INFORMES TECNICOS

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DEL COLERA. ACTIVIDADES DEL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

Elizabeth Castañeda, Nélida Muñoz*, Clara Inés de Vargas*,
Marcela Escalante*, Betty de Galindo*, Lucero Castrillón**

De acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en un área con riesgo de cólera se debe establecer un Laboratorio Nacional de Referencia.

Durante la actual epidemia de cólera el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud asumió la responsabilidad de entrenar personal de laboratorio, suministrar materiales para el diagnóstico bacteriológico y desarrollar un programa de garantía de calidad. Todos los Servicios de Salud participaron en el taller de adiestramiento. Durante los 23 meses del brote (febrero 1991 a diciembre de 1992) se han aislado e identificado 1412 cepas de **Vibrio cholera O1** (empleando el agar TCBS, las pruebas de la oxidasa, cuerda y aglutinación) de 5032 muestras procedentes de 32 de los 33 Servicios de Salud y se han confirmado 1919 cepas, enviadas por 22 laboratorios regionales; de las 3331 cepas, 3302 (99,13%) subtipo Inaba y 29 (0,87%) subtipo Ogawa. Veinte cepas, aisladas en diferentes regiones fueron caracterizadas por sus propiedades bioquímicas e inmunológicas y en 5 de ellas se determinó el biotipo y la producción de toxina. Los resultados identificaron a las cepas como **V. cholerae O1**, biotipo El Tor, toxigénicas. Las 138 cepas en las que se determinó la susceptibilidad antimicrobiana mostraron sensibilidad a la tetraciclina. Nuestra experiencia previa en el programa de Bacteriología Clínica nos permitió asumir la responsabilidad de Laboratorio Nacional de Referencia.

INTRODUCCION

De acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en un área con riesgo de cólera se debe establecer un Laboratorio Nacional de Referencia, con la capacidad de identificar y biotipificar **Vibrio cholerae O1**, realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y determinar la toxigenicidad de las cepas aisladas. Igualmente ese laboratorio debe asumir las responsabilidades de suministrar medios de cultivo y

reactivos, de entrenar al personal profesional de los laboratorios regionales y locales en las técnicas de toma, transporte y procesamiento de las muestras, aislamiento, identificación y serotipificación de **V. cholerae O1** a partir de las muestras clínicas y adicionalmente, garantizar la calidad del diagnóstico realizado en los laboratorios estableciendo un programa de control de calidad (1).

Durante la actual epidemia de cólera en Colombia, el Grupo de Microbiología del Insti-

* Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

tuto Nacional de Salud fue designado por el Comité Nacional de Vigilancia del Cólera como Laboratorio Nacional de Referencia, las actividades desarrolladas durante 23 meses son el objeto de este informe.

MATERIALES Y METODOS

1. Entrenamientos y suministro de materiales. En febrero de 1991 se realizó en las instalaciones del Instituto, un taller sobre toma, transporte y procesamiento de coprocultivos para el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1. En ese momento se les suministró a los participantes medio de transporte Cary-Blair y escobillones tratados con carbón, con las respectivas indicaciones para el envío de las muestras. Posteriormente, con un auxilio de la Oficina de Desastres del Ministerio de Salud, se envió a todos los Servicios medio de transporte y tubos tapa de rosca y adicionalmente, a 22 de ellos los medios de cultivo, reactivos y elementos del laboratorio requeridos para realizar el diagnóstico bacteriológico.

En julio de 1992 y con el apoyo de la OPS como parte del programa BID/OPS se realizó otro taller sobre diagnóstico bacteriológico de las enfermedades diarreicas con énfasis en cólera; como componente de ese convenio los participantes recibieron nuevamente elementos de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades diarreicas bacterianas.

2. Procesamiento de muestras y de cepas. El aislamiento y la identificación de *V. cholerae* O1 se realizó con las recomendaciones de la OMS y el Manual de Microbiología de la Sociedad Americana de Microbiología (1,2), brevemente: las muestras en el medio de transporte Cary-Blair se sembraron en agua peptonada alcalina pH 8,4, el enriquecimiento de la muestra se realizó a 37°C durante 6 h, posteriormente la muestra se sembró en el agar TCBS el cual se incubó a 37°C por 18 h; las colonias fermentadoras de sacarosa se resembraron en agar Mueller-Hinton, agar no selectivo; este agar se incubó a 37°C durante 6 a 8 h. Con las colonias aisladas se realizaron las pruebas de la oxidasa y de la cuerda (3) empleando el dihidrocloruro de tetrametil parafenilendia-mina al 1% y el desoxicolato de sodio al 0.5%. Las pruebas de aglutinación para determinar el serogrupo y el

serotipo se realizaron con los antisueros polivalente, Inaba y Ogawa (DIFCO).

3. Pruebas bioquímicas y de crecimiento. Veinte de las cepas aisladas en diferentes regiones del país se estudiaron determinando sus propiedades bioquímicas de crecimiento e inmunológicas.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: determinación de citrato, acetato, Voges Proskauer (VP) adicionado de cloruro de sodio al 1%, fermentación de azúcares (sacarosa, glucosa, manosa, arabinosa, celobiosa) y decarboxilación de aminoácidos (lisina, arginina y ornitina), se determinó el crecimiento en caldo peptonado adicionado de 0%, 1% y 8% de NaCl (2,3), y la seroaglutinación con los sueros ya descritos.

4. Biotipificación y determinación de la toxina. En cinco de las veinte cepas estudiadas bioquímicamente se determinó el biotipo, mediante las siguientes pruebas: resistencia a la polimixina B (50U), aglutinación y hemólisis de eritrocitos de carnero (técnica en tubo y en caja de Petri), prueba de susceptibilidad al bacteriófago V y la determinación de la reacción de VP (2). Se emplearon como cepas control *V. cholerae* O1 El Tor (E-9118) y *V. cholerae* O1, Clásica (1518-65). Los bacteriófagos y las cepas control fueron gentilmente suministradas por Joy Wells del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta.

La prueba para la determinación de la toxina se hizo con la aglutinación de partículas de latex sensibilizadas con antisuero obtenido de conejos inmunizados con la enterotoxina de *V. cholerae* (VET-RPLA, OXOID).

5. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana. Las 138 cepas en las que se determinó la susceptibilidad antimicrobiana correspondían a aislamientos obtenidos en 30 Servicios y las dos Secretarías. Se empleó el método de difusión de disco en agar Mueller-Hinton (BBL) estandarizado por Kirby-Bauer (4), con los siguientes antibióticos (BBL): tetraciclina (Te 30 ug), trimetoprim sulfa (SXT 1.75/23.75 ug), norfloxacin (NOR 10 ug), nitrofurantoína (F/M 300 ug), eritromicina (E 15 ug) y cloranfenicol (C 30 ug).

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó en 19 cepas provenientes de 17 Servicios, unas aisladas al inicio de la epidemia y otras recientemente. Se empleó el micrométodo UNISCEPT MIC/TYPE 2 (Analytab Products); para la lectura e interpretación de los resultados se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

RESULTADOS

1. Entrenamientos. El personal profesional de los laboratorios de los 33 Servicios de Salud y de las Secretarías de Salud de Cali y Metrosalud de Medellín fue entrenado en el primer taller ofrecido sobre el diagnóstico bacteriológico del cólera a partir de las muestras clínicas. En el taller realizado en 1992, participaron 14 Servicios de Salud.

2. Procesamiento de muestras y de cepas. El 16 de febrero de 1991 se recibieron las primeras muestras en el laboratorio y con fecha 31 de diciembre de 1992 se han recibido y procesado un total de 5032, procedentes de 32 de los 33 Servicios. La bacteria se ha aislado en 1412 (28%) muestras; se han confirmado 1919 cepas de *V. cholerae* O1 aisladas, identificadas y remitidas por 22 Servicios de Salud, inicialmente en la búsqueda activa de casos y actualmente como parte del programa de garantía de calidad, para el cual remiten el 10% de los aislamientos. De las 3331 cepas de *V. cholerae* O1, 3302 (99,13%) se han determinado como subtipo Inaba y 29 (0,87%) subtipo Ogawa, 28 (96,5%) de las cuales han sido aisladas a partir de enero de 1992.

En la tabla 1 se presenta el año y mes del primer diagnóstico bacteriológico de cólera en 30 Servicios de Salud y en las dos Secretarías. En tres Servicios (Vaupés, Vichada y Guainía) no se han detectado casos.

En la figura 1, se registran el número total de muestras y cepas recibidas de febrero a diciembre de 1991, igualmente el número de muestras positivas y el número de cepas confirmadas. En la figura 2 se presenta la información de 1992, y en la figura 3 el número de casos por mes diagnosticados bacteriológicamente durante 1991, en los departamentos de Nariño, Cauca, Valle y Chocó.

TABLA 1.

Fecha del diagnóstico bacteriológico del cólera en los Servicios de Salud

AÑO	MES	SERVICIOS
1991	Marzo	Nariño
	Abril	Amazonas Guaviare Cali
	Mayo	Cauca Meta Valle
	Junio	Chocó Tolima Cundinamarca Huila
	Julio	Caldas Bogotá
	Agosto	Antioquia Bolívar Santander Boyacá Córdoba Risaralda
	Septiembre	Sucre Magdalena Quindío Caquetá Atlántico Cesar Medellín
	Noviembre	Guajira San Andrés
	Diciembre	N. de Santander Arauca
1992	Enero	Casanare
	Abril	Putumayo

Figura 1. Número de muestras y cepas recibidas para procesamiento y confirmación de febrero a diciembre de 1991. Número de muestras positivas y de cepas confirmadas.

Figura 2. Número de muestras y cepas recibidas para procesamiento y confirmación de enero a diciembre de 1992. Número de muestras positivas y de cepas confirmadas.

Figura 3. Diagnóstico bacteriológico del cólera en los departamentos de Nariño, Valle, Cauca y Chocó de febrero a diciembre de 1991.

3. Pruebas bioquímicas y de crecimiento. En la tabla 2 se consignó la procedencia y fecha de aislamiento de las 20 cepas en las que se realizaron las pruebas bioquímicas y de crecimiento, en la tabla 3 los resultados de las pruebas. Las cepas estudiadas correspondieron a los patrones bioquímicos y de crecimiento de *V. cholerae* y los resultados de la seroaglutinación las clasificaron como *V. cholerae* O1, 19 de ellas subtipo Inaba y 1 subtipo Ogawa.

4. Biotipificación y determinación de la toxina. En la tabla 4 se encuentran los resultados de las pruebas empleadas para la biotipificación y la determinación de toxina. Las cinco cepas correspondieron al biotipo El Tor y todas fueron toxigénicas.

TABLA 2.

Fecha de aislamiento y procedencia de las veinte cepas caracterizadas bioquímicamente.

CEPA	Fecha de aislamiento		PROCEDENCIA
0013	MARZO	10	Nariño
0402	Abril	24	Valle
0516	Mayo	7	Cauca
0531	Mayo	9	Amazonas
0541	Mayo	10	Valle
0928	Junio	7	Chocó
1038	Junio	13	Valle
2426	Agosto	5	Caldas
2950	Agosto	20	Bolívar
3031	Agosto	22	Santander
3155	Agosto	25	Boyacá
3156	Agosto	25	Córdoba
4584	Octubre	8	Atlántico
4602	Octubre	9	Cesar
4617	Octubre	10	Magdalena
5036	Noviembre	1	Quindío
5149	Noviembre	12	Guajira
5166	Noviembre	13	Bolívar
5226	Noviembre	18	San Andrés
5378	Noviembre	25	Cauca

TABLA 3.

Resultados de las pruebas bioquímicas y de crecimiento empleadas para la caracterización de 20 cepas de Vibrio cholerae O1.

PRUEBA		RESULTADO
CITRATO SIMMONS		+
ACETATO		+
VP + 1% NaCl		+
AMINOACIDOS:	LISINA	+
	ORNITINA	+
	ARGININA	-
CARBOHIDRATOS:	GLUCOSA	+
	SACAROSA	+
	MANOSA	+
	ARABINOSA	-
	CELOBIOSA	-
CRECIMIENTO:	CALDO+0% NaCl	+
	+1% NaCl	+
	+8% NaCl	-

TABLA 4.

Resultados de las pruebas de biotipificación de cinco cepas de *Vibrio cholerae* O1.

PRUEBA	RESULTADO
POLIMIXINA B (50 U)	RESISTENTE
AGLUTINACION EC	POSITIVA
HEMOLISIS EC	
CAJA	POSITIVA
TUBO	POSITIVA
FAGO V	SENSIBLE
VP	POSITIVA

EC=Eritrocitos de carnero

5. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana. De las 138 cepas en las que se realizó el Kirby-Bauer, 41 fueron aisladas en 1991 y 97 en 1992. Todas las cepas mostraron sensibilidad a tetraciclina, cloranfenicol, norfloxacin, nitrofurantoína y trimetoprim sulfá. Frente a la eritromicina, la susceptibilidad fue intermedia. Los resultados de la CIM de las 19 cepas, mostraron sensibilidad con los antibióticos estudiados excepto para la eritromicina, con la que se presentó resistencia (CIM ≥ 8 ug/ml). Los resultados del CIM se encuentran consignados en la tabla 5.

TABLA 5

Concentración inhibitoria mínima (CIM) de 19 cepas de *Vibrio cholerae* O1

Antibiótico	Estandar sensibilidad ug/ml	Resultados concentración ug/ml	No.cepas
Tetraciclina	≤ 4	≤ 1	17
		2	2
Cloranfenicol	≤ 8	≤ 1	18
		4	1
Eritromicina	≤ 0.5	8	9
		> 8	10
Norfloxacin	≤ 16	≤ 1	18
		2	1
SXT	$\leq 2/3$	$\leq 1/19$	19

DISCUSION

Sólo debido a la infraestructura del programa de Red de Laboratorios en Bacteriología Clínica pudimos cumplir con las responsabilidades de Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de esta patología, lo que permitió, al inicio de la epidemia que a nivel regional y local se realizara la búsqueda activa de los casos de cólera con la confirmación bacteriológica inicial, única manera de establecer la circulación de *V. cholerae* O1 en una comunidad (1,10).

El diagnóstico bacteriológico del cólera, realizado en las diferentes regiones del país, permitió visualizar la propagación lenta de la epidemia a partir de la costa pacífica. El número de muestras y cepas recibidas en el Instituto disminuyó en la medida que los laboratorios de los Servicios adquirieron los elementos y asumieron el diagnóstico, fue ese el momento en que se pudo establecer el programa de control de calidad con el envío del 10% de los aislamientos y cuando se cumplió a cabalidad el programa de Red.

El estudio de las propiedades bioquímicas, inmunológicas, de biotipo y toxigénicas de algunas de nuestras cepas, clasificaron al *V. cholerae* O1 con las mismas características de las cepas aisladas en Perú y Ecuador; el subtipo predominante ha sido el Inaba, las pocas cepas Ogawa recuperadas están de acuerdo con los cambios de subtipo descritos en la literatura durante las epidemias (1). Análisis complementarios de genes de la toxina y de genes del RNA ribosomal muestran que se trata de la misma cepa y a su vez que es indistinguible, por esos procedimientos, de la cepa de la séptima pandemia (5).

No obstante el amplio uso de la tetraciclina, en nuestro país, con fines terapéuticos y profilácticos no se ha registrado hasta el momento la aparición de cepas resistentes a esta droga. Es de anotar la resistencia, *in vitro*, frente a la eritromicina presentada por las cepas estudiadas, es por esto que la elección del antibiótico debe ser el reflejo de los datos de susceptibilidad de las cepas obtenidos en cada lugar.

La resistencia del *V. cholerae* a múltiples antibióticos se estableció desde hace varias décadas (6-9), esta resistencia está mediada por plásmidos. La resistencia a más de seis antibióticos es llevada por un solo factor R, el cual se transfiere de una célula a otra por conjugación; este factor R es inestable ya que se pierde fácilmente cuando la célula es cultivada en un medio libre de antibióticos. (9).

En un estudio en Tanzania y Kenia, las cuales son áreas endémicas de cólera, se determinó que el 77% de las cepas de *V. cholerae* O1, Ogawa, El Tor, eran resistentes a múltiples antibióticos, después de cinco meses del uso extensivo de la tetraciclina (10). En la epidemia latinoamericana solo conocemos, por comunicación personal, la aparición de cepas resistentes en Ecuador y Panamá. En nuestro laboratorio continuamos controlando la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos

Actualmente ha disminuído considerablemente el número de casos, por lo tanto, teniendo en cuenta las consideraciones de la OMS (1), podríamos pensar en tres posibilidades: la primera, que estaríamos en el fin de la epidemia, lo cual sería muy prematuro de afirmar; la segunda, que es el inicio de una declinación transitoria, debido a las condiciones climáticas, el cólera es una entidad de estaciones, y la tercera que la infección está entrando en un estado endémico el cual podría persistir indefinidamente. En estos momentos, al igual que en el período "pre-epidémico", el laboratorio tiene un papel fundamental en la vigilancia de los casos de diarrea para determinar la presencia o la ausencia de la cepa epidémica (1,10).

SUMMARY

Following WHO recommendations, a country at risk for cholera should establish a National Reference Laboratory; during the recent outbreak of cholera, the Colombian INS assumed the responsibility of training health personnel, supplying materials and monitoring quality assurance. All state laboratories participated in the training course. During 23 months of the outbreak (February 1991- December 1992) we isolated and identified 1412 strains of *Vibrio cholerae* O1 (by growth in TCBS agar, oxidase, string test and agglutination) from 5032 samples received from 32 out of 33 states and have confirmed all the 1919 strains sent by 22 regional laboratories. Of the 3331 strains, 3302 (99.13%) were subtype Inaba and 29 (0.87%) subtype Ogawa. Twenty strains have been further characterized by their biochemical and immunological properties. In five of them we also did the differential tests for biotyping and tested the toxin production. The biochemical, biotyping and immunological patterns characterize the strains as *V. cholerae* O1 biotype El Tor, toxin producers. All the 138 strains tested are totally susceptible to

tetracycline. Our previous Clinical Bacteriology Laboratory Network program allowed us to assume the role of the National Reference Laboratory in cholera.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Grupo de Microbiología, Jeannette Castillo, Nelly Ordoñez, Esperanza Gaona, Fernando Barreneche, Herlinda de Cobos, Margarita Ortega, Florencio Castro, por su invaluable colaboración. Al Ingeniero Víctor Venegas del Grupo de Sistemas del INS por la eficaz sistematización de la información.

REFERENCIAS

1. Guidelines for Cholera Control. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. WHO/CDD/SER/80.4 Rev 1. 1986.
2. Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer III JJ. *Vibrio*. In: Manual of Clinical Microbiology, Fifth ed. 1991. A Balows, WJ Hausler, KL Herrmann, HD Isenberg, HJ Shadomy (ed.) p.384-395. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
3. Restrepo M, Castañeda E, Rivas F, et al. Cólera. Serie de Notas e Informes Técnicos No. 19. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, 1991.
4. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45: 493.
5. Wachsmuth K, Bopp CA, Fields PI, et al. Differences between toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from South America and US gulf coast. Lancet 1991; 337: 1097.
6. Glass RI, Hug I, Alim ARMA, Yunus M. Emergence of multiply antibiotic resistant *Vibrio cholerae* in Bangladesh. J Infect Dis 1980; 142: 939.
7. Fingh JM, Morris JG, Kavitt JR, et al. Epidemiology of antimicrobial resistant cholera in Kenya and East Africa. Am J Trop Med Hyg 1988; 39: 484.
8. Maimone F, Coppo A, Pazzani C. Clonal spread of multiply resistant strains of *Vibrio cholerae* in Somalia. J Infect Dis 1986; 153:802.
9. Yokota T, Kasuga T, Kaneka M, et al. Genetic behavior of R factors in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol 1972; 109: 440.
10. Vugia DJ, Koehler JE, Ries AA. Surveillance for epidemic cholera in the Americas: an assessment. MMWR 1992; 41(SS-1): 27.