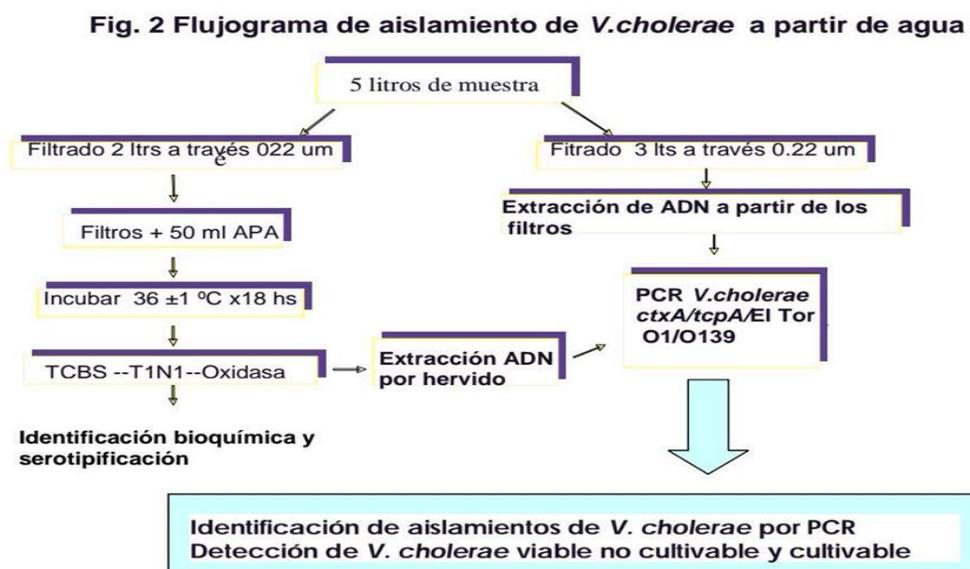
Anexos

Anexo 1. Flujoograma 1. Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de materia fecal.



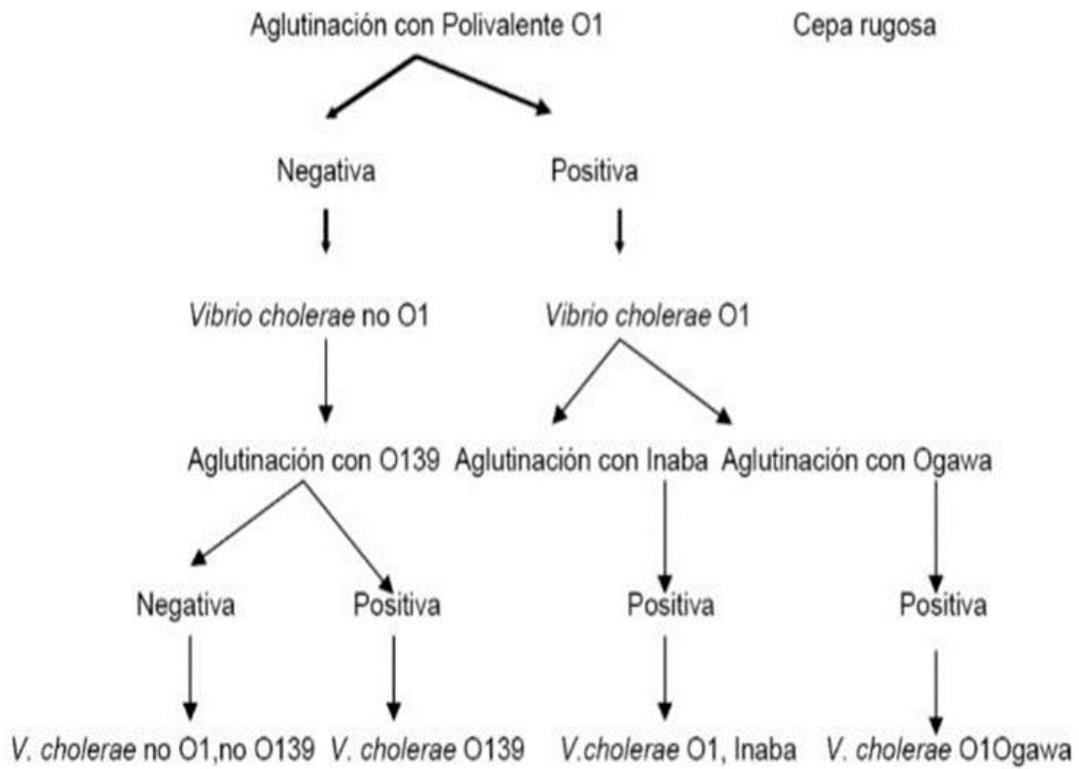
Fuente: (INDEI, 2010, pag.12)

Anexo 2. Flujoograma 2. Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de agua



Fuente: (INDEI, 2010, pag.12)

Anexo 3. Flujoograma 3. Identificación serológica para *Vibrio cholerae*



Fuente : (Ulloa flores,2011)

Anexo 4. Identificación bioquímica de *Vibrio cholerae*

Figura 1.

<p>Producción de indol</p>	 <p>Positivo:</p>	<p>99</p>
<p>Rojo de metilo</p>	 <p>Positivo:</p>	<p>75</p>
<p>Arginina deshidrolasa</p>	<p>Negativa</p>	<p>100</p>
<p>Lisina descarboxilasa</p>	<p>Positiva:</p>	<p>99</p>
<p>Ornitina descarboxilasa</p>	<p>Positiva: izq</p>	<p>99</p>

Figura 2.



Figura 3. Reaccion descarboxilasa y dihidrolasa cuando hay fermentación aparece el color rosado, en las reacciones negativas es amarillo.

