

REPORTE HISTÓRICO: PRIMER AISLAMIENTO DE *Vibrio Cholera* SEROGRUPO O1 BIOVAR EL TOR SEROVAR INABA DURANTE LA EPIDEMIA DE CÓLERA EN EL PERÚ - 1991

Nora Bravo Cruz^{1,a,b}, Alfredo Guillén^{2,3,c},

RESUMEN

Hace 20 años apareció una enfermedad diarreica nueva en el Perú y el Laboratorio de Referencia de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud, cumplió una labor destacada en el aislamiento e identificación rápida y oportuna del *Vibrio cholerae*. La enfermedad del cólera no se había presentado anteriormente, pero en la última semana de enero de 1991 se detectó un brote epidémico de diarrea aguda con deshidratación intensa y algunos casos de fallecidos. La epidemia afectó, al comienzo, varias localidades del litoral peruano. Equipos de trabajo de la Oficina General de Epidemiología y de los laboratorios del Instituto Nacional de Salud obtuvieron muestras fecales de pacientes con diarrea aguda procedentes de las ciudades de Chancay, Chimbote, Piura y algunos hospitales de Lima. Las muestras colectadas en el medio de transporte de Cary y Blair fueron procesadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos (LANARE) del Instituto Nacional de Salud. De todas las muestras se aisló e identificó *Vibrio cholerae* serogrupo O1 biovar El Tor serovar Inaba que mostró ser sensible a la tetraciclina y a otros antibióticos. Esta investigación confirmó el primer brote epidémico de cólera en el Perú.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O1; Epidemias; Perú (fuente: DeCS BIREME).

HISTORICAL REPORT: FIRST ISOLATION OF *Vibrio Cholera* SEROGROUP O1 BIOVAR EL TOR SEROVAR INABA DURING THE CHOLERA EPIDEMIC IN PERÚ - 1991

ABSTRACT

20 years ago, a new diarrheal disease was introduced in Peru and the Enteropathogens Reference Laboratory of the Instituto Nacional de Salud had an outstanding role in the isolation and rapid and timely identification of *Vibrio cholerae*. Cholera had not been seen before, but during the last week of January 1991 an outbreak of acute diarrhea was detected, presenting intense dehydration and some deaths. The epidemic affected, in the beginning, many locations of the peruvian coast. Some working teams of the General Office of Epidemiology and of the Instituto Nacional de Salud obtained fecal samples from patients with acute diarrhea coming from the cities of Chancay, Chimbote, Piura and some hospitals in Lima. The collected samples were transported on Cary and Blair media and processed in the National Reference Laboratory of Enteropathogens (LANARE) of the Instituto Nacional de Salud. *Vibrio cholerae* serogroup O1 biovar El Tor serovar Inaba was isolated from all the samples, it was sensible to tetracyclines and other antibiotics. This research confirmed the first outbreak of cholera in Peru.

Key words: *Vibrio cholerae* O1; Outbreaks; Peru (source: MeSH NLM).

El 31 de enero de 1991, representantes del Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos (LANARE), del Centro Referencial de Laboratorios de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (Perú) viajaron a las ciudades de Chancay y Chimbote integrando los equipos de trabajo de la Oficina General de Epidemiología para obtener muestras de pacientes que presentaban un cuadro de enfermedad diarreica aguda intensa y de etiología aún desconocida.

Al mismo tiempo, en la región Grau, al norte del país, se encontraba un representante del Instituto Nacional de Salud coordinando acciones de la Red Nacional de Laboratorios de Salud, quien al percatarse de la aparición del brote de enfermedad en un centro de reclusión y un cuartel, centra su actividad en el Hospital Regional Cayetano Heredia de Piura y procede a seguir el protocolo de trabajo de laboratorio para el aislamiento del agente etiológico.

¹ Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal.

² Facultad de Tecnología Médica, Universidad Nacional Federico Villarreal.

³ Laboratorio de Microbiología, Clínica San Borja.

^a Bióloga; ^b Exjefa del Departamento de Bacteriología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. ^c Médico Microbiólogo.

Recibido: 02-02-11 Aprobado: 09-03-11

Es así como el LANARE inicia su tarea de búsqueda del causante de estos cuadros diarreicos agudos; la sintomatología de los pacientes indicaba que se trataba de una infección por un germen altamente toxigénico, por lo que se decidió cultivar las muestras en una batería de medios de cultivo muy amplia, para poder determinar el agente etiológico de esta infección que hasta ese momento ya había producido muertes.

Inicialmente se procesaron cinco muestras procedentes de Chancay y quince de Chimbote. Las muestras fueron obtenidas por hisopado rectal y mantenidas, hasta el momento de su procesamiento, en el medio de transporte de Cary y Blair (BBL). El cultivo se realizó en los siguientes medios: agar Mac Conkey (DIFCO), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD; BBL), medio para aislamiento de *Campylobacter* usando agar sangre suplementado con antibióticos según la fórmula de Butzler (oxidol), agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa), caldo selenito y agar SS (DIFCO). Los medios se incubaron a 37 °C (a excepción del medio para el aislamiento de *Campylobacter* el que se incubó a 42 °C por 48 h) y al cabo de 18 h se procedió a la selección de las colonias. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en medios diferenciales TSI (*Triple Sugar Iron Agar*; DIFCO) y LIA (*Lysine Iron Agar*; DIFCO) al que se colocó una tira de papel filtro impregnada de reactivo de Kovacs para ver la prueba de Indol. Se sembró también en agar *Trypticase Soya* (TSA, DIFCO) para hacer la prueba de oxidasa y la prueba del cordón, posteriormente, las cepas se sembraron en una batería de medios diferenciales ⁽¹⁾. Se realizó la identificación siguiendo las pautas descritas por Farmer y col ⁽²⁾. El antibiograma se efectuó según el método de Bauer y Kirby ⁽³⁾ utilizando discos de tetraciclina, penicilina G, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cloramfenicol, estreptomycin, gentamicina y ácido nalidíxico (DIFCO). Para la identificación serológica se utilizó sueros inmunes polivalente O1 y mono-específicos Inaba y Ogawa (DIFCO).

En los días siguientes se procesaron muestras procedentes de Piura y Lima. Los cultivos aislados fueron enviados para su confirmación al *Centers for Disease Control* (CDC) en Atlanta, Estados Unidos.

El crecimiento en los diferentes medios de cultivo fue abundante, dando la apariencia de ser un cultivo puro. En el agar Mac Conkey las colonias fueron incoloras y de 1 a 2 mm de diámetro, en el agar XLD se observaron colonias de 2 a 3 mm incoloras o de color ligeramente amarillo pálido, en el agar TCBS se observaron colonias de 2 a 4 mm de diámetro, amarillas, redondas, ligeramente convexas y de apariencia cremosa, no hubo crecimiento en el agar sangre con antibióticos ni en el agar SS. La

serotipia confirmó que se trataba del serogrupo O1 y el serovar Inaba, mientras que las pruebas bioquímicas y la aglutinación con glóbulos rojos de pollo indicaban que se trataba del biovar El Tor ⁽²⁾.

La prueba de susceptibilidad antibiótica mostró que las cepas de *V. cholerae* fueron sensibles a todos los antibióticos con excepción de la penicilina G, a la que fue resistente. Esto permitió que el Dr. Carlos Carrillo Parodi, Jefe del Instituto Nacional de Salud, informara al Ministro de Salud que se había aislado, por primera vez, una cepa de *Vibrio cholerae* toxigénica en el Perú y América Latina.

Haciendo un análisis de los resultados obtenidos de las muestras procedentes de Chancay, Chimbote y Piura se pudo confirmar en 72 horas el primer brote epidémico de cólera en el Perú, causado por *Vibrio cholerae* serogrupo O1, biovar El Tor, serovar Inaba; estos resultados fueron confirmados por el CDC.

En 1985, a través de la Agencia Internacional de Cooperación de Japón (JICA) y el Instituto Nacional de Salud por gestión del Dr. Oscar Grados Bazalar, el Dr. Yoshifumi Takeda dictó en Lima el curso teórico - práctico "Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* y determinación de toxina de *Escherichia coli*" al que asistieron profesionales microbiólogos de los principales hospitales de Lima y provincias. Esta experiencia permitió que la identificación de *Vibrio cholerae* durante la epidemia de cólera (enero de 1991) se realizara en forma correcta y temprana así como que los laboratorios hospitalarios de donde provenían los participantes rápidamente pudieran implementar los procedimientos (Figura 1).



Figura 1. Participantes del curso sobre *Vibrio parahaemolyticus* y toxinas de *Escherichia coli* provenientes de hospitales y laboratorios de Tumbes, Piura, Chiclayo, Trujillo, Lima, Arequipa, Huamanga y otras ciudades.

Si bien se trata del primer aislamiento de una cepa de *V. cholerae* serogrupo O1, biovar. El Tor en el Perú, existen reportes previos de aislamientos de *V. cholerae* no toxigénicos realizados por Black y col. quienes entre 1982 y 1984 aislaron *V. cholerae* non O1 de un paciente con diarrea y de un asintomático. Además, se le encontró en dos muestras de alimento y una muestra de agua⁽⁴⁾. Guerra realizó el aislamiento de *V. cholerae* serogrupo non O1 en Piura⁽⁵⁾, Kay y colaboradores aislaron *V. cholerae* serogrupo non O1 en cinco pacientes con diarrea⁽⁶⁾. Posteriormente, Batchelor y Wignall reportaron la presencia de *V. cholerae* serogrupo O1 biovar El Tor serovar Ogawa no toxigénico en dos norteamericanos que visitaban el Perú. Dichas cepas no producían toxina colérica como fue demostrado por la prueba de ELISA por cultivo en células adrenales Y1⁽⁷⁾. Sin embargo, estos casos no representaron la presencia de un brote epidémico de las características actuales, ya que por un lado el *V. cholerae* non O1 no produce toxina y el otro *V. cholerae* O1 serovar Ogawa, a pesar de presentarse en un paciente con diarrea aguda, la cepa no fue toxigénica. Cabe mencionar que el diagnóstico clínico de cólera en su caso índice fue realizado por Uribe J, y colaboradores⁽⁸⁾. Benza realiza un estudio en el Hospital Cayetano Heredia previo a la epidemia de cólera de 1991 relacionando la presencia de *Vibrio sp.* con la diarrea infantil⁽⁹⁾.

Si hacemos una comparación con lo sucedido en Haití, donde se ha producido una epidemia desde octubre de 2010, podemos apreciar que en solo cuatro meses, la morbilidad y mortalidad es superior a lo ocurrido en el Perú durante 1991⁽¹⁰⁾ y que además se han reportado casos en República Dominicana, Venezuela y Estados Unidos. En este caso han intervenido factores como la presencia de un terremoto y las deficiencias en saneamiento ambiental⁽¹¹⁾, similar a lo que ocurría en el Perú en 1991 después de un episodio del fenómeno El Niño.

A pesar de que el cuadro diarreico, causado por la toxina colérica, produce primariamente deshidratación, el uso de antibióticos en cólera se ha recomendado para el tratamiento de casos agudos y en la prevención de casos secundarios, mientras que su abuso ha condicionado la aparición de resistencia. En las cepas aisladas durante la epidemia de 1991 se encontró que eran sensibles a todos los antibióticos, mientras que en Haití se encontró que eran sensibles a tetraciclina y azitromicina, y ya presentaban resistencia al ácido nalidíxico, el sulfizoxazole y el trimetoprim-sulfametoxazol⁽¹²⁾ pero como recomienda Kitaoka el uso de antibióticos debe ser restringido y se debe buscar métodos alternativos para el tratamiento⁽¹³⁾.

Finalmente, los estudios moleculares y genéticos han demostrado que la cepa de Haití tiene una cercana

correlación con las cepas de Bangladesh y es distante de las cepas de América del Sur, indicando el posible origen y capacidad de estas cepas de viajar para producir brotes epidémicos en lugares inesperados⁽¹⁴⁾.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos (Bióloga Mirtha Espejo Flores, Sra. Orfelinda Tello, Sres. Adrián Gómez y Alejandro Churata, Srtas. Zoila López y Rosario Medrano) Asimismo a los biólogos: Elena Leo, Noé García Baca, Edda Guerra, Luisa Lázaro y Carlos Holguín; Al Navy Army Medical Research Detachment (NAMRID) que proporcionó los sueros para la serotipia.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación del presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae (4th ed). New York: Elsevier Science Publishing Co Inc.; 1986.
2. Farmer JJ III, Hickman Brenner FW, Kelly MT. *Vibrio*. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, et al, eds. Manual of clinical microbiology (4th ed). Washington, DC: American Society for Microbiology; 1985:282-301.
3. Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, et al, eds. Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1985; P. 978-987.
4. Black RE, Lopez de Romaña G, Brown KH, Bravo N, Bazalar OG, Kanashiro HC. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar, Peru. Am J Epidemiol. 1989;129(4):785-99.
5. Guerra E. *Vibrio cholerae* non O:1 en el Perú [Tesis para optar el grado de Magister en Microbiología]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 1984.
6. Kay BA, Sack RB, Spire WM, Guerra HE, Guerrero CE, Chaparro E, Yi AE, Salazar-Lindo E, Chea E, Wachsmuth IK, et al. *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from five people with diarrhoea in Lima. Lancet. 1984;1(8370):218.
7. Batchelor RA, Wignall FS. Nontoxigenic O1 *Vibrio cholerae* in Peru: a report of two cases associated with diarrhea. Diagn Microbiol Infect Dis. 1988;10(3): 135-8.
8. Uribe J, Ortiz H, Pemberton G, Ortiz W. Cólera en el Perú. Primer caso diagnosticado clínicamente. Rev Farmacol Terap. 1991;1(1): 8-9.
9. Benza J. Diarrea infantil asociada a *Vibrio sp.* antes de la epidemia del cólera en el Hospital Cayetano Heredia [Tesis para optar el grado de Bachiller en Medicina]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 1992.

- 10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on cholera --- Haiti, Dominican Republic, and Florida, 2010. MMWR. 2010;59:1637-1641.
- 11. Walton DA, Ivers LC. Responding to Cholera in Post-earthquake Haiti. N Eng J Med. 2011;364:3-5.
- 12. Nelson EJ, Nelson DS, Salam MA, Sack DA. Antibiotics for both moderate and severe cholera. N Eng J Med. 2011;364(1):5-7.
- 13. Kitaoka M, Miyata ST, Unterweger D, Pukatzki S. Antibiotic Resistance Mechanisms of *Vibrio cholerae*. J Med Microbiol. 2011; 60 (Pt 4): 397-407.
- 14. Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR *et al.* The Origin of the Haitian cholera outbreak strain. N Engl J Med. 2011;364(1):33-42.

Correspondencia: Blgo. Nora Bravo Cruz.
 Dirección: Sor Edecia 130, San Miguel, Lima 32 Perú.
 Teléfono: (511) 578-5799.
 Correo electrónico: nbravo@terra.com.pe

Suscríbase en forma electrónica y gratuita a los contenidos de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, ingrese a www.ins.gob.pe, seleccione el ícono de la revista y envíenos sus datos.