

IV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Publicación INCAP E-1389



MEMORIAS

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

25-29 NOVIEMBRE 1991

CONSIDERACIONES SOBRE EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO
DE VIBRIO CHOLERAE

Cano, Florida Alma

Programa de Infección, Nutrición e Inmunología. INCAP

En la vigilancia del cólera, la eficacia de los servicios de laboratorio juega un papel importante en el diagnóstico temprano de casos y en la investigación epidemiológica, a través de la identificación del agente causal del cólera: Vibrio cholerae O1. La metodología a aplicar en la recuperación y aislamiento de V. cholerae, depende del tipo de muestra: heces, agua, alimentos y otras. En general se utilizan los siguientes medios de cultivo:

Enriquecimiento-selectivo: Agua peptonada alcalina (APA), de preferencia pH 9.0 a 9.2. Se utiliza para una mejor recuperación cuando la cantidad de vibrios es baja.

Aislamiento selectivo: Agar TCBS (tiosulfato-citrato-sales biliares), es el más recomendado. Las colonias de V. cholerae se observan de color amarillo intenso, indicativo de la fermentación del carbohidrato sucrosa presente en el medio. Esto ayuda a una diferenciación inicial de las especies de Vibrio que no fermentan sucrosa y de algunas especies de bacterias que el medio permite su crecimiento.

Medios no selectivos: V. cholerae, crece bien en cualquier medio no selectivo como agares nutritivo, tripticasa soya, Mueller-Hinton, agar sangre. Estos medios se utilizan para subcultivar colonias sospechosas y realizar la prueba de indofenol-oxidasa. Vibrio es oxidasa positivo (a excepción de una especie).

Medios y reactivos para caracterización bioquímica: Los fundamentales son: a) TSI o KIA para observar la fermentación de glucosa (fondo amarillo), para su diferenciación de bacilos oxidasa positivo, pero no fermentadores de glucosa. b) Reactivo de oxidasa (prueba de Kovacs: N'N'N' tetrametil-parafenilendiamino), c) Desoxicolato de sodio, para la prueba del cordón, que ayuda a diferenciar entre el género Vibrio y Aeromonas, d) Caldo nutritivo o triptonal al 1% sin cloruro de sodio.

Antisuero anti-V. cholerae 01: Indispensable para confirmar si la cepa de V. cholerae aislada corresponde al serogrupo 01. Si se desea conocer el serotipo (Ogawa, Inaba e Hikojima) y biotipo (clásico o eltor), lo que es de interés epidemiológico es necesario contar con los antisueros y reactivos respectivos. La serología se realiza a partir de TSI o del agar selectivo.

El diagnóstico de V. cholerae de heces de pacientes sintomáticos es fácil y puede ser llevado a cabo en menos de 24 horas, siempre que se disponga de las facilidades de laboratorio. En el esquema 1 se ilustran los pasos a seguir. Sin embargo, en las personas asintomáticas es más difícil, los vibriones se excretan en cantidades reducidas, siendo necesario el paso de enriquecimiento con APA.

En muestras de agua y alimentos, la detección de V. cholerae se dificulta por la cantidad de flora acompañante y la competencia con otros vibrios, que crecen adecuadamente en los medios utilizados en el aislamiento de V. cholerae. El uso de APA va incluido siempre en estos análisis, como diluyente y medio de enriquecimiento selectivo, recomendándose en alimentos con alta contaminación, otras diluciones además de la inicial (1:10). La cantidad y tratamiento varía de acuerdo al tipo de alimento. En el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) se explican bien estos pasos. En los alimentos como pescado, mariscos, principalmente ostras, recomiendan usar durante el enriquecimiento una temperatura de incubación adicional a la usual (35-37°C), que es de 42°C, para inhibir especies de vibrios diferentes a V. cholerae, que no crecen a esa temperatura.

V. cholerae sobrevive mejor en el agua que en los alimentos y la metodología a usar depende del origen del agua, utilizando siempre un paso de enriquecimiento con APA. En general para el análisis de aguas negras se utiliza la técnica del hisopo de Moore y para otro tipo de agua se pueden utilizar diversas técnicas: Filtración con membrana (millipore) y doble enriquecimiento.

Para la identificación de V. cholerae en alimentos y agua se siguen pasos similares a los de muestras clínicas, esquema 2. En base a experiencias vividas en el laboratorio, desde que llegó el cólera a nuestro país, se hacen las siguientes consideraciones:

No es necesario contar con una serie de pruebas bioquímicas para el diagnóstico de V. cholerae 01. En el caso de muestras clínicas, el diagnóstico es sencillo, y se puede realizar en no más de 24 horas, siempre que se cuente con las facilidades para su realización.

La prueba de oxidasa, se puede realizar del TSI o KIA, solo si la parte inclinada es alcalina (color rojo).

En agua y alimentos se aíslan otras especies de Vibrio, Aeromonas y otros, lo que requiere algunas veces de pruebas bioquímicas adicionales.

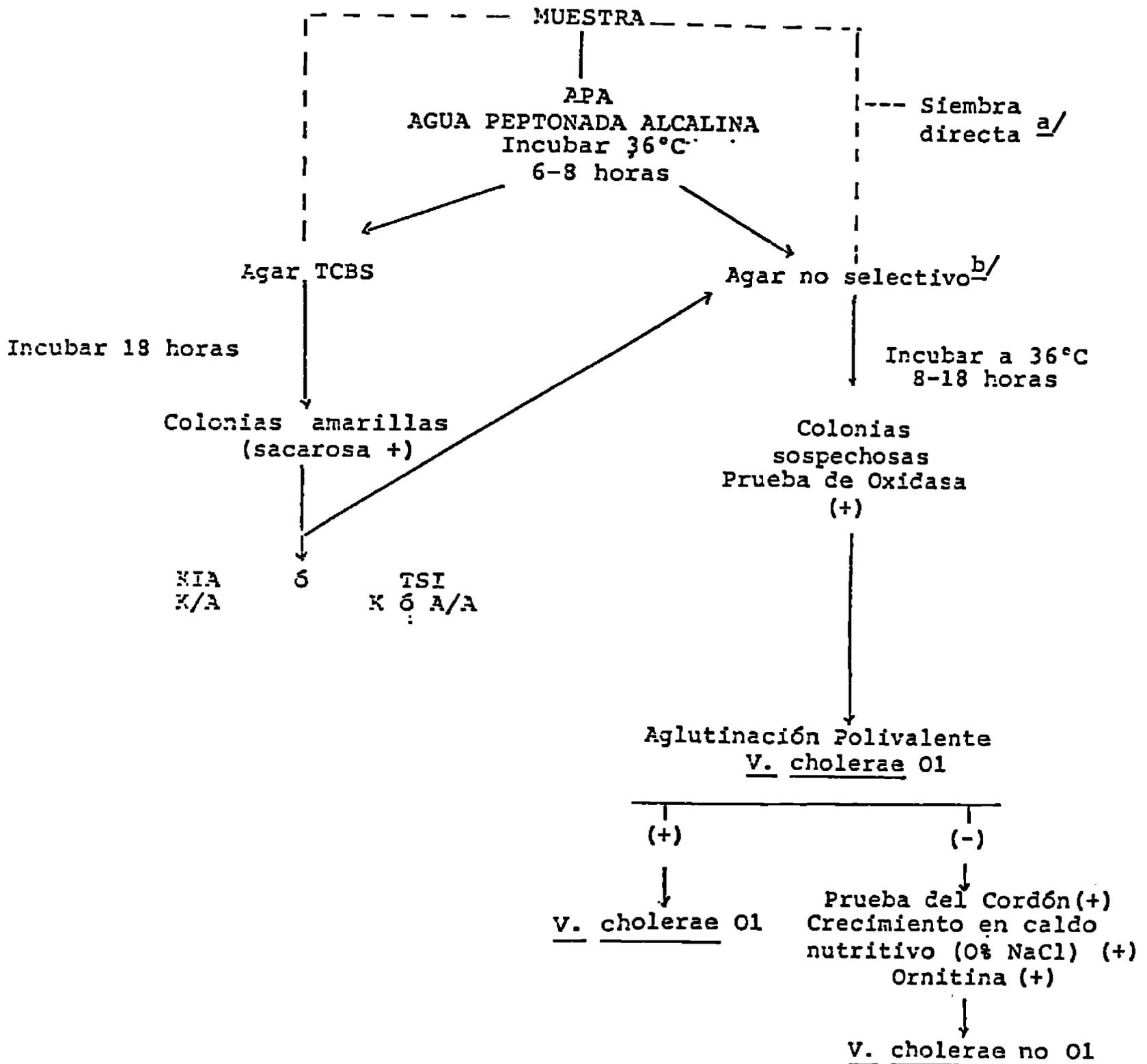
De la mayoría de muestras de agua se aísla frecuentemente V. cholerae no 01. V. cholerae no 01 es bioquímicamente igual a V. cholerae 01, diferenciándose de este porque no aglutina con el antisuero polivalente 01. Necesita para su confirmación de algunas pruebas bioquímicas como el crecimiento en un caldo nutritivo sin sal, pues se sabe que las únicas especies de Vibrio que no son halofílicas son: V. cholerae y V. mimicus. Este último se diferencia de V. cholerae únicamente por no fermentar la sacarosa.

En algunos casos se ha aislado en muestras de agua V. cholerae 01 y no 01 juntos; por lo que se recomienda picar no menos de 5 colonias sacarosa-positivo. Ambas colonias son similares.

Otro problema en el análisis de agua, es que se aíslan muchas cepas rugosas de V. cholerae, lo que impide su serotipificación. Debe usarse como primer paso en la serología un control negativo con solución salina estéril. Las cepas rugosas aglutinan con solución salina. Esto evitará el reportar falsos positivos.

Debido a que el antisuero polivalente 01, es uno de los insumos más caros, se realizaron pruebas, comprobándose que una dilución 1:4 del antisuero con solución salina formalinizada al 0.5% y estéril es igual de efectiva que el antisuero no diluido. No se recomienda diluir todo el antisuero, puede ser conforme se vaya utilizando (1 ml del antisuero + 3 ml del diluyente). Los antisueros monovalentes (serotipo) no deben diluirse.

ESQUEMA 1
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE VIBRIO CHOLERA
MUESTRAS FECALES



- a/ La siembra directa es útil en el diagnóstico rápido de los casos severos. Se puede omitir y partir del cultivo en APA, cumpliendo con su subcultivo entre las 6-8 hrs. de incubación.
- b/ Agar Sangre de Carnero, Tripticasa Soya, Mueller-Hinton o Nutritivo

ESQUEMA 2
 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
 VIBRIO CHOLERAE O1 Y NO O1
 MUESTRAS AMBIENTALES

