

C-300



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD

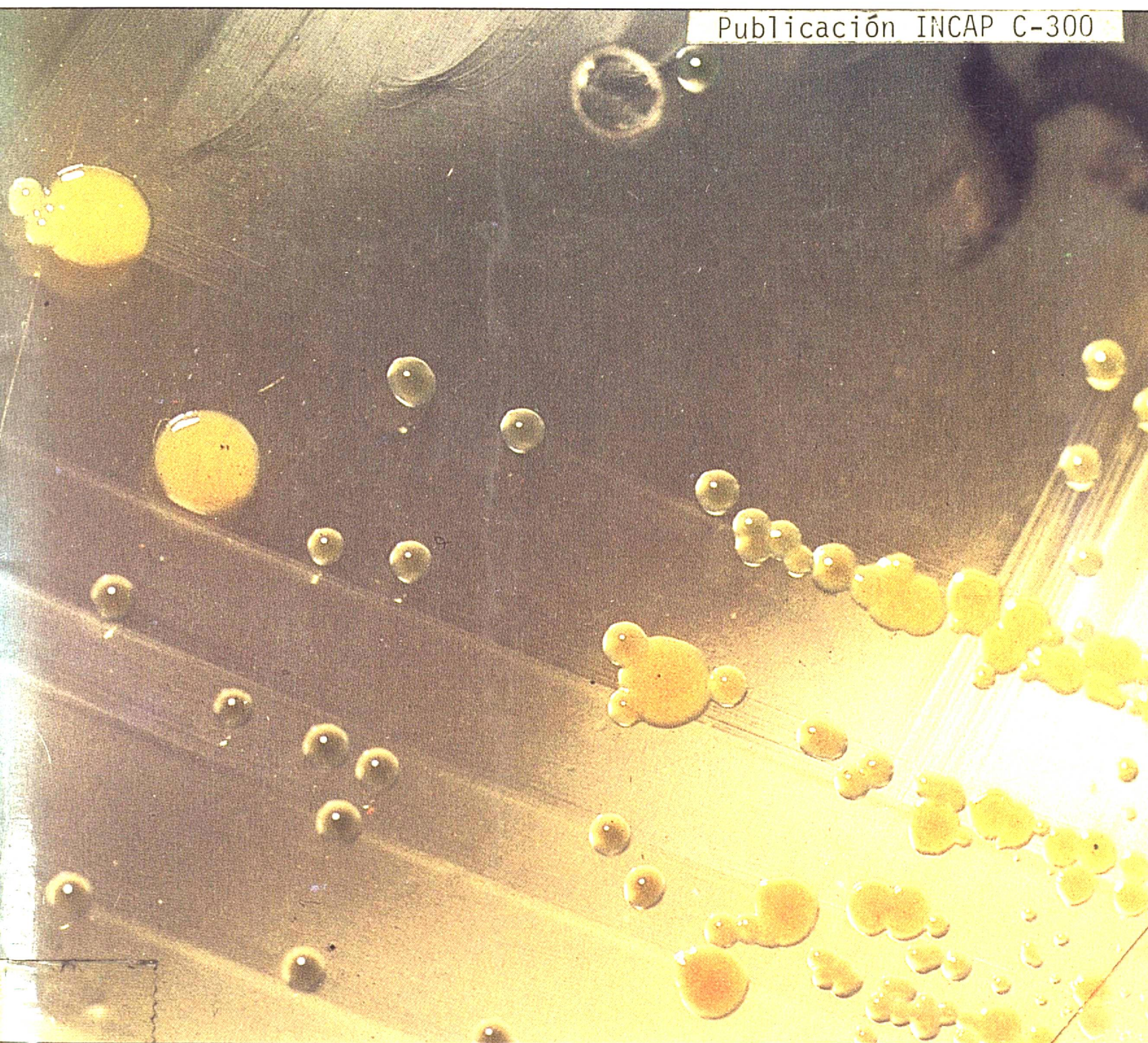
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

Publicación Técnica No. 1.

ETIOLOGIA Y DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE EL COLERA

Publicación INCAP C-300



Guatemala, 1991.

Carátula: Cultivo mixto de *Vibrio cholerae* y *Vibrio mimicus* en agar TCBS. Las colonias del primero son grandes, amarillas (sacarosa positivo) y con bordes aplanados; *V. mimicus* presenta colonias pequeñas y verdes, (sacarosa negativo).

Fotografía: Miguel F. Torres, QB., MA. Guatemala.



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD

Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

ETIOLOGIA Y DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE EL COLERA

Publicación Técnica Número 1.
Guatemala, 1991



Ministerio de Salud Pública
y Asistencia Social

Guatemala, C. A.

NUM.

REF.

Al contestar sírvase mencionar el
Número de referencia de esta nota

PRESENTACION

Pese al desarrollo tecnológico y del conocimiento científico en los últimos decenios, cerca del final del siglo XX, la Región de Las Américas es cruelmente fustigada por una de las mayores epidemias de cólera que registra la historia, problema que refleja las profundas deficiencias sociales y estructurales acumuladas a lo largo del tiempo.

Referencias históricas indican que la enfermedad estuvo presente - por última vez en Guatemala en 1866; situación que traduce que carecemos de experiencia reciente para el manejo de ese problema.

Dentro de las actividades desarrolladas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, dentro del plan de contingencia, fue la creación de la Comisión de Laboratorio para el Diagnóstico del Cólera en apoyo a la Vigilancia Epidemiológica.

La Comisión Multi-Institucional ha trabajado desde que se notificó la enfermedad en América del Sur, desarrollando actividades de coordinación y capacitación a través de los cursos efectuados con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud. Asimismo, se preparó este manual de ETIOLOGIA Y DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL COLERA, que considero, es una contribución importante que complementará lo ya existente en nuestro medio y será de mucha utilidad aun para los otros países de la Región Centroamericana en estos momentos de emergencia.

Cordialmente,

Dr. Miguel Angel Montepeque Contreras
Ministro Salud Pública y Asistencia Social





ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

PLAZUELA ESPAÑA
EDIFICIO ETISA, 3ER PISO
ZONA 9 O APARTADO POSTAL 383
GUATEMALA, GUATEMALA

CABLES, OFSANPAN
GUATEMALA
TELEFONOS 64151 - 66807
64911 - 318621

REFERENCIA:

Nos es grato presentar el "Manual de Etiología y Diagnóstico de Laboratorio de el Cólera". Esta publicación preparada por técnicos guatemaltecos, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, del Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, así como del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, con el apoyo de asesores de la Representación de la OPS/OMS en Guatemala, es un aporte extraordinariamente oportuno para el sector salud de Centro América.

Este esfuerzo Centroamericano sin duda contribuirá a la preparación de nuestros países para hacer frente a la actual epidemia de el Cólera que en días recientes se ha hecho presente en este territorio. Este valioso trabajo constituye el primero de una serie técnica que esperamos alimentar en un futuro cercano con otros aportes de similar calidad técnica y aplicabilidad práctica, contribuyendo así a la formación y actualización de los trabajadores de la salud de Guatemala y los países hermanos del Istmo.


Dr. Juan Antonio Casas
Representante de OPS/OMS

Guatemala, julio 1991

ETIOLOGIA Y DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE EL COLERA

Miguel F. Torres, Q.B., M.A. (Jefe del Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR)-USAC/IGSS); Floridalma Cano, Q.B. (Laboratorios de Microbiología "Leonardo J. Mata", INCAP); César Leonel González Camargo, M.C. (Jefe del Depto. de Laboratorios Centrales, D.G.S.S., Ministerio de Salud Pública y A. S.); Teresita Aguilar de Miranda, Q.B. (Supervisora de la Sección de Microbiología de Alimentos, Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM), Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social); y Francisco Paniagua A., MQC, MPH, ScD. (Asesor de Enfermedades Transmisibles, OPS/OMS, Guatemala).

CON AVAL DE LA COMISION DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE EL COLERA EN APOYO A LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DENTRO DEL PLAN DE CONTINGENCIA DEL MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL DE GUATEMALA

NOMBRE

INSTITUCION

Doctores

César Leonel González Camargo

Jefe del Depto. de Laboratorios Centrales, D.G.S.S., Ministerio de Salud Pública y A.S. (Coordinador).

Francisco Paniagua A.

Asesor de Enfermedades Transmisibles OPS/OMS, Guatemala.

Miguel F. Torres	Jefe del Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR) Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, y Microbiólogo, Laboratorio Clínico, Hospital General del IGSS, zona 9.
Floridalma Cano G.	Supervisora del Laboratorio de Bacteriología y Parasitología Intestinal, Laboratorios de Microbiología "Leonardo J. Mata", INCAP.
Patricia Vélez de Marsicovetere	Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de Ciencias Médicas, USAC.
Amelia Flores G.	Jefe de Laboratorio de Microbiología, D.G.S.S.
Teresita Aguilar de Miranda	Supervisora de la Sección de Microbiología de Alimentos, LUCAM, Ministerio de Salud Pública.
Blanca E. Samayoa	Jefe del Laboratorio de Microbiología, Hospital General San Juan de Dios.
Eyda Mendiá de Campollo	Jefe del Laboratorio Central de Referencia Nacional en Tuberculosis, D.G.S.S. -DAC.
Edwin Fernando Mérida M.	Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de Ciencias Médicas, USAC.
Regina Girón de Bolaños	Jefe del Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, Ministerio de Salud Pública.

I. INTRODUCCION:

La Familia *Vibrionaceae* agrupa a bacterias acuáticas, tanto de agua salada como de agua dulce; varias son patógenas a diversos animales acuáticos. Esta familia incluye los siguientes tres géneros de importancia en Bacteriología Médica: *Vibrio*, *Aeromonas*, y *Plesiomonas*. *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides* causan gastroenteritis humana.

PROPIEDADES DE CUATRO GENEROS DE LA FAMILIA VIBRIONACEAE

GENEROS				
Propiedades	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Asociación con infecciones humanas	+	—	+	+
Requerimientos Na ⁺	+	+	—	—
Sensible a 0129 (Compuesto vibriostático)	+	+	—	+
Fermentación D-manitol	+	v	+	—
Flagelo polar	+	—	—	—
Oxidasa	+	+	+	+

(Referencia No. 4)

Una clasificación simplificada, de utilidad para el laboratorio clínico, reconoce once especies del género *Vibrio*, como causantes de infecciones intestinales y extraintestinales en humanos. Estas bacterias habitan en aguas marinas, plantas y animales que viven en estas aguas. Son microorganismos halófilos (requieren cloruro de sodio para su crecimiento), a excepción de dos especies, llamadas por esta razón vibrios "no halófilos": *V. cholerae* y *V. mimicus*. De las especies de *Vibrio*, se considera que las asociadas con diarrea son: *V. cholerae* serotipo O1, *V. cholerae* no O1, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, y *V. furnissii*. *V. cholerae* O1, productor de enterotoxina es el agente causal de el cólera, de gran importancia epidemiológica.

II. *Vibrio cholerae*:

CARACTERISTICAS DE LA BACTERIA:

Bacilos gram-negativo facultativos. Son pequeños (0.5x1.5-3 micras); en aislamiento primario se presentan como bacilos rectos y formas curvadas, por lo que Koch, su descubridor, les llamó "Kommabacillus". Al efectuar varios sub-cultivos, desaparecen las formas curvas y sólo se observan bacilos rectos. Poseen un solo flagelo polar, cubierto de una envoltura. Son sensibles a pH ácido; pH de 5.0 o menos les es letal.

Se trata de bacterias de fácil crecimiento, mesófilos y aerobios. Crecen bien en algunos medios de cultivo comunes, especialmente en agar sangre de carnero al 5%. Sin embargo, el uso del medio selectivo y diferencial llamado TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sucrosa) ayuda considerablemente en el aislamiento primario. En este medio las bacterias presentan colonias grandes, aplanadas en los bordes y amarillas.

La clasificación serológica de *V. cholerae* se basa en las características del antígeno somático ("O") el cual está constituido por una proteína termolábil y otra termoestable, y varios polisacáridos. Esta especie se divide en 6 serogrupos (1 al 6). Al serogrupo 1 pertenecen los vibriones coléricos epidémicos que causan el cólera (*Vibrio cholerae* O1). Según la proteína somática termoestable, el antígeno "O" se diferencia en 13 tipos (A-L); *Vibrio cholerae* O1 presenta combinaciones de tres tipos de antígeno somático: A, B y C. En base a las combinaciones de estos antígenos, se diferencian tres subtipos serológicos o serotipos: Ogawa (A+B), Inaba (A+C), e Hikojima (A+B+C) (ver Tabla No.3). Independientemente de la clasificación serológica, *V. cholerae* O1 se diferencia según sus características bioquímicas y epidemiológicas, en dos biotipos o variantes "biofisiológicas": biotipo eltor (antes El Tor) y biotipo clásico (ver Tabla No. 2). El biotipo eltor ha causado casi todos los brotes recientes de cólera. Este biotipo se caracteriza por causar epidemias con pocos casos graves (aproximadamente 2%) y muchos casos leves o asintomáticos; también sobrevive más tiempo en el medio ambiente, y es más resistente a los agentes químicos.

Conviene tener presente que el agente etiológico de cólera que pareció en Perú en enero de 1991, y se ha diseminado a otros países de América es: *Vibrio cholerae* O1, serotipo Inaba, biotipo eltor.

EL COLERA:

Esta infección es de transmisión feco-oral. Se adquiere por la ingestión de *Vibrio cholerae* O1 de agua contaminada y mariscos (principalmente bivalvos), y de otros alimentos contaminados. El período de incubación es corto, de uno a cinco días. Cuando la infección se ha establecido en la población humana, el agua servida desempeña un importante papel en la diseminación de la infección.

Vibrio cholerae O1 produce una potente enterotoxina extracelular llamada "colerágeno"; se trata de una proteína cuyo peso molecular aproximado es 84,000 dalton. La enterotoxina activa el sistema adenilato ciclasa de las células de la mucosa del intestino humano. Como consecuencia, intracelularmente se acumula adenosin - monofosfato cíclico (AMP-c) que altera el transporte activo de iones a nivel de la membrana celular. Ocurre secreción activa de líquido y electrolitos hacia el lumen del intestino con disminución de la absorción. En los casos graves (*colera gravis*), el paciente presenta diarrea abundante y acuosa (como "agua de arroz"), y vómitos, lo que causa deshidratación severa y acidosis metabólica. La muerte puede ocurrir en casos agudos sin tratamiento apenas 12 horas después del apareamiento de los síntomas. Se sabe que pacientes con cólera gravis pueden secretar un volumen de fluido equivalente al peso de su cuerpo en 4 días. Las infecciones moderadas, leves y asintomática son las más comunes. Los síntomas presentes en las infecciones moderadas y leves son similares a los presentes en diarreas causadas por otros enteropatógenos, por lo que no pueden diferenciarse clínicamente.

TRATAMIENTO:

El tratamiento principal de cólera es para evitar la muerte por deshidratación por medio del pronto reemplazo de agua y electrolitos, que el paciente ha perdido por la diarrea profusa. Debe hacerse por vía oral y si es necesario debe recurrirse a hidratación endovenosa con soluciones de glucosa y electrolitos. En los casos graves, el tratamiento antimicrobiano ayuda a la recuperación, pues elimina los vibrios y acorta la diarrea. En adultos se recomienda tetraciclina, y en niños trimetoprim-sulfametoxazol, por vía oral. En algunos lugares se da resistencia a la tetraciclina. En el caso de embarazadas se indica furazolidona. Hay pacientes que pueden eliminar los vibrios por tiempo variable, y son fuente de contaminación de agua y alimentos, lo que contribuye a perpetuar la infección. El tratamiento con antimicrobianos, evita el estado de portador. La vacunación y la

administración masiva de antimicrobianos son ineficaces en la prevención y control de brotes.

III. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Vibrio cholerae*:

RECOLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS:

Muestra: Heces diarreicas (principalmente con apariencia de "agua de arroz"), hisopo rectal y/o vómitos. Deben recolectarse de preferencia dentro de las primeras 24 horas de la enfermedad y previo a la administración de antimicrobianos.

Recolección y transporte: Si las muestras de heces frescas van a ser procesadas en un tiempo adecuado (antes de dos horas), pueden recolectarse en un recipiente de vidrio o plástico bien limpio. En caso contrario, deberán inocularse 2 hisopos con material fecal en el medio de transporte de Cary-Blair que deberá ser enviado al laboratorio de referencia que corresponda, sin refrigeración.

CULTIVO:

V.cholerae puede aislarse directamente de las heces, sin embargo se logran mejores resultados si previamente se efectúa un enriquecimiento en agua peptonada alcalina (APA). Se recomienda proceder así:

1. Inocular masivamente heces o hisopos del medio de transporte en agar TCBS y simultáneamente, en un tubo con agua peptonada alcalina de pH 9.0 a 9.2. Incubar el tubo de agua peptonada alcalina de 5 a 8 horas a 36°C. Incubar el agar TCBS aeróbicamente a 36°C por 24 horas (ver Esquema No. 1).
2. Subcultivar una asada de la superficie del agua peptonada alcalina (APA) a agar TCBS. Cuando no es posible cumplir el tiempo de incubación del APA deberá subcultivarse a otra APA previo a sembrar el agar TCBS. Incubar el agar TCBS aeróbicamente de 18 a 24 horas a 36°C.
3. Inocular también agar MacConkey, agar SS e idealmente XLD, para buscar otros enteropatógenos.
4. Interpretación del agar TCBS: *V. cholerae* produce en TCBS colonias

de 2 a 3 mm de diámetro, amarillas (sacarosa positivo), planas o de bordes delgados.

El agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares , sacarosa) contiene elevadas concentraciones de tiosulfato de sodio y citrato de sodio. La fuerte alcalinidad del agar TCBS inhibe considerablemente las enterobacterias; la bilis de buey y el colato inhiben sobre todo a los enterococos. Los coliformes que eventualmente puedan crecer, no fermentan la sacarosa (sinónimo: sucrosa). Contiene dos indicadores de pH: azul de timol y azul de bromotimol que viran al color amarillo. *Vibrio cholerae* es sacarosa positivo, por lo que produce colonias amarillas. *Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. furnissii* también producen colonias amarillas en TCBS. Algunas cepas de enterococos, *Proteus* y *Klebsiella* sacarosa-positivo puede producir también colonias amarillas.

CRECIMIENTO DE *VIBRIO* spp. QUE FERMENTAN SACAROSA EN AGAR TCBS

	TCBS (%) colonias		Crecimiento TCBS (36°C)
	Verdes	Amarillas	
<u>V. cholerae</u>	< 1	> 99	Bueno
<u>V. metschnikovii</u>	0	100	Regular
<u>V. damsela</u>	95	5	Poco
<u>V. fluvialis</u>	0	100	Bueno
<u>V. furnissii</u>	0	100	Bueno
<u>V. alginolyticus</u>	0	100	Bueno
<u>V. parahaemolyticus</u>	99	1	Bueno
<u>V. vulnificus</u>	90	10	Bueno
Vibrios marinos	variable	variable	Variable

(Referencia No. 4)

IDENTIFICACION:

5. Hacer coloración de Gram de las colonias características en agar TCBS. Se observan bacilos cortos rectos gram-negativo, con algunas células curvas.
6. Simultáneamente, subcultivar una colonia sospechosa a TSI (agar triple azúcar hierro), LIA (agar de lisina-hierro); también a un tubo de agar tripticasa soya (ATS) inclinado, agar nutritivo o en agar sangre (agar tripticasa soya + 5% sangre carnero). Incubar a 36°C de 18 a 24 horas. En estos medios, puede observarse crecimiento a las 8 horas de incubación.
7. Después de incubar 18 hrs. a 36°C, *V. cholerae* reacciona así:
TSI: ácido/ácido (A/A) o alcalino/ácido (K/A), sin gas ni ácido sulfhídrico. En caso de que se use agar doble azúcar y hierro de Kligler, la reacción es: alcalino/ácido (K/A).
LIA: alcalino/alcalino (K/K o K/N) sin gas ni ácido sulfhídrico.
8. Prueba de oxidasa: esta prueba es fundamental para continuar la identificación serológica. Es la base de la identificación. Se debe efectuar a partir del crecimiento en agar nutritivo, agar tripticasa-soya o agar sangre de carnero al 5%. Ver apéndice de pruebas bioquímicas.

Esta bacteria es capaz de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono, por lo que generalmente produce coloración azul en el medio citrato de Simmons. Otras pruebas para la identificación de *V. cholerae* se encuentran en la Tabla No. 1.

SEROLOGIA:

9. Antisero polivalente *Vibrio cholerae* O1:

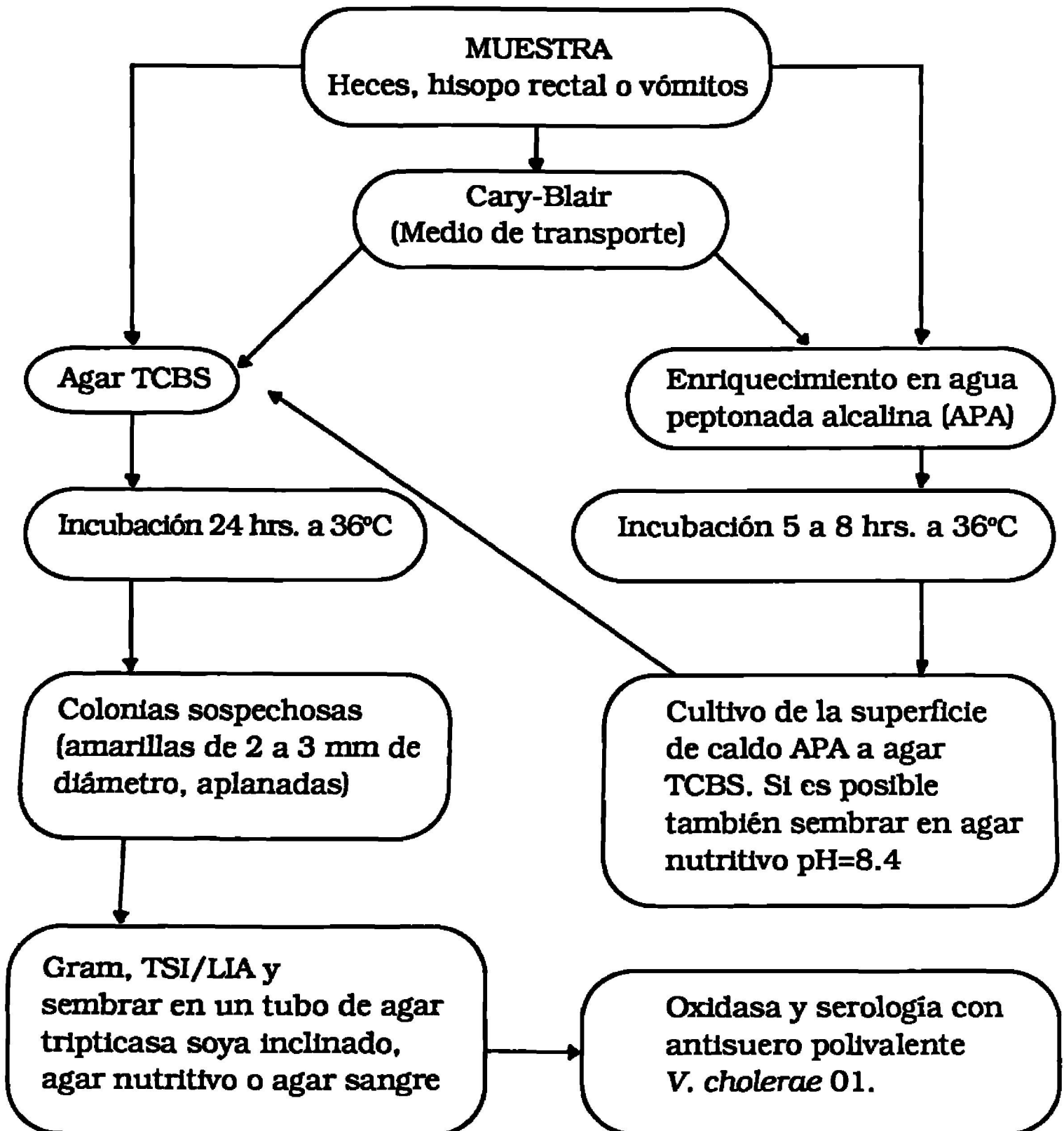
Realizar una aglutinación en lámina a partir de una asada del crecimiento en TSI, agar tripticasa soya o agar sangre de carnero, con antisero polivalente anti-*V. cholerae* O1 y un control negativo con solución salina estéril. No se recomienda aglutinar directamente del agar TCBS, pues es difícil emulsificar la colonia en el antisero.

Interpretación:

- a) **Reacción positiva:** se evidencia por aglutinación macroscópica con el antisuero anti-*V. cholerae* 01, y no en solución salina.
 - b) **Reacción negativa:** los cultivos que no aglutinan en el antisuero anti-*V. cholerae* 01, ni en solución salina.
 - c) **Los cultivos que también aglutinan en solución salina, no pueden ser serotificados; pues son cepas rugosas. En este caso, subcultivar en agar sangre de carnero.**
- 10. **Diferenciación de serotipos:** sólo es de interés epidemiológico; aglutinar en antisueros Ogawa e Inaba (ver Tabla No. 3).
 - 11. **Diferenciación de biotipos (biovars):** el biotipo "eltor" es Voges-Proskauer positivo y resistente a un disco de 50 unidades de polimixina-B. El biotipo "clásico" da las reacciones opuestas. Esta diferenciación también es de interés epidemiológico (ver Tabla No. 2).
 - 12. **Prueba de susceptibilidad:** debe efectuarse sobre agar Müller-Hinton. Inocular este medio con un hisopo a partir de un cultivo en caldo tripticasa-soya. Este cultivo líquido debe ser ligeramente turbio (semejante al estándar 0.5 de MacFarland). Dejar secar por corto tiempo y luego aplicar discos de tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, eritromicina y ampicilina. Proceder e interpretar de acuerdo a la técnica estándar, según Bauer-Kirby y colaboradores. En vista que puede presentarse resistencia a la tetraciclina, en cada región debe conocerse el patrón de susceptibilidad de las cepas recientemente aisladas.
 - 13. **Tratamiento de muestras de heces:** Antes de eliminar las excretas que podrían contener *V. cholerae* se les debe adicionar solución de cloro al 1-5%, y dejarlas en contacto por lo menos 30 minutos.

ESQUEMA No. 1

ESQUEMA DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *V. cholerae* O1



AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae* DE ALIMENTOS Y AGUA

El agua y los alimentos contaminados, constituyen vehículos muy importantes en la transmisión del cólera; las fuentes de infección pueden ser las siguientes:

1. Vegetales y frutas lavadas o regadas con agua contaminada y que usualmente se consumen crudos (como lechuga o aplo).
2. Preparación de bebidas con agua contaminada.
3. Pescado y mariscos provenientes de aguas contaminadas, sobre todo cuando éstas son aguas costeras poco profundas, y consumidos crudos o insuficientemente cocinados.
4. Vegetales de hojas que han sido "refrescados" con agua contaminada.
5. Exposición de los alimentos a las moscas.
6. A través de personas contaminadas, infectadas o enfermas que manipulan alimentos y no cumplen las mínimas condiciones de higiene, como el lavarse las manos con agua y jabón antes de preparar los alimentos.

Vibrio cholerae puede sobrevivir en alimentos húmedos, poco ácidos y en refrigeración por 2 semanas o más. En alimentos muy ácidos (pH 4.5) su sobrevivencia es menor de un día y en alimentos secos menos de 2 días. En equipo y utensilios de servicio el organismo puede sobrevivir de 4-48 horas.

V. cholerae no se multiplica en el agua, pero puede sobrevivir hasta 2 semanas, dependiendo del número de organismos depositados, nutrientes presentes, disponibilidad de oxígeno, temperatura, pH, contenido de sal, materiales orgánicos y otros factores. Sobrevive muy bien en agua de mar y más tiempo en cubos de hielo que en agua fresca no congelada (ver Tabla para viabilidad de *V. cholerae* en diferentes alimentos, agua y fomites).

El aislamiento de *V. cholerae* de alimentos y agua, utiliza más o menos el mismo procedimiento que el usado para el aislamiento del organismo de muestras clínicas, aunque con ciertas modificaciones, debido a que por lo regular el microorganismo se encuentra en muy bajo número.

Las muestras de alimentos y agua sospechosos de estar contaminados deben ser recolectadas y refrigeradas (a 4-10°C, no congelar), y ser procesadas lo antes posible.

Alimentos sólidos: Preparar una dilución 1:10. Pesar 25g del alimento, adicionar 225 ml. de agua peptonada alcalina (APA) y homogenizar. Incubar por 6 a 8 horas a 35°C-36°C y sembrar posteriormente en agar TCBS. El período de enriquecimiento es crítico y no debe pasar de 8 horas; el crecimiento competitivo de otros organismos puede enmascarar a *V. cholerae*. Continuar según el Esquema No. 1

Agua y alimentos líquidos: el procedimiento varía, ya que previo al enriquecimiento la muestra debe ser filtrada o usar el método de doble enriquecimiento con APA.

Método de filtración por membrana:

Para agua, debe filtrarse de 1 a 10 litros de muestra. Si la muestra es poco turbia se filtra directamente a través de un filtro de membrana Millipore con un poro de 0.45 micras de diámetro. Para aguas muy turbias, debe prefiltrarse a través de un filtro hecho con una suspensión de tierra de diatomeas estéril (5g/lt de agua destilada) y continuar con el filtrado de la muestra. La membrana de filtración se coloca luego en agua peptonada alcalina (pH 9) y se incuba por 6 y 18 horas a 35°C-36°C. Sembrar de la superficie de APA a agar TCBS a las 6 hrs y luego a las 18 hrs e incubar 24 hrs a 35°C-36°C. Continuar según el Esquema No. 1.

Método de doble enriquecimiento con agua peptonada:

En los laboratorios que no cuentan con un equipo para filtración, puede utilizarse la siguiente técnica:

1. Colocar 200 ml del agua a examinar (colectada en frascos estériles) y agregarle 20 ml de agua peptonada al 10 por ciento con cloruro de sodio.
2. Ajustar el pH a 9.2 con hidróxido de sodio 1N, e incubar toda la noche a 35°C-36°C
3. Transferir 1 a 2 ml de esta muestra a un tubo con 10 ml de agua peptonada alcalina e incubar durante 6 horas a 35°C-36°C.
4. Sembrar una asada de la superficie de este caldo en agar TCBS y continuar según el Esquema No. 1.

VIABILIDAD DE *Vibrio cholerae* EN LOS ALIMENTOS, AGUA Y FOMITES

ARTICULOS	Supervivencia (días)	
	30-32°C	5-10°C
Alimentos cocinados: Arroz, fideos, legumbres, frutas, pescado, carne, atole, tortas de arroz, salchichas, huevos, cereales, espinacas, tomates, guisantes, patatas	2-5	3-5
Hortalizas frescas: Tomates, cebollas, berenjenas, guisantes, apio, judías verdes, calabazas, patatas, col, pepinos, melones, lechugas, zanahorias, coliflor, ajo, pimienta, perejil, maíz.	1-7	7-10
Pescado y mariscos: Camarones salados, mariscos, ostras, filetes de pescado, pescado ahumado, pescado seco	2-5	7-14*
Frutas: Guayaba, banana, mango, lima, naranja, toronja, mandarina, melón, papaya, piña.	1-3	3-5
Frutos secos: Dátiles, higos, pasas, cacahuates, nueces, avellanas	1-3	—
Bebidas: Cerveza, coca-cola, gaseosa, Leche y productos lácteos: Leche, helados, mantequilla	1 7-14	1 14 o más
Cereales: Arroz, trigo, lentejas, otras leguminosas	1-3	3-5
Especias: Chile rojo, cardamomo, canela, semillas de alcaravea, granos de pimienta, pimienta molida, hojas de laurel, raíz de jengibre	1-5	
Dulces: Dulces de leche	1-2	
Varios: café molido, hojas de té, requesón (yogurt), arroz (tras una noche de remojo), agua de cisterna o pozo, agua de mar	menos 1 1 hora 7-13 10-13	18 60
Fomites: Aluminio laminado, monedas, papel, carbón, cemento, metales, minerales, superficies barnizadas Algodón, tabaco, seda, caucho, plásticos, cuero.	1-2 3-7	

[Referencia No. 9]

* Más de tres semanas en la carne y el pescado conservados en refrigerador

Tabla No. 1

PRUEBAS DE IDENTIFICACION de *Vibrio cholerae*

Prueba :	<i>V. cholerae</i>
Oxidasa	+
Crecimiento en caldo nutritivo sin NaCl	+
Crecimiento en caldo nutritivo + 1% NaCl	+
Movilidad	+
Indol*	+
Descarboxilación aminoácidos:	
Arginina	—
Lisina	+
Ornitina	+
Fermentación de sacarosa (sucrosa)	+

- * Esta prueba puede realizarse en caldo nutritivo con 1% de cloruro de sodio o en medio MIO (movilidad-indol-ornitina), donde también puede observarse la movilidad. Las pruebas deben interpretarse hasta las 48 horas de incubación a 36°C. La prueba de oxidasa es inmediata.

Tabla No. 2

DIFERENCIACION DE BIOTIPOS DE *V. cholerae* 01

Prueba	Biotipo:	
	Clásico	Eltor
Voges-Proskauer*	—	+
Hemólisis a eritrocitos de carnero	—	+
Zona de inhibición a disco de polimixina-B 50 UI	+	—

- * Esta prueba se debe efectuar en caldo MR VP + 1% NaCl, según el método de Barrít.

Tabla No. 3

DIFERENCIACION DE *V. cholerae* 01 EN SEROTIPOS

Serotipo:	Tipos de antígenos somáticos:	Aglutinación anti-suero absorbido:	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima	A, B, C	+	+

IV. APENDICE:

PREPARACION DE ALGUNOS MEDIOS DE CULTIVO

Agua peptonada alcalina (APA):

Peptona	10.0 g*	* g= gramos
Cloruro de sodio	10.0 g	**ml=mililitros
Agua destilada	1000.0 ml **	

pH final: 9.0-9.2

Llevar a pH con hidróxido de sodio 1N.

Distribuir 5ml en tubos 13x100 o de un mayor volumen con tapón de rosca, autoclavar 15 minutos a 121°C (15 libras de presión por pulgada cuadrada). Para alimentos autoclavar volúmenes mayores en erlenmeyers apropiados.

Cary Blair:

Tioglicolato de sodio	1.5 g
Na ₂ HPO ₄ (fosfato dibásico de sodio)	1.1 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	5.0 g
Agua destilada	991.0 ml

Disolver los ingredientes en el agua, por calentamiento y con agitación constante.

Enfriar a 50°C y adicionar 9 ml de cloruro de calcio al 1% recién preparado (0.1 g de cloruro de calcio + 10 ml de agua).

Ajustar el pH a 8.4 con hidróxido de sodio 1N y distribuir 6 ml en tubos 13x100 con tapón de rosca dejando un pequeño espacio de aire entre la tapadera y el medio.

Esterilice a 100°C en baño de María hirviendo por 15 minutos.

Apretar los tapones y guardar en lugar frío y oscuro.

TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa) agar:

Extracto de levadura	5 g
Proteosa peptona No. 3	10 g
Citrato de sodio	10 g
Tiosulfato de sodio	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Bilis de buey (sales biliares)	8 g
Sacarosa	20 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol (25°C)	0.04 g pH final: 8.6 ± 0.2
Azul de timol	0.04 g
Agar	15 g

El agar comercial se prepara pesando 89 gramos (según instrucciones del productor) para un litro de agua destilada. Se calienta para disolver agitando constantemente y llevar a ebullición. "NO AUTOCLAVEAR". Enfriar a 50°C y ajustar el pH a 8.6 con hidróxido de sodio 1N y vaciar de 15 a 20 ml en cajas de Petri.

ALGUNAS PRUEBAS BIOQUIMICAS:

Oxidasa:

- Preparar una solución al 0.5% de dihidrocloruro de tetrametil p-fenilendiamina en agua destilada cada día (1 pizca + 1 ml de agua).
- Colocar en tiras o discos de papel filtro gotas del reactivo.
- Remover una porción del crecimiento en agar nutritivo, agar tripticasa-soya o agar sangre con palillo de madera y frotar sobre el papel filtro humedecido.
- Observar un cambio de color: el cambio a azul o púrpura dentro de un tiempo de 10 segundos es una prueba positiva.
- Incluir siempre un control positivo (*Pseudomonas aeruginosa*) y un control negativo (*E. coli*) para estar seguro del resultado.

Voges-Proskauer:

Prueba para identificación de enterobacterias y otros bacilos gram-negativo; método de Barrit.

1. Solución A:

Naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

2. Solución B:

KOH	40 g
Agua destilada	100 ml

- Adicionar 0.6 ml de la solución A y 0.2 ml de la solución B a 1 ml de cultivo en caldo MR-VP del organismo evaluado, incubado a 37°C por 48 horas.
- Mezclar bien después de la adición de cada reactivo; no tapar el tubo. Dejar en reposo por 15 minutos.
- Reacción positiva: presencia de color rojo que empieza a aparecer en la superficie del medio.

V. BIBLIOGRAFIA:

1. Baron EJ & Finegold SM. *Vibrio* and Related Species, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Campylobacter*, and Others. in: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 8t ed. The C.V. Mosby Company. St. Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto. 1990.
2. Center for Disease Control, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Vol. 40, No. 6, p. 108 Cholera-Perú, February 15, 1991.
3. Farmer JJ, Hickman-Brenner FW, & Kelly MT. *Vibrio*. in: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1985.
4. Fitzgerald JH. Management of acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 8:564-569, 1989.
5. Gangarosa E.J. & Mosley Wyley H. *Colera Asiático*. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana: 135-154 Febrero, 1972.
6. González Camargo, C.L. Examen Bacteriológico de Heces Fecales cuando se sospecha Cólera. En: *Manual de Laboratorio Clínico*, Departamento de Laboratorios Centrales, D.G.S.S. Ministerio de Salud Pública y A.S. 4a. Edición página 146 y 5a. Edición página 165. Tipografía Nacional, Guatemala, C.A. 1975 y 1979.
7. *Micro-Organisms in Foods. Their significance and methods of enumeration*, Second edition. ICMSF, Toronto, 1978.
8. Madden, JM, MacCardell, BA & Boutin, B.K. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae*. *Bacteriological Analytical Manual FDA/BAM* 6th. edition, 1984.
9. Nicoletti, G. y Nicolosi, V.M. *Diccionario de Bacteriología Humana*. Centro Documentación Científica Menarini, Barcelona, 1990.
10. *Principios y Práctica de la Lucha Contra el Cólera*. Cuadernos de Salud Pública No. 40 Organización Mundial de la Salud, 1970.
11. *Standard Methods. For the Examination of Water and Wastewater* 15th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1980.
12. World Health Organization. *Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases*, CDD/83.3 Rev. 1, 1987.
13. World Health Organization. *Pautas para el Control del Cólera*. DOC W H O / CDD/Ser/80.4 Rev.2, 1991.

FIGURAS



Figura 1.

Tubo de medio de transporte Cary-Blair, que contiene dos hisopos con muestra fecal. Mantiene la viabilidad de *Vibrio cholerae* y otros enteropatógenos.

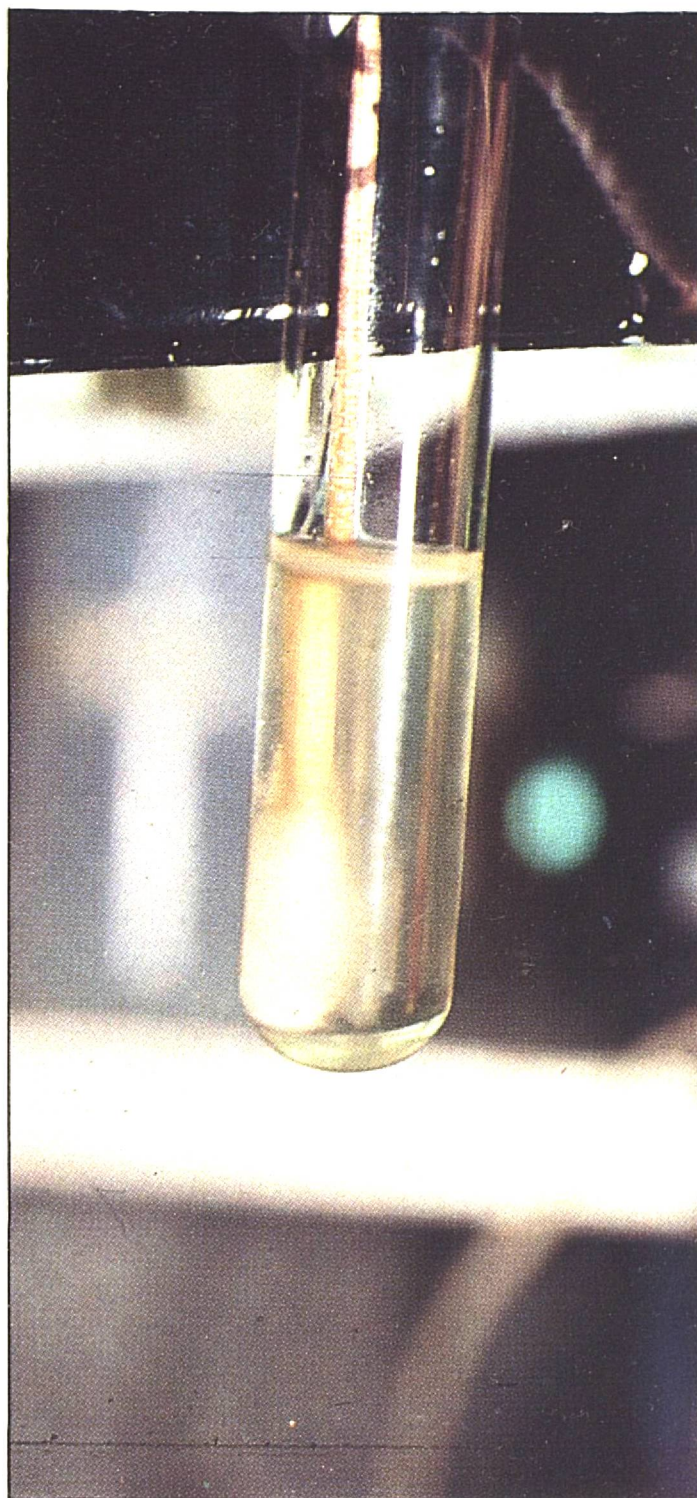
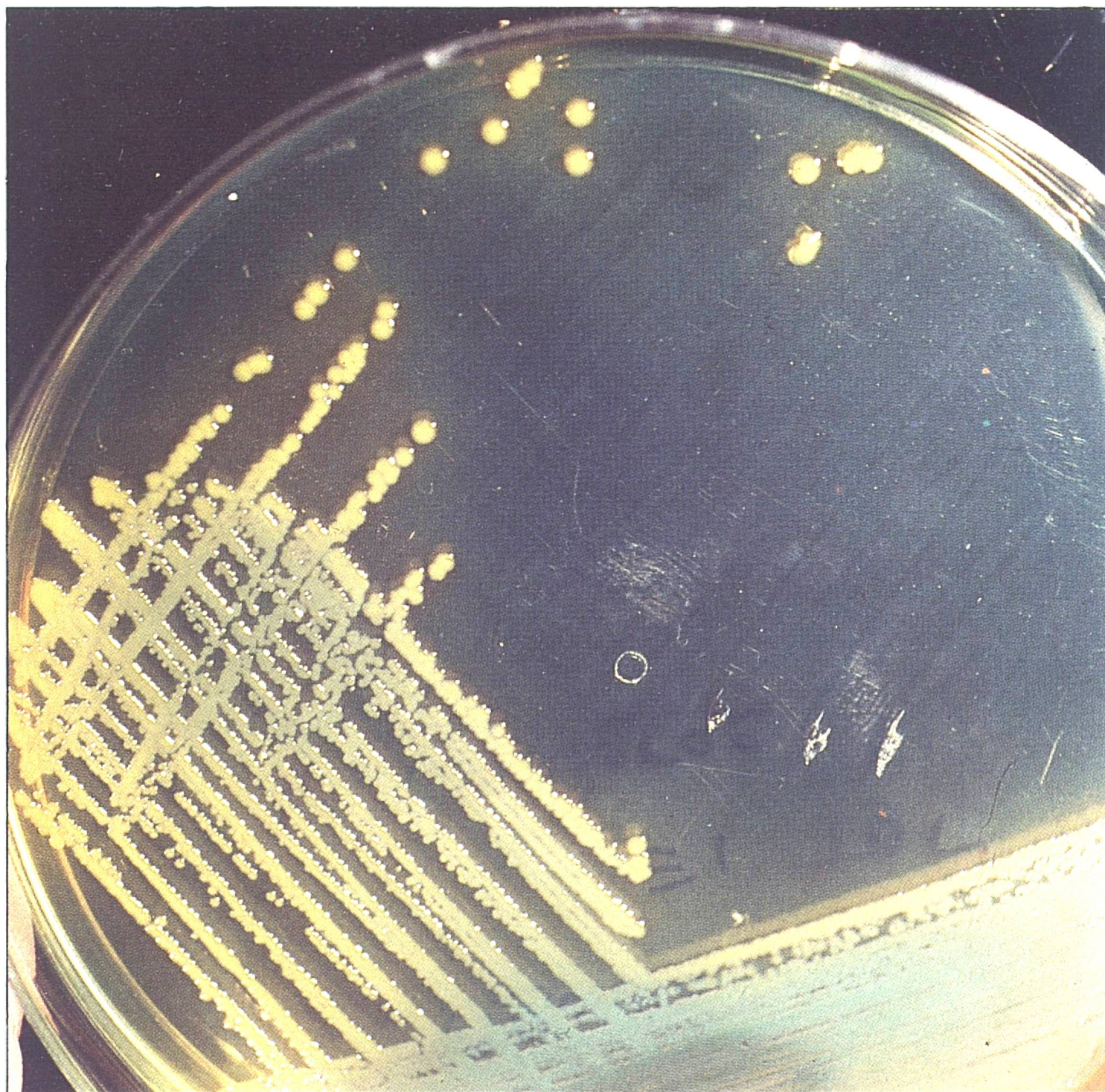


Figura 2.

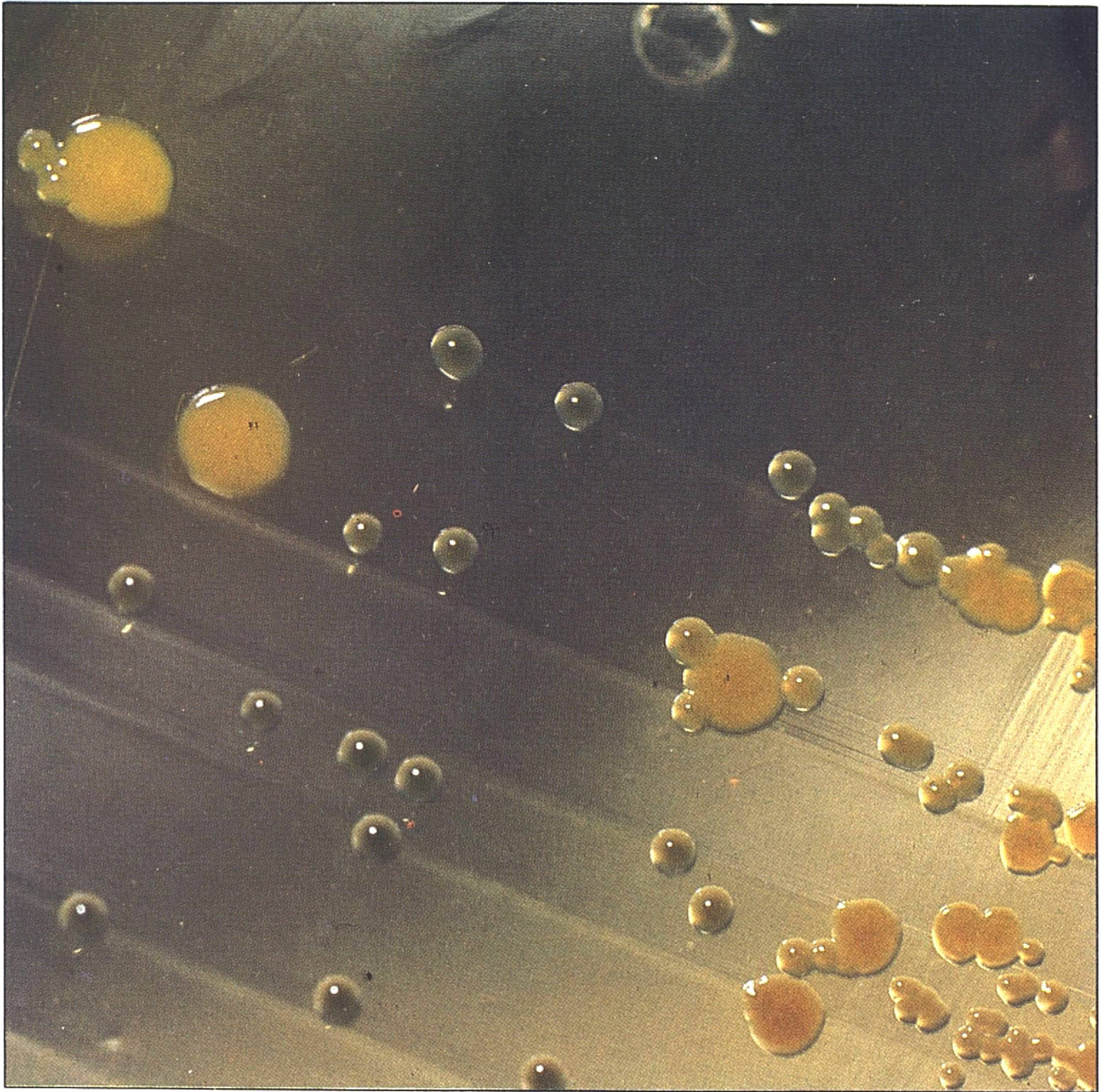
Tubo con agua peptonada alcalina inoculado con *Vibrio cholerae*. Después de incubación a 36°C de 5 a 8 horas, puede observarse una película blanca de crecimiento en la superficie.

Figura 3.



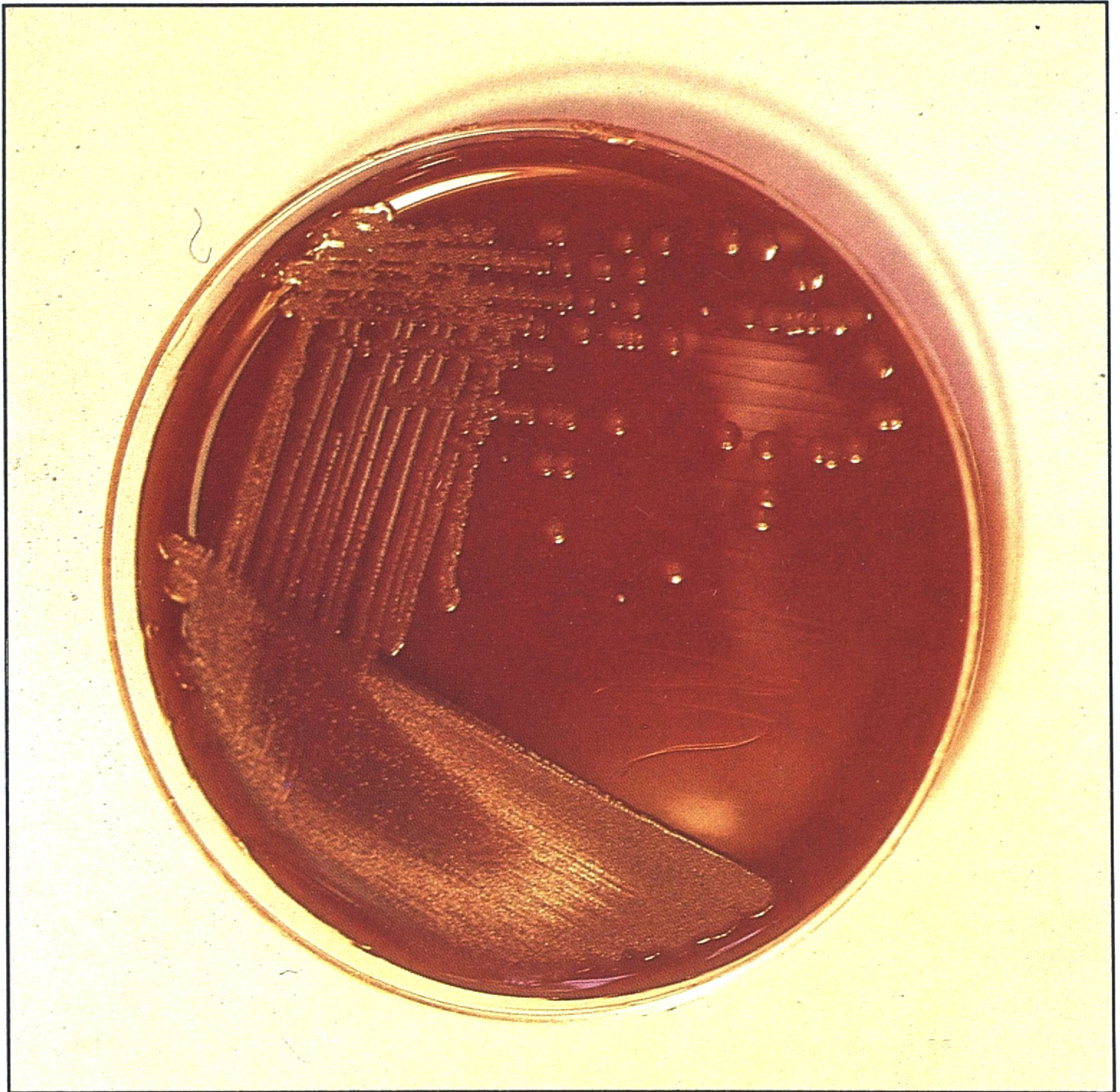
Cultivo puro de ***Vibrio cholerae*** en agar TCBS. Presenta colonias sacarosa positivo, amarillas y aplanadas.

Figura 4.



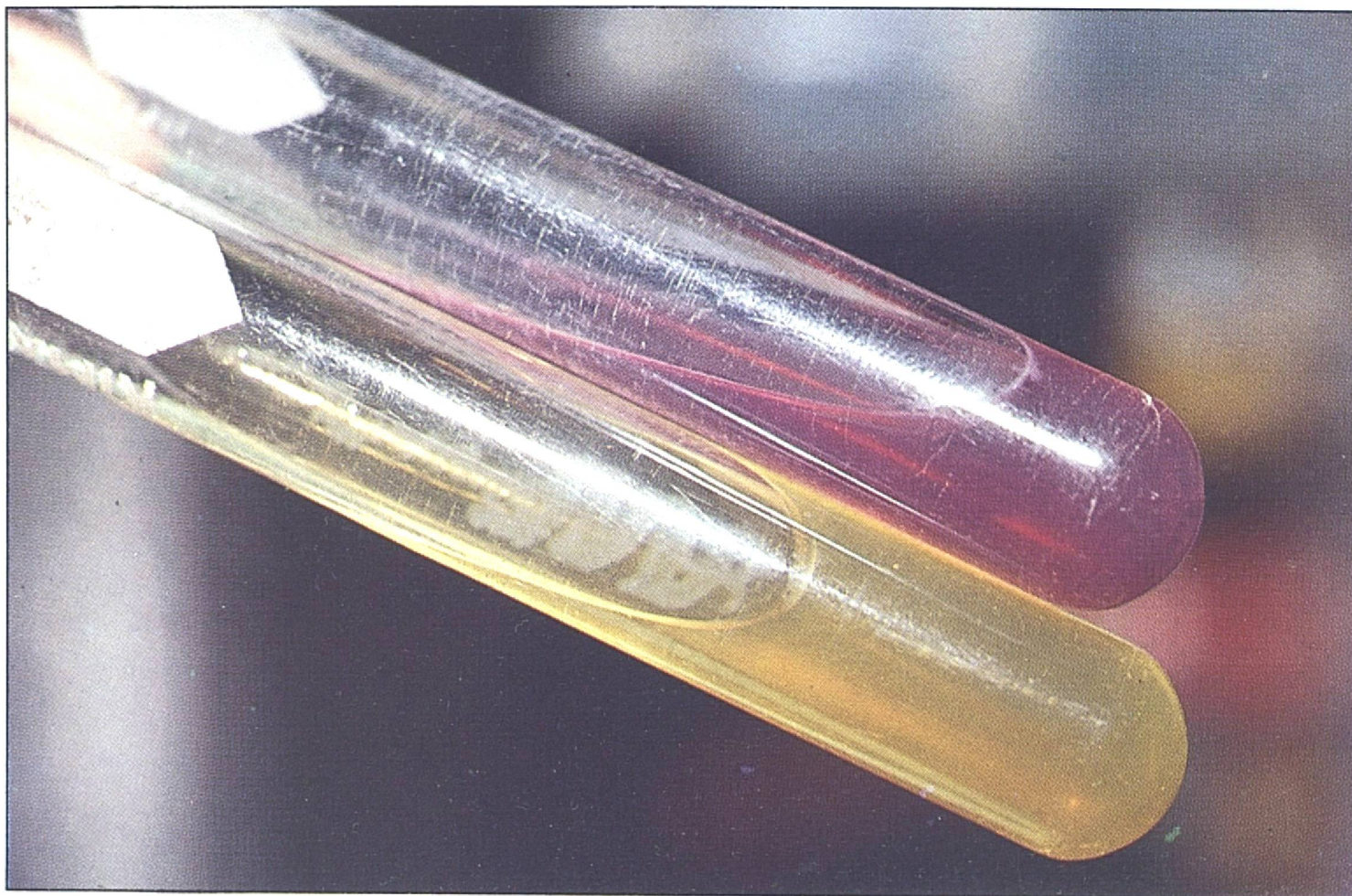
Cultivo mixto de *Vibrio cholerae* y *V. mimicus* en agar TCBS. Las colonias del primero son grandes, amarillas y con bordes aplanados; *V. mimicus* presenta colonias pequeñas y verdes, sacarosa negativo.

Figura 5.



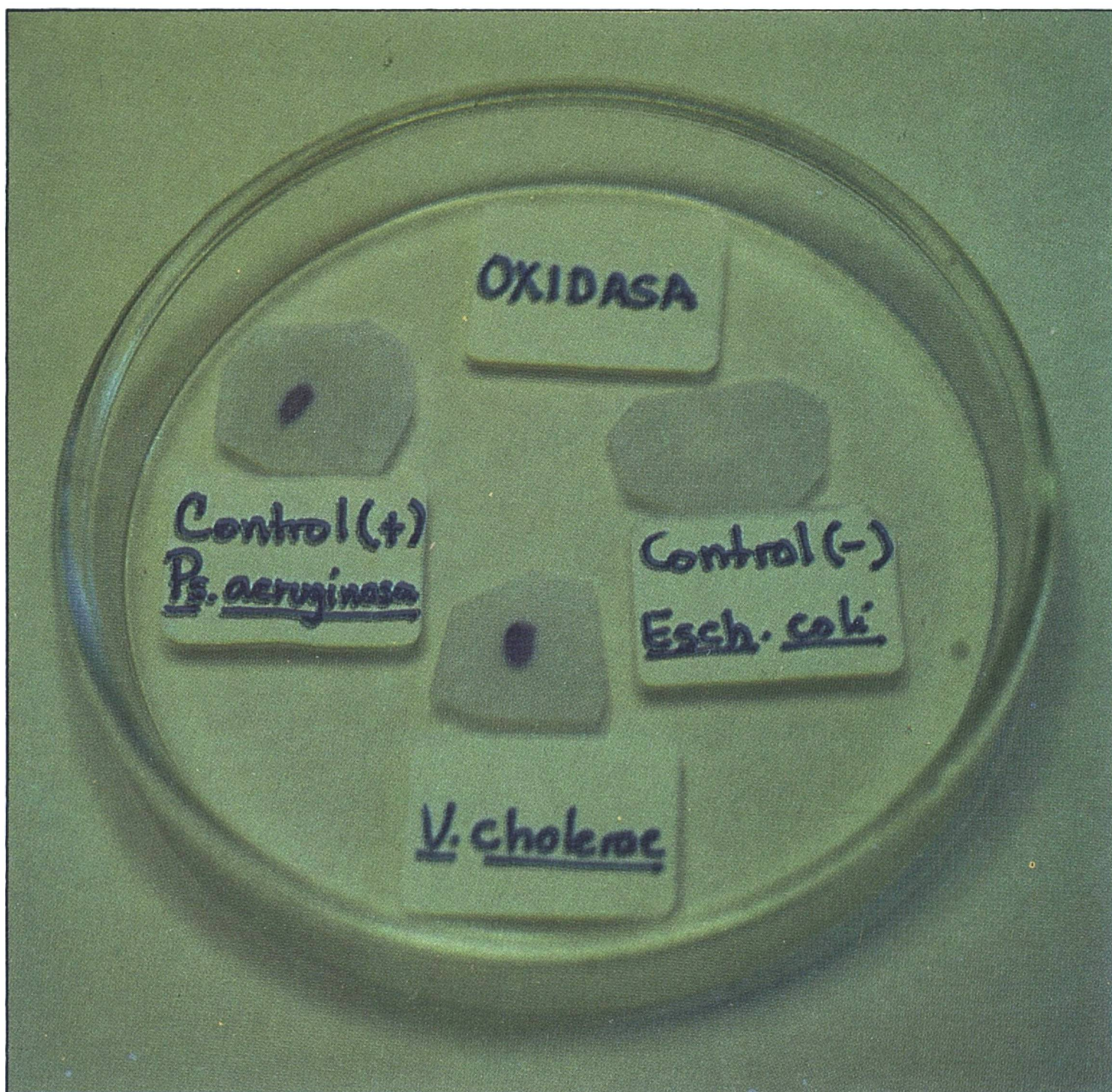
Cultivo de *V. cholerae* en agar sangre de carnero al 5%. La prueba de oxidasa debe efectuarse a partir de cultivos puros. Teóricamente el biotipo eltor es hemolítico; parece haber perdido esta característica.

Figura 6.



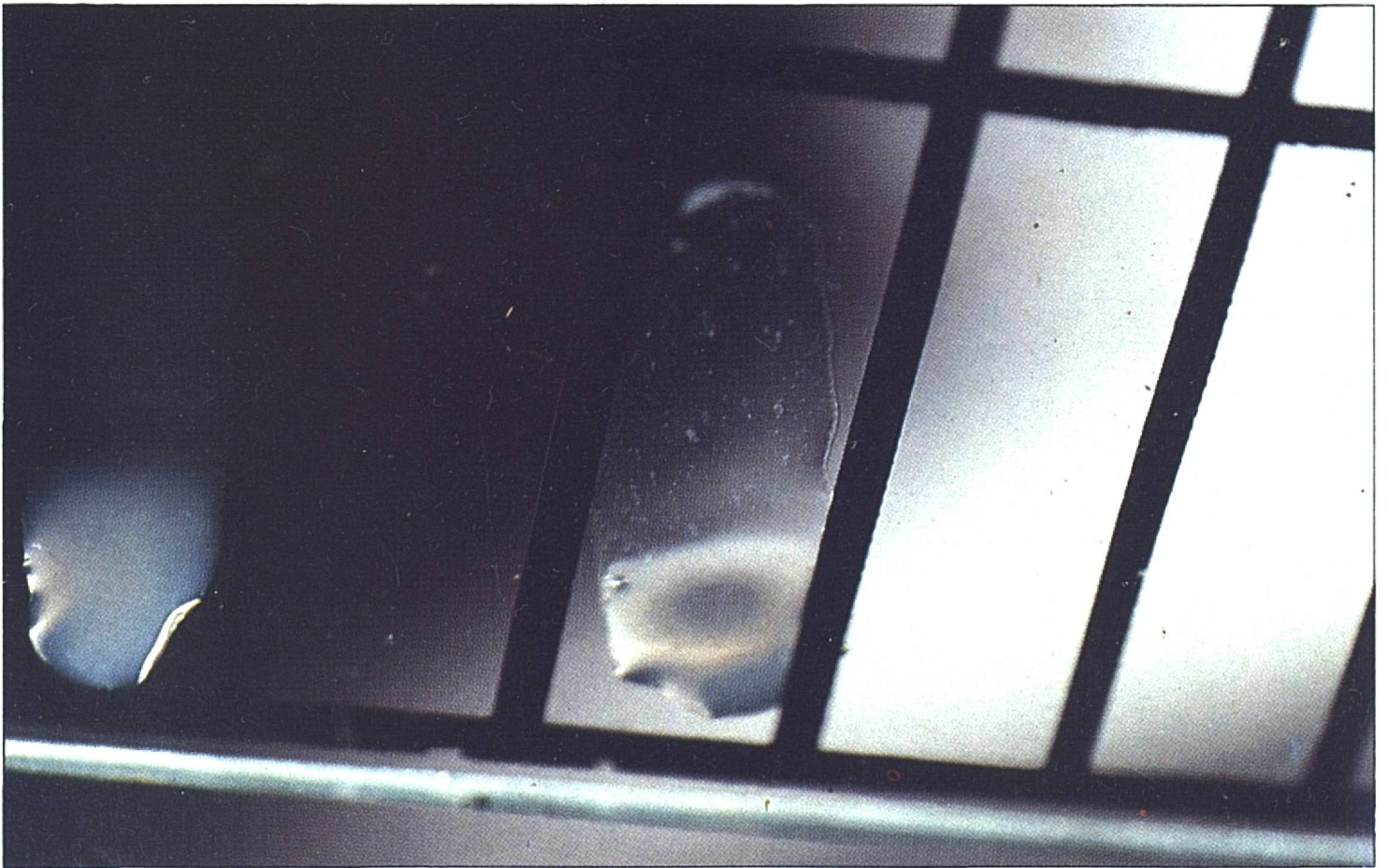
Reacciones de *V. cholerae* en TSI (A/A) y LIA (K/K-N). No produce gas ni ácido sulfhídrico. En TSI puede dar también la reacción alcalino/ácido (K/A).

Figura 7.



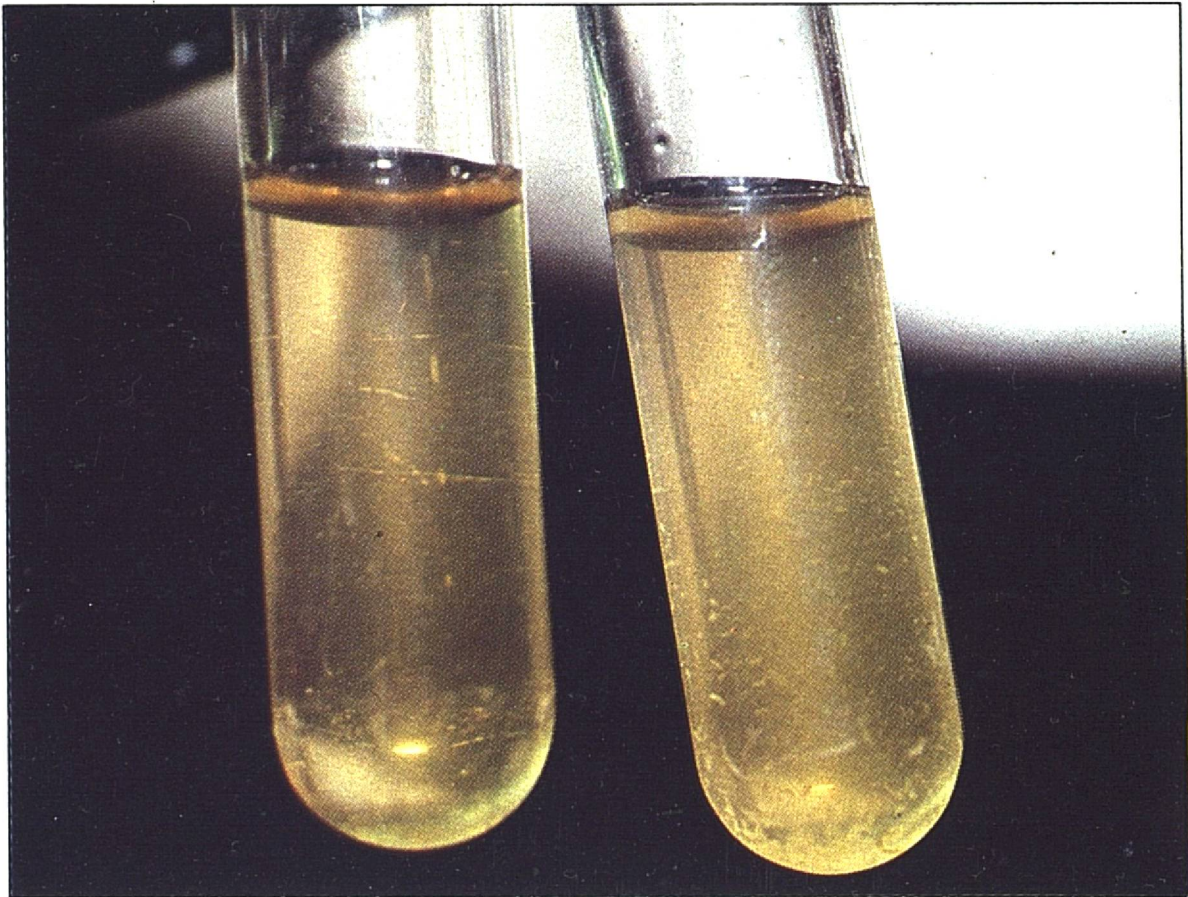
Prueba de indofenol oxidasa. Es fundamental para la identificación de *V. cholerae*, que da la prueba positiva. Siempre deben usarse controles positivos y negativos.

Figura 8.



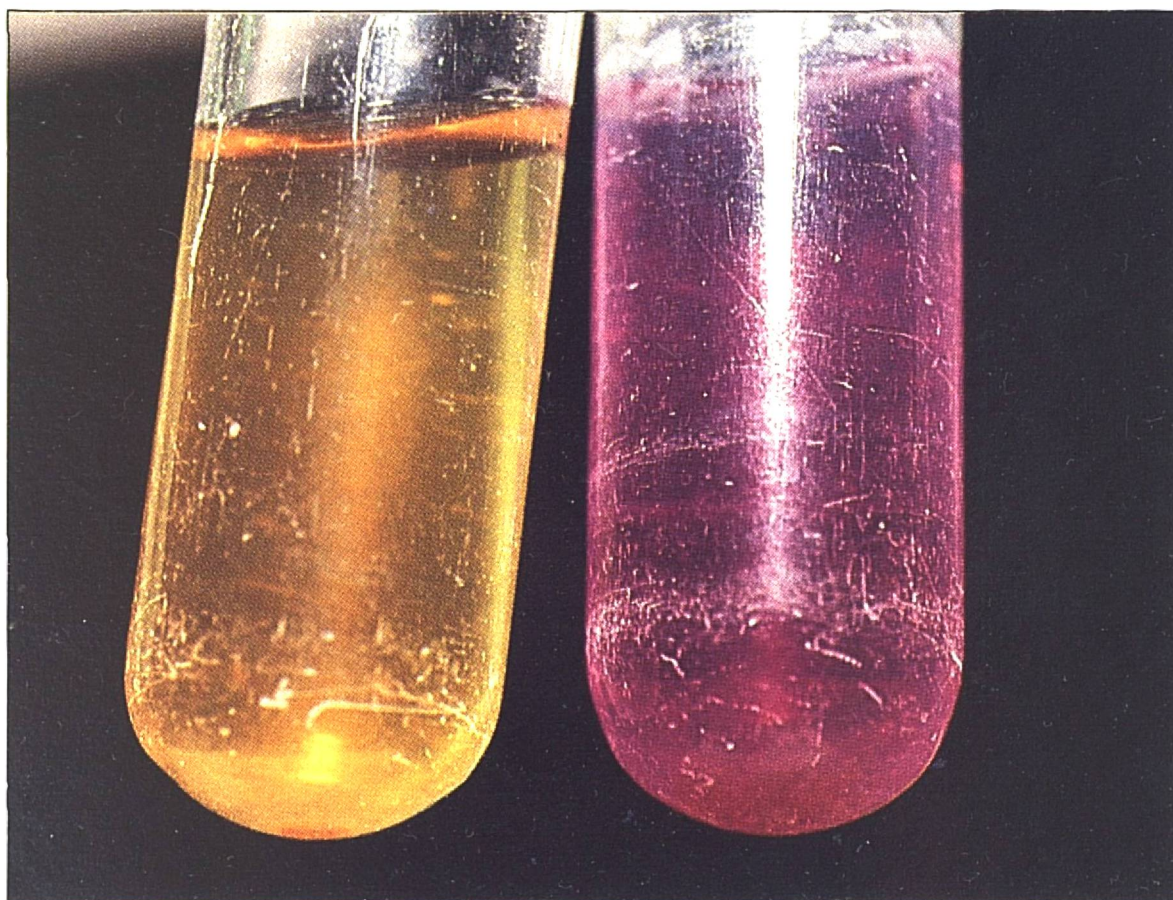
Aglutinación positiva de *V. cholerae* 01 con antisuero de conejo homólogo. Presenta una aglutinación fina.

Figura 9.



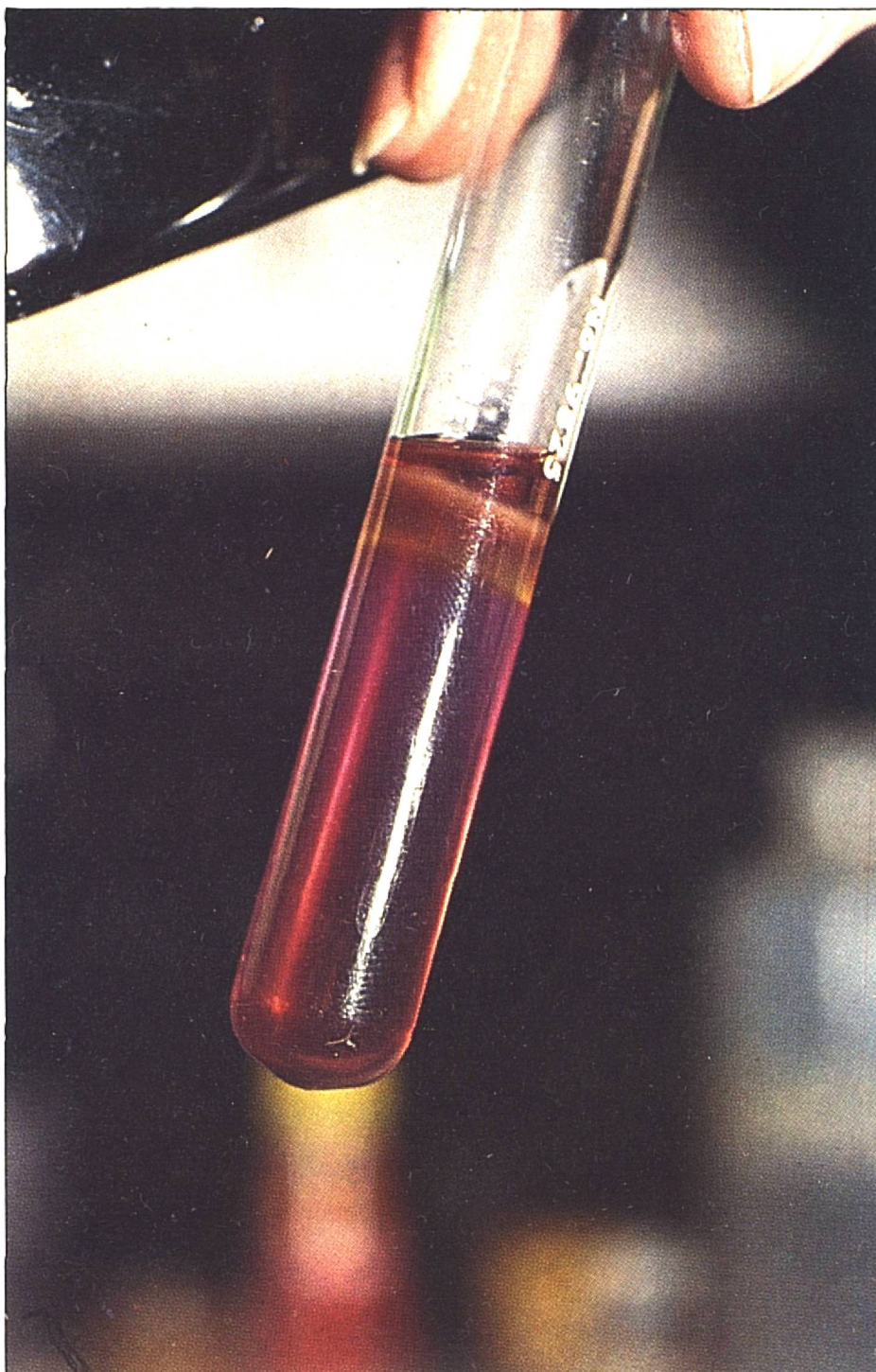
V. cholerae no es halófilo, pero si halotolerante, por lo que crece bien tanto en caldo nutritivo con y sin NaCl.

Figura 10.



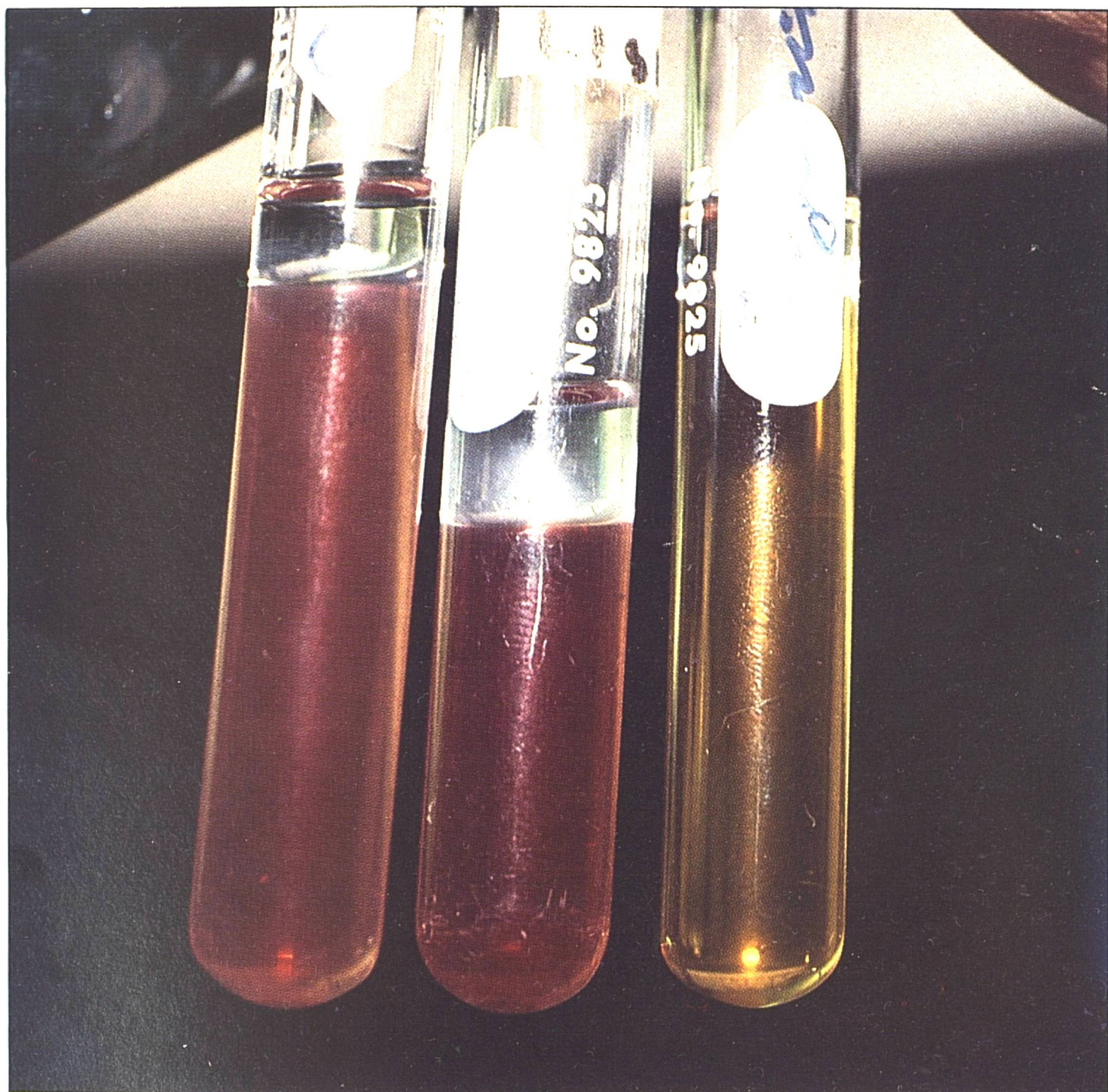
V. cholerae fermenta la sacarosa (tubo amarillo), y ***V. mimicus*** no lo hace (tubo morado).

Figura 11.



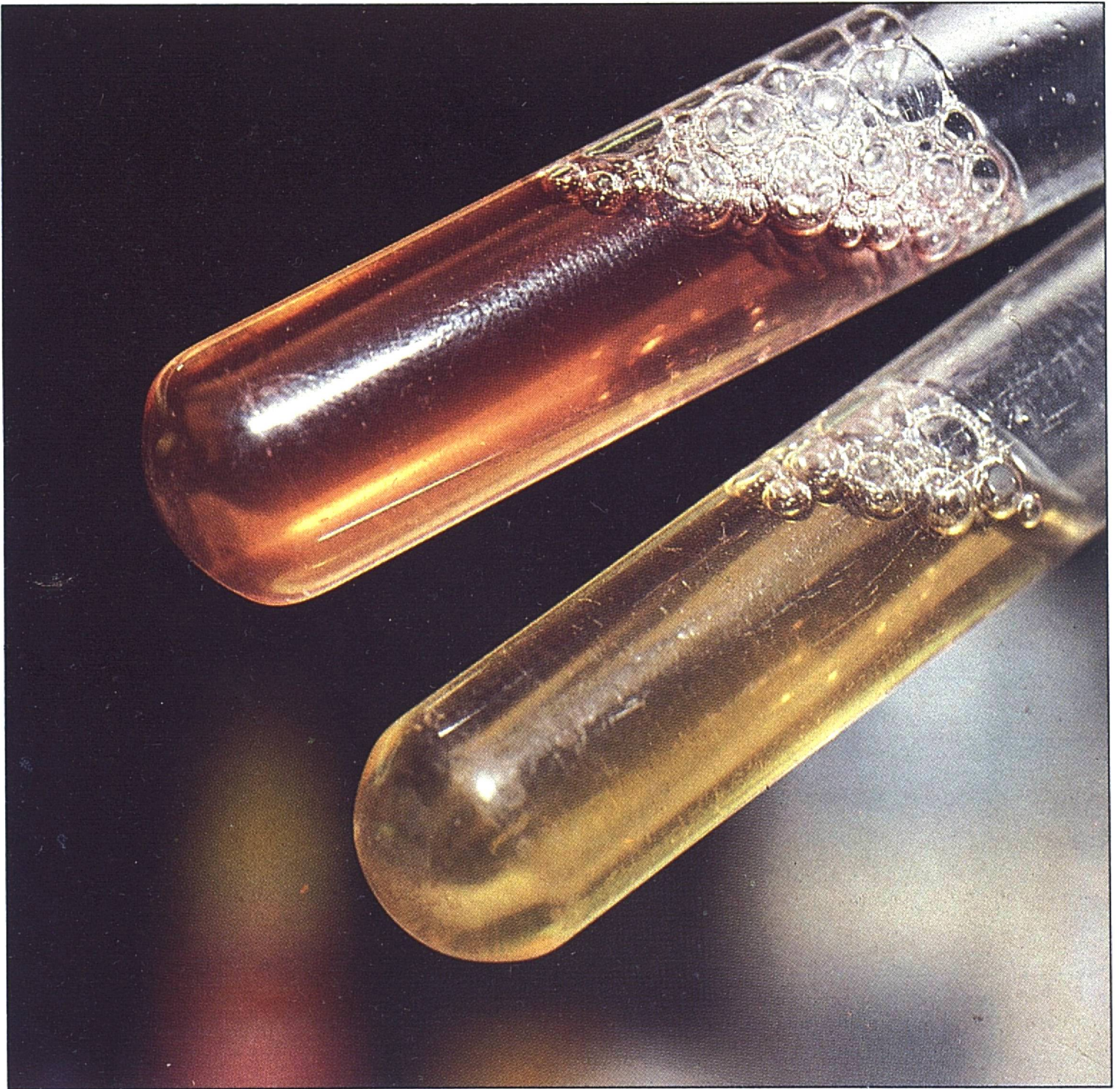
V. cholerae en medio MIO (movilidad, indol y ornitina); las tres pruebas son positivas.

Figura 12.



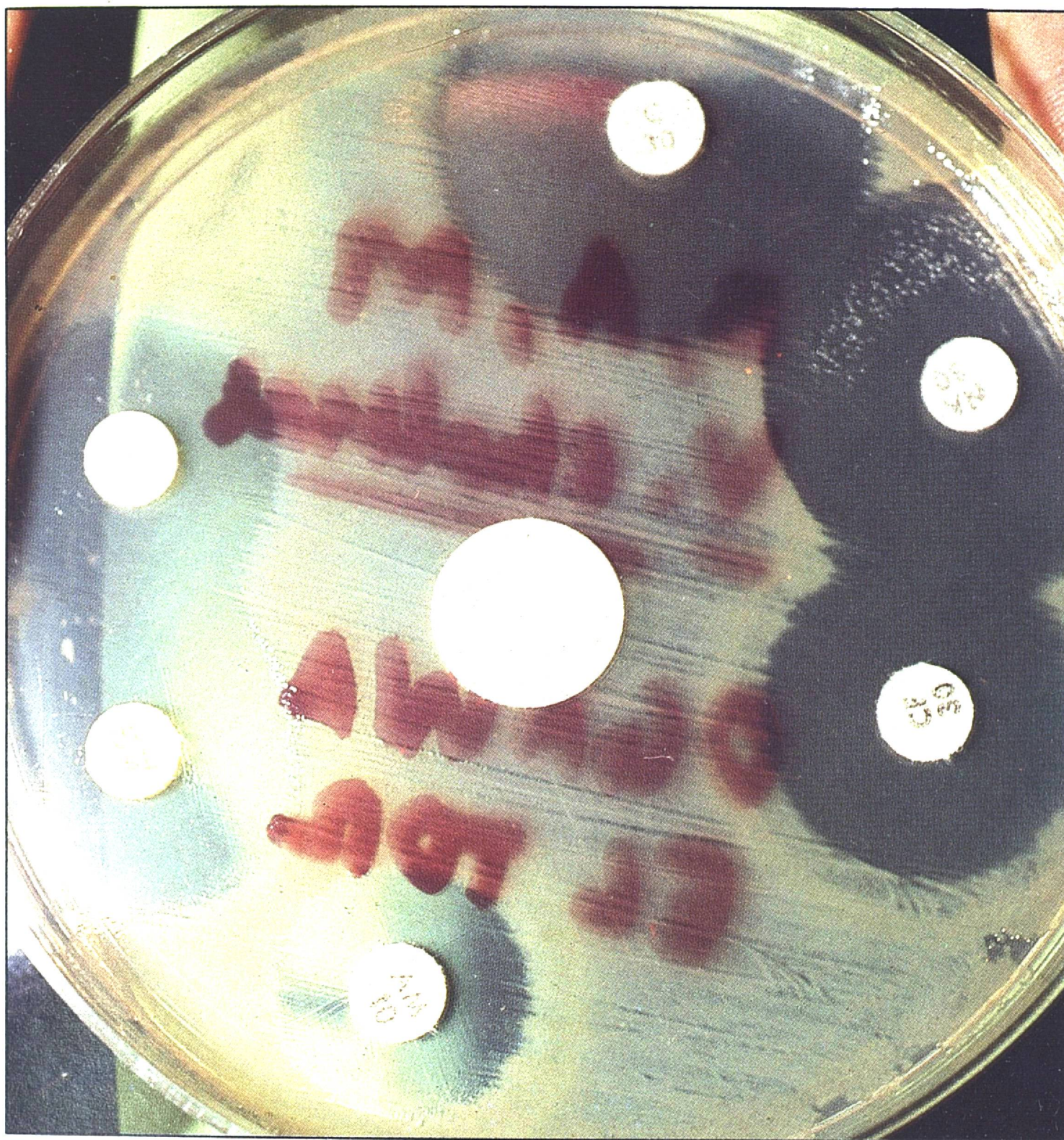
Prueba de "OLA" (descarboxilación de ornitina, lisina y arginina); sólo la arginina es negativa (amarillo).

Figura 13.



Prueba de Voges-Proskauer: es positiva para el biotipo eltor (rojo), y negativa para el biotipo clásico.

Figura 14.



Prueba de susceptibilidad según el método de Bauer-Kirby. El biotipo eltor es resistente al disco de 50 UI de Polimixina-B, que se observa en el centro.

Fotografías tomadas por Miguel F. Torres, Q.B., M.A., durante el I Curso de Diagnóstico de ***Vibrio cholerae*** O1, Laboratorios de Microbiología "Leonardo J. Mata", Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Guatemala, 21, 22 y 25 de marzo 1991. Este curso fue coordinado por Floridalma Cano Q.B., INCAP.

Agradecimiento al Dr. José Ramiro Cruz, Coordinador de la Sección de Nutrición, Infección e Inmunología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), por la revisión del manuscrito.

Esta publicación se terminó de imprimir en los talleres gráficos de Serviprensa Centroamericana de Guatemala, el día 2 de agosto de 1991. La edición consta de 1,000 ejemplares en papel couché base 100.