

***Vibrio cholerae* 01 fenotipos y genotipos México**

Silvia Glono C.*,** Lucina Gutiérrez Cogno,* Guadalupe Rodríguez Angeles,** Aurora del Río Zolezzi,* José Luis Valdespino González,* Jaime Sepúlveda Amor***

Resumen

Se caracterizaron 26922 cepas de *Vibrio cholerae* aisladas en México de 1991 a 1993, el patrón fenotípico demostró que 100% pertenece al biovar El Tor y fueron sensibles a los antibióticos, excepto a la furazolidona, la estreptomycin y el sulfisoxazol probados en 1993. Se empleó como marcadores epidemiológicos al 97% de las cepas que fueron resistentes. Se observó un cambio drástico en la frecuencia de los serotipo Inaba; en 1991 el 99.5% de las cepas fueron Inaba mientras que para 1992, el 95.0% fueron del serotipo Ogawa. Todas las cepas 01 excepto una Ogawa, fueron toxigénicas, y las no 01 dieron negativa la prueba de ELISA. PCR y los cultivos celulares para investigar toxina colérica. Los ribotipos correspondieron en su mayoría al patrón 5, un lote pequeño a la 6a y dos al ribotipo 12. En este estudio se buscó el ribotipo 2, que se ha relacionado con las cepas aisladas del Golfo de México entre las cepas hemolíticas, pero hasta ahora no se ha identificado ninguna cepa con dicho patrón. Para estudios fenotípicos y genotípicos en apoyo al análisis epidemiológico de la enfermedad, es conveniente continuar haciendo el cultivo en una fracción de las muestras para recuperar cepas puras, aunque se utilicen pruebas rápidas para el diagnóstico de cólera.

Palabras clave: Cólera, *Vibrio cholerae*, biovars, resistotipos, ribotipos y PCR.

Summary

This paper presents the phenotypical and genotypical characterization of 26922 *Vibrio cholerae* 01 strains isolated in Mexico from 1991 to 1993. All strains isolated were El Tor biovar. Strains were sensitive to antibiotics excluding furazolidone, streptomycin and sulfisoxazole to which we found resistance in 97% and we are using this characteristic as epidemiological markers. We detected a marked change in frequency of Inaba serotype from 1991, when it was dominant, with 99.5%, until 1992 when Ogawa serotype turned to be dominant with 95% of isolates. All *Vibrio cholerae* 01 strains, except one Ogawa strain, were to be toxigenic, and *V. cholerae* 01 were not toxigenic by ELISA, PCR and cell culture tests. Dominant ribotype was 5, but we found some strains with 6a pattern and two with ribotype 12. We are searching for ribotype 2 among hemolytic strains in order to learn if there is any relation to Gulf Coast strains prevalent in the USA, but until now we have not found any *V. cholerae* ribotype 2 in our isolates. Even if rapid tests are recommended for immediate diagnosis of cholera, it is necessary to continue bacterial isolation in order to have strains for phenotyping and genotyping studies that may support epidemiological analysis.

Keywords: Cholera, *Vibrio cholerae*, biovar, resistotypes, ribotypes and PCR

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas INDRER SSA

* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

** Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo.

Vibrio cholerae es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Vibrionaceae* descrita por Veron en 1965, que incluye báculos móviles por flagelos polares oxidasa positivos, que utilizan la glucosa con producción de ácido pero no de gas, en la que se incluye a la especie *Vibrio cholerae* descrita por Pacini en 1854¹ y más tarde confirmada por Koch, en 1884.²

Habitat

Se encuentra en la materia fecal de individuos enfermos de cólera en la etapa aguda y en el período prodrómico de la enfermedad y permanece durante dos o tres semanas. Hay pocos casos descritos de portadores crónicos. Se adapta fácilmente a crecer en aguas negras de donde se puede aislar mediante el empleo de hisopos de Moore;³ permanece en *habitats* acuáticos con baja salinidad, de 5-700 mM y en agua dulce contaminada con materia orgánica.¹

La viabilidad de *Vibrio cholerae* en alimentos es variable, dependiendo del grado de contaminación, de la temperatura de almacenamiento y del pH alcalino de 9.0.⁴

Transmisión

El hombre es el hospedero natural de *Vibrio cholerae*. El cuadro clínico es diferente debido a las variaciones en la relación huésped-parásito, pero el medio ambiente juega un papel importante, ya que la transmisión hombre-medio ambiente-hombre es la que prevalece.⁵ El agua, los alimentos y las manos sucias suelen ser los vehículos más importantes en la transmisión.

Un grupo de investigadores asegura que la bacteria permanece "viable y no cultivable" en el ambiente, en donde se ha detectado por técnicas de inmunofluorescencia directa.⁶

Los mariscos crudos o mal cocidos procedentes de aguas contaminadas pueden también participar en la transmisión.^{7,8}

Diagnóstico

Hay síntomas premonitorios asociados al cólera como anorexia, malestar abdominal y diarrea líquida. Las evacuaciones al principio son de color

café y poco a poco adquieren consistencia más líquida y pierden color hasta aparecer como "agua de arroz"; no hay fiebre ni tenesmo, a menudo se acompaña de vómito y pérdida de 10 a 15% de peso corporal.⁹

El diagnóstico de laboratorio (desde un punto de vista microbiológico), se hace mediante el aislamiento e identificación de la bacteria presente en la materia fecal.⁴

Enfermedad

Vibrio cholerae es el agente etiológico del cólera, infección gastrointestinal aguda que puede producir la muerte en pocas horas, debido al alto grado de deshidratación que produce. Si el enfermo se atiende oportunamente, la mortalidad baja de 1 a 2%.²

Epidemiología

La historia de las epidemias de cólera en el mundo, revela que estamos atravesando por la séptima pandemia. Las fechas aproximadas que se dan varían según los autores.²⁻¹⁰

En 1989 se vieron afectados 35 países y hubo brotes en zonas rurales de China. Algunos casos esporádicos ya se habían registrado en el hemisferio Occidental incluido Estados Unidos y Australia.¹⁰

Los casos autóctonos en los Estados Unidos se observaron en 1973, cuando se registró un caso de *Vibrio cholerae* 01 serotipo Inaba en Port Lavaca, Texas, aparentemente de origen desconocido y persistió esporádicamente hasta 1978.¹¹

En 1981 se informó de un brote por la misma cepa en 16 personas y otros, asociados al consumo de mariscos crudos provenientes del Golfo de México.⁷

En México se cree que la enfermedad llegó procedente de Europa en 1832, con los inmigrantes infectados y viajó por todo el territorio hasta Juchitán, en donde se reportó el último caso en 1883.¹² En 1983 se informó de una turista estadounidense que viajó a Cancún, México y de la que se aisló *V. cholerae* 01 Inaba toxigénico en heces. En el estudio epidemiológico sólo se encontró 16% de *Vibrio cholerae* 01 en medio ambiente, pero no fue posible aislar la cepa 01 toxigénica.¹³

Desde enero de 1991 se informó de casos de cólera en Perú, mismos que rápidamente se diseminaron a otros países de Latinoamérica, con algunos casos importados de Sudamérica.¹⁴

El 12 de junio de 1991 se confirmó el primer caso de cólera en San Miguel Totolmaloya, Municipio de Sultepec en el Estado de México. A partir de esa fecha casi todos los estados de la República Mexicana han presentado casos de cólera con aislamiento positivo.¹⁵

En 1991 en Georgia, Estados Unidos hubo un brote asociado al consumo de carne de cangrejo, transportada ilegalmente de Sudamérica.¹⁶

Desde 1991 el INDRE participa en los estudios de aislamiento y caracterización de cepas de *Vibrio cholerae* 01 tanto en pacientes, como de medio ambiente, en apoyo a las actividades de prevención y control de la Dirección General de Epidemiología, por medio de la Red Nacional de Laboratorios de Cólera para apoyar el diagnóstico, el adiestramiento y la certificación de los aislados de todo el país.⁴ Además se realizan estudios serológicos de cólera incluyendo la determinación de anticuerpos vibriocidas y antitoxina,^{4,17} cuyos resultados no se incluyen en esta publicación. En este trabajo presentamos los resultados de la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *Vibrio cholerae* 01 aisladas en México.

Material y métodos

Se establecieron las normas para el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* 01, con muestras de materia fecal y otras de origen humano y ambientales como las de aguas negras (Figura 1), aguas blancas y alimentos.⁴

El aislamiento se hizo previo enriquecimiento en medio de agua peptonada alcalina pH 9.0, incubada a 37° C durante 8 h, y resiembra en medio selectivo TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) con 18 - 24 h a 37°C.^{4, 8, 19} Las colonias amarillas características, se seleccionaron para identificarlas en medios diferenciales: TSI, agar de triple azúcar, LIA, medio agar lisina hierro, MIO agar para movilidad, indol, y descarboxilación de la ornitina y caldo tripton para verificar la producción de indol.⁴

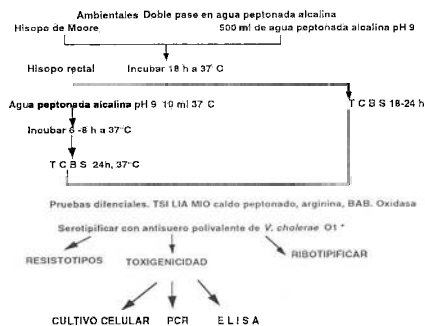


Figura 1. Aislamiento de *V. cholerae*.

La diferenciación microbiológica de *Vibrio cholerae* de otras especies relacionadas, se hizo de acuerdo con Giono y cols.⁴ y Kelly y cols.¹⁸

La caracterización fenotípica se inició con la identificación del género y especie y continuó con la identificación serológica que en este caso se hizo con antisuero polivalente 01 anti-*Vibrio cholerae* y sueros específicos para la identificación de los serotipos Inaba y Ogawa, preparados en el INDRE con los determinantes antigénicos correspondientes.^{4,20} Se incluyó también la determinación de biovars que clasifica a *V. cholerae* en biovar clásico y biovar o biotipo El Tor (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferenciación de los biotipos clásicos y elector de *V. cholerae* serogrupo 01

Prueba	Biotipo Clásico	El Tor
Aislado en Continente Asiático	Ocasional	Común
Aislado en el resto del mundo	muy raro	común
Pruebas diferenciales:		
hemólisis de eritrocitos	-	+
Voges-Proskauer	-	+
Inhibición con Polimixina B (disco con 50 U)	+	-
Aglutinación con eritrocitos de pollo	-	+
Lisis por bacteriófago:		
Clásico IV	+	-
FK	+	-
El Tor 5	-	+
Serotipos	Antígenos	
Ogawa	AB	
Inaba	AC	
Hikojima	ABC	

Tomado de: Kelly, Lickman-Brenner and Farmer, Ch 27 p.384-395. In Manual of Clin. Microbiol. 5a. Ed. 1991. Balows et al A.S. M[®]

La hemólisis se probó inicialmente en medio de gelosa con sangre de carnero al 5N (BAB) incubado a 37°C por 24 h en atmósfera parcial de CO₂; las cepas hemolíticas se verificaron mediante la prueba de hemólisis en tubo con eritrocitos humanos al 2% en presencia de glicerol.¹⁹

Además se incluyó el estudio de resistotipos empleando el método de Kirby-Bauer⁴ y los antibióticos: tetraciclina (T), doxiciclina (D), eritromicina (E), ampicilina (Am), cloranfenicol (CM) y trimetoprim con sulfametoxazol (TM/SMT). Un lote se seleccionó para la prueba de concentración inhibitoria mínima (CMI), utilizando replicador de Steers.⁴ En 1993 se agregó furazolidona, estreptomina y sulfisoxazol.

En un grupo se probó el efecto citotónico y citotóxico en células Vero y CHO de filtrados de cultivos.¹⁹ El ensayo de la producción de toxina colérica (CT) se hizo por la técnica de ELISA a partir de filtrados en medio de Craig.²⁰

El genotipo se hizo mediante la prueba de PCR, que utiliza dos iniciadores *ctx* 2: CGG GAT TCT AGA CCT CCT en posición 73 a 94 *ctx* 3: CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC en posición 614 - 636, que amplifica un fragmento de 569 pb del gene *ctx* A en un lote seleccionado de *Vibrio cholerae* 01 y no 01, siguiendo la técnica descrita por Fields y cols.²¹ utilizando el termociclador Techne PHC-2.

Actualmente la ribotipificación es un método de biología molecular que se emplea con fines taxonómicos para obtener el patrón genotípico de las cepas.²² Originalmente se utilizaba el patrón polimórfico de los fragmentos de DNA o RNA tratados con enzimas de restricción RFLPC.²³ Se seleccionaron cepas hemolíticas²⁴ y las primeras cepas Ogawa para la subtipificación de *Vibrio cholerae* o ribotipificación, que se hizo siguiendo la técnica descrita por Popovic y cols.²⁵ Para analizar fragmentos de DNA en estas cepas, obtenidos mediante tratamiento con enzimas de restricción, las cuales se transfirieron a una membrana e hibridaron con una sonda, misma que selecciona las secuencias complementarias, se puede emplear rRNA, ya que es altamente conservado durante la evolución y revela los fragmentos de DNA que presentan esa secuencia, así se obtienen 7 - 12 bandas que pueden analizarse y agruparse mejor. La especificidad de los fragmentos se

evidencia con sondas, utilizando la técnica de Southern Blot.¹⁸

Resultados

El Cuadro II señala el número de cepas de origen humano procesadas en 1991, 1992 y 1993. Estas cifras no son representativas de los casos de cólera, ya que se incluye un porcentaje parcial enviado al INDRE para la certificación por parte de la Red Nacional de Laboratorios de Cólera y las cepas aisladas de muestras de casos y/o contactos enviados por la Dirección General de Epidemiología (DGE). Todos los resultados fueron procesados en una base de datos.

Los serovares se presentan en donde se observa una variación evidente del serotipo Inaba presente en 99.5% para 1991, al serotipo Ogawa que prevaleció en 95.0% de las cepas de 1992.

Los biovars o biotipos estudiados correspondieron 100% al biotipo El Tor, y se observaron algunas variaciones en la prueba de Voges Proskauer y en la hemólisis. Se destaca que gran parte de esta cepas provenían del Golfo de México²⁶ (Campeche, Puebla y Veracruz). Hay que señalar que las cepas de *Vibrio cholerae* No 01 son hemolíticas, y esta característica se puede utilizar en el laboratorio para separar del total de Vibrios No 01, la cepa *Vibrio cholerae* No 01 perteneciente al serotipo 0139, que apareció en Asia en 1993, y cuya entrada probable a México está siendo objeto de vigilancia por el INDRE, sobre todo en zonas costeras.

Los resistotipos se presentan en el cuadro II. Vale la pena señalar que la resistencia a furazolidona, estreptomina y sulfisoxazol, se observó en 1993 en más del 97% de las cepas.

La expresión de la toxina en caldo de Craig se verificó en el 100% de las cepas, con la técnica de ELISA, y se confirmó mediante la técnica de PCR; así mismo en el ensayo de la actividad biológica en cultivos celulares CHO y VERO se observó que 95% presentó efecto citotónico y 5% efecto citotóxico; esto hace pensar que además de la toxina colérica CT que produce efecto citotónico, es probable que existan otras citotoxinas que deben estudiarse.²⁶

La caracterización genotípica con base en los estudios de biología molecular, confirmó que las cepas de *Vibrio cholerae* 01, abrigan en su genóforo la información para la producción de CT, y por ende dan positiva la prueba de PCR y las cepas que serológicamente son negativas para el sero-tipo 01 y que lógicamente corresponden al género *Vibrio cholerae* No 01, dieron negativa la prueba PCR para CT, aunque en la prueba en cultivos celulares algunas fueron citotóxicas.

Los ribotipos se presentan en el Cuadro III, en donde se observa el patrón de la ribotipificación que se obtuvo en 11 cepas probadas, uno del estado de Guerrero, dos del Estado de México, seis procedentes de Hidalgo y dos de Quintana Roo. Como controles se emplearon cepas proporcionadas por

la doctora K. Wachsmuth del CDC de Atlanta, Ga. Se observa que los ribotipos fueron 5, 6a y 12, éste último correspondió a dos cepas aisladas en Cancún en 1983 y correlacionó con el ribotipo 12 en donde se incluye a un grupo de cepas de *Vibrio cholerae* No 01.²⁵

Discusión

La eficacia en la recuperación de *Vibrio cholerae* depende del momento en que se tome la muestra, ya que durante el período prodrómico y durante la fase de estado, la bacteria está presente en gran número en las muestra fecales en la mayoría de los casos, observando que en los primeros brotes la

Cuadro II. Aislamiento de *Vibrio cholerae* en México

Cultivos y cepas procesadas			V.cholerae 01		Vc No. 01		Inaba		Ogawa		β hemolíticas	
No.	%		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
1991	13808	26.4	1015 +3735 ^{***}	17.6	NR [*]		4727	32.2	23	0.2	103	2.17
1992	18345	35.1	11706	43.5	385	51.5	9422	64.2	2268	18.5	343	2.9
1993	20027	38.4	10466	38.9	363	48.5	519	3.6	9947	81.3	79	0.75
Total	52180	100	26922	100	748	100	14668	100	12238	100	525	2.0

^{**} Capturado en libreta

^{*} Hikojima 16(0.1%) aislada en 1992

Cuadro III. Ribotipos obtenidos en cepas mexicanas

Cepas No.	Estado	Año	Fuente	Bio/Ser	Ribotipo	Elisa	PCR
C7331	Edo. de México	7/91	Humano	E/I	5	+	+
C7343	Guerrero	7/91	Humano	E/I	5	+	+
C7354	Edo. de México	7/91	Agua	E/I	5	+	+
C7479	Hidalgo	8/91	Humano	E/I	5	+	+
C7727	Hidalgo	9/91	Humano	E/I	5	+	+
C7846	Hidalgo	/91	Humano	E/I	5	+	+
C8344	Hidalgo	4/92	Humano	E/O	6a	ND	+
C7486	Hidalgo	8/91	Humano	E/O	6a	+	+
C7496	Hidalgo	8/91	Humano	E/O	6a	+	+
CM 91-3	Quintana Roo	9/83	Agua Negra	E/O	5		
CM 157-4	Quintana Roo	9/83	Agua Negra	No 01	12		

recuperación de *Vibrio* de casos con sintomatología, fue de un 100%; sin embargo, en población abierta cuando se hacía una búsqueda intencional de casos y en contactos, tuvieron o no síntomas, era de un 25 a 30%. Este valor relativo se atribuye a que no todos los individuos habían estado en contacto con la bacteria o ya habían sido infectados antes. Los casos clínicos observados con cultivo negativo, muchas veces fueron atribuibles a que la muestra se obtuvo después de haber administrado antibióticos, con frecuencia se usó vibramicina en una sola dosis, que es suficiente para negativizar algunos cultivos.²⁴ Otro aspecto importante es seguir una metodología que permita el aislamiento no sólo de *Vibrio cholerae* sino de otros agentes causantes de diarreas secretoras; hay que hacer notar que en aquellas áreas en donde ya se tenían documentados casos de cólera, se obtenía cultivo positivo aun en casos asintomáticos, y cuando la materia fecal era semiformada o semi líquida. La búsqueda dirigida de anticuerpos vibriocidas y antitoxina reveló que había existido, en algunas áreas, circulación amplia de la bacteria; por lo general, al principio, apareció en las aguas negras y poco tiempo después o casi simultáneamente, se presentaron los casos, permaneciendo en el ambiente aun cuando los casos clínicos ya no se presentaban en la zona.

El estudio fenotípico de *Vibrio cholerae* 01 basado en las variaciones fenotípicas de las pruebas metabólicas, se hizo desde Heiberg en 1935, considerando la fermentación de manosa y sacarosa, así como la aglutinación con suero específico *anti-Vibrio cholerae* 01; Gardner y Venkataram, también lo utilizaron agregando varios azúcares, y luego Kauffman agregó el indol, el Voges Proskauer y la reducción de nitratos.²⁶ La fenotipificación de las cepas en la actualidad, se basa en la diferenciación en biovars o biotipos clásico y El Tor, esto se hace con la finalidad de distinguirlos mediante pruebas sencillas pero discriminatorias y reproducibles, que indirectamente señalan diferencias fenotípicas en receptores a los fagos, el lipopolisacárido o en la superficie de la pared celular, lo que se evidencia por la diferente sensibilidad a la polimixina y al fago IV y V, y a la presencia o ausencia de hemaglutinina que fija a la célula; no obstante los dos biovars tienen la capacidad de producir toxina colérica (CT). Los

mapas genéticos de ambos biotipos señalan que en la zona que codifica para CT, está cercana al *locus his-1* de la cepa 569B clásica. Al compararla con la cepa 162 y la cepa El Tor GN6300, se observó que tiene un alto grado de similitud, pero en la región que contiene el *loci* pro-201-pyrA201-leu-1-ura-201, tienen secuencias invertidas.²⁷ Aunque ambas producen toxina colérica, con frecuencia se menciona que la cepa El Tor es menos virulenta; sin embargo, este concepto es relativo, ya que está comprobado que el biotipo clásico tiene capacidad de producir comparativamente más toxina que El Tor. Las otras pruebas como hemaglutinación, resistencia a polimixina y producción de hemolisina, están cercanas genéticamente a los genes: *cha*, *pmx* y *hly* cercanos al gene *leu*.²⁸ La hemólisis se considera presente en las cepas El Tor aisladas desde 1973 en la zona del Golfo de México, y es congruente con un patrón sólo de enzimas de restricción para este grupo que permitió distinguirlo del resto de las cepas cuando se empleó *Hind* III; sin embargo, desde los primeros aislamientos de la cepa peruana, es decir, la que prevalece en este estudio, se observó que no había producción de hemolisina. En este trabajo, la frecuencia de las cepas hemolíticas fue de 2.1% en 1991, 2.9% en 1992 y 0.75% en 1993, cuando se empleó la técnica de siembra en placa de BAB; no obstante en la mayoría de ellas, cuando se hizo la prueba en tubo se confirmó que eran negativas. Este sistema, también sirvió para separar a las cepas de *Vibrio cholerae* No 01, que son hemolíticas y puede servir para distinguir a las cepas de *Vibrio* No 01 del serotipo 0139, que también al igual que la cepa epidémica de cólera son negativas.

En Louisiana se han aislado variantes 01 tox+ y tox- y variantes No 01 tox+ y tox- con patrones de enzimas de restricción diferentes.²⁷ En este trabajo se observa que la frecuencia relativa de aislamientos de *Vibrio cholerae* No 01 fue muy baja, y se observa que las cepas no han sido toxigénicas sino hemolíticas, y algunas presentan efecto citotóxico en cultivos celulares aparentemente no relacionado con la producción de CT, sino más bien pudiera deberse a otro tipo de citotoxina. Esto mismo se ha observado con cepas aisladas del ambiente, es decir, aguas negras y aguas blancas.

Es justificable que en la actualidad se recomienda el empleo de pruebas rápidas para el diag-

nóstico de cólera, como la prueba Coa-Vich, diseñada por el INIREO o algunas pruebas comerciales; sin embargo, no indica que se deje de emplear el cultivo para disponer de un número razonable de cepas procedentes de diversos puntos del país, que permitan la caracterización fenotípica y genotípica. Los resistotipos revelaron que con los antibióticos que empleamos en 1991-1992 y en 1993, todas fueron sensibles, con excepción de un grupo de cepas resistentes a tetraciclina y doxiciclina que se obtuvieron en 1992, en una zona limitada del estado de Veracruz, las que dieron patrón intermedio al practicar la determinación de CMI fueron sensibles, por ello recomendamos que el diámetro de la zona de inhibición se reduzca 2-3 mm de lo recomendado por Kelly; con ello se evita reportar como resistentes a cepas que en realidad son sensibles.¹⁸

En 1993, se agregaron en este estudio 3 antibióticos más: furazolidona, estreptomina y sulfisoxazol, los cuales fueron útiles, ya que dieron más del 97% de resistencia y, en forma retrospectiva, algunas cepas aisladas al inicio de los casos en 1991, principalmente en las cepas del serotipo Ogawa; este patrón puede servir como marcador epidemiológico inicial en estudios posteriores.

Los estudios genotípicos se orientaron principalmente a corroborar la toxigenicidad por los métodos de ELISA y los cultivos celulares, todas las cepas fueron toxigénicas y aquellas cuya lectura fue cercana o menor a dos desviaciones estándar o bajas productoras, con ELISA, confirmaron que eran toxigénicas por la prueba de PCR, y no se obtuvo ninguna cepa toxigénica en el grupo de No 01.

Las preparaciones del DNA se emplearon para hacer la ribotipificación (aunque el gene de la toxina se puede investigar para buscar la biodiversidad genotípica) y dan tres patrones; en este estudio no se aplicaron ya que sólo se usaron dos tipos de iniciadores, *ctx 1* y *ctx 2*, que amplifican el *loci* relacionado con el gene de la subunidad A de la toxina, pero se puede combinar si se emplean otros iniciadores y con el patrón de fagos estos resultados se analizan en forma conjunta.

Una subtipificación más completa incluye el patrón de enzimas multilocus con 15 variables y los electrofenotipos con cuatro. En la ribotipificación empleamos la enzima de restricción *Btlm 1* que da

resultados reproducibles, ya que Popovic y cols.²⁵ emplearon otras más y al final seleccionaron ésta. En este trabajo, se obtuvo el patrón correspondiente al ribotipo 5, que corresponde con la cepa peruana o epidémica. El ribotipo 6a, se observó en un grupo de cepas procedentes del estado de Hidalgo asociadas a la resistencia a furazolidona, estreptomina y sulfisoxazol; en todas las cepas que se han ribotipificado hasta ahora (datos no mostrados), todas han correspondido al ribotipo 5. Consideramos que debemos probar un mayor número, ya que es probable que subsistan en la colección de cepas de 1993 y necesitemos corroborar la presencia del ribotipo 2 en el grupo de cepas hemolíticas. Con este método no fue posible que pudiéramos distinguir entre las cepas Inaba de 1991 y las cepas Ogawa de 1993; sin embargo, parecen provenir de la misma clona, ya que dieron ribotipo 5.

El ribotipo 12 se obtuvo en Cancún, solamente con una cepa proporcionada por K. Wachsmuth, procedente de *Vibrio cholerae* No 01 aislada de aguas negras, en 1983, después de que una turista presentó un cuadro con un aislamiento positivo a *Vibrio cholerae* 01.¹⁴

Este trabajo muestra que hay todavía muchas interrogantes que deben investigarse y que si consideramos que en 1990, la posibilidad de tener casos de cólera y hacer diagnóstico microbiológico se veía remota, ahora es evidente que tendremos cólera por una larga temporada y los estudios microbiológicos pueden ayudar a esclarecer las variaciones en las clones, su probable origen, así como ayudar a establecer medidas de control.³⁰

Referencias

1. Baumann P, Scubert. Section S Facultative anaerobic Gram negative rods, Fazy II *Vibrio-aceae* En: J.G. Holt, Bergeys Manual of sistematyc bacteriology. Vol. I Williams and Williams, Baltimore USA NR Kriegs cd. 1984;516-550.
2. Kumate JI. Origen e historia de las pandemias, 3. El descubrimiento del microbio Koch y Pottenkofer; 5. Contagio experimental del cólera. En: J Kumate, J Sepúlveda, G Gutiérrez. El cólera. Epidemia endemias y pandemias. México, Interamericana. 1993; 3-20 y 41-52.
3. Barret TJ, Blake PA, Morris GK. Use of Moore swabs for isolating *Vibrio cholerae* from sewage. Clin Microbiol. 1980; 11: 385-388.

4. Giono CS, Gutiérrez L, Hinojosa MA. Manual de procedimientos, aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01, 1a. ed. México. Publicación Técnica No. 10 del INDR, SSA. 1991.
5. Benenson AS. Cholera. Infections, agents and host reactions. Toronto. W.B. Saunders Co. 1970;28:302.
6. Colwell RR, Brayton PR, Gries DJ. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biol Technology* 1985; 3: 817-820.
7. Pavia AT, Campbell JF, Blake PA, Smith JD, Kinley TW, Martin DL. Cholera from raw oysters shipped interstate. *JAMA* 1987; 285-2374.
8. Janda JM, Power C, Bryant RG, Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology of a pathogenesis of clinically significant *Vibrio* Clin. Microbiol. Rev. 1988;1: 245-267.
9. Rabbani GA, Greenough III WB. Pathophysiology and clinical aspects of cholera. In: Current topics in infectious disease Cholera, D Barua, WB, Greenough III. N.Y. Plenum Med. Book C (eds). 1992;228-235.
10. Barua D. History of cholera. In: D Barua, WB, Greenough III (eds). Current topics in infectious disease Cholera. NY. Plenum Med Book Co. (eds). 1992;1-35.
11. Weissman JB, Dcwitz WE, Thompson J. A case of cholera in Texas. *Am J. Epidemiol* 1973;100: 487-498.
12. Valdespino JL, Isibasi AA, Hinojosa MA, Giono S. Perspectivas de las vacunas contra el cólera. *Salud Pùb Méx.* 1993;35: 3-49.
13. Finch MJ, Valdespino JL, Wells J, Pérez PG, Arjona F, Sepúlveda A, Bessudo D, Blake P. Non-01 *Vibrio cholerae* infections in Cancún, México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987;36: 393-397.
14. CDC. Cholerae, Perú. *MMWR* 1991;40: 108-110.
15. Giono S, Gutiérrez CL. Caracterización microbiológica del brote de cólera en el Municipio de Sultepec Edo. de México. *Boletín quincenal de cólera/diarreas infecciosas.* 1991;1: 4-5.
16. CDC. Importation of cholera from Perú *MMWR* 1991; 40:258-259.
17. Ristaino PA, Levine MM, Young CR. Improved GM-1 Enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *J. Clin Microbiol.* 1983;18: 808-815.
18. Kelly MT, Hickman - Brenner FW, Farmer JJ, III. *Vibrio*. En: A Balows, WJ Hausler, KL Ann, HD Isenberg and HJ Shadomy. *Manual of clinical microbiology*. Washington. 5th ed ASM, 384-395.
19. Elliot EL, Kajoner CA, Tamplin ML. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* + her *Vibrio* spp. In: Bacteriological analytical manual. 7th. ed. Center for food safety and applied. on. FDA, Virginia, USA.
20. Wachsmuth IK, Fecley, JC, Dewitt WE, Young CR. Immune response to *Vibrio cholerae*. NR Rose, H Friedman and JL Fahey. *Manual of clinical immunology*. Washington. 2nd ed, ASM, 464-473.
21. Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection toxigenic *Vibrio cholerae* 01 strains from Latin American cholera epidemic. *J. Clin Microbiol* (8) 118-2121.
22. Morris JG Jr, Picardi JL, Lieb S, Lee JV, Roberts A, Hood M, Gunn RA, Blake PA. Isolation of nontoxigenic *Vibrio cholerae* 01 group 1 from a patient with severe gastrointestinal disease. *J. Clin Microbiol.* 1984;19: 296-297.
23. Wing CY, Ling ML, M HN. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Vibrio cholerae* is associated with a cholera outbreak in Hong Kong. *J. Clin Microbiol.* 1991;29 (5). 1058-1059.
24. Giono CS, Gaytan D, Cortés I, Valdespino G JL, Gutiérrez CL. Haemolytic, *Vibrio cholerae* 01 strains from Gulf coast of México. Abstract 93rd General Meeting. B American Society Microbiology, 271-494.
25. Popovic T, Bopp CA, Olsvik O, Wachsmuth K. Epidemiology application of standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* 01. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31: 2474-2482.
26. Giono S. *Vibrio cholerae* y vibrios no coléricos. En: Kumate I, Sepúlveda J y Gutiérrez G. (eds). El cólera. Epidemias, endemias y pandemias. México. Interamericana. 1993; 93-111.
27. Guidolin A, Manning PA. Genetics of *Vibrio cholerae* and its bacteriophages. *Microbiol. Rev.* 1985;1 (2): 285-298.
28. Greem BA, Newland SW, Holmes RK. Mapping of chromosomal genes that determines the El Tor biotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1983;42: 924-929.
29. Kaper JB, Bradford HB, Roberts NC, Falcow S. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the US. Gulf Coast J. Clin. Microbiol. 1982;16 (1): 129-134.
30. Faruque SM, Abdul A AR, Rahman MM, Siddique AK, Sack RB, Albert MJ. Clonal relationship among classical *Vibrio cholerae* 01 strains isolated between 1961 and 1992 in Bangladesh. *J. Clin Microbiol.* 1993;3 (9): 2513-2516.

Comentario

Alejandro Cravioto*

Comentar el trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina de la doctora Silvia Giono, es un doble honor: primero por tratarse de una distinción especial que me hace por primera vez nuestra Corporación, y segundo por tratarse del esfuerzo de una persona a quien admiro y estimo desde hace mucho tiempo.

El estudio presentado por Silvia Giono y sus colaboradores, refleja claramente el enorme esfuerzo que se ha realizado en nuestro país a partir de 1991, por conocer y controlar un problema emergente de salud pública como es el cólera. A pesar del gran interés de investigadores mexicanos en el estudio de bacterias causantes de diarrea, durante los últimos 50 años, antes de que aparecieran los primeros casos de cólera en nuestro país, existía poco interés en el estudio detallado del *Vibrio cholerae* 01 causante de esta enfermedad. Afortunadamente, la preparación técnica y científica de microbiólogos como la doctora Giono, permitieron una rápida implementación de medidas tendientes a controlar el problema, una vez que se detectó el primer caso de cólera en el país. A partir de ese momento, se comenzó no sólo el estudio detallado del microorganismo causante del problema, sino también el entrenamiento de microbiólogos en todo México, a fin de habilitar una red nacional de laboratorios que puedan aislar e identificar al germen, conforme aparece en distintas partes del territorio nacional. Quizá por modestia, el trabajo de Giono y colaboradores no destaca esta segunda parte, a pesar de haber recaído sobre ellos el mayor peso de esta capacitación a nivel nacional.

El estudio muestra la magnitud del trabajo desarrollado, el cual no sólo ha comprendido la caracterización de un gran número de cepas de *Vibrio cholerae* 01, sino también el subsecuente empleo de técnicas para la identificación rápida del microorganismo, con objeto de apoyar la labor de los miembros de los equipos de salud, a fin de brindar un mejor manejo de sus pacientes. Muestra también cómo el empleo de técnicas de biología molecular, utilizadas para la caracterización genotípica y fenotípica de la bacteria, han permitido obtener un enfoque epidemiológico más adecuado del problema. Sin el estudio detallado hecho por los autores, hubiera sido difícil entender por qué la bacteria ha cambiado gradualmente del serotipo Inaba al Ogawa, o por qué ha ido adquiriendo progresivamente resistencia a antimicrobianos utilizados como parte del tratamiento de la enfermedad.

La aparición del cólera en México ha permitido también el entendimiento de la participación de otros *Vibrio cholerae* de serotipos No 01 dentro del panorama epidemiológico de las diarreas en nuestro país. Fuera de un estudio realizado hace 10 años por Finch y colaboradores,¹ existía poca información sobre la participación de estas bacterias como causantes de enfermedad en México. Dada la importancia del brote de cólera reportado recientemente en el sudeste asiático asociado con el aislamiento de un *Vibrio cholerae* No 01 de serotipo 0139,² la búsqueda de este tipo de gérmenes en nuestro medio cobra aún mayor importancia. La experiencia obtenida para la detección de estas bacterias en los últimos tres años, permitirá una mejor vigilancia de un problema emergente de salud que pudiera también arribar a nuestro país.

*Académico Numerario

Aunque no en forma explícita, se desprende también del trabajo, que esta descripción inicial de las característica fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Vibrio cholerae* estudiadas por Giono y colaboradores, se complementará en un futuro cercano, con otros estudios de corte analítico que permitan un mejor entendimiento de la dinámica del problema y de la bondad del uso de medidas para su control, como pudiera ser el uso de vacunas.

Quisiera destacar, finalmente, que ingresa hoy a nuestra Corporación un eminente maestro, durante los últimos 20 años. La doctora Silvia Giono ha dedicado gran parte de su tiempo al entrenamiento de la mayor parte de los microbiólogos médicos que existen en este país. Su capacidad para guiar a mentes jóvenes dentro de la investiga-

ción se refleja claramente en la gran cantidad de sus alumnos, actuales y pasados, que han venido a oírla y a acompañarla en este reconocimiento que le hacen sus pares al recibirla como Académico Numerario de nuestra Corporación. Como parte de estos últimos, me complace mucho darle la bienvenida.

Referencias

1. Finch MJ, Valdespino JL, Wells JG, y cols. Non-01 *Vibrio cholerae* infections in Cancún, México. Am J Trop Med Hyg 1987; 36:393-397.
2. Shimada T, Nair GB, Deb BC, Albert MJ, Sack RB, Takeda Y. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-01 in India and Bangladesh. Lancet 1993; 341:1347.