



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**BUSQUEDA DE Vibrio cholerae O1 EN AGUAS  
RESIDUALES, EN EL LABORATORIO DE LA  
COMISION NACIONAL DEL AGUA EN  
CELAYA, GTO.**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

**CONSUELO MUÑOZ MARTINEZ**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**COMISION NACIONAL  
DEL AGUA**

***ESTE TRABAJO SE IMPRIMIO CON  
APOYO DE LA COMISION NACIONAL  
DEL AGUA.***

---

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	PROFRA. ELDA B. PENICHE QUINTANA
VOCAL	PROFRA. MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA
SECRETARIO	PROFR. RAUL GARZA VELASCO
1er. SUPLENTE	PROFRA. ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
2do. SUPLENTE	PROFRA. MAYTE ASTIGARRAGA ZAVALA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:  
LABORATORIO DE LA COMISION NACIONAL DEL AGUA CELAYA, GTO.

ASESOR



Q. F. B. ELDA B. PENICHE QUINTANA

SUSTENTANTE



CONSUELO MUÑOZ MARTINEZ

DEDICO ESTE TRABAJO

A

LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,

A LA FACULTAD DE QUIMICA,

A LA C. QFB ELDA B. PENICHE QUINTANA, CON MI MAS PROFUNDO  
AGRADECIMIENTO POR EL TIEMPO Y CONOCIMIENTOS QUE ME BRINDO.

AL PERSONAL DE LA COMISION NACIONAL DEL AGUA QUE ME BRINDO SU  
APOYO, EN ESPECIAL AL DEPARTAMENTO DE CALIDAD Y REUTILIZACION  
DEL AGUA,

A MIS PADRES, DOCTOR HORACIO MUÑOZ DE ALBA Y SEÑORA BEATRIZ  
MARTINEZ DE MUÑOZ, CON INFINITO AMOR,

A MI ESOSO, MVZ JORGE FLORES TRUJILLO, CON MUCHO CARIÑO Y  
AGRADECIMIENTO POR SU APOYO Y ALIENTO,

A MI HIJO JORGE, CON TODO MI AMOR,

A MIS HERMANOS.

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
- OBJETIVOS	
I.- GENERALIDADES .....	4
- EL COLERA .....	4
- AGENTE INFECCIOSO .....	6
- TAXONOMIA Y NOMENCLATURA .....	9
- MECANISMOS DE PATOGENICIDAD .....	13
- TOXINA COLERICA .....	18
- ECOLOGIA Y MECANISMOS DE TRANSMISION .....	26
- AGUA PARA CONSUMO HUMANO .....	31
- AGUAS NEGRAS .....	33
- TRANSPORTE DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTOS .....	34
DE LABORATORIO PARA EL AISLAMIENTO Y LA CARACTERIZACION DE <u>V. cholerae</u>	
- TABLAS PARA DIFERENCIACION DE VIBRIOS Y GENEROS..	39
GRAM-NEGATIVOS OXIDASA POSITIVOS	
- TABLAS PARA DIFERENCIAR OTROS VIBRIOS .....	40
- IDENTIFICACION DE <u>V. cholerae</u> O1 y NO O1 .....	43
- INTERPRETACION DE PRUEBAS BIOQUIMICAS .....	44
II.- PARTE EXPERIMENTAL .....	50
III.- RESULTADOS .....	57

IV. -	DISCUSION DE RESULTADOS .....	75
	- CONCLUSIONES	
	- RECOMENDACIONES	
V. -	ANEXO .....	81
VI. -	BIBLIOGRAFIA .....	90

## INTRODUCCION

En el Estado de Guanajuato los primeros cinco casos de cólera, aparecieron en habitantes de la ciudad de León, en donde, según investigaciones no existió relación epidemiológica alguna con otro brote, por lo que se consideraron casos autóctonos.

Los casos mencionados ocurrieron entre el 18 y el 24 de enero de 1992, tomando inmediatamente la S.S.A. y la Comisión Nacional del Agua estrictas medidas de control sanitario para evitar la propagación del brote.

Desde entonces, la S.S.A. y la Comisión Nacional del Agua del Estado de Guanajuato, han estado en contacto continuo para detectar y controlar posibles casos de cólera en el Estado.

De acuerdo a los boletines quincenales publicados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, hasta el 15 de febrero de 1993, el Estado de Guanajuato no registró casos de cólera sino hasta el mes de octubre de 1993, donde se presentaron 4 defunciones, dato que no se ha incrementado hasta enero de 1994, según datos recabados en las gacetas quincenales (23, 24, 25, 26, 27).



El cólera es una enfermedad de tipo intestinal, de forma aguda, y grave, que se caracteriza por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación rápida, acidosis, colapso circulatorio y, en los casos no tratados, produce la muerte dentro de las 24 horas de su aparición. Hoy se sabe que la enfermedad también puede ser asintomática o sólo provoca una leve sintomatología. La letalidad en los casos graves no tratados puede exceder el 50%, pero si se aplica el debido tratamiento, se reduce a menos del 1% (10, 14, 19, 20).

La enfermedad se transmite por la ingestión de alimentos o directamente de agua, contaminados con Vibrio cholerae, de ahí la importancia de hacer la detección de este bacilo en todo tipo de agua sospechosa.

## OBJETIVOS

- Describir el método microbiológico para el aislamiento e identificación de Vibrio cholerae en agua.
- Aplicar dicho método en muestras de diversos puntos del Estado de Guanajuato.
- Determinar el porcentaje de detección de vibrio cholerae en los diferentes sitios de muestreo.

## I. GENERALIDADES

### EL COLERA

Esta enfermedad ocasiona una afección gastrointestinal aguda, grave y transmisible. Se presenta tanto en forma endémica como epidémica. Se caracteriza clínicamente por diarrea acuosa severa, vómito, deshidratación rápida, acidosis y colapso circulatorio. El agente causal es la bacteria Vibrio cholerae biotipos; clásico y El Tor. Vibrio cholerae se encuentra muy difundido en aguas dulces y salobres en muchas partes del mundo pero no todos son toxigénicos (10, 11, 19).

Como se mencionó, los biotipos clásico y El Tor pueden producir la enfermedad, sin embargo, el último favorece el contagio ya que un 80% de los casos sólo presentan manifestaciones leves, o son asintomáticos que eliminan el bacilo y perpetúan la infección. Además, el biotipo El Tor permanece viable más tiempo en los alimentos (aproximadamente 10 días) e indefinidamente en el agua, especialmente si esta es salobre (10, 11, 19).

El hombre es el único reservorio natural de esta bacteria y el agua su principal vehículo de transmisión directa o indirecta. En un país como el nuestro, en que el 31% de la población no

tiene acceso a agua limpia y/o potable y el 53% no disfrutaban de servicios de saneamiento adecuado, el riesgo de contraer dicha enfermedad es grande (15, 12).

El aislamiento e identificación del vibrio en agua, además de involucrar varios procedimientos un tanto complejos (no accesibles a todos los laboratorios), requiere un equipo especializado para el aislamiento y la identificación de estas colonias mediante pruebas bioquímicas y serológicas (10).

Este aislamiento en ocasiones se complica por dos razones; la primera, por el empleo casi nulo de la técnica en forma rutinaria y, la segunda, por el número relativamente pequeño de Vibrios en comparación con el de coliformes encontrados en la misma muestra, o con los microorganismos encontrados en general en los análisis clínicos.

## AGENTE INFECCIOSO

De acuerdo al Manual de Bergey la familia Vibrionaceae fué inicialmente propuesta por Véron en 1965 y en ella incluyó géneros móviles por flagelos polares y oxidasa positivos, esto no implicaba necesariamente que existiera una estrecha relación entre los géneros, sino que fue por conveniencia, para poder diferenciarlos de los de la familia Enterobacteriaceae (1, 2, 4, 6, 8, 9, 19, 28).

En los últimos años, el género Vibrio ha cambiado de un grupo heterogéneo de microorganismos pobremente caracterizados, a un grupo bien estudiado. Esto se debe a la salida de "vibrios no fermentadores", "vibrios anaerobios" y "vibrios microaerofílicos" a otros géneros tales como Campylobacter (Vibrio fetus), Wolinella (Vibrio succinogenes) y Pseudomonas y Alteromonas, por lo que ahora el género Vibrio es mucho más homogéneo. Este género está clasificado en la familia Vibrionaceae junto con otros tres géneros: Photobacterium, Aeromonas y Plesiomonas (1, 4, 8, 10, 11).

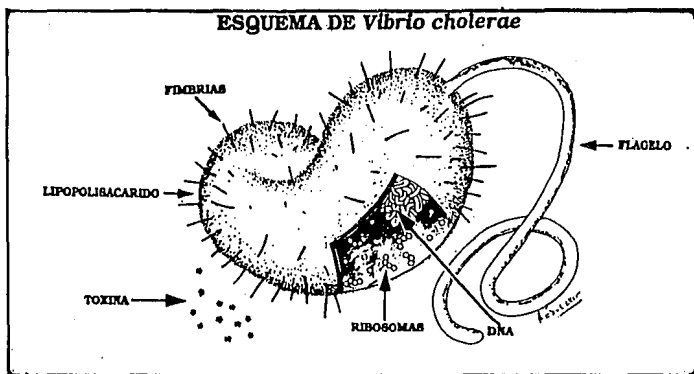
El género Vibrio esta compuesto por bacilos Gram negativos que miden de  $0.5\mu$  -  $0.8\mu$  de diámetro por  $1.4$ - $2.6\mu$  de largo, usualmente se presentan en cultivos viejos (en fase estacionaria) o bajo condiciones adversas de cultivo, no forman endosporas, ni

microquistes, en medio líquido son móviles por flagelos polares, son facultativos, ya que poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo, no fijan ni desnitrifican el nitrógeno, todos son quimiorganótrofos, muchos son capaces de crecer en un medio mineral conteniendo D-glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , sólo unas cuantas cepas necesitan de factores orgánicos de crecimiento. Los iones de sodio estimulan el crecimiento de todas las especies y son un requerimiento para la mayoría, la mínima concentración necesaria para un óptimo crecimiento es del orden de 5-700 mM; muchas especies crecen bien en medio conteniendo una base de agua de mar (1, 8, 10, 11, 19, 22, 28).

Se encuentran en hábitats acuáticos en una gran variedad de salinidad. Son muy comunes en ambientes marinos, algunas especies se encuentran sobre la superficie y en el contenido intestinal de animales marinos. También se pueden encontrar en agua dulce en donde sobreviven unas horas y algunas semanas si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica y tiene un pH entre 6 y 9. Son susceptibles a la desecación, la ebullición, el cloro, otros desinfectantes y a las tetraciclinas (10, 20, 25).

Fermentan la D-glucosa dando como resultado producción de ácido pero no de gas. Todos utilizan D-glucosa, D-fructuosa, maltosa y glicerol. La mayoría de las especies son oxidasa positiva, todas crecen a 20°C y muchas a 30°C (2, 10, 11, 19).

ESQUEMA DE *Vibrio cholerae*



(16)

## TAXONOMIA Y NOMENCLATURA

Varias especies son patógenas para el hombre así como también para animales marinos. Existen más de 20 especies de Vibrio de las cuales sólo las 12 siguientes se han encontrado en muestras clínicas humanas (1, 10).

Vibrio alginolyticus  
Vibrio cholerae O1  
Vibrio cholerae no O1  
Vibrio damsela  
Vibrio fluvialis  
Vibrio cincinnatiensis

Vibrio hollisae  
Vibrio metschnikovii OX  
Vibrio mimicus  
Vibrio parahaemolyticus  
Vibrio vulnificus  
Vibrio carchariae

Las especies de Vibrio que se han encontrado en muestras clínicas humanas son las siguientes:

V. aestuarianus  
V. anguillarum  
V. campbellii  
V. costicola  
V. diazotrophicus  
V. fischeri  
V. gazogenes  
V. harveyi  
V. lagoi

V. natriegens  
V. nereis  
V. nigrivulchrutudo  
V. ordalii  
V. orientalis  
V. pelagicus  
V. proteolyticus  
V. splendidus  
V. tubiashii

La nomenclatura y taxonomía del género Vibrio ha sufrido recientemente un cambio importante. El término Vibrio cholerae se restringía generalmente a los microorganismos que causaban cólera epidémico y entonces se usaron términos como "vibrios no-aglutinantes (NAGs)" y "vibrios no-coléricos (NCVs)", que de

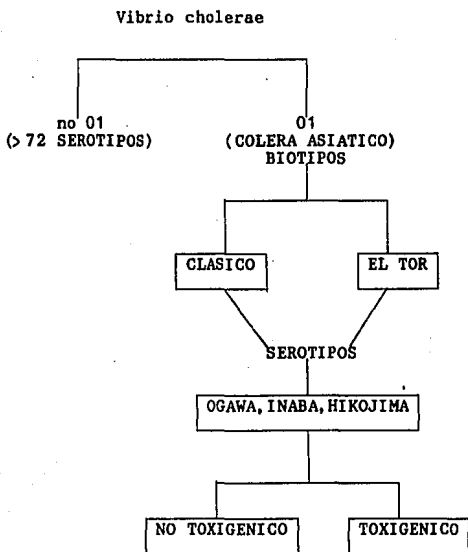


forma muy ambigua podían diferenciar todos los vibrios que no aglutinaban con el suero polivalente del grupo 01, o únicamente señalaban el grupo de vibrios que son bioquímicamente similares a la cepa de vibrio que causa el cólera, pero no reaccionan con el suero del grupo 01. Los taxónomos han llevado a cabo estudios para determinar la nomenclatura y han encontrado que es más adecuado colocar a los vibrios bioquímicamente similares al vibrio que causa el cólera y que anteriormente eran llamados NAGs-NCVs, en una sola especie llamada Vibrio cholerae No 01 (2, 11, 22).

Las cepas puras de vibrio cholerae cuando reaccionan con el suero somático del grupo 01, se denominan Vibrio cholerae 01; así como aquellas cepas de Vibrio cholerae que pertenecen a otras serovariedades, de las cuales existen aproximadamente 72 y se denominan V. cholerae del grupo no-01, no reaccionan con otros sueros del grupo 01. El antígeno O somático es un lipopolisacárido típico de las bacterias Gram negativas, componente de la superficie de la célula, las porciones lipídicas tienen actividad endotóxica y la especificidad antigénica depende de los polisacáridos. Es importante el antígeno O en la prueba de diagnóstico, a diferencia del antígeno H que es compatible con muchos no patógenos. Debido a que V. cholerae correspondiente a otras serovariedades, también causa diarrea parecida al cólera, se debe identificar al grupo de V. cholerae para tener el diagnóstico específico de cólera (10, 22).

Vibrio cholerae O1 incluye dos clases de biotipos, el clásico y la variante El Tor (figura 1). Los dos biotipos se encuentran separados en dos serotipos principales: el Ogawa y el Inaba y raramente en un tercero, el Hikojima (figura 1, cuadro 1) (1, 5, 10, 12, 13, 15, 19)

FIGURA 1



CUADRO 1

SEROTIPOS DE Vibrio cholerae 01 BASADO EN ANTIGENOS SOMATICOS

SEROTIPO	ANTIGENOS PRESENTES
Ogawa	AB
Inaba	AC
Hikojima	ABC

(1, 10, 19)

## MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Las cepas de Vibrio cholerae O1 producen la toxina colérica cuya acción sobre la mucosa del intestino delgado es responsable de la diarrea característica de la enfermedad. La toxina colérica es una proteína oligomérica (84 kDa) compuesta de una subunidad A1(21 kDa), una subunidad A2(7 kDa) y cinco subunidades B(10 kDa). Las subunidades B son responsables de la fijación de la toxina al receptor GM1 en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. La subunidad A1 activa el complejo enzimático adenilato ciclasa, incrementando los niveles intracelulares de AMPc que provocan la hipersecreción de sales y agua, dando como consecuencia una diarrea isotónica con respecto al plasma; es decir, con concentraciones de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> ligeramente inferiores a las del plasma. La concentración de NaHCO<sub>3</sub> es aproximadamente el doble de la del plasma y la concentración de K<sup>+</sup> es 3 a 5 veces mayor que la plasmática (9, 11, 22, 28).

Todos los serotipos producen enterotoxinas similares y también el cuadro clínico es semejante. Algunos vibrios producen toxinas citolíticas, hemolisinas, o bien tienen capacidad invasiva como la descrita para V. vulnificus (10).

La virulencia de V. cholerae depende de diversos factores, entre los que mencionan, su capacidad para:

- Adherirse a la mucosa intestinal.
- Multiplicarse en ella y colonizarla.
- Producir y secretar su enterotoxina.
- Llevar a cabo su acción enzimática con los consecuentes efectos.

La excreción de los factores de virulencia importantes para la adherencia, colonización y penetración del epitelio, así como la síntesis de toxinas, proteasas, hemaglutininas, etc, está influenciada por condiciones ambientales como pueden ser la variedad de nutrientes, la presencia de iones, de metales traza, de vitaminas, los cambios de temperatura y tensión de oxígeno, entre otros. Así, entre los principales determinantes de virulencia de V. cholerae se pueden mencionar:

- Adhesión: El mecanismo por el cual V. cholerae se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado aún no es claro, ya que, mientras algunos autores sostienen la existencia de adhesinas fimbriales o pilis producidos por V. cholerae, otros niegan cualquier evidencia de dichos organelos, sugiriendo en su lugar, que el microorganismo posee hemaglutininas de superficie que pueden actuar como adhesinas, igualmente se ha propuesto que la asociación entre el vibrio y las células epiteliales puede estar mediada por reacciones hidrofóbicas (11, 16).

Sin embargo, sea cual fuere el mecanismo utilizado por el microorganismo para adherirse a las células epiteliales, se ha observado que la presencia de otros microorganismos en el intestino delgado, dificultan la fijación y colonización del epitelio por parte de V. cholerae .

- Motilidad y quimiotaxis: se ha propuesto que ambos procesos facilitan la llegada del microorganismo hasta las criptas intestinales y ahí favorecen la penetración a la mucosa intestinal, igualmente se ha puesto en duda su participación en la adhesión del microorganismo a las células epiteliales.

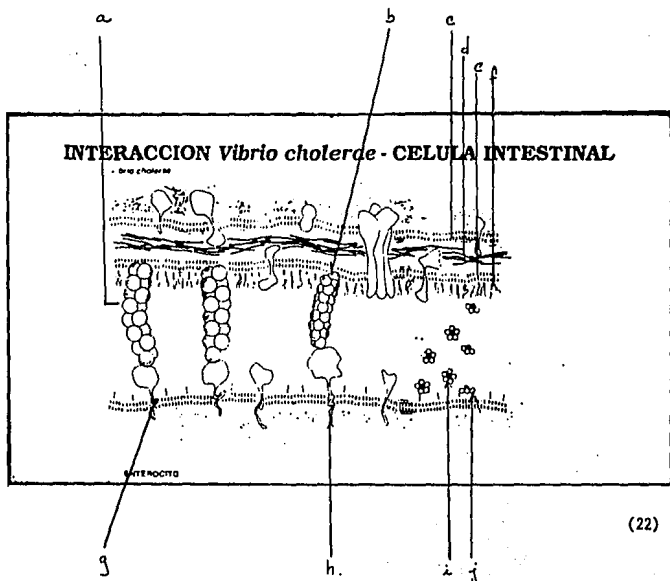
- Mucinasas: Esta enzima es capaz de digerir la mucina de la superficie mucosa del intestino delgado, de tal forma que los receptores que permiten la adherencia de los microorganismos a las células epiteliales quedan expuestos para tal proceso.

- Hemolisinas: A pesar de poseer actividad citotóxica, cardiotóxica y letal, su participación en la patogénesis del cólera es remota.

- Proteasa y neuraminidasas: Participan en la penetración a la mucosa, así como para proveer sustratos para el crecimiento de V. cholerae.

- Enterotoxina: Sin duda alguna, es ésta el determinante de virulencia más importante con que cuenta el microorganismo, ya que la sintomatología característica de la enfermedad se debe a los efectos producidos por esta toxina en el organismo; así, mediante un mecanismo complejo que se explicará más adelante origina un incremento en los niveles de AMPc intracelular en los enterocitos, lo que conducirá a una hipersecreción de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  a la luz intestinal, trayendo consigo grandes cantidades de agua, que constituirá la diarrea líquida característica del cólera (11,16).

FIG. 2 INTERACCION *Vibrio cholerae* - CELULA INTESTINAL



- a Fimbria
- b Hemaglutinina
- c Membrana Interna
- d Peptidoglicano
- e Membrana Externa
- f Lipopolisacárido
- g Receptor de la Fimbria
- h Receptor de la Hemaglutinina
- i Toxina Colérica
- j Receptor GMI de la Toxina



## TOXINA COLERICA (CT)

Composición y características físicas y químicas:

La toxina colérica (CT) o colerágeno, es una proteína oligomérica de aproximadamente 84 kDa cuya naturaleza química, además del 98% de proteínas, está formada también por lípidos (1%) y carbohidratos (1%).

Esta enterotoxina, está a su vez constituida por cinco cadenas ligeras asociadas no covalentemente, denominadas sub-unidades B, de aproximadamente 11.5 kDa cada una, y una cadena pesada denominada sub-unidad A de 28 kDa, esta última, está compuesta de dos fragmentos proteicos denominados A1 (23 kDa) y A2 (5 kDa), unidos entre sí por un enlace disulfuro.

Las cinco sub-unidades B de la molécula, forman una estructura pentamérica muy estable, en forma anular y que presenta un hueco al centro de la estructura, en el cual se encuentra insertada parcialmente la sub-unidad A por su fragmento A2, el mismo que se encuentra unido al anillo B mediante enlaces disulfuro.

A las sub-unidades B se les ha nombrado también sub-unidades de unión, dado que éstas no son tóxicas para la célula por sí solas, su función es únicamente la de unir específica e

irreversiblemente a la enterotoxina con las células blanco mediante el receptor gangliósido GM1, en tanto que a la sub-unidad A, también se le ha denominado sub-unidad activa, por ser precisamente la responsable de la actividad de la molécula, el fragmento A1 es el responsable directo de la acción tóxica sobre la célula mientras que el A2 actúa junto con las sub-unidades B como vehículo, además de participar en la internalización de A1 (11, 16).

La sub-unidad A no puede unirse por sí sola a la célula, por lo que se requiere de la interacción de ambas sub-unidades (A y B) para tener una enterotoxina funcionalmente activa (11, 31).

#### CUADRO 2

##### PRINCIPALES CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LA ENTEROTOXINA COLERICA

PROPIEDAD	
- Peso molecular	84 kDa
- Sub-Unidades	A y B
- Respuesta al calor (100°C/15 min)	Inactivación
- Respuesta a los ácidos	Inactivación
- Naturaleza química	Proteica
- Receptores	Gangliósidos GM1
- Acción bioquímica	Activación de la adenil-ciclase
- Acción fisiológica	Prolongada hipersecreción de iones y agua

### Mecanismos de acción y efectos de la toxina colérica:

Una vez que V. cholerae libera la enterotoxina colérica, ésta se une a la membrana celular de las células blanco (enterocitos), mediante la unión específica de las sub-unidades B con el residuo de ácido siálico del receptor biológico natural, el gangliósido GM1 (galactosil N-acetil-galactosaminil-sialil-galactosil-glucosil-cerámido).

Dado que el sitio de ataque de la toxina colérica es intracelular, es necesario que alguna porción de la misma penetre la membrana celular hasta alcanzar el sitio donde ejecutará su actividad tóxica. Al respecto, se ha establecido una hipótesis que sugiere que tras la unión de la toxina colérica a las células blanco, las fuerzas internas proteína-proteína de las sub-unidades B son reemplazadas por interacciones proteína-lípido de la membrana celular, causando el desdoblamiento de tales sub-unidades para formar un tunel hidrofílico en la membrana, a través del cual la sub-unidad A (activa), tras disociarse de la sub-unidad B, podrá difundirse al interior de la célula, una vez ahí, se llevará a cabo la reducción del enlace disulfuro que une a los fragmentos A1 y A2 para liberar a A1 en el citoplasma, en donde activará la adenil-ciclase.

El sistema adenil-ciclase es un complejo enzimático unido a la membrana, compuesto por: a) receptores hormonales

específicos estimulantes (Rs) e inhibitorios (Ri), b) proteína catalítica (C) responsable de la conversión  $ATP \rightarrow AMPc$  y c) complejos regulatorios de estimulación (Gs) e inhibición (Gi), dependientes de GTP, constituidos por sub-unidades, respectivamente  $\alpha_s, \beta_s$  y  $\alpha_i, \beta_i$  (11, 16)

#### Activación del sistema adenil-ciclasa:

Una vez que el fragmento A1 de la toxina alcanza el citoplasma, catalizará la hidrólisis del  $NAD^+$  (nicotinamida-adenina-dinucleótido) celular, para dar dos compuestos a) nicotinamida y b) adenosín-5'-difosfato-ribosa (ADP-ribosa), éste último se transferirá mediante una reacción de ADP-ribosilación a la sub-unidad de la proteína estimuladora Gs (residuo guanidilnucleótido unido a una proteína) del sistema adenil-ciclasa.

Este complejo GTP-proteína Gs, es el que regula la actividad de la adenil-ciclasa, sin embargo, la unión es de baja estabilidad, ya que en un proceso de regulación es este mismo complejo el que cataliza la reacción de hidrólisis del GTP, para dar el complejo GDP-proteína Gs +  $P_i$ , que es el estado inactivo para la adenil-ciclasa. Esta actividad de GTPasa del complejo, se inhibe por la ADP-ribosilación de la proteína Gs, mediada por la sub-unidad A1, manteniendo a la adenil-ciclasa en un estado activo

permanente, por lo que ésta actuará sobre su sustrato ATP celular para convertirlo en AMPc (adenosina 3'5'-monofosfato cíclico), incrementando rápidamente de esta manera, los niveles intracelulares del compuesto (11, 16).

#### Efectos de la toxina colérica en las células del intestino delgado:

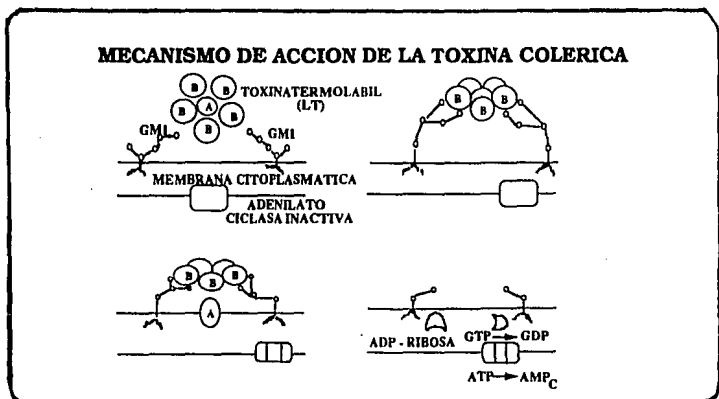
Normalmente las células epiteliales con microvellosidades o células maduras del intestino, llevan a cabo la absorción de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y agua, en tanto que las células crípticas son las encargadas de la secreción de iones y agua, estableciéndose así un equilibrio hidroelectrolítico, sin embargo, la presencia de niveles incrementados en AMPc intracelular en el intestino delgado, altera dicho transporte iónico, disminuyendo la absorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y agua en las células crípticas, todo lo cual origina una respuesta netamente secretoria, por lo que iones y agua se acumulan temporalmente en el intestino y ante la incapacidad de reabsorción por parte del colon, surge la diarrea líquida y profusa, característica de la enfermedad.

Además del incremento en los niveles intracelulares de AMPc, que es la respuesta primaria encargada de la regulación de la liberación y/o acumulación del fluido intestinal, se ha demostrado la existencia de otros compuestos como las

prostaglandinas, también estimuladas por la toxina colérica y que son capaces de llevar a cabo una actividad regulatoria similar, concluyendo con ello que la pérdida de agua y electrolitos durante el cólera, no está mediada únicamente por el AMPc.

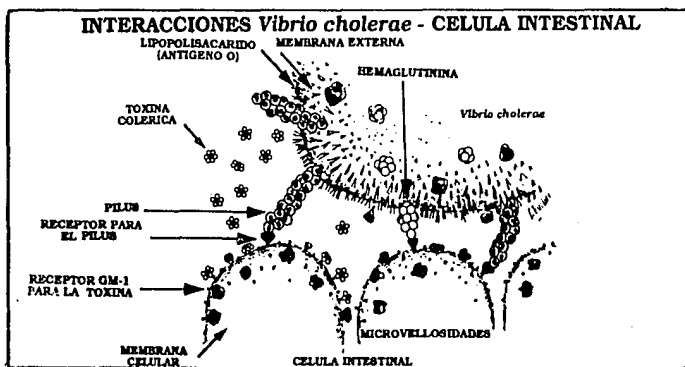
Por otro parte, serotonina y péptidos intestinales vasoactivos liberados durante la enfermedad, estimularán al sistema nervioso entérico (SNE), afectando la neurotransmisión de la secreción de fluido mediada por la toxina colérica, el 60% o más de la secreción estimulada es mediada a través de este sistema nervioso (SNE) (11,16).

FIG. 3 MECANISMOS DE ACCION DE LA TOXINA COLERICA



(14)

FIG. 4 INTERACCIONES *Vibrio cholerae* - CELULA INTESTINAL



(17)



## ECOLOGIA Y MECANISMOS DE TRANSMISION

El reservorio natural es el hombre, aunque las observaciones recientes en Estados Unidos y Australia sugieren la presencia de reservorios ambientales. El cólera se mantiene siguiendo un ciclo de transmisión hombre-medio ambiente-hombre (10, 12, 22).

No se ha encontrado ninguna otra especie regularmente infectada, aunque existe una gran variedad de animales de laboratorio susceptibles. Se desconoce la forma en que sobrevive el microorganismo durante los períodos interepidémicos. Muchos pacientes eliminan vibriones por unos días cuando han recibido tratamiento con antibióticos y sin el tratamiento, los eliminan por una a dos semanas. Se han descubierto portadores convalecientes de cepas endémicas. Los estudios más cuidadosos no han podido descubrir portadores del biotipo El Tor (10).

La transmisión se realiza normalmente por la ingestión de agua o alimentos contaminados con vómitos o heces del paciente y, en menor grado, de persona a persona, por contacto directo, las manos sucias o las moscas (10).

Durante los brotes, se consideran más los mecanismo de transmisión, el más frecuente es la ingestión de aguas contaminadas por heces y vómitos de enfermos y, en menor medida,

heces de portadores, ingestión de alimento contaminado por agua sucia, heces, manos sucias y moscas. El vibrio clásico y el biotipo El Tor pueden persistir en el agua por largo tiempo, fue así como la ingestión de alimentos crudos o mal cocidos procedentes de aguas contaminadas ocasionó brotes y epidemias en Guam y Portugal (10).

La dosis infecciosa es variable, la susceptibilidad también puede variar ampliamente:

- 1) Dependiendo de la acidez gástrica (el vibrio es destruido en un pH de 5 o menos, por lo tanto, individuos aclorhídricos o con gastrectomía son particularmente más susceptibles).
- 2) La cantidad y tipo de comida que hay en el estómago (la comida disminuye la dosis infecciosa) y
- 3) La adquisición de cierta inmunidad en el caso de que se haya presentado una infección previa con Vibrio cholerae 01. (Se ha demostrado que la lactancia natural produce protección).

El período de incubación puede ser de unas cuantas horas a cinco días, generalmente 2 a 3. El período de transmisión se realiza mientras dura el estado de portador. La excreción de Vibrio en las heces se mantiene generalmente durante sólo unos cuantos días después del restablecimiento (10).

Los antibióticos eficaces como la tetraciclina acortan el período de transmisibilidad. En adultos se ha observado una infección crónica biliar asociada a la eliminación (prolongada en tiempo) de vibriones en las heces (10).

El inóculo de V. cholerae O1 biotipo clásico, necesario para adquirir la infección, es de 100,000,000 microorganismos según se ha determinado en estudios realizados en voluntarios norteamericanos, aparentemente sanos (18).

Dicho inóculo parece ser demasiado grande para hacer factible la transmisión a través de agua contaminada con inóculos mínimos. Sin embargo, la dosis infectiva para Vibrio cholerae El Tor es menor y puede reducirse a 100,000 e incluso hasta 1000 microorganismos (18).

El inóculo puede protegerse del pH gástrico mediante la presencia de bicarbonato o comida. En investigaciones epidemiológicas desarrolladas en Italia, así como en ensayos con voluntarios, se ha demostrado que los individuos con una hipoclorhidria gástrica secundaria a cirugía, enfermedad, o a la administración de medicamentos, son particularmente susceptibles al cólera (18).

### Susceptibilidad y resistencia del hospedero:

Aunque la susceptibilidad es variable, la aclorhidria gástrica aumenta el riesgo de la enfermedad. El cólera clínico generalmente está limitado a los grupos socioeconómicos más bajos. Aún en epidemias graves la tasa de ataque rara vez sobrepasan el 2%. La infección provoca una respuesta serológica significativa de anticuerpos aglutinantes, vibriocidas y antitóxicos y una mayor resistencia a la reinfección que es más duradera contra el serotipo homólogo. En las zonas endémicas, la mayoría de las personas adquieren anticuerpos al principio de la edad adulta. La inmunidad activa parcial a la enfermedad es inducida por vacunas anticoléricas existentes pero la protección no dura más de 6 meses y no evita la infección asintomática (10, 12, 19).

OBTENCION DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTO DE Vibrio cholerae.

CUADRO 3

IMPORTANCIA DE Vibrio Y ESPECIES RELACIONADAS

TIPO DE INFECCION	ESPECIES ASOCIADAS
Gastroenteritis	<u>V. cholerae serotipo 01</u> <u>V. cholerae No 01</u> <u>V. parahaemolyticus</u> <u>V. fluvialis</u> <u>V. mimicus</u> <u>V. fummisil</u> <u>V. hollisae</u>
Heridas infectadas	<u>V. alginolyticus</u> <u>V. vulnificus</u> <u>V. damsela *</u>
Sepsis	<u>V. cholerae No 01</u> <u>V. vulnificus</u>
Infección ótica	<u>V. alginolyticus</u> <u>V. cholerae No 01</u> <u>V. mimicus</u> <u>V. parahaemolyticus</u>

\* V. damsela es ahora Listonella damsela

(10, 15)

## AGUAS PARA CONSUMO HUMANO

El examen de agua potable debe ser frecuente y regular, en base a programas previamente establecidos. La frecuencia dependerá de la calidad de la fuente, el tratamiento del agua, los riesgos de contaminación y el tamaño de la población servida. Las muestras de agua deben tomarse en ciertos puntos fijos, tales como estaciones de bombeo, tanques de almacenamiento, o sitios que al haber sido muestreados con anterioridad hayan revelado problemas de contaminación. Otras muestras deben tomarse al azar a través de la red de distribución, incluyendo edificios de apartamentos, hospitales, escuelas, edificios públicos, hoteles, etc. El muestreo debe incrementarse cuando se presenten epidemias, en tiempos de lluvias, después de interrupciones por trabajos de reparación, en operaciones de emergencia, etc. Igualmente, el seguimiento debe ser más frecuente cuando se instale una nueva fuente de abastecimiento de agua para poder observar las variaciones que sufre, ya sea por cambios climáticos o por cualquier otra circunstancia (10,11,15).

Se debe de recolectar por lo menos un litro de agua en un recipiente estéril. La botella o recipiente debe de contener dos cucharadas cafeteras llenas de NaCl. Después de que la muestra se haya recolectado, el pH se debe ajustar a 9.2 con NaOH 1N, antes de ser transportada al laboratorio, o en el caso de que se

atrás el procesamiento de las muestras en el laboratorio. La incubación de estas muestras es igual que para las muestras clínicas, lo mismo que las bioquímicas que se utilizan (10, 11, 15).

**Enriquecimiento doble en agua peptonada:** Se emplean botellas de 500 ml con 50 ml de agua peptonada concentrada alcalina, las cuales tienen un contenido de 10% de peptona y 10% de NaCl, se esterilizan en autoclave y se envían al campo o sitio donde se colectarán aproximadamente 450 ml de agua. Se ajusta el pH a 9.2 con NaOH 1N e incuba la botella durante 6 hrs (o toda la noche si es necesario); se transfieren aproximadamente 2-10-15 ml de agua peptonada alcalina al 1% con NaCl 1%, se incuba durante 6 hrs y se siembra en placas de TCBS (Tiosulfato-Citrato-sales Biliares-Sacarosa) (5, 10, 11, 15, 29).

El método de doble enriquecimiento en agua peptonada es simple y ha demostrado ser más sensible que el método de filtración con filtros Milipore (10, 11, 15).

**Técnica simple de filtración:** Se pasan de 300-1,000 ml de la muestra de agua a través de un filtro Seitz (disco de 6 cm), bajo la acción de una leve succión. Se dobla el disco y se coloca en 50 ml. de agua peptonada alcalina dentro de un recipiente o matraz de boca ancha, se ajusta el pH a 9.2 y se incuba el cultivo a 37°C durante 6 horas antes de sembrar en

placas con medios adecuados, se recomienda el medio TCBS (Tiosulfato-Citrato-sales Biliares-Sacarosa) ((10, 11, 15).

Técnica del filtro Millipore: Se coloca un disco de filtro Millipore dentro de un portafiltro especial. Después de haber filtrado por lo menos un litro del agua de muestra, hacer lo mismo que en el paso anterior con el disco de filtro o bien, colocar el disco en la superficie de agar TCBS, incubar durante 18 hrs a 37°C y contar las colonias en un microscopio de disección (10, 11, 15).

#### AGUAS NEGRAS

La recolección de aguas negras debe llevarse a cabo en una botella estéril. Esta agua debe diluirse con solución salina estéril para poder filtrarla fácilmente y eliminar el material suspendido. El filtro se trata de la misma manera que en el caso de aguas para consumo humano, con la técnica de doble enriquecimiento en agua peptonada (10, 15, 31).



## TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

### MUESTRAS DE AGUA

Se deben transportar lo más pronto posible al laboratorio, manteniéndolas en refrigeración, se puede utilizar un frasco con agua peptonada alcalina estéril y si no se dispone de ésta, se emplean bolsas limpias de polietileno .

Los frascos se etiquetan bien y se debe anotar la localidad o sitio donde se tomó la muestra y fecha (10, 15).

PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO PARA EL AISLAMIENTO Y LA  
CARACTERIZACION DE V. cholerae.

IDENTIFICACION DEL GENERO Vibrio

Las cepas de Vibrio pueden crecer en el medio MacConkey como colonias pálidas no fermentadoras de lactosa, pero usualmente requieren aislarse en un medio de cultivo especial como es el TCBS (agar de tiosulfato citrato bilis sacarosa) el cual no debe de emplearse si tiene más de 24 horas de haberse preparado. En el agar TCBS, las colonias típicas de V. cholerae son amarillas, planas, un poco convexas, de aproximadamente 2 mm de diámetro, mientras que las colonias azul-verdosas, grandes, planas, son típicas de V. parahaemolyticus. Sin embargo, no todas las colonias amarillas en medio TCBS son de V. cholerae; además de éste, dan colonias amarillas: Vibrio alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. fumiisii, V. metschnikovii (que también es el único vibrio oxidasa negativa) y algunos biotipos de V. vulnificus, debido a que todos ellos fermentan la sacarosa. Otros vibrios importantes como V. parahaemolyticus, no fermentan la sacarosa y dan colonias verde olivo. Hay por lo menos 5 marcas comerciales de medio TCBS y hay alguna variación entre ellos con respecto al grado de inhibición de la flora fecal normal como Proteus, Enterococcus, Klebsiella y Aeromonas, que a veces pueden crecer, mientras que algunas cepas de V. cholerae

pueden inhibirse, de manera que siempre hay que probar cada lote con cepas de referencia (10).

Las colonias de V. cholerae en TCBS generalmente son más "pegajosas" lo que dificulta la aglutinación directa de las colonias crecidas en ese medio. Las colonias de V. cholerae O1 no pueden diferenciarse de las de V. cholerae No O1 o de cepas rugosas (muy raras). Para un diagnóstico presuntivo y rápido se pasa una de las colonias aisladas a un cuadrante de medio base de sangre o de agar nutritivo para hacer serología y la prueba de oxidasa (10)

#### CUADRO 4

##### Vibrio Y GENEROS GRAM-NEGATIVOS OXIDASA POSITIVOS

CARACTERISTICAS	<u>Vibrio</u>	<u>Pseudomonas</u>	<u>Aeromonas</u>	<u>Plesiomonas</u>
Fermentación de glucosa	+	-	+	+
Acido de:				
Inositol	-	NA	-	+
Manitol	+	NA	-	+
Hidrólisis gelatina	+	+/-	+	-
Crecimiento en TCBS	+	-	-	-
crecimiento/estimulado por iones Na+	+	-	-	-
Sensible a O/129				
10 mg.	+/-	-	-	+/-
150 mg.	+	-	-	+

+ Mayoría positivo - Mayoría negativo +/- Variable

(10)

#### Técnica de aislamiento (FIGURA 5)

A partir de la muestra directa, se inocula con un hisopo de algodón un tubo con 10 ml de agua peptonada alcalina de pH 9.0. El tubo deberá ser de 16 x 150 con tapón de rosca, se incuba de 6-8 horas a 37°C. Se toman 3 asadas de la superficie con cuidado y tratando de no agitar el tubo. Es muy importante tomar sólo de la superficie, ya que aquí se encuentran en mayor cantidad los vibrios (figura 5) (10, 19).

Se siembran las 3 asadas en placas de gelosa TCBS, se aíslan colonias por estría cruzada, flameando el asa entre cada estría. Se incuba de 18 a 24 horas a 37°C

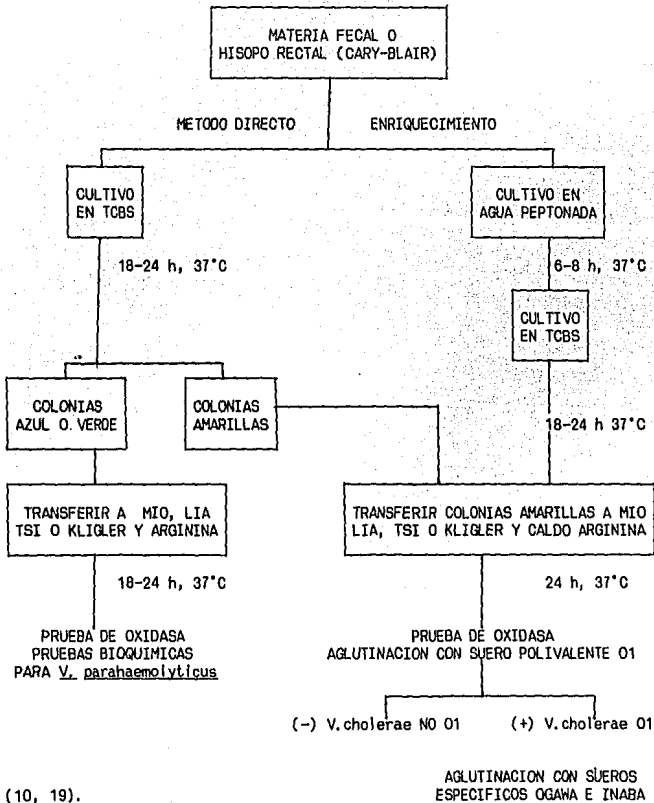
Se seleccionan al menos 3 colonias amarillas sospechosas de ser V. cholerae en agar TCBS y se siembra cada una de las siguientes pruebas bioquímicas:

1. Medio MIO  
(Movilidad-Indol-Ornitina)----- picadura hasta el fondo
2. Agar de hierro y triple azúcar -- picadura y estría
3. Agar de hierro y lisina ----- estría y doble picadura
4. Caldo arginina ----- depositar el inóculo y sellar con vaselina líquida o aceite mineral estéril; no utilice glicerol (glicerina).

Incubar todos los medios durante 18 a 24 horas a 37°C (7, 10, 19).

FIGURA #5

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Vibrio cholerae*



(10, 19).

CUADRO N° 5

DIFERENCIACION ENTRE *Vibrio* Y OTRAS BACTERIAS

ORGANISMO	FONDOS DEL TSI ACIDO GAS H <sub>2</sub> S		OXIDASA DISCOS	LISINA DESCARB.	ARGININA DIHIDR. (ACEITE)	ORNITINA DESCARB. MID	LICUEFACCION GELATINA
<i>Vibrio cholerae</i>	+	-	-	+	-	+	+
<i>Serratia hydrophila</i>	+	0	-	+	0	-	+
<i>Plesiomonas shingii</i>	+	-	-	+	+	+	-
Enterobacterias	+	0	0	0	0	0	0

+ POSITIVO  
 - NEGATIVO  
 0 DIFERENTE TIPO BIODIVINICO

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Vibrio*

ESPECIES	CRECIMIENTO EN NaCl			VDGES PROSKAUER	ARGININA	INOOL
	Dx	Gx	Bx			
<i>V. cholerae</i>	+	+/-	-	+/-	-	+
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	+	-	+/-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	-	+	-	-
<i>V. damsela</i>	-	+	-	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+/-	-	+	+/-
<i>V. fischerii</i> 2	-	+	+/-	-	+	-
<i>V. bellina</i>	-	+	-	-	-	+
<i>V. fisheri</i> 1	+/-	+	-	-	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i> 2	+	+/-	-	+	+	+/-
<i>V. vulnificus</i>	+	+	+	-	-	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	-	-	-	+

1 Ureasa (+)

2 Gas de glucosa

3 Dxidasa (-), nitrato (-)

CUADRO N° 7

PRUEBAS DIFERENCIALES DE *Vibrio*

PRUEBA	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio</i> NO <i>cholerae</i>
FERMENTACION DE GLUCOSA	+, NO GAS	+, NO GAS	+, NO GAS
FERMENTACION DE SACAROSA	+, (RARD -)	-, (RARD +)	+, (RARD -)
ROJO DE METILO 37 °C	+, (RARD -)	+, (REQUIERE NaCl)	-, (RARD -)
TSI: SUPERFICIE TSI: FONDO TSI: H2S	R; (RARD R) A -	A A -	R o A A -
CRECIMIENTO A 43 °C	-	+	-
CALDO NUTRITIVO SIN NaCl	CRECE	NO CRECE	CRECE
CALDO NUTRITIVO CON 10x NaCl	NO CRECE	CRECE	NO CRECE

+: POSITIVO    -: NEGATIVO    A: ACIDO    R: ALCALINO



DIFERENCIACION BIOQUIMICA DE ALGUNAS ESPECIES DE *Vibrio*

	V. CHOLERAE	V. VIBRICUS	V. PARAHEMOLYTICUS	V. ALGOLYTICUS	V. VULNIFICUS ?	V. FLUVIAL S 3 (EF-6)	V. DARSELA 4 (EF-5)	V. HOLLISRES (EF-13)
TSI	R(A)/A	R(A)/A	R/A	R/A	R(A)/A	R/A	R/A	R/A
GAS DE GLUCOSA	-	-	-	-	-	V	-(+)	-
GLUCOSA	A	A	A	A	A	A	A	A
LACTOSA	(A)	(A)	-	-	V (OMP+)	-	-	-
SACAROSA	A	-	-	A	-	A	-	-
MANTOL	A	A	A	A	- (A)	A	-	-
CITRATO	+ (-)	+ (-)	+ (-)	+ (-)	+ (-)	+ (-)	-	-
GELATINA	+	+	+	+	+	+	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-	+	-
FENILALANINA	-	-	-	-	-	-	-	-
INDOL	+	+	+	+	+	- (+)	-	****
ROJO METILO	+ (-)	+ (-)	+	-	-	+	V	-
VP CLASICO	-	-	-	-	-	-	V	-
EL TOR	+	-	-	+	-	-	-	-
MOVILIDAD	+	+	+	+	+	+	+	(+) 7 DIAS
LISINA	+	+	+	+	+	-	V	-
ARGININA	-	-	-	-	-	+	+	-
ORNITINA	+	+	+	+	+	-	-	-
CRECIMIENTO EN CALDO CON NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-
NaCl 6%	V	V	+	+	+	+	V	+
NaCl 10%	-	-	-	+	-	-	-	-

## IDENTIFICACION DE V. cholerae 01 Y No 01

Si después de incubar toda la noche la bioquímica concuerda con la de Vibrio cholerae (cuadro 4,5 y 6), se procede a realizar la prueba de oxidasa y si ésta es positiva, se procede a confirmar serológicamente por aglutinación en placa con los sueros polivalentes 01. Si el resultado es positivo se busca aglutinación con sueros Ogawa e Inaba. El reporte se hace de la siguiente manera: V. cholerae 01, Serotipo Ogawa o Inaba. Las cepas Ogawa generalmente reaccionan leve y suavemente con el suero Inaba pero esta aglutinación no se considera positiva (10)

Las cepas Hikojoma reaccionan de una forma muy rápida y fuerte con ambos sueros Ogawa e Inaba; es posible preparar un suero absorbido, pero estas cepas se presentan con muy baja frecuencia (10).

En caso de que la aglutinación con el suero 01 sea dudosa, la prueba se debe repetir y lo más recomendable es utilizar simultáneamente controles positivos y negativos empleando cepas de referencia. En caso de ser posible, se utiliza suero polivalente correspondiente a otro lote. Cuando la cepa no corresponde al serogrupo 01 se reporta como V. cholerae no 01 y en esta categoría quedan incluidos más de 72 serovariedades diferentes de 01 (10, 19).

## INTERPRETACION DE PRUEBAS BIOQUIMICAS

### PRUEBA DE OXIDASA

La prueba de la oxidasa debe realizarse a partir de un cultivo fresco de 18 a 24 horas procedente del medio LIA (Agar de Hierro y Lisina), o de un medio que no contenga azúcar, como lo es la base de agar para sangre (no usar cultivos en TCBS). Después de considerar el aspecto anterior, colocar un pedazo de papel filtro sobre una caja Petri, agregar a continuación 2 a 3 gotas del reactivo de oxidasa, y por último esparce un pequeño inóculo con un asa de platino (no de nicromo). De forma alternativa puede emplearse un palillo o un aplicador de madera estéril. La reacción positiva se indica por la aparición de un color púrpura oscuro sobre el papel en un lapso de 10 segundos. Los bacilos Gram negativos como Vibrio, Campylobacter, Aeromonas, Plesiomonas, Pseudomonas y Alcaligenes reaccionan como positivos para la prueba de oxidasa, en tanto que todas las enterobacterias son negativas. Se pueden emplear como controles a Pseudomonas (positivo) y E. coli (negativo) (30).

#### MEDIO MIO (MOVILIDAD, INDOL, ORNITINA)

Es semisólido, se siembra por picadura y se incuba 24 horas a 37°C. Sirve para observar movilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina. Cada tubo debe de contener 4 ml de medio, utilizando tubos de vidrio de 13 x 100 con tapón de rosca.

Indicador de pH ----- púrpura de bromocresol  
pH ácido ----- vire de color a amarillo  
pH alcalino ----- vire de color a púrpura o morado

Movilidad positiva ----- el medio se enturbia y se ve crecimiento en todo el tubo.

Movilidad negativa ----- el crecimiento es sólo a lo largo de la picadura.

Purpura de bromocresol -- pH ácido                      pH alcalino  
  5.2 amarillo                      6.8 purpura

ORNITINA: La descarboxilación de la ornitina se lleva a cabo en anaerobiosis, por lo tanto, la prueba se lee sólo en el fondo del tubo.

Ornitina positiva ----- el fondo del tubo debe alcalinizarse y presentar un color púrpura o morado.

Ornitina negativa ----- fondo del tubo amarillo.

**PRUEBA DEL INDOL:** Para llevar a cabo la prueba del indol, se siembra el medio y se incuba 24 horas a 37°C. Se emplea caldo triptona o caldo nutritivo. El indol es un producto final de la utilización del triptofano y se pone de manifiesto agregando 5 gotas de reactivo de Ehrlich o de Kovacs al medio (30).

Indol positivo: ----- formación de anillo color rojo

Indol negativo: ----- formación de anillo de color  
ámbar

#### **AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR (TSI)**

Este medio sirve para determinar la fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa, además de la producción de gas a partir de glucosa y la producción de ácido sulfhídrico que precipita como sulfuro férrico al reaccionar con el hierro.

indicador de pH ----- rojo de fenol

pH ácido ----- vire del indicador a color amarillo

pH alcalino ----- vire del indicador a color rojo

## AGAR DE HIERRO Y LISINA (LIA)

En este medio se determina la descarboxilación de la lisina que se lleva a cabo en anaerobiosis y la desaminación de la lisina que se lleva a cabo en aerobiosis.

Indicador de pH: ----- púrpura de bromocresol

pH ácido: ----- vire del indicador a color  
amarillo

pH alcalino: ----- vire del indicador a color  
púrpura

Descarboxilación positiva:- fondo del tubo de color púrpura

Descarboxilación negativa:- fondo del tubo de color amarillo  
sin cambio.

(30)

## CALDO ARGININA (BASE MOELLER Y ARGININA)

En este medio se puede demostrar la descarboxilación de la arginina en anaerobiosis. Este caldo debe estar sellado con vaselina líquida o aceite mineral estéril (0.5 ml) para evitar el contacto con el aire.

Indicador de pH: ----- púrpura de bromocresol

pH ácido: ----- vire del indicador a color  
amarillo

pH alcalino: ----- vire del indicador a color  
púrpura

Arginina positiva: ----- todo el caldo se pone de color  
púrpura

Arginina negativa: ----- todo el caldo se pone de color  
amarillo

El caldo arginina se incuba de 1 a 4 días a 37°C para poder darlo como negativo (30).

## PRUEBA DEL HILO MUCOSO (STRING TEST)

Esta prueba se lleva a cabo en un portaobjetos, suspendiendo un inóculo de un cultivo de 18 a 24 horas de medio Kligler o TSI en una gota de suspensión acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5%.

Cuando la reacción es positiva, como en el caso de los vibrios, la suspensión pierde inmediatamente su turbiedad y adquiere una consistencia mucoide formándose un "hilo mucoso" que se observa al levantar y alejar el asa lentamente de la suspensión. Algunas cepas de Aeromonas pueden dar una reacción leve o retardada con esta prueba en unos 60 segundos (30).



### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### Material:

- Asas bacteriológicas en punta y redondas
- Caja de aplicadores de madera estériles
- Cubrebocas
- Frascos de 1,000 ml de Nalgene clase HDPE (resiste autoclave)
- Guantes estériles
- Hielera
- Libreta.
- Metros de alambre flexible
- Perilla de succión
- Porta objetos
- Rollo parafilm
- Rollos de gasa de algodón de malla cerrada (15 cm de ancho y 60 - 120 cm de largo para fabricar los Hisopos de Moore)
- Tijeras.
- Tubos de ensayo Pyrex de 13X100 mm con tapón de baquelita

#### Equipo:

- Autoclave
- Balanza Granataria Ohaus
- Balanza Analítica Sartorius

- Encendedor
- Incubadora a 35 °C
- Mechero Bunsen
- Microscopio Binocular Marca ZEISS
- Potenciómetro Marca Corning, Modelo 7
- Refrigerador Nieto

**Reactivos y Medios:**

- Cloruro de Sodio
- Desoxicolato de Sodio
- Hipoclorito de Sodio
- Peptona Difco
- Reactivo de Erlich
- Reactivo para oxidasa en cajas de tiras reactivas Merck
- Agar TCBS
- Caldo Nutritivo
- Medio con Caldo Arginina con sello de Vaselina.
- Medio con Agar base sangre.
- Medio con Agar de Hierro y Lisina (LIA) Difco
- Medio con Agar de Hierro y Triple azúcar (TSI) Difco
- Sangre de Carnero

## Material Biológico

110 muestras de agua procedentes 20, de clínicas y hospitales, 11 de centros turísticos y 79 de aguas superficiales distribuidas en todo el estado de Guanajuato. (cada una de las 110 muestras se analizaron por duplicado haciendo un total de 220 análisis.

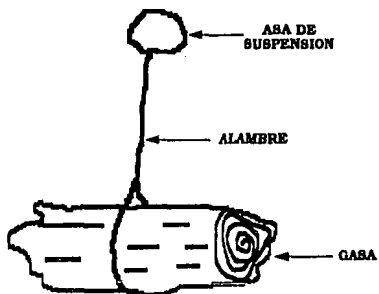
## Metodología:

En el laboratorio se elaboraron los hisopos de Moore, los cuales se esterilizan previamente antes de su empleo, esto se hace de la siguiente manera: Se corta la gasa de algodón (15 cm de ancho y 60-120 cm. de largo), doblándolo de forma longitudinal por varias ocasiones para formar rollos cilíndricos compactos, atando el centro firmemente con un alambre, se envuelve el hisopo en papel y se esteriliza en autoclave 15 lb/15 min. Los alambres que sostienen las gasas están unidos a hilos de pescar de Nylon o bien se usa otro pedazo de alambre; se sumergen los hisopos durante 24 horas en las aguas negras para obtener la muestra (ver figura 6).

Transcurridas las 24 horas, se sacan los hisopos, se separan de los alambres, e inmediatamente se sumergen en 500 ml de agua peptonada alcalina estéril, pH de 8.5-9.0 como medio de

HISOPO DE MOORE

FIGURA # 6  
HISOPO DE MOORE



(15)

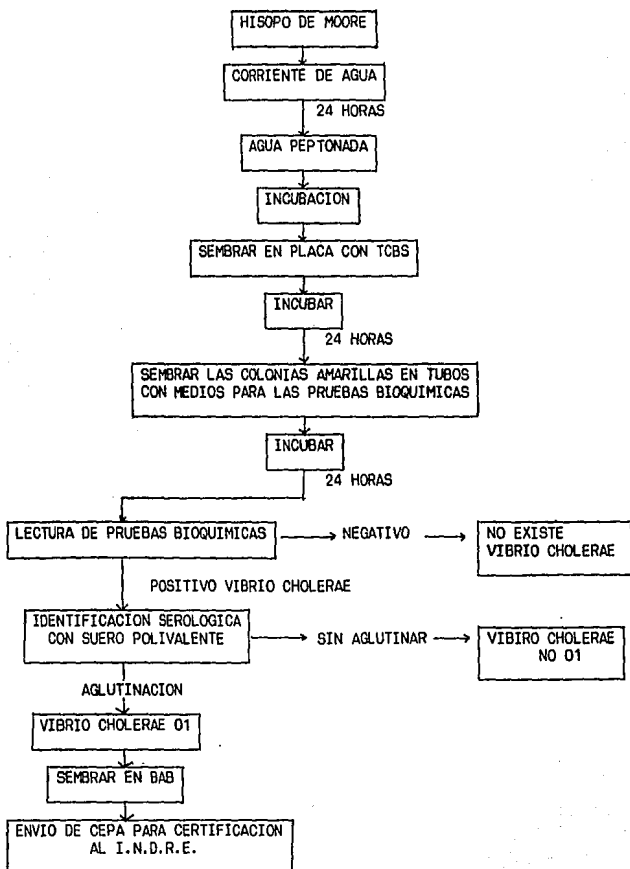
transporte, empleando recipientes de boca ancha. El transporte de estos recipientes al laboratorio debe de hacerse en refrigeración. En el laboratorio se incuban y se hacen resiembras, después de 8-18 hrs de incubación a 35 °C en una caja con medio TCBS. En el laboratorio se recomienda incubar hasta 18 hrs por tratarse de un material altamente contaminado, se hace un doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina, ya que este procedimiento permite una mejor recuperación de Vibrio cholerae. Tomar 3 asadas de la superficie con cuidado y tratando de no agitar el tubo, es muy importante tomar sólo de la superficie, ya que aquí se encuentran los vibrios en mayor cantidad. Se siembran las 3 asadas en placas de gelosa TCBS (Agar de Tiosulfato citrato bilis sacarosa) el cual debe prepararse diariamente. Aislar colonias por estría cruzada, flamear el asa entre cada estría. Incubar de 18 a 24 hrs a 37 °C. En el Agar TCBS, las colonias típicas de V. cholerae son amarillas, planas, un poco convexas, de aproximadamente 2 mm de diámetro, mientras que las colonias azul-verdosas-grandes, planas, son típicas de V. parahaemolyticus. Hay que enfatizar que no todas las colonias amarillas en medio TCBS son V. cholerae, ya que también dan colonias amarillas Vibrio alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. furnissii, V. metschnikouii (que además es el único vibrio oxidasa negativa) (10).

Las colonias de V. cholerae en TCBS generalmente son "pegajosas", lo que dificulta la aglutinación directa de las

colonias crecidas en ese medio. Las colonias de V. cholerae O1 no pueden diferenciarse de las de V. cholerae NO O1 o de las cepas rugosas (muy raras). Para un diagnóstico presuntivo y rápido se pasa una de las colonias aisladas a un tubo de medio de base de sangre o de agar nutritivo para hacer serología y la prueba de oxidasa (Figura 6).

En este estudio se seleccionaron 2 colonias amarillas sospechosas de V. cholerae en agar TCBS para sembrar cada una en bioquímicas.

FIGURA 6  
IDENTIFICACION DE *Vibrio cholerae* EN AGUA RESIDUAL



#### IV. RESULTADOS

Los datos mostrados en las hojas de resultados se pueden resumir en la siguiente tabla:

TABLA No. 1 RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN 1992

TIPO DE MUESTRA	No. DE MUESTRAS ANALIZADAS		MICROORGANISMOS ENCONTRADOS					
		%	ENTEROBACTERIAS	%	OTROS BACILOS GRAM (-)	%	V. FLUVIALI	%
AGUAS SUPERFICIALES	158	71.8	127	70.5	29	82.8	2	40
CLINICAS Y HOSPITALES	40	18.2	40	22.2	-	-	-	-
CENTROS TURISTICOS	22	10	13	7.2	6	17.1	3	60
T O T A L	220		180		35		5	

OBSERVACIONES: No se identificaron en ninguna de las muestras analizadas Vibrio cholerae ni Vibrio cholerae 01



## HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

## IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C I S	NIO		LIA LISINA DCARR. DESA.	TSI			ARGENTINA	OXIDASA	REACTIVACION	RESULTADO
			NOV. INDOL. GRN.			ACIDO	LAC/SAC	GLUC.				
230192	PUENTE PLAN DE AYALA	1 COL.	-	-	-	A	+	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	A	-	+	-	-	-	
230192	DESC. MPAL. DE LEON	1 COL.	+	+	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	+	A	+	+	-	-	
230192	DESC. MPAL. DE SELAO	1 COL.	+	-	-	+	-	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	A	+	+	-	-	
230192	DESC. MPAL. DE IRAPUATO	1 COL.	+	+	-	+	+	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	+	-	-	-	A	+	+	-	
230192	PUENTE LIRAMIENTO A SALAMANCA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	
230192	DESC. MPAL. DE SALAMANCA	1 COL.	+	+	-	-	-	K/A	-	+	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	+	-	-	-	K/A	-	+	-	
230194	DESC. MPAL. DE VILLAGRAN	1 COL.	+	+	-	+	+	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	-	A	+	+	-	
230194	DESC. MPAL. DE CORTAZAR	1 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	-	A	-	+	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE 01

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S	MIO		LTA LISTINA DCARB. DESA.	TSI				ARGENTINA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
			NOV.	INDOL.		ORN.	ACIDO LAC/SAC	SLUC.	MZS				
230192	DESC. MPAL. DE APASEO EL ALTO	1 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
230192	CALERAS DE ANECHE	1 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
240192	PUENTE PLAN DE AYALA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
240192	DESC. MPAL. DE LEON	1 COL.	+	+	-	-	-	A	-	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	-	+	-	-	
240192	DESC. MPAL. DE SILAO	1 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
240192	DESC. MPAL. DE IRAPUATO	1 COL.	-	-	-	+	+	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	+	+	A	+	+	-	-	
240192	PUENTE LITRAMIENTO A SALAMANCA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	+	-	-	-	A	+	+	-	-	

• PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE 01

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE 01

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S	NIO		LIA LISTINA DCARB. DESA.	TSI				ARGENINA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
			MOV.	INOL. ORN.		ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S				
240192	DESC. NPAL. DE SALAMANCA	1 COL.	+	+	-	-	-	A	-	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	-	+	-	+	
240192	DESC. NPAL. DE VILLAGRAM	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	
240192	DESC. NPAL. DE CORTAZAR	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
240192	DESC. NPAL. DE APASEO EL ALTO	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
240192	CALERAS DE ANECHE	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
200292	DESC. NPAL. DE SALAMANCA	1 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	V. FLUVIALI
		2 COL.	-	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
200292	DESC. NPAL. DE VILLAGRAM	1 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE 01

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIRIDIO CHOLERAE 01

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C S	H2O		L1A L151NA		TSI				ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			MOV.	INDOL.	ORN.	DCARR.	DESA.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.					MPS
220292	DESC. NPAL. DE CORTAZAR	1 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	+	+	OTRO BACILO GRAM (-)
220292	PUENTE RIO GUARAJURTO IIRAPURTO	1 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
250292	DESC. NPAL. DE IIRAPURTO	1 COL.	-	+	-	-	+	A/R	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	+	+	K/A	-	+	+	+	+	-	ENTEROBACTERIA
250292	DESC. RTE. LI- BRAMIENTO A SA LAMANCA	1 COL.	-	+	+	-	-	A/R	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	A/R	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
010292	DESC. NPAL. DE IIRAPURTO	1 COL.	-	-	-	+	+	A	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	+	-	K/A	-	+	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
040292	DESC. RIO GUARAJURTO IIRAPURTO	1 COL.	+	-	+	-	-	K/R	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	K/R	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
050292	DESC. NPAL. DE ATASOLO	1 COL.	+	-	+	+	+	A	+	+	+	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	+	K/A	-	+	+	-	+	-	ENTEROBACTERIA
050292	DESC. NPAL. DE SALAMANCA	1 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/R	-	+	-	+	-	+	OTRO BACILO GRAM (-)

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIRIDIO CHOLERAE 01

DESC: DESCARBA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S *	RIO	LIA LISTINA DCARR. BESA.	TSI			ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
					ACIDO	LAC/SAC	GLUC. H2S GAS				
050392	DESC. PUEBLO LIBRAMIENTO SALAMANCA	1 COL.	+ - +	- - -	K/A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+ + +	- - -	K/A	-	-	-	-	-	
050392	DESC. NPAL. DE VILLAGRAN	1 COL.	- - -	- - -	A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	- + +	- - -	A	-	-	-	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
050392	DESC. NPAL. DE CORTAZAR	1 COL.	+ - +	- - -	A	-	-	-	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	- - -	- - -	A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
050392	DESC. NPAL. DE SALVA TIERRA	1 COL.	- - +	- - -	A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+ - +	- - -	A	-	-	-	-	-	
050392	RIO LERMA ANTES PRESA SOLIS	1 COL.	- - +	- - -	A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+ - -	- - -	K/A	-	-	-	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
050392	RIO LERMA A SALVA TIERRA	1 COL.	- - +	- - -	A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	- - +	- - -	A	-	-	-	-	-	
050392	DESC. NPAL. DE APASEO EL ALTO	1 COL.	- - +	- - -	A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	- - +	- - -	K/A	-	-	-	-	-	
050392	RIO QUE-RETARDO CALERAS DE AMECHE	1 COL.	+ - -	- - -	K/A	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+ - -	- - -	K/A	-	-	-	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C # S	NIZO			LIA LISINA BCART. DESA.	TSI					ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
			MOV.	INDOL.	ORN.		ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S	GAS				
050392	DESC. MPAL. DE APASEO EL GRANDE	1 COL.	+	-	-	-	A	+	+	-	-	-	-		ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	K/A	+	-	-	+	-	-	
050392	RIO LAJA TEGUIS-QUIAPAN	1 COL.	-	-	+	-	-	K	-	-	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	K	-	-	-	-	+	-	
216492	DESC. MPAL. DE CELAYA CARACANO SUR	1 COL.	-	+	+	-	-	A/A	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	
218192	DESC. MPAL. DE CELAYA CARACANO ORIENTE	1 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A/A	+	+	-	-	+	-	
230492	DESC. MPAL. DE SALAMANCA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	+	-	-	+	A	+	+	+	+	-	-	
230392	PUENTE LITRAMIENTO A SALAMANCA	1 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	-	-	-	

• PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S	MIO		LIA LISINA	TSI				ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
			NOV. INDOL. ORN.	OCARR. DESA.		ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S				
230492	DESC. MPAL. DE VILLA GRAN	1 COL.	-	-	-	A	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	A	+	+	-	-	-	-	
230492	DESC. MPAL. DE CORTAZAR	1 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	-	
240492	DESC. MPAL. DE APASEO EL ALTO	1 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	
230492	DESC. MPAL. DE SAN MIGUEL DE ALLENDE	1 COL.	+	-	+	+	+	K/A	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	K/K	-	-	-	-	
230492	DESC. MPAL. DE SALVA-TIERRA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K	-	-	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIRRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C N S	NIO		LIA LISTINA DCARR. DESA.	TSI					ARGENTINA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			NOV.	INDOL.		ORN.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S					GAS
210592	RIO LERMA SALVA-TIERRA	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	
210592	R. LERMA SALAMANCA PTE. LIDRAMIENTO	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	
210592	DESC. MPAL. SA LANANCA R. LERMA	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	
210592	DESC. MPAL. DE VILLAGRAN	1 COL.	+	+	+	+	+	K/A	-	+	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	+	+	-	-	
210592	DESC. MPAL. DE CORTAZAR	1 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	-	-	
270592	CARCAMO SUR #1	1 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	-	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIRRIO CHOLERAE O1

BESC: DESCARGA



HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C I S	MIO		LIA LISTINA DCARB. DESA.	TSI					ARGENTINA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
			NOV.	INDOL.		ORN.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S				
150692	VILLAGRAN	1 COL.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
150692	R. LERMA PTE. LIBRAMIENTO SALAMANCA	1 COL.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
150692	R. LERMA DESC. SALAMANCA	1 COL.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
170692	DESC. MPAL. DE IAPUATO	1 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
170692	DESC. MPAL. DE LEON	1 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
150692	CORTAZAR	1 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
170692	RIO LOS GONZALEZ EN LEON	1 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
290692	DESC. COMUNIDAD SN. ISIDRO	1 COL.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE NUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE NUESTRO	T C B S *	N/O		LIZ LISINA DCARR. DESA.	TSI				ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			NOV.	INDOL.		ORN.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.					H2S
010792	DESC. MPAL. DE IRAPUATO	1 COL.	+	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	-	A	+	+	+	+	
010792	DESC. MPAL. DE SILAO	1 COL.	-	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	
010792	LA YERBA BUENA MPID. DE SILAO NUEVA	1 COL.	+	+	-	+	+	-	K	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	+	+	-	K	-	-	-	-	
010792	LA YERBA BUENA MPID. DE SILAO VIEJA	1 COL.	+	-	+	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	-	-	A	-	+	-	-	
010792	R. LERMA PTE. LI-BRARIEN-TO SALA-MANCA	1 COL.	+	-	+	-	-	-	K/A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	-	K/A	-	+	-	-	
010792	R. LERMA PTE. LI-BRARIEN-TO SALA-MANCA	1 COL.	-	+	+	-	-	-	K/A	+	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	
300792	DESC. MPAL. DE SALVA-TIERRA	1 COL.	+	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	-	+	-	-	+	-	A	+	+	-	-	
300792	R. LERMA PTE. SALVA-TIERRA	1 COL.	+	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE 01

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C N S	MIO		LIA LISINA		TSI					ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
			NOV.	INDOL.	ORN.	NOV.	INDOL.	ORN.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.				
300792	DESC. MPAL. APASEO EL GDE.	1 COL.	+	-	-	-	-	R	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	R	+	+	-	-	-	-	
300792	DESC. MPAL. APASEO EL ALTO	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	-	-	-	-	-	
260892	DESC. MPAL. DE APASEO EL GRANDE	1 COL.	+	-	-	-	-	R	+	+	-	-	+	+	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	-	-	-	-	R	+	+	-	+	+	+	
265092	DESC. MPAL. DE APASEO EL GRANDE	1 COL.	+	-	-	+	+	K/A	-	+	+	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	+	+	K/A	-	+	+	+	+	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE 01

BESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS SUPERFICIALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C # S	MIO		TSI				ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			NOV. INDOL. ORN.	DCARR. DESA.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S					GAS
260892	DESC. MPAL. APASEO EL GRE.	1 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	+	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	A	+	+	-	+	
260892	DREN LA PALMA NPIO. ESCOBEDO	1 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	+	OTRO BACILO GRAN (-)
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	+	
260892	DREN LA PALMA NPIO. ESCOBEDO	1 COL.	+	+	+	+	+	A	+	+	-	+	OTRO BACILO GRAN (-)
		2 COL.	+	+	+	+	+	A	+	+	-	+	
051192	DESC. MPAL. SAN JOSE GTO. CELAYA	1 COL.	+	-	-	+	+	A/R	+	+	-	+	OTRO BACILO GRAN (-)
		2 COL.	+	+	+	+	+	A/K	+	-	-	+	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCAR6A

## HOJA DE RESULTADOS DE MUESTROS PROCEDENTES DE CLINICAS + HOSPITALES

## IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTRO	C N S	MIO		LIA LISINA DCARR. DESA.	TSI					ARGENTINA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			NOV.	INDOL.		ORN.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S					GAS
250592	HOSPITAL CELAYA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	+	+	+	-	
250592	ISSSTE CELAYA	1 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	+	-	
250592	HOSPITAL PENEX SALAMANCA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	-	+	-	
250592	I N S S CELAYA	1 COL.	+	+	+	-	-	K	-	-	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	-	-	A	+	+	-	+	-	-	
250592	HOSPITAL REGIONAL SALAMANCA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	-	+	-	
270592	I N S S CELAYA	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	+	+	-	
060692	HOSPITAL GENERAL 556 SALA-	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-	-	

• PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CLINICAS Y HOSPITALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S	MIO		LTA LISINA DCARR. DESA.	TSI			ARGININA OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			MOV.	INDOL. ORN.		ACIDO	LAC/SAC	GLUC.				H2S
060692	SANATORIO GUALUPANO SALAMANCA	1 COL.	-	+	+	-	-	K/A	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	+	+	A	+	+	+	
060692	HOSPITAL GENERAL REGIONAL LEON	1 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	
060692	HOSPITAL ARANDA PARRA LEON	1 COL.	-	-	+	-	-	K/A	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	
060692	CENTRO MEDICO IAJTO LEON	1 COL.	+	+	+	+	+	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	+	+	+	A	+	+	-	
150692	CLINICA LA SALUD S.M.A	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	
150692	SANATORIO TORRES S.M.A	1 COL.	-	-	-	-	-	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	-	A	+	+	-	
150692	SANATORIO DE ESPECTABILIDADES D. HGO.	1 COL.	-	+	-	+	+	A	+	+	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	+	-	-	+	A	+	+	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CLINICAS Y HOSPITALES

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T	C	S	MIO		LIA LISTINA	ISI			ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO
					MOV.	IMBOL.		ORN.	ACIDO	LAC/SAC				
150692	HOSPITAL REGIONAL PENEX	1	COL.	+	-	-	-	A/A	+	+	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2	COL.	+	-	-	-	A/A	+	+	-	+	-	
150692	HOSPITAL REGIONAL SALAMANCA	1	COL.	-	-	+	-	A/A	+	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2	COL.	-	-	+	-	A/A	+	+	-	-	-	
290692	SANTUARIO CELAYA	1	COL.	+	-	+	-	A	+	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2	COL.	+	+	+	-	A	+	+	+	-	-	
300692	CENTRO DE ESP. MEDICAS DE CELAYA	1	COL.	+	+	+	-	K/A	-	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2	COL.	+	+	+	-	K/A	-	+	-	-	-	
300692	SANTUARIO GUADALUPANO CELAYA	1	COL.	+	-	-	-	A	+	+	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2	COL.	-	-	-	-	A	+	+	-	+	-	
300692	CENTRO MEDICO QUIRURGICO CELAYA	1	COL.	-	-	-	-	A	+	+	-	+	-	ENTEROBACTERIA
		2	COL.	-	-	-	-	A	+	+	-	+	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CENTROS TURISTICOS

IDENTIFICACION DE VIBRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S *	MIO		LIA LISINA DCARRI. DESA.	TSI			ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			NOV. INDOL. ORN.			ACIDO LAC/SAC	GLUC.	H2S					GRAS
230192	DESC. APAL. DE CELAYA	1 COL.	+	+	-	-	-	A	+	+	-	-	V. FLUVIALI
		2 COL.	-	-	-	-	-	A	-	+	-	-	OTRO BACILO GRAM (-)
240192	DESC. APAL. DE CELAYA	1 COL.	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	-	-	-	A	-	+	-	-	V. FLUVIALI
060392	SAN RIGUEL ALLENDE	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	-	+	-	-	A	+	+	-	+	
060392	BOLORES HIDALGO	1 COL.	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	-	-	-	-	K/A	-	+	-	+	
210592	COLONIA ARIOLEBAS CELAYA	1 COL.	-	+	+	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	-	
210592	CARCAMO SUR CELAYA	1 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	-	

\* PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIBRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA



## HOJA DE RESULTADOS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CENTROS TURISTICOS

## IDENTIFICACION DE VIRIO CHOLERAE O1

FECHA	SITIO DE MUESTREO	T C B S	MIO		LIA LISTINA DCARR. DESA.	TSI					ARGININA	OXIDASA	AGLUTINACION	RESULTADO	
			NOV.	INDOL.		ORN.	ACIDO	LAC/SAC	GLUC.	H2S					GAS
210592	COLONIA ARBOLEDAS II CELAYA	1 COL.	-	+	+	-	-	A	+	+	-	-	-	-	ENTEROBACTERIA
		2 COL.	-	+	+	-	-	A	+	+	-	-	-	-	
217092	DESC. MPAL. DE GUANAJURTO	1 COL.	+	+	+	-	-	A	+	+	-	-	-	+	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	+	-	+	
290692	DESC. MPAL. CARCANO ARBOLEDAS	1 COL.	-	+	-	-	-	A/A	+	+	-	-	+	+	OTRO BACILO GRAM (-)
		2 COL.	+	-	-	-	-	A/A	+	+	-	-	+	+	
300692	DESC. RTO GUANAJURTO CELAYA	1 COL.	+	+	+	+	+	A	+	+	-	+	-	ENTEROBACTERIA	
		2 COL.	+	+	+	-	-	K/A	-	+	-	-	-		
051192	DESC. MPAL. ARBOLEDAS CELAYA	1 COL.	+	+	+	+	+	A/A	+	+	-	+	+	OTRO BACILO GRAM (-)	
		2 COL.	+	+	+	+	+	A/A	+	+	-	+	+		

• PRESENCIA DE COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER VIRIO CHOLERAE O1

DESC: DESCARGA

## DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras sembradas con hisopos de Moore se muestran en la tabla #1 en la cual podemos observar que de las 110 muestras trabajadas en forma doble, la mayoría corresponden a enterobacterias, siguiéndole otros bacilos gram negativos y 5 casos donde se encontró Vibrio fluviali.

De las muestras de clínicas y hospitales todos los resultados corresponden a enterobacterias, resultando lógico por la gran carga microbiana que se presenta en este tipo de aguas.

En los centros turísticos y en aguas superficiales también se encontró en gran cantidad al grupo de enterobacterias. Cabe hacer mención que en algunas poblaciones se presentaron brotes de cólera, pero la bacteria no se pudo detectar en las descargas, posiblemente debido a las medidas de control sanitario que se aplicaron en el estado, principalmente la cloración de las descargas de aguas residuales.

Se debe tener en cuenta que muchas de las clínicas y hospitales descargan sus desechos a cuerpos receptores sin tratamiento previo, por lo cual se deben de establecer estrictas medidas de vigilancia en estos centros hospitalarios.

La Comisión Nacional del Agua en el Estado de Guanajuato, se encargó de la selección de los sitios de muestreo para la detección del cólera en el estado, dicha selección se hizo tratando de abarcar de una manera amplia y confiable completamente a toda la entidad.

Los sitios seleccionados para el monitoreo fueron los siguientes:

- Ciudades principales, densamente pobladas.
- Centros turísticos, debido al alto grado de riesgo que estos representan por su población flotante tanto nacional como extranjera.
- Las principales corrientes superficiales de la entidad, por ser portadoras o conductoras en su mayoría, de descargas de tipo residual, además de abarcar gran parte del territorio.
- Clínicas y Hospitales en las principales ciudades del estado.
- Comunidades con sospecha de posibles brotes (ver mapa).

Asimismo, a parte de estos monitoreos se concentra la vigilancia en los lugares donde la Secretaría de Salud detecta casos sospechosos de cólera.

En el Laboratorio Regional Zona Centro, de 220 muestras analizadas no se detectó la presencia de Vibrio cholerae dato

que concuerda con los boletines quincenales publicados por el Instituto de Diagnóstico y referencia Epidemiológicos, en los cuales se observa que Guanajuato es uno de los estados menos afectados por esta infección intestinal.

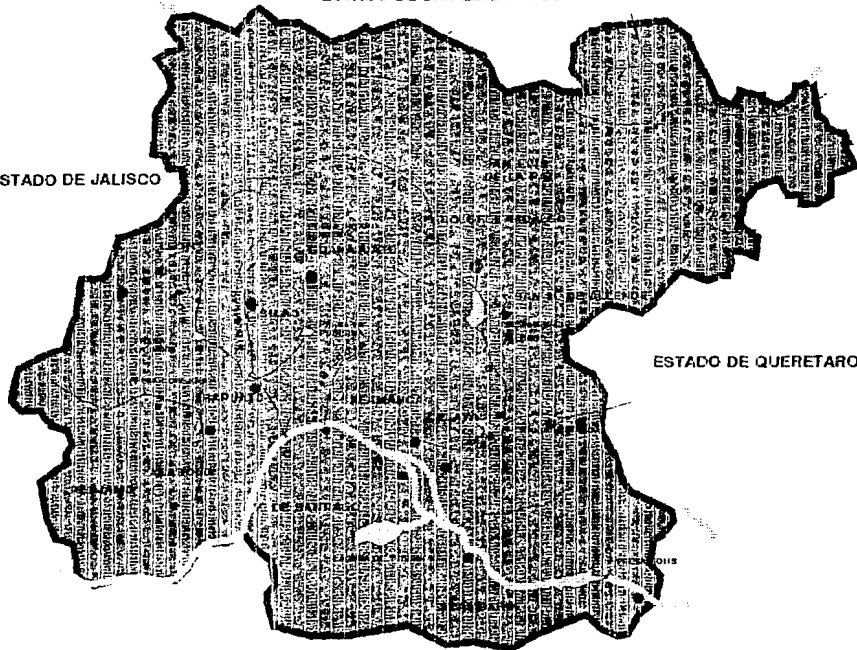
# ESTADO DE GUANAJUATO

ESTADO DE SAN LUIS POTOSI

ESTADO DE JALISCO

ESTADO DE QUERETARO

ESTADO DE MICHOACAN



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

Del trabajo realizado durante el presente estudio se puede concluir lo siguiente:

- Se logró establecer una metodología eficaz para la detección de Vibrio cholerae 01, gracias a la cual se puede realizar actualmente en forma rutinaria este análisis.
- Durante el estudio del cólera en el estado de Guanajuato, se capacitó al personal del laboratorio en la metodología para la detección de la bacteria Vibrio cholerae, de tal manera que en caso de ser necesario se puede contar con personal auxiliar capaz de realizar la técnica en una forma eficaz y confiable.
- Gracias a los monitoreos continuos tanto de la Comisión Nacional del Agua como de la Secretaría de Salud se detectaron las poblaciones donde existe mayor posibilidad de brotes de cólera, lográndose así un control de la infección en la Entidad.
- Sólo se encontraron 5 casos de Vibrio fluviali en muestras procedentes de centros turísticos y de los puntos superficiales.

- De acuerdo a las bioquímicas elegidas se recomienda usar el medio de caldo sacarosa rojo de fenol más 1% de urea, ya que a veces hay confusión en la lectura de esta bioquímica en el medio de TSI (agar de hierro y triple azúcar).

## RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir tomando estrictas medidas de control sanitario, para mantener el bajo promedio de personas enfermas de cólera que hasta ahora se ha podido lograr en el Estado de Guanajuato.

Algunas de las medidas que se han tomado y que es necesario seguir aplicando son:

La dotación del equipo necesario a las escuelas primarias y secundarias, para que laven y cloren sus tinacos, ya que este sector de la población es uno de los más propensos a contraer esta enfermedad; además, la Comisión Nacional del Agua dota de hipoclorito a las cabeceras municipales, para que éstas, a su vez, lo repartan en todas las comunidades para controlar posibles brotes de cólera. Dar mayor información a comunidades marginadas acerca de las medidas preventivas para evitar este padecimiento.

## VII. ANEXO

### PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVOS

#### SOLUCIONES

Fenol al 5%	
Fenol .....	50 gr
Agua destilada .....	1,000 ml

Preparación: pesar 50 gr de cristales de fenol y colocarlos en un frasco ambar adicionando 1,000 ml de agua destilada.

Hipoclorito de sodio 0.5%	
Hipoclorito de sodio .....	5 ml
Agua destilada .....	1000 ml

Preparación: Tomar 5 ml del hipoclorito de sodio concentrado y disolver en un litro de agua destilada.

Hidróxido de sodio 1 N	
NaOH .....	40 gr
Agua destilada .....	1,000 ml

Preparación: Pesar 40 gr de hidróxido de sodio y colocarlos en un matraz volumétrico y completar un volumen de 1,000 ml con agua destilada.

#### Reactivo de Kovacs

p-dimetil-amino-benzaldehido .....	5 gr
Alcohol amílico o isoamílico .....	75 ml
HCl concentrado .....	25 ml



Preparación: Disolver 5 gr. de p-dimetil-amino-benzaldehido en 75 ml de alcohol isoamílico y adicionar 25 ml de ácido clorhídrico. El reactivo presenta una coloración amarilla.

#### Reactivo de Erlich

p-dimetil-amino-benzaldehido .....	2 gr
Etanol al 95% .....	190 ml
HCl concentrado .....	40 ml

Preparación: Pesar 2 gr de p-dimetil-amino-benzaldehido y disolverlo en 190 ml de etanol al 95% , agregar 40 ml de ácido clorhídrico concentrado.

#### Reactivo de oxidasa

Oxalato de p-aminodimetilanilina .....	1 gr
Agua destilada .....	100 ml

Preparación: Diluir el reactivo en agua destilada estéril ligeramente tibia, agitar hasta disolución.

NOTA: El oxalato puede ser sustituido por N,N,N,N, tetrametil p-feniléndiamino.

#### Desoxicolato de sodio 0.5%

Desoxicolato de sodio .....	0.5 gr
Agua destilada .....	100 ml

Preparación: Pesar 0.5 gr de desoxicolato y disolver en 100 ml de agua destilada estéril, guardar en frasco claro.

#### Cloruro de sodio 0.85%

NaCl .....	0.85 gr
Agua destilada .....	100 ml

#### Solución formalinizada al 0.6%

Formaldehido Q.P. ....	0.6 ml
NaCl al 0.85% .....	100 ml

#### MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de los mismos se deben utilizar medios de cultivo deshidratados de procedencia idónea, realizando la mejor uniformidad de los mismos: olor, color y consistencia semejantes.

Agua peptonada alcalina	
Bacto peptona .....	10 gr
NaCl .....	10 gr

Preparación: Las sales se disuelven en 1,000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 9.0 con solución 1 N de NaOH y esterilizar la solución a 121°C durante 15 minutos.

Usos: Se utiliza principalmente como medio de enriquecimiento para vibrios, especialmente Vibrio cholerae, debido a que funciona como medio de enriquecimiento para las muestras de agua que contienen un pequeño número de microorganismos.

## MEDIOS DE AISLAMIENTO SELECTIVO

Estos medios, por la alta concentración de sales biliares que contienen, inhiben el desarrollo de los microorganismos Gram positivos, retardando el crecimiento de *E. coli* y otros bacilos entéricos, permitiendo recuperar vibrios de las muestras donde la concentración de coliformes es muy alta.

Aunque estos medios pueden ser innecesarios para el aislamiento de algunos de los microorganismos indicados, es aconsejable utilizarlos si el material que va a sembrarse puede contener otros muchos microorganismos. Sin embargo, debe hacerse notar que todos los medios selectivos son en algún grado, inhibidores de los microorganismos que se intenta seleccionar.

### Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa)

Preparación: Suspender 89 g. de este medio en un litro de agua destilada y llevar el pH de la solución a 8.6 a 25°C (en caso de que la temperatura sea superior a la especificada meter al refrigerador un momento), con solución 1 N de NaOH, calentar a ebullición hasta disolución completa. Después de disolver el medio, enfriar ligeramente y vaciarlo en cajas petri estériles; Mantener en refrigeración a una temperatura 2 a 8°C.

Usos: Es un medio selectivo para el crecimiento de Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus y otros vibrios. Las colonias del primero son de color amarillo, convexas, de aproximadamente 2 a 3 mm de diámetro, mientras que las del segundo son grandes con el centro verde azulado, de aproximadamente 2 a 5 mm. de diámetro.

La elevada concentración de Tiosulfato y Citrato, así como la alcalinidad, inhiben notablemente a las enterobacterias. La bilis de buey y el colato inhiben a los enterococos. Los coliformes que eventualmente pueden crecer no degradan la sacarosa, algunas cepas de Proteus sacarosa positivos pueden dar lugar a colonias amarillas semejantes a los vibriones. El indicador mixto azul de timol y azul de bromotimol presenta un claro viraje a amarillo por la producción de ácido, incluso en un medio fuertemente alcalino.

#### MEDIOS DE IDENTIFICACION

Se utilizan para diversos ensayos bioquímicos:

#### Medio Kligler

Preparación: Se disuelven 52 gr del medio deshidratado en un litro de agua destilada y el pH final de la solución debe ser de 7.4, se debe mezclar bien y calentar a temperatura de ebullición

durante un minuto; se distribuyen de 3 a 4 ml en tubos de ensayo de 13 x 100, esterilizando posteriormente a 121°C durante 15 minutos dejándolos enfriar en posición inclinada.

Usos: Es un medio creado para favorecer la fermentación de hidratos de carbono y para la diferenciación entre varios grupos, géneros y especies de las enterobacterias, así como para otro grupo de bacterias de metabolismo oxidativo. Determina la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico H<sub>2</sub>S.

#### Agar TSI (Agar de Hierro y Triple Azúcar)

Preparación: Se disuelven 65 gr del medio deshidratado en un litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final de 7.4, mezclar bien y calentar a ebullición durante un minuto. Inmediatamente después distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100 y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Se deja solidificar en posición inclinada, de forma que sobre una columna de unos 3 cm de altura, se forme una superficie oblicua, elíptica, de unos 5 cm de diámetro mayor.

Usos: Es un medio diferencial muy usado para identificación de enterobacterias patógenas y saprofitas en los análisis bacteriológicos de agua. Su modo de acción es semejante al medio de Kligler lo cual permite el reconocimiento y exclusión de algunas enterobacterias.

#### Agar lisina-hierro

Preparación: Disolver 34.5 gr por litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final 6.7 a 25°C. Calentar a ebullición hasta disolución completa y distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos, enfriar y antes de que solidifique inclinar los tubos, conservar los tubos preparados en refrigeración entre 2 a 8°C.

Usos: Esta prueba es de gran utilidad par la identificación de algunas enterobacterias. La mayoría de las cepas de Vibrio dan la prueba positiva (excepto V. fluvialis I, V. fluvialis II y V. anguillarum que la dan negativa). En este medio se observa la descarboxilación y desaminación de la lisina.

#### Medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)

Preparación: Disolver 31 gr por litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final de 6.5 a 25°C, calentar a ebullición hasta

disolución completa, distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, enfriar y dejarlos en reposo en posición vertical, conservar los tubos preparados en refrigeración entre 2 y 8°C.

Usos: Esta prueba es de gran utilidad para la identificación de algunas enterobacterias. Vibrio cholerae da la prueba positiva sobre la base de movilidad, producción de ornitina descarboxilasa y de indol. Este método tiene las ventajas de poder observar la fermentación de la glucosa, la producción de indol, la movilidad y la descarboxilación de la ornitina.

Caldo arginina (Base de Moeller + arginina)

Preparación: Rehidratar el medio disolviendo 10.5 gr en un litro de agua destilada o agua desionizada. El pH final debe ser de 6.8 a 25°C. Calentar hasta completa disolución. Adicionar 10 g de L-arginina o 20 de DL-arginina, y agitar hasta completar disolución. Distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Conservar los tubos preparados en refrigeración de 2 a 8°C.

Usos: Esta prueba es de gran utilidad para la identificación de algunas enterobacterias y Vibrio cholerae que no hidrolizan la arginina, dando por consiguiente una respuesta negativa.

### Prueba de la oxidasa

Preparación: Disolver 1 g de Oxalato de p-aminodimetilanilina en menos de 100 ml de agua destilada (con excepción del Alfa-naftol-alcohol etílico). Calentar suavemente hasta su disolución. Pasar a un matraz volumétrico y agregar un diluyente adecuado (agua o alcohol etílico csp 100 ml). Dejar reposar 15 minutos antes de su empleo. Guardar en frasco de vidrio de color ámbar, tapado. Evitar la innecesaria exposición a la luz.

Usos: Las cepas de Vibrio cholerae dan la prueba positiva a la oxidasa.



## BIBLIOGRAFIA

1. Balows Albert; William J. Hausler; JR Kenneth L. Herrmann;  
Henry D. Isenber; H. Jean Shadomy.  
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY  
Washington, D.C. 1991 fifty th.  
PAG. 384-386;388-390
2. Bauman P.; Furnissal; Lee J.U.  
"Genus I vibrio" in:  
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY  
VOL. I  
Krieg N.R; Holt J.G.  
The Williams and Wilkins  
Baltimore/London, (1984)
3. Carpenter CCJ.  
"CHOLERA: DIAGNOSIS AND TREATMENT" BULL  
N.Y. ACAD. MED. (1971)  
PAG. 1192-1203
4. Cowan ST. y Steel kJ.  
MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA  
MEDICA.  
Compañía Editorial Continental S.A., México 2th., 1979  
Pag. 143-147
5. Clesceri Leonore S.; WPCF; Arnold E.; Greenberg; APHA; R.  
Rhodes Trussell; Awoja.  
METODOS NORMALIZADOS PARA EL ANALISIS DE AGUAS POTABLES Y  
RESIDUALES.  
Ediciones Díaz de Santos, S.A.  
Madrid (España) 1992

6. Davis Bernard; Dulbecco R.; Eisen; H.N. and Ginsberg, H.S.  
"MICROBIOLOGY"  
Harper Internacional Edition  
1980 (3th)  
PAG. 665-668
  
7. Enriquez Enriquez Carlos  
MANUAL DE APUNTES DEL TALLER DE MICROBIOLOGIA II  
IMTA; S.A.R.H.; C.N.A.  
MEXICO, (1990)
  
8. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México  
MANUAL DE BACTERIOLOGIA MEDICA. 4a. EDICION  
México, IPN 1983  
Academia de Profesores del Laboratorio de Bacteriología Médica
  
9. Frobisher y Fuerst  
MICROBIOLOGIA  
Ed. Interamericana S.A. de C.V.  
PAG. 312-315
  
10. Glono C.S.; Gutiérrez C.L.; Hinojosa.  
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
vibrio cholerae01  
Publicación Técnica del INDRE #10  
Secretaría de Salud  
México, D.F. (1985)  
PAG. 630-631
  
11. Gonzalez Cardel Ana María  
"COLERA EN LATINOAMERICA 1991" (TESIS)  
U.N.A.M. México, 1992
  
12. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia  
Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
16/mayo/1991

13. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
12/julio/1991
14. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
26/julio/1991
15. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
13/septiembre/1991
16. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
27/septiembre/1991
17. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
18/octubre/1991
18. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
01/noviembre/1991

19. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
22/noviembre/1991
20. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/enero/1992
21. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
14/febrero/1992
22. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/abril/1992
23. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/mayo/1992
24. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/febrero/1993

25. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/octubre/1993
26. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/diciembre/1993
27. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.  
BOLETIN QUINCENAL. COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS.  
Secretaría de Salud. México.  
15/enero/1994
28. Jawetz Ernest  
MICROBIOLOGIA MEDICA  
Editorial el Manual Moderno, S.a. 7th.  
(1977)  
PAG. 248-251
29. Burdon Kenneth  
"MICROBIOLOGIA"  
Publicaciones Cultural S.A. de C.V.  
México, D.F. (1985)  
PAG. 630-631
30. Mac. Faddin.  
PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA.  
Editorial Panamericana  
Buenos Aires, (1990)  
PAG. 61-63; 104-107; 112-114; 138-140; 154-156.

31. Valdespino G.J.L.; García G.M.L.; Gutiérrez C.L.; Giono C.S.;  
Morales; R.A.; Sepúlveda A.J.  
MANUAL SOBRE COLERA PARA PERSONAL DE SALUD. 85 PREGUNTAS Y  
RESPUESTAS.  
Publicación Técnica del INDRE #11.  
México, D.F. junio 1991.