

35
2º



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**"VALIDACION DE LA TECNICA DEL INDRE
PARA EL AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae*
01 DE MUESTRAS DE PESCADOS
Y MARISCOS."**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

EUSTOLIA ALEJANDRA MORENO ESCOBAR

DIRECTORES

DRA. SILVIA GIONO CEREZO

OFI. ANDREA BECERRIL OSNAYA

M. en C. GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES, N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIO



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Validación de la técnica del INDRE para el aislamiento de
Vibrio cholerae O1 de muestras de pescado y mariscos.

que presenta la pasante: Eustolia Alejandra Moreno Escobar
con número de cuenta: 8205131-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de agosto de 1990

PRESIDENTE J.F.I. Andrea Becerril Osnaya *Andrea Becerril Osnaya*
VOCAL M.V.Z. Gerardo Cruz Jimenez *Gerardo Cruz Jimenez*
SECRETARIO M. en C. Andres Romero Rojas *Andres Romero Rojas*
PRIMER SUPLENTE M. en C. Susana E. Mendoza Elvira *Susana E. Mendoza Elvira*
SEGUNDO SUPLENTE J.F.B. Marcela Hernandez Vargas *Marcela Hernandez Vargas*

**VALIDACION DE LA TECNICA DEL INDRE PARA
EL AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae* O1 DE
MUESTRAS DE PESCADOS Y MARISCOS.**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCION DE LA
DRA. SILVIA GIONO CEREZO, QFI. ANDREA BECERRIL
OSNAYA Y LA M EN C. MA. GUADALUPE RODRIGUEZ
ANGELES EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA
MOLECULAR, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS (INDRE).**

**A Dios:
Por todo lo que me ha dado
a lo largo de la vida**

**A mis padres:
Silvestre Moreno Ramírez
Celestina Escobar González
por su ejemplo, amor,
confianza y apoyo para
lograr ésta meta**

A mis hermanos:

Verónica, Fernando y Celina

**Por el amor y apoyo que me han
brindado en todo momento y espero
que esta tesis llegue a significar un
motivo de superación para ustedes.**

**A la M en C Guadalupe
Rodríguez Angeles
por su ayuda y consejos para
la realización de éste trabajo**

**A mis amigos:
que me han ayudado
en los momentos
difíciles de mi vida**

Contenido

	Pag.
Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Generalidades.....	3
1.3. Importancia.....	4
1.4. Estructura antigénica y clasificación serológica.....	7
1.5. Significado clínico.....	9
1.6. Mecanismo de patogenicidad.....	9
1.7. Tratamiento.....	10
1.8. Epidemiología.....	11
1.9. Ecología y mecanismo de transmisión.....	11
II. Justificación.....	14
III. Hipótesis	15
IV. Objetivo general	16
4.1. Objetivos particulares	16
V. Material	17
5.1. Medios de cultivo	18
5.2. Pruebas bioquímicas diferenciales	18
5.3. Reactivos	19
VI. Material biológico	20
6.1. Muestras	20
6.2. Cepa de referencia	20
6.3. Testigo negativo	20

6.4. Antisueros somáticos	20
VII. Metodología	21
7.1. Toma de muestra	21
7.2. Preparación del inóculo	21
7.3. Preparación de la muestra	21
7.4. Método del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (I.N.D.R.E.)	24
7.5. Método del Food and Drugs Administration (F.D.A.)	27
7.6. Método de los Laboratorios Nacionales de Salud Pública (L.N.S.P.)	30
7.7. Identificación de <i>Vibrio cholerae</i>	34
7.7.1. Prueba del hilo mucoso	34
7.7.2. Prueba de oxidasa	34
7.7.3. Pruebas bioquímicas en tubo	35
7.7.4. Serotipificación de <i>Vibrio cholerae</i>	36
7.8. Procesamiento de 1041 muestras de pescados y mariscos por el método del INDRE.....	37
7.8.1. Identificación bioquímica en tubo	38
7.8.2. Identificación por sistema API 20 E	38
VIII. Resultados	41
IX. Discusión	51
X. Conclusiones	56
XI. Apéndice.....	57
XII. Referencias.....	64

Índice de tablas

	Pag.
Tabla 1. Especies del género <i>Vibrio</i> aisladas de muestras humanas	4
Tabla 2. Características del crecimiento en NaCl de <i>Vibrio spp</i> patógenos para el humano	5.
Tabla 3. Asociación de <i>Vibrio spp</i> con diferentes síndromes clínicos	6
Tabla 4. Serotipos de <i>Vibrio cholerae</i> serogrupo O1	7
Tabla 5. Diferenciación de los biotipos de <i>Vibrio cholerae</i> O1	8
Tabla 6. UFC en las diluciones iniciales	23
Tabla 7. UFC/ml/g de ostión en la técnica del INDRE	25
Tabla 8. UFC/ml/g de ostión en la técnica de la FDA	28
Tabla 9. UFC/ml/g de ostión en la técnica de los LNSP	31
Tabla 10. Reacciones bioquímicas de <i>Vibrio cholerae</i>	35
Tabla 11. Características de las cepas de <i>Vibrio cholerae</i> aisladas por los métodos del INDRE, LNSP y FDA	42
Tabla 12. UFC/ml/g de ostión en las técnicas del INDRE, FDA y LNSP después de 6 y 18 h de incubación	43
Tabla 13. Determinación de la sensibilidad de los métodos del INDRE, FDA y LNSP para la recuperación de cepas de <i>Vibrio cholerae</i> O1	45
Tabla 14. <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Vibrio spp</i> aislados de 1041 muestras de pescados y mariscos provenientes de una Central de Abasto de la Ciudad de México	46
Tabla 15. Frecuencia de aislamientos de <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> y otras enterobacterias de muestras de pescados y mariscos	47

Tabla 16.	Sensibilidad del doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina pH 9 en el aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> O1 a partir de muestras de pescados y mariscos empleando la técnica del INDRE	49
Tabla 17.	Sensibilidad del doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina pH 9 en el aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> No O1 a partir de muestras de pescados y mariscos empleando la técnica del INDRE	50

Índice de figuras

Figura 1.	Método modificado del INDRE	26
Figura 2.	Método modificado de la FDA	29
Figura 3.	Método modificado de los LNSP	33
Figura 4.	Prueba de hilo mucoide con desoxicolato de sodio en cepas de <i>Vibrio cholerae</i>	34
Figura 5.	Serología para <i>Vibrio cholerae</i>	36
Figura 6.	Identificación de cepas bacterianas por el sistema API-20E para enterobacterias	39

Abreviaturas

Ac	Anticuerpos
ADH	Arginina dehidrolasa
Ag	Antígeno
APA	Agua peptonada alcalina pH 9
ARA	Arabinosa
BAB	Base de agar sangre
CIT	Citrato de Simmons
CN	Caldo nutritivo
CT	Toxina colérica
LIA	Medio de lisina, hierro
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELISA.....	Inmunoensayo enzimático
FDA	Food and Drug Administration
GEL	Licuefacción de gelatina
GLU	Glucosa
HA	Hemaglutinación
H ₂ S	Acido Sulhídrico
IND	Indol
INDRE.....	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INO	Inositol
LIA	Lisina descarboxilasa
LNSP.....	Laboratorios Nacionales de Salud Pública
MAN	Manosa
MEL	Melobiosa

MIO	Medio de movilidad, indol y ornitina
NF	Nefelómetro de Mac Farland
ODC	Ornitina descarboxilasa
RHA	Ramnosa
SAC	Sacarosa
SLT	Toxina semejante a Shiga
SOR	Sorbitol
TCBS.....	Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa
T_1N_0	Agar triptona
T_1N_1	Agar triptona con 1 % de NaCl
T_1N_3	Agar triptona con 3 % de NaCl
TSI	Agar de triple azúcar-hierro
UFC	Unidades formadoras de colonias
URE	Urea
VERO.....	Células de riñón de mono verde africano
VP	Voges Proskauer

Glosario

- Aglutinación.-** Las reacciones de aglutinación consisten en la agregación de partículas tales como células o material sintético por anticuerpos llamados aglutininas
- Antibiótico.-** Sustancia química elaborada por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y puede eventualmente destruirlos.
- Anticuerpo.-** Es una molécula elaborada por animales en respuesta a un antígeno. El anticuerpo tiene la propiedad particular de combinarse específicamente con el antígeno el cual indujo su formación.
- Antígeno.-** Es una molécula que induce la formación de anticuerpos
- Diarrea.-** Aumento en la frecuencia de las evacuaciones, que se acompaña de un incremento en el contenido de agua en las heces.
- Gene.-** Unidad básica de la herencia. Secuencia de DNA que codifica para una proteína específica.
- Hemolisina.-** Proteína capaz de producir lisis de globulos rojos
- Toxina.-** Sustancia de origen microbiano que da lugar a cuadros clínicos bien definidos, sea en ausencia del microorganismo

Resumen

Se comparó el grado de recuperación de *Vibrio cholerae* de ostiones por el método del INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) comparando la técnica que siguen los laboratorios Nacionales de Salud Pública (LNSP) y el método de la FDA (Food and Drug Administration).

Las muestras de ostiones se inocularon con *Vibrio cholerae* O1 Inaba y se procesaron por el método del INDRE (doble enriquecimiento en APA) y por los métodos que siguen la FDA y LNSP (diluciones seriadas en APA a 37°C y 42°C)

Los resultados obtenidos en las tres técnicas son similares siendo la técnica del INDRE la más sencilla de realizarse.

Para las técnicas del FDA y LNSP se observa mejor crecimiento a 37°C que a 42°C además la recuperación de *Vibrio cholerae* es mejor a las 24 h que a las 6h

En la técnica de doble enriquecimiento del INDRE la recuperación es mejor a las 6 h.

Al mismo tiempo se procesaron 1041 muestras de pescados y mariscos por el método del INDRE (doble enriquecimiento en APA) de una central de abasto de la Ciudad de México.

Se aislaron uno o más microorganismos por muestra. A las 18 h de incubación se aisló 1 (0.1 %) de *V. cholerae* O1 Inaba, 129(13%) *V. cholerae* No O1, 155(15.7%) *Vibrios spp* , 691(70%) enterobacterias. 858 microorganismos se aislaron a las 6 h (segundo enriquecimiento); 1(0.1%) correspondió a *V. cholerae* O1 Inaba, 185 a (21.56%) a *V. cholerae* No O1, 122(14.21%) *Vibrio spp* , 536(62.4%) enterobacterias.

Se concluye que el doble enriquecimiento en APA pH 9 permite mayor recuperación de *V. cholerae* de alimentos y disminuye la concentración de bacterias contaminantes.

I. Introducción

El cólera ha sido endémico en la India por siglos, pero se han registrado epidemias devastadoras en otras partes del mundo de forma esporádica. A partir del brote de cólera que se inició en México en el mes de junio de 1991, se está considerando la necesidad de vigilar el agua y los alimentos como vehículo de transmisión de la enfermedad.

Varios alimentos han estado asociados con el cólera, incluyendo ostras, cangrejos de mar y langostinos en los EEUU (7), mejillones, almejas y pescado seco en las Filipinas y el Pacífico Sur (11).

La colaboración interinstitucional, el adiestramiento y la confirmación llevada a cabo por el Laboratorio de Bacteriología Entérica del INDRE ha permitido detectar oportunamente los casos, identificar portadores y establecer cercos sanitarios que impidan la diseminación de la bacteria pero se necesita impulsar más ampliamente la búsqueda de *Vibrio cholerae* O1 en muestras ambientales ya que la diseminación ambiental es ahora más frecuente y existe la probabilidad de que se contaminen pescados y mariscos (21).

1.1. Antecedentes.

Las enfermedades que son transmitidas por alimentos son causadas por microorganismos, toxinas microbianas y agentes químicos que contaminan los alimentos.

Los Centros para el Control de Enfermedades Infecciosas (CDC) en Atlanta EE UU estiman que anualmente ocurren en ese país 9 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos. En México (de 1986 a 1990) la causa más frecuente fue la bacteriana (53.2%).

La OMS ha informado que ciertos brotes de cólera pudieran presentarse como resultado de la importación de alimentos (24).

Vibrio cholerae puede sobrevivir largos periodos en congelación. Los peces que viven en las profundidades del mar no se infectan dentro de su propio habitat pero pueden

llegar a contaminarse durante su pesca y manipulación (6).

Cuando *Vibrio cholerae* infecta el tracto intestinal humano, puede causar la enfermedad del cólera y grandes cantidades de *Vibrio cholerae* son descargadas en las heces de éstos individuos. El tratamiento inadecuado de los desechos permiten la contaminación de los sistemas de aguas y generalmente las pandemias de cólera ocurren en áreas del mundo que tienen prácticas sanitarias pobres (1).

En las grandes epidemias que han ocurrido durante el último siglo, el agua contaminada ha sido indudablemente el vehículo principal de transmisión, jugando los alimentos un papel mucho menor pero significativo en la diseminación de la enfermedad. (29).

1.2. Generalidades.

El género *Vibrio* es una bacteria Gram negativa, no esporulada que está clasificada en la familia *Vibrionaceae* junto con otros tres géneros: *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium*. *Vibrio* constituye la mayor parte de la familia *Vibrionaceae*, la especie tipo es: *Vibrio cholerae* de los cuales *Vibrio cholerae* O1 es el agente etiológico del cólera (2).

Los miembros del género *Vibrio* son oxidasa positivo (con excepción de *Vibrio metchnikovii*), móviles, anaerobios facultativos. Los vibrios requieren de sodio o bien su crecimiento es estimulado por NaCl y poseen ambos metabolismos, oxidativo y fermentativo (2, 22).

Las especies de *Vibrio* son habitantes naturales de ambientes acuáticos y pueden producir infecciones gastrointestinales que son adquiridas por la exposición o consumo de alimentos provenientes de ambientes marinos y que han sido contaminados. El aumento en el consumo de alimentos marinos, especialmente los que se consumen crudos, favorece la transmisión de éstos microorganismos en áreas muy alejadas del océano, hasta sitios en donde se distribuye para su consumo (2, 6).

De manera característica los *Vibrio* crecen a un pH muy elevado (8.5 a 9.5) y los destruye rápidamente la acidez. *Vibrio cholerae* produce colonias convexas, lisas y re-

dondas que son opacas y granuladas; fermenta con regularidad la sacarosa y la manosa, pero no la arabinosa. En la prueba de rojo de cólera se combinan dos características metabólicas, la producción de indol y la reducción de nitrato a nitritos, cuando se desarrolla en un medio de peptona que contiene cantidades suficientes de triptosa y nitrato. La prueba positiva en el laboratorio se observa después de incubar una noche y al añadir ácido sulfúrico se desarrolla un color rojo (reacción del nitrosoindol, "prueba roja de cólera" positiva). La glucosa inhibe ésta reacción (15).

1.3. Importancia.

En la familia *Vibrionaceae* existen más de 30 especies de *Vibrio* que son reconocidas comúnmente y de ellas 12 son conocidas como patógenos humanos. Tabla 1.

Tabla 1. Especies del género *Vibrio* aisladas de muestras humanas

<i>Vibrio cholerae</i> O1	<i>Vibrio furnisii</i>
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	<i>Vibrio hollisae</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>
<i>Vibrio carchariae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Vibrio damsela</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Vibrio fluvialis</i>	

Dentro de éstas doce especies sólo *Vibrio cholerae* y *Vibrio mimicus* no requieren NaCl para su desarrollo Tabla 2, las otras diez especies necesitan la presencia de NaCl para su desarrollo por lo cual son conocidos como *Vibrios* halofílicos (2).

La importancia que tienen éstas especies de *Vibrio* se debe a las enfermedades que produce en humanos que son: gastroenteritis, infecciones en heridas, oídos y septicemias

Tabla 2. Características del crecimiento en NaCl de *Vibrio* spp patógenos para el humano

Especies de <i>Vibrio</i>	Crecimiento en NaCl		
	0%	6%	8%
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+/-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	+
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	-	+	-
<i>Vibrio damsela</i>	-	+	+
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	+	+/-
<i>Vibrio furnisii</i>	-	+	+/-
<i>Vibrio hollisae</i>	-	+	-
<i>Vibrio metschnikovii</i>	+/-	+	+/-
<i>Vibrio mimicus</i>	+	+/-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	+	-

+: positivo

-: negativo

+/-: La mayoría de las cepas positivas

Tomado de Giono y col., 1991 (6)

Tabla 3. Asociación de *Vibrio* spp con diferentes síndromes clínicos

Especies	Gastroenteritis	Infección en heridas	Infección en oídos	Septicemia	
				1a.	2a.
<i>Vibrio cholerae</i> O1	+++	+			
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	+++	++	+	+	+
<i>Vibrio mimicus</i>	++		+		
<i>Vibrio fluvialis</i>	++	+	+/-		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>				+	
<i>Vibrio hollisae</i>	++			+	
<i>Vibrio vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>Vibrio furnisii</i>	(+)				
<i>Vibrio damsela</i>		++			
<i>Vibrio metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>Vibrio carchariae</i>		+			

+++ : más frecuentemente reportado

++ : poco común (6 - 100 reportes)

+ : raro (1 - 5 reportes)

(+) : asociado con

Tomado de Giono y col., 1991 (2)

(2). Tabla 3.

4. Estructura antigénica y clasificación serológica.

Los *Vibrios* de diferentes especies comparten un antígeno flagelar (H) termolábil único, que probablemente no participa en la protección mediada por anticuerpos.

Vibrio cholerae contiene en su pared celular lipopolisacáridos O que le confieren especificidad serológica, se conocen más de 100 grupos antigénicos O. Las cepas de *Vibrio cholerae* del grupo O número 1 son las que producen el cólera clásico. En ocasiones *Vibrio cholerae* que no pertenece al O1 puede producir una enfermedad del tipo del cólera. En marzo de 1993, se reportaron brotes de enfermedad diarreica similar al cólera en el sur de Asia, donde se aisló un serotipo de *Vibrio cholerae* designado O139, que tiene la capacidad de producir una toxina indiferenciable de la toxina que causa el cólera producida por *Vibrio cholerae* O1 (16).

El antígeno del grupo O1 tiene tres determinantes serológicas que se encuentran en combinaciones de dos antígenos A y B y se denominan serotipos Inaba, Ogawa e Hikojima éste último como de transición entre los dos primeros serotipos. Tabla 4.

Tabla 4. Serotipos de *Vibrio cholerae* , serogrupo O1

Serotipo	Antígeno O	Aglutinación con antiseros absorbidos	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima	A, B, C	+	+

Tomado de: Kelly y col., 1991. (4)

Vibrio cholerae O1 también se divide en dos biotipos o biovares: Clásico y El Tor que se distinguen basándose en pruebas de laboratorio (18). Tabla 5.

Se sugiere que el biotipo El Tor se adapta mejor al ambiente y compite con las cepas del biotipo Clásico aunque ambas cepas pueden coexistir en una zona geográfica como sucede en el delta del Ganges. La cepa epidémica que ocasionó en América el problema desde enero de 1991 en Perú está bien caracterizada en base a su género, especie, biotipo, resistencia a antibióticos, fagotipificación y serología. El genotipo está basado en ensayos específicos para antígenos, enzimas, toxinas y otros productos de los genes. (34)

Tabla 5. Diferenciación de los biotipos de *Vibrio cholerae* O1

Prueba	Biotipo	
	Clásico	El Tor
Voges-Proskauer	-	+
Agglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Hemólisis de eritrocitos de carnero	-	+

La identificación bioquímica de enterobacterias y otros Gram negativos se puede hacer con metodología tradicional utilizando medios TSI, LIA, MIO, caldo peptonado y caldo arginina más la prueba de oxidasa o realizarla mediante el micrométodo API 20E, el cual es un equipo comercial Analytab® que contiene 20 pruebas diferenciales, que hasta ahora se ha utilizado más para el estudio de la familia *Enterobacteriaceae* y ha sido poco estudiada en lo referente a su utilidad para la identificación de la familia *Vibrionaceae*. Sin embargo Overman y Kessler en 1987 demostraron que API 20E es efectivo en el 100 % para la identificación de *Vibrios* spp y en cuanto al género *Aeromonas* fué detectable la *Aeromonas hydrophila*, no así la *Aeromonas caviae* ni la *Aeromonas sobria* (26).

En estudios que se realizaron para la identificación de miembros de la familia *Vibrionaceae* se ha comprobado que el sistema API 20E es más efectivo en comparación con API Rapid NFT, el cual se utiliza principalmente para organismos no fermentadores

como *Pseudomonas* spp y con el API Rapid E, el más inespecífico de los tres para la identificación del género *Vibrio* (26).

1.5. Significado clínico.

Las especies de *Vibrio* son reconocidas ampliamente por su papel en las infecciones intestinales humanas por lo general son gastroenteritis o intoxicaciones alimentarias y en las diarreas graves causadas por *Vibrio cholerae* O1 conocida comúnmente como cólera y por *Vibrio parahaemolyticus* muy común en Japón y en países en donde por cultura o tradición se consumen mariscos crudos aunque son importantes mundialmente; también causan infecciones extraintestinales que varían desde simples infecciones en heridas hasta septicemias letales (2, 20).

6. Mecanismo de patogenicidad.

Vibrio cholerae O1 produce una potente enterotoxina (CT) que se encuentra relacionada directamente con la patogénesis del cólera, es termolábil con peso molecular de cerca de 80 000 Da que está constituida por 2 subunidades A (PM 28 000 Da) y 5 subunidades B (10 000 Da). El gangliósido GM₁ sirve como receptor de la mucosa para la subunidad B de CT, que favorece la entrada en la célula de la subunidad A que es enzimáticamente activa y tiene dos subunidades A1 y A2 (18 ,29, 35).

La subunidad A, estimula indirectamente la adenilato ciclasa la cual incrementa los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc), provocando la alteración del transporte de electrolitos a través de la membrana celular del enterocito, dando por resultado una hipersecreción prolongada de agua y electrolitos hacia la luz intestinal (44), a veces de hasta 20 litros al día, lo que produce deshidratación grave rápida acompañada de choque, acidosis y muerte (19). Los genes que codifican para las subunidades A y B son designados *ctx A* y *ctx B* , respectivamente y se expresan como una sola unidad transcripcional (36).

La detección de la toxina colérica se realiza en modelos animales (in vivo) o bien en cultivos celulares (in vitro) (18); se pueden efectuar además ensayos inmunológicos como ELISA (25) y técnicas de biología molecular que ayudan a identificar a los genes

asociados a la producción de la toxina mediante el uso de sondas *ctxA* y *ctxB* y la reacción de polimerización en cadena (PCR) en las que generalmente se utiliza cultivo puro, contenido gástrico o materia fecal e iniciadores relacionados con el gene *ctxA* y *ctxB* (13).

Vibrio cholerae O1 El Tor producen hemolisinas solubles pero la cepa americana es negativa a la hemólisis. Otros lisan los eritrocitos pero sin liberar una hemolisina soluble (20).

1.7. Tratamiento.

El tratamiento de cólera depende de la gravedad con la que haya evolucionado en el hospedero pero debe atenderse de inmediato mediante la restitución del agua y los electrolitos que se han perdido para corregir la deshidratación grave y la deficiencia de sal, la elección suele ser terapia por vía oral si el individuo está consciente y no vomita demasiado.

Los antimicrobianos no se usan de rutina para tratar la enfermedad diarreica ya que no son efectivos (28). La mayoría de los agentes infecciosos que causan diarrea no requieren de tratamiento antimicrobiano(43) y se utiliza en casos especiales con diarrea mucosanguinolenta o en pacientes con cólera (41).

La Organización Mundial de la Salud recomienda que los pacientes con síntomas típicos de cólera sean tratados inmediatamente con tetraciclina, doxiciclina u otro antibiótico de elección, esta acción terapéutica inmediata tiene como objeto interrumpir cuanto antes la cadena de transmisión, acortar el volumen y la duración de la diarrea, facilita la hidratación y reduce el período de excreción de *Vibrio cholerae* O1 (34).

Las tetraciclinas administradas por vía bucal tienden a reducir las evacuaciones en caso de cólera y acorta el periodo de excreción de *Vibrio*, ya que la cepa causante de cólera en América es sensible a éstos antibióticos, cuando llega a haber resistencia de *Vibrio cholerae* a la tetraciclina ésta se encuentra en plásmidos transmisibles) (34).

En los niños menores de 5 años y en mujeres embarazadas se recomienda succinato de eritromicina o trimetoprim-sulfametoxazol (29).

8. Epidemiología.

En el siglo XIX y principios del siglo XX hubo varias epidemias mundiales (pandemias) de cólera. El biotipo clásico predominaba hasta los primeros años de la década de 1960; el biotipo El Tor, descubierto en 1905, se volvió muy común a fines de la década de 1960 y desplazó al biovar clásico y el trastorno de manera pandémica observado en Asia, Oriente Medio y Africa se atribuye al biovar El Tor. La enfermedad ha sido rara en América del Norte desde mediados del siglo XIX, pero puede existir un foco endémico autóctono en la costa del Golfo de Louisiana y Texas (28).

El cólera es endémico en India y Asia Sudoriental. En muchos casos desarrollan la enfermedad sólo 1 a 5 % de las personas sensibles expuestas. Es poco común que el estado portador dure más de 3-4 semanas y en este periodo se sigue eliminando *Vibrio* en la materia fecal (21).

A partir de la introducción de *Vibrio cholerae* O1 en América Latina en 1991, este agente ha ocasionado epidemias en varios países de la región incluyendo México (21).

El biotipo El Tor es el único que está presente en América y es menos virulento que el Clásico, pero su resistencia al medio ambiente es mayor (34).

Al principio de la epidemia el único serotipo circulante en México era el Inaba y para septiembre de 1993 el que más circuló fué el serotipo Ogawa. En nuestro medio las tasas más altas se observaron en mayores de 65 años (21).

En marzo de 1993 aparecieron informes de brotes de diarrea semejante a cólera en 2 países del sur de Asia en los que se mostró a *Vibrio cholerae* No O1 como productor de toxina CT y que corresponden al serotipo O139. Hasta el momento no se ha reportado su presencia en el Continente Americano (5, 6).

9. Ecología y mecanismo de transmisión.

Hasta principios de los años 80's se creyó que *Vibrio cholerae* estaba altamente adaptado al hospedero y era incapaz de sobrevivir unas cuantas horas o días fuera del

intestino humano.

La evidencia acumulada en la década pasada muestra que *Vibrio cholerae* es un habitante autóctono del agua de drenaje y sistemas estuarinos.

Las cepas de *Vibrio cholerae* no necesariamente mueren cuando se descargan a ambientes acuáticos, sino que en su lugar permanecen viables y son capaces de transformarse en un estado cultivable si las condiciones ambientales otra vez llegan a ser favorables (28).

Las formas de latencia, viable pero no cultivable cuando se inoculan en asas ileales de conejo y voluntarios humanos, las formas no cultivables de *Vibrio cholerae* O1 causan la acumulación de una gran cantidad de fluidos y diarrea, respectivamente (34).

Las dificultades para aislar *Vibrio cholerae* O1 del ambiente acuático puede deberse al hecho de que los métodos de aislamiento fueron desarrollados para muestras clínicas que contienen gran cantidad de bacterias creciendo activamente y tales métodos no trabajan para muestras ambientales que probablemente contienen células expuestas y adaptadas a una variedad de condiciones ambientales incluyendo baja concentración de nutrientes, pH en el intervalo de 7 a 8 (agua de mar), temperatura y pH fluctuante, variaciones en la tensión de oxígeno, exposición a UV via luz solar.

El cólera puede transmitirse vía agua, agua de drenaje y alimentos, pero cuando las cepas de *Vibrio cholerae* son suspendidas en agua fresca o salina con el tiempo muestran una disminución constante pero la sobrevivencia es aumentada en aguas salinas ya que presentan un requerimiento absoluto de Na^+ para crecer (34).

Vibrio cholerae O1 posee la capacidad para entrar en un estado de latencia como respuesta a la privación de nutrientes, salinidad elevada y/o temperatura reducida. La exposición a condiciones bajas de nutrientes ha sido reconocida recientemente como un estímulo importante para entrar al estado viable pero no cultivable que representa una estrategia común para sobrevivir entre las bacterias en ambientes pobres de nutrientes.

Los aislamientos más frecuentes en los meses de verano pueden ser a causa de concentraciones más elevadas de células cultivables, observándose una correlación lineal con la salinidad, mayor frecuencia de aislamientos en sitios con salinidades entre 0.2 y

2.0%. El efecto de la temperatura se correlacionó fuertemente con la frecuencia de aislamientos cuando la temperatura del agua era mayor a los 17°C. Las condiciones constantemente cambiantes en los estuarios sugieren una asociación de la capacidad de *Vibrio cholerae* para adaptarse a un rango de salinidades y temperaturas con el hecho de que su habitat ecológico natural es el agua ribereña y estuarina (34).

Es difícil determinar si el alimento o el agua es el vehículo de transmisión de *Vibrio cholerae*, algunos reportes indican que ambos están involucrados o que el agua era el vehículo primario y por consiguiente el alimento un vehículo secundario.

Los reportes que involucran alimentos como vehículos de transmisión de *Vibrio cholerae* son los alimentos casi neutros en pH, ya que *Vibrio cholerae* no tolera las condiciones ácidas. Se ha mostrado también que *Vibrio cholerae* sobrevive a la refrigeración y congelamiento siendo ésta una forma en que pueden distribirse lejos de su origen (8).

Uno de los tipos de alimentos mencionados como vehículo de transmisión son los moluscos. El primer reporte de mariscos como vehículos de transmisión resultó de un brote en Malasia en 1969, las ostras fueron implicadas nuevamente en Italia en 1973 y en 1974 los caracoles crudos en Portugal. El consumo de ostiones crudos contaminados en Texas se presume fue la causa de un caso de cólera en 1973 y en 1977 ostiones crudos se implicaron de nuevo en un solo caso en Alabama. Se identificó al biotipo El Tor de *Vibrio cholerae* O1 en todos los brotes anteriores. Las investigaciones han demostrado que los mariscos están contaminados con *Vibrio cholerae* O1 toxigénico en el ambiente en el cual crecen donde la cepa toxigénica del organismo ha llegado a ser endémica o bien el ambiente ha sido contaminado recientemente con agua del drenaje. Ya que los mariscos, moluscos, ostiones, almejas y ostras son consumidos o con mínimo tratamiento han resultado enfermedades esporádicas.

La mayoría de los reportes de cólera por consumo de mariscos se han obtenido durante los meses más cálidos (5, 29, 34).

II. Justificación.

Está comprobado que el agua peptonada alcalina pH 9.0 (APA) es un excelente medio de enriquecimiento para el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* No O1 a partir de materia fecal y de alimentos sobre todo pescados y mariscos o agua contaminada.

El INDRE desde 1991 esta empleando un procedimiento que es el más factible de ser realizado por los laboratorios estatales a diferencia del método validado que sugiere la FDA que consiste en preparar homogenizado del pescado en licuadora y hacer suspensión del macerado en APA realizando dos series de diluciones

La única forma de verificar si el método del INDRE es efectivo es a través de una validación en la que simultáneamente se realicen ambos métodos para verificar la sensibilidad y especificidad del método del INDRE para el aislamiento de *Vibrio cholerae* en muestras de ostiones inoculados artificialmente.

III. Hipótesis.

El método del INDRE es tan efectivo como el método de la FDA y el método los LNSP para la recuperación de *Vibrio cholerae* O1 de mariscos.

IV. Objetivo general

Validar el método del INDRE y compararlo con el método del FDA para la recuperación de *Vibrio cholerae* O1 a partir de ostiones inoculados artificialmente con *Vibrio cholerae* O1 de referencia, así como la búsqueda de *Vibrio cholerae* O1 en muestras de pescados, mariscos y ostiones.

4.1. Objetivos particulares

1. Evaluar la sensibilidad del método del INDRE comparado con los métodos de la FDA y los LNSP para la recuperación de *Vibrio cholerae* O1 a partir de ostión inoculado artificialmente .

2. Aislar *Vibrio cholerae* a partir de muestras de pescados y mariscos para consumo humano (obtenidos de una Central de Abasto de la Ciudad de México) mediante el método de doble pase de enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina (APA) pH 9.0 utilizado por el INDRE y determinar el o los serotipos de *Vibrio cholerae* aislados.

3. Aislar e identificar *Vibrio cholerae* No O1 y otras especies predominantes de *Vibrio* spp (halofílicos) a partir de muestras de pescados y mariscos y determinar la presencia de otros géneros de la familia *Vibrionaceae* : *Aeromonas* y *Plesiomonas* .

4. Identificar las diferentes especies de *Vibrio* por pruebas bioquímicas convencionales utilizadas de rutina en el INDRE o por el sistema API 20 E para enterobacterias.

V. Material

Botes de boca ancha de 1000 ml de capacidad con tapa de rosca.

Licuada y vasos de licuadora estériles.

Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0.2 g de sensibilidad.

Incubadoras de 35-37°C y 42°C +/- 0.2°C.

Pipetas estériles de 1 ml, con graduación de 0.01 ml.

Pipetas estériles de 5 ml, con graduación de 0.1 ml.

Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de cromel o platino.

Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro desechables.

Micropipetas.

Tijeras y pinzas estériles.

Lámpara (para observar reacciones serológicas).

Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm.

Portaobjetos.

Aplicadores de madera estériles.

Papel aluminio.

Gasa.

Benzal.

5.1. Medios de cultivo.

Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS). Bioxon^R
Agar Triptona Sal, T₁N₁, T₁N₃ y T₁ Bioxon^R
Agua Peptonada Alcalina (APA) pH 9. Bioxon^R
Base de Agar Saagre (BAB). Bioxon^R
Caldo Muller-Hinton. Bioxon^R
Caldo Nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl (0%, 1%, 3%, 6%, 8%,
y 10%). Bioxon^R

5.2. Pruebas bioquímicas diferenciales

Caldo Arginina en medio base Møller. Dibco^R
Caldo Peptonado pH 7. Bioxon^R
Medio Triple Azúcar Hierro (TSI). Bioxon^R
Medio Lisina Hierro (LIA). Bioxon^R
Medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO). Bioxon^R
Tiras de sistema miniaturizado API 20E Analytab^R

5.3. Reactivos.

Tiras reactivas y discos para prueba de oxidasa.

N, N, N', N' - tetrametil p-fenilendiamina

Desoxicolato de sodio al 0.5%

Reactivo de Erlich, para producción de indol

Cloruro férrico al 10%.

Hidroxido de potasio (KOH) al 40%.

Alfa-naftol al 40%.

Solución Salina 0.85%.

VI. Material biológico

6.1. Muestras:

A: 3 muestras de ostiones desconchados recolectados en la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz

B: 1041 muestras de pescados y mariscos provenientes de una central de abasto de la Ciudad de México

6.2. Cepa de referencia:

- *Vibrio cholerae* O1 Inaba C-6707 Latin American Seed de referencia obtenido de los Laboratorios Nacionales de Salud Pública de México.

6.3. Testigos negativos:

Muestras de ostión sin inocular con *Vibrio cholerae* de referencia en agua peptonada alcalina pH 9.0 APA (dilución 1:10) por cada una de las técnicas y temperaturas de trabajo.

6.4. Antisueros somáticos:

Polivalente O1

Monovalente Inaba

Monovalente Ogawa

Los sueros son producidos en el INDRE

VII. Metodología

7.1. Toma de muestra.

1. Se tomaron 1 500 g de ostión desconchado
2. Las muestras se depositaron en bolsas perfectamente selladas.
3. Se etiquetaron con: a) Lugar de origen de la toma, b) Muestra, c) Fecha de recolección
4. La transportación se realizó en baño de hielo en una hielera

7.2. Preparación del inóculo.

Un cultivo joven de 13- 24 h de la cepa C-6707 de *Vibrio cholerae* O1 incubado a 37 °C en caldo nutritivo(CN), éste cultivo se ajustó a la misma turbiedad del tubo # 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (15) (inóculo A) y a partir de él se hicieron diluciones 1:20 (inóculo B) y 1:100 (inóculo C). En la tabla 6 se muestran las UFC/ml para cada uno de los inóculos.

7.3. Preparación de la muestra.

Las muestras de ostión se inocularon con 0.1 ml de un cultivo de *Vibrio cholerae* O1 de referencia (C-6707) ajustado al tubo #0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (inóculo A), diluciones 1:20 (inóculo B) y 1:100 (inóculo C) y se analizaron por los 3 diferentes métodos.

Las muestras se procesaron simultáneamente y por triplicado, empleando los 3 diferentes métodos.

TESIS

COMPLETA

Tabla 6. UFC/ml en las diluciones iniciales

Dilución	UFC/ml
# 0.5 del NF	150×10^6 bacterias/ ml
1:20 del # 0.5 del NF	7.5×10^6 bacterias/ ml
1:100 del # 0.5 del NF	1.5×10^6 bacterias/ ml

NF = Nefelómetro de Mac Farland

UFC/ml = Unidades formadoras de colonias por mililitro

7.4. Método del I.N.D.R.E. (doble enriquecimiento) (3, 5, 18)

a) Se pesaron 50 g de ostiones (con todo y líquido) y se cortó en trozos pequeños con las tijeras estériles.

b) Posteriormente se adicionó 0.1 ml de cultivo de 24 h de *Vibrio cholerae* O1 en caldo nutritivo ajustado al tubo #0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (150×10^6 unidades formadoras de colonias/ml).

c) Los ostiones se depositaron, ya inoculados, en 450 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) pH 9. Tabla 7

d) El APA se incubó durante 18 h a 37 °C

e) Transcurrido el tiempo de incubación se tomó de la superficie con un hisopo y se depositó en una placa de agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS), sembrando por estría cruzada e incubando 18-24 h a 37 °C; el hisopo se transfirió a un tubo que contenía 10 ml de APA pH 9 y se incubó a 37 °C durante 6 h.

f) Después de incubada el APA se depositaron 3 asadas en la placa de TCBS, tomando con un asa calibrada de la superficie del APA, la siembra fué por estría cruzada.

g) Se incubó la placa de TCBS 18-24 h a 37 °C.

h) Las colonias típicas de *Vibrio cholerae* se seleccionaron en TCBS (colonias amarillas, planas con bordes lisos).

i) Como parte de la confirmación de cepas de *Vibrio cholerae* se inocularon 30 colonias en agar triptona con 1%, 3% y 6% de NaCl utilizando una cuadrícula para organizar las colonias. Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

j) Se registró el número de cepas que se desarrollaron en las tres concentraciones de NaCl.

k) La prueba de oxidasa se realizó a las cepas que se desarrollaron en las tres concentraciones de NaCl (la prueba solamente se realizó a una de las placas).

l) Los cultivos sospechosos a *Vibrio cholerae*: se eligieron de acuerdo a: 1) Crecimiento en las diferentes concentraciones de NaCl y 2) Prueba de oxidasa positiva.

m) Los cultivos sospechosos a *Vibrio cholerae* se aglutinaron con suero polivalente.

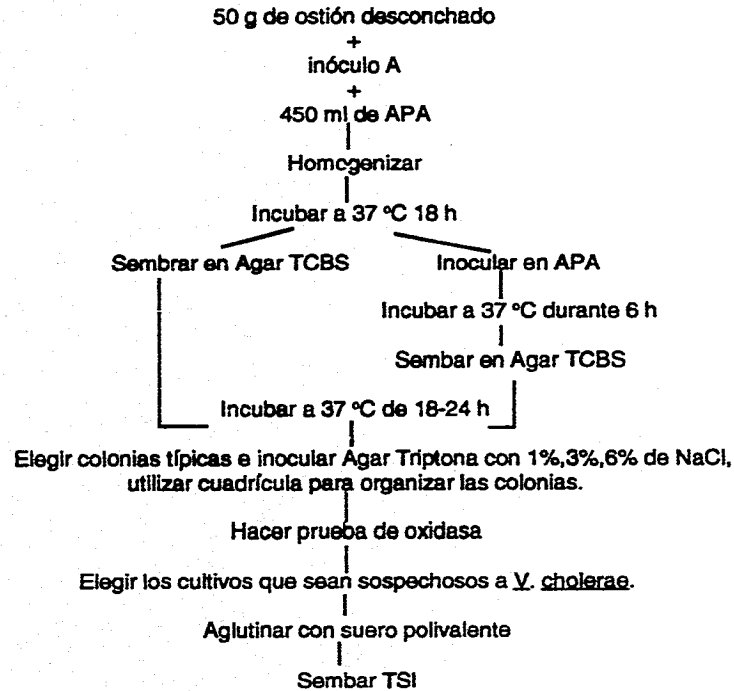
Tabla 7. UFC/ml/g de ostión en la técnica del INDRE

Dilución del inóculo	Cantidad inoculada (ml)	Dilución de la muestra	UFC/ml*
# 0.5 NF	0.1 ml	10^{-1}	3.0×10^4
1:20 del # 0.5 del NF	0.1 ml	10^{-1}	1.5×10^3
1:100 del # 0.5 del NF	0.1 ml	10^{-1}	3.0×10^2

* En los 500 ml de APA

NF = Nefelómetro de Mac Farland

Figura 1. Método Modificado del I.N.D.R.E.



Nota: Realizar lo anterior para los inóculos B y C.

n) Se inocularon en TSI 10 cultivos positivos a *Vibrio cholerae* para conformar que se trataba de dicho microorganismo.

o) El mismo procedimiento se realizó para cada uno de los ensayos con inóculos diluidos 1:20 y 1:100. Figura 1.

7.5. Método del Food and Drug Administration (F.D.A) (9, 12)

a) Se pesaron 50 g de ostiones (con todo y líquido).

b) Se adicionó 0.1 ml de cultivo de 24 h de *Vibrio cholerae* en caldo nutritivo ajustado al tubo #0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.

c) Los ostiones se depositaron, ya inoculados, en 450 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) pH 9 y se homogenizaron a 8 000 rpm de 1-2 min (dilución 10^{-1}).

d) Las diluciones se realizaron por duplicado de 10^{-2} a 10^{-6} en APA pH 9 (se tomó 1 ml del homogenizado y fué depositado en 9 ml de APA pH 9), se homogenizó (dilución 10^{-2}), el mismo procedimiento se repitió hasta la dilución 10^{-6} Tabla 8.

e) Una serie de diluciones (10^{-1} a 10^{-6}) se incubó a 37 °C de 6-8 h, la otra serie de diluciones se incubaron a 42 °C de 6-8 h.

f) Transcurrido el tiempo de incubación cada dilución fué sembrada en agar TCBS, depositando tres asadas de 10 µl en la placa de agar, se tomó con un asa calibrada de la superficie del APA y se sembró por estría cruzada.

g) Las placas de TCBS se incubaron 18-24 h a 37 °C.

h) Las series de diluciones fueron incubadas durante 18 h más a su respectiva temperatura.

i) Cada dilución se sembró en agar TCBS, una vez transcurrido el tiempo de incubación, depositando tres asadas (de la superficie del APA) en la placa de agar (utilizar asa calibrada), se sembró por estría cruzada.

j) La placa de TCBS se incubó 18-24 h a 37 °C.

k) 30 colonias de cada dilución se sembraron en agar triptona con 1%, 3%, 6% de NaCl utilizando una cuadrícula para organizar las colonias. Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

l) Se registró el número de cepas que se desarrollaron en las diferentes concentra-

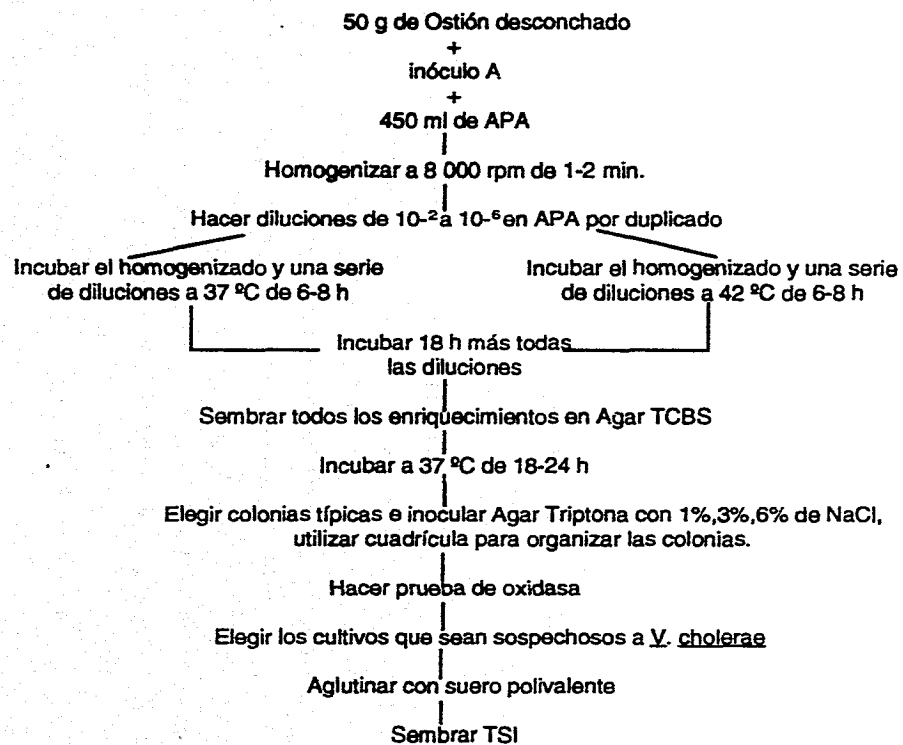
Tabla 8. UFC/ ml/g de ostión en la técnica de la FDA

Dilución del inóculo	Cantidad inoculada (ml)	Dilución de la muestra	UFC/ml*
# 0.5 NF	0.1 ml	10^{-1}	3.0×10^4
		10^{-2}	3.0×10^3
		10^{-3}	3.0×10^2
		10^{-4}	30.0
		10^{-5}	3
		10^{-6}	$p < 0.3$
1:20 del # 0.5 del NF	0.1 ml	10^{-1}	1.5×10^3
		10^{-2}	1.5×10^2
		10^{-3}	15
		10^{-4}	$p < 1.5$
		10^{-5}	$p < 0.15$
		10^{-6}	$p < 0.015$
1:100 del # 0.5 del NF	0.1 ml	10^{-1}	3.0×10^2
		10^{-2}	30
		10^{-3}	3
		10^{-4}	$p < 0.3$
		10^{-5}	$p < 0.03$
		10^{-6}	$p < 0.003$

* En los 500 ml de APA

NF = Nefelómetro de Mac Farland

Figura 2. Método Modificado de la F.D.A.



Nota: Realizar lo anterior para los Inóculos B y C.

ciones de NaCl.

m) La prueba de oxidasa se realizó a las cepas que se desarrollaron en las tres concentraciones de NaCl (la prueba solamente se realizó a una de las placas).

n) Los cultivos sospechosos a *Vibrio cholerae* se eligieron según los siguientes parámetros:

1) Crecimiento en las tres concentraciones de NaCl y

2) Prueba de oxidasa positiva.

o) Se aglutinaron con suero polivalente los cultivos sospechosos a *Vibrio cholerae*.

p) 10 cultivos positivos a *Vibrio cholerae* se inocularon en TSI para confirmar la cepa.

q) El mismo procedimiento se repitió para cada uno de los ensayos con inóculos diluidos 1:20 y 1:100. Figura 2.

7.6. Método de los Laboratorios Nacionales de Salud Pública (L.N.S.P.) (17, 38, 39).

a) 50 g de ostiones se pesaron con todo y líquido.

b) Se adicionó 0.1 ml de cultivo de 24 h de *Vibrio cholerae* en caldo nutritivo ajustado al tubo #0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.

c) Los ostiones ya inoculados se depositaron en 450 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) pH 9 y se homogenizó a 8 000 rpm de 1-2 min (dilución 10^{-1})

d) Las diluciones se realizaron por duplicado de 10^{-2} a 10^{-3} en APA pH 9 (se tomó 1 ml del homogenizado y se depositó en 9 ml de APA pH 9), se homogenizó (dilución 10^{-2}). 1 ml de esta dilución se depositó en 9 ml de APA pH 9, se homogenizó (dilución 10^{-3}) Tabla 9.

e) Una serie de diluciones (10^{-1} a 10^{-3}) se incubó a 37 °C de 6-8 h, la otra serie de diluciones se incubó a 42 °C de 6-8 h.

f) Transcurrido el tiempo de incubación cada dilución fué sembrada en agar TCBS, depositando tres asadas en la placa de agar, se tomó con un asa calibrada de la superficie del APA y se sembró por estría cruzada.

Tabla 9. UFC/ ml/g de ostión en la técnica de los LNSP

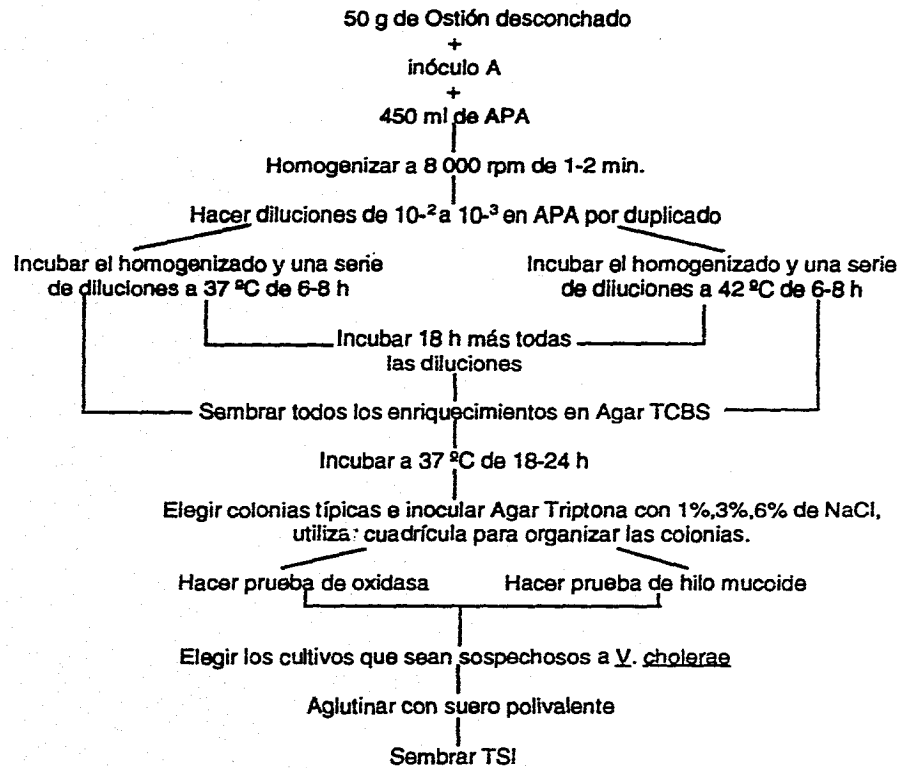
Dilución del inóculo	Cantidad inoculada (ml)	Dilución de la muestra	UFC/ml*
# 0.5 NF	0.1 ml	10 ⁻¹	3.0 x 10 ⁴
		10 ⁻²	3.0 x 10 ³
		10 ⁻³	3.0 x 10 ²
1:20 del # 0.5 del NF	0.1 ml	10 ⁻¹	1.5 x 10 ³
		10 ⁻²	1.5 x 10 ²
		10 ⁻³	15
1:100 del # 0.5 del NF	0.1 ml	10 ⁻¹	3.0 x 10 ²
		10 ⁻²	30
		10 ⁻³	3

* En los 500 ml de APA

NF = Nefelómetro de Mac Farland

- g) Las placas de TCBS se incubaron 18-24 h a 37 °C.
- h) Las series de diluciones se incubaron durante 18 h más a su respectiva temperatura.
- i) Cada dilución fué sembrada en agar TCBS depositando tres asadas (de la superficie del APA) en la placa de agar (se utilizó asa calibrada), se sembró por estría cruzada.
- j) La placa de TCBS se incubó 18-24 h a 37 °C.
- k) 30 colonias de cada dilución fueron sembradas en agar triptona con 1%, 3%, 6% de NaCl utilizando una cuadrícula para organizar las colonias. Se incubó 18-24 h a 37 °C.
- l) Se registraron las cepas que se desarrollaron en las tres concentraciones de NaCl.
- m) La prueba de oxidasa se realizó a las cepas que se desarrollaron en las tres concentraciones de NaCl (realizándose la prueba solamente a una de las placas).
- n) La prueba del hilo mucoso, Figura 4, se realizó a las cepas que se desarrollaron a las tres concentraciones de NaCl (a prueba solamente se realizó a una de las placas).
- ñ) Los cultivos sospechosos a *Vibrio cholerae* se eligieron de acuerdo a:
- 1) Crecimiento en las tres concentraciones de NaCl,
 - 2) Prueba de oxidasa positiva y
 - 3) Prueba del hilo mucoso positiva.
- o) Se aglutinaron con suero polivalente los cultivos sospechosos a *Vibrio cholerae*.
- p) 10 cultivos positivos a *Vibrio cholerae* se inocularon en TSI para descartar la posibilidad de recuperar microorganismos diferentes.
- q) El mismo procedimiento se repitió para cada uno de los ensayos con inóculos diluidos 1:20 y 1:100 Figura 3.

Figura 3. Método Modificado del L.N.S.P.



Nota: Realizar lo anterior para los Inóculos B y C.

7.7. Identificación de *Vibrio cholerae*

7.7.1 Prueba de hilo mucoide

En un portaobjetos colocar una gota de desoxicolato de sodio al 0.5% en solución acuosa, resuspender la cepa de un cultivo joven de 18-24 h proveniente de agar T₁N₁, retirar el asa lentamente de la suspensión. La prueba fué positiva cuando la suspensión perdió inmediatamente su turbiedad y adquirió una consistencia mucoide por la lisis bacteriana causada por el desoxicolato y la liberación del DNA formandose un "hilo mucoso" (17).

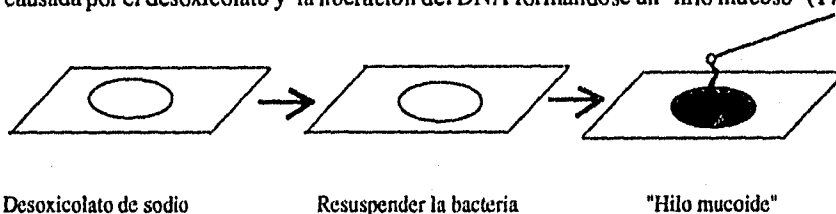


Figura 4. Prueba de hilo mucoide con desoxicolato de sodio en cepas de *Vibrio cholerae*

7.7.2. Prueba de oxidasa

Impregnar un círculo de papel filtro, sobre una placa Petri, con N,N,N',N'-tetrametil p-fenilendiamina al 1% en agua.

Tomar con un palillo de madera estéril o asa de platino un pequeño inóculo de un cultivo fresco de 18-24 h crecido en medio T₁N₁. Esparcir en el papel impregnado. Una coloración azul o púrpura oscuro en un lapso de 10 segundos es indicativo de una prueba positiva (27).

7.7.3. Pruebas bioquímicas en tubo

Las colonias características a *Vibrio cholerae* que se desarrollaron en agar TCBS (amarillas mucoides con bordes lisos) se sembraron en el juego de bioquímicas utilizado de rutina en el INDRE :TSI, LIA, MIO, caldo peptonado en el cual se determina la producción de indol, caldo arginina (al cual se le adicionó vaselina estéril) . También se utilizó agar triptona a diferentes concentraciones de NaCl para confirmar la presencia de *Vibrio cholerae* y descartar la posible recuperación de algún *Vibrio* halofílico o algun otro miembro de la familia *Vibrionaceae*

Las bioquímicas se incubaron a 37°C 18 - 24 h

Tabla 10. Reacciones bioquímicas característica de *Vibrio cholerae*

Bioquímica	Lectura
TSI	K / A o A / A
LIA	K / K o K / N
MIO	+ / + / +
CP	+
Arginina	-

TSI.- agr triple azucar hierro

LIA.- agar de hierro y lisina

MIO.- medio para movilidad indol y ornitina

CP.- caldo peptonado

7.7.4. Serotipificación de *Vibrio cholerae*

De un cultivo joven de 18-24 h de *Vibrio cholerae* (identificado mediante pruebas bioquímicas) se hizo una suspensión en solución salina y se mezcló en un portaobjetos una gota de esta suspensión con una gota de solución salina, con una gota de suero polivalente y una gota de cada uno de los dos sueros monovalentes (Figura 5), se mezclaron perfectamente y se observó si existe o no aglutinación en cada uno de ellos.

La presencia de aglutinación se consideró como prueba positiva.

Cuando se observó que no había aglutinación con ninguno de los sueros la cepa correspondió a un *Vibrio cholerae* No O1. La aglutinación de la cepa con el suero polivalente y con uno de los dos monovalentes indicó que la cepa correspondió serológicamente al suero monovalente con el cual aglutinó. La cepa al aglutinar con el suero polivalente pero no con suero monovalente se reportó como cepa de *Vibrio cholerae* No O1. Cuando se observó aglutinación de la cepa tanto en el suero polivalente como con los sueros monovalentes y con la solución salina se reportó como cepa rugosa.

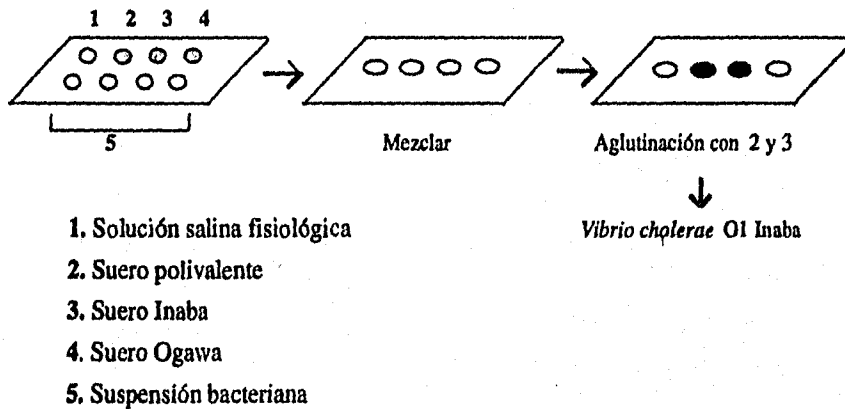


Figura 5. Serología para *Vibrio cholerae*. En el último portaobjetos se observa aglutinación con los sueros polivalente e Inaba con lo que el *Vibrio* aglutinado fue *Vibrio cholerae* O1 Inaba.

7.8. Procesamiento de 1041 muestras de pescados y mariscos por el método del INDRE.

Se procesaron 1041 muestras de pescados y mariscos por el método del INDRE. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico o en botes de 500 ml con tapa de rosca y se transportaron inmediatamente de la Central de Abasto de la Ciudad de México al INDRE siguiendo un calendario de 20 muestras por día.

Las almejas, ostiones u otros moluscos bivalvos se lavaron perfectamente al chorro del agua para eliminar los restos de lodo que pudiesen haber tenido (el agua no entró en contacto con el molusco), se desconcharon con pinzas, cuchillos o tijeras que previamente se había sumergido en benzal concentrado por 30 min. Se pesaron 50 g o 12 piezas del molusco con todo y líquido, el molusco se partió en trozos con las tijeras y se depositó en 450 ml de APA pH 9.0.

Para el procesamiento de pescados se pesaron 50 g principalmente de la porción correspondiente a las agallas y las vísceras, se partieron en trozos y se depositaron en 450 ml de APA pH 9.0.

Los frascos con los 450 ml de APA y la muestra se etiquetaron verificando los datos en la hoja de encuesta correspondiente, se incubaron a 37 °C durante 18 h. Se tomó con hisopo una muestra de la superficie del APA y se inoculó una placa de TCBS y el hisopo se depositó en un tubo conteniendo 10 ml de APA. El tubo se incubó 6 h a 37 °C y se tomó del tubo, con asa estéril y con cuidado 3 asadas de la superficie del APA y se depositaron en otra placa de medio de TCBS.

Las 2 placas de TCBS (por cada muestra) se incubaron a 37 °C durante 18-24 h.

Se estudiaron y seleccionaron todos los tipos de colonias que crecieron en el agar TCBS que fueron sembrados en las siguientes bioquímicas: caldo arginina, caldo peptonado, MIO, TSI, LIA y se sembró en un tubo de medio base de gelosa sangre sin sangre (BAB), al tubo de arginina se le adicionó vaselina estéril. Las bioquímicas se incubaron a 37 °C 18-24 h.

Al término del tiempo de incubación se leyeron las bioquímicas, se realizó la prueba de oxidasa y se identificó el microorganismo existente. Cuando no pudo ser

identificado el microorganismo aislado se utilizó el sistema miniaturizado API 20E.

La especie de *Vibrio* halofílico se determinó sembrando las cepas en caldo nutritivo con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0,1,3,6,8,10%).

Vibrio cholerae O1 se aglutinó con suero *Vibrio cholerae* polivalente O1 y sueros monovalentes Ogawa y Inaba para su identificación serológica.

7.8.1. Identificación bioquímica en tubo

Las cepas que se desarrollaron en agar TCBS se sembraron en el juego de bioquímicas utilizado de rutina en el INDRE :TSI, LIA, MIO, caldo peptonado en el cual se determina la producción de indol, caldo arginina (al cual se le adicionó vaselina estéril) y un tubo con medio base sangre sin sangre (BAB) para conservar las cepas. También se utilizó caldo nutritivo a diferentes concentraciones de NaCl para identificar a los posibles *Vibrios* halofílicos aislados.

Las bioquímicas se incubaron a 37°C 18 - 24 h

7.8.2. Identificación por sistema API 20 E

1. La cepa del microorganismo a identificar se sembró en placa de BAB y se incubó 18-24 h a 37 °C.

2. Se realizó prueba de oxidasa

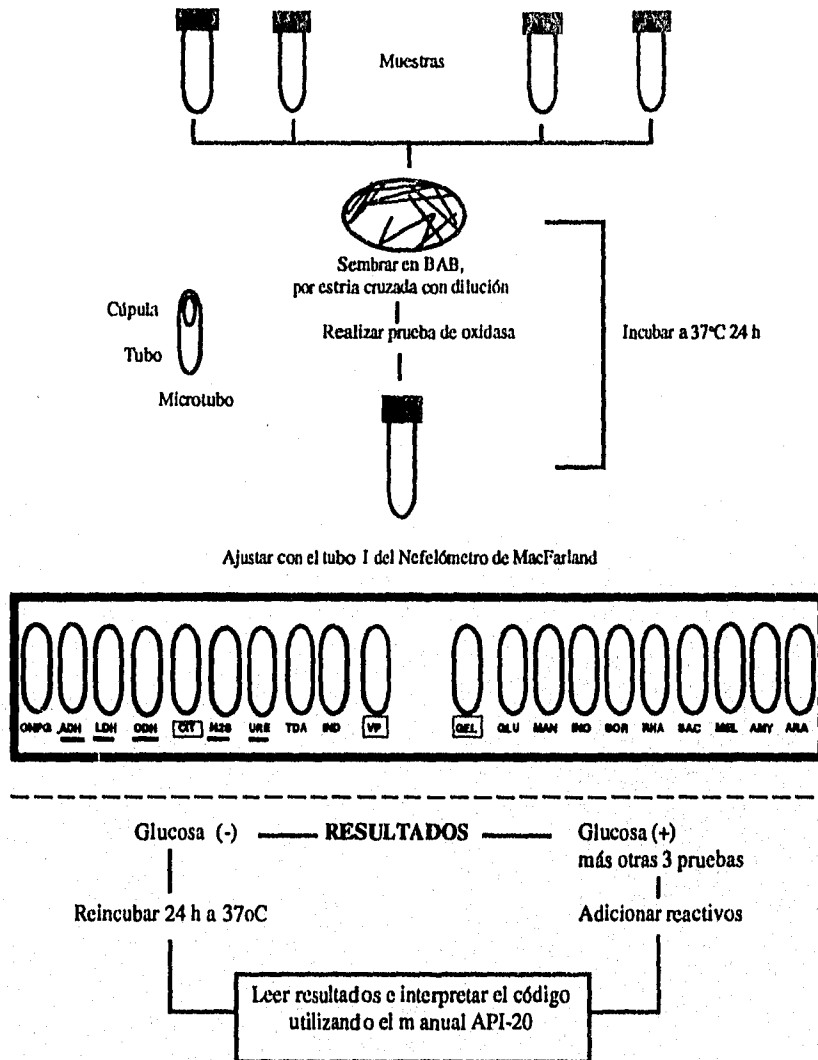
3. Se tomó del cultivo y se ajustó al tubo # 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland en solución salina 0.85%

4. Con esta suspensión se llenaron los tubos de la tira de API hasta el borde, los tubos marcados en su parte inferior con una línea (descarboxilación de aminoácidos, urea y producción de ácido sulfhídrico) se les adiciona vaselina, los que están marcados con un rectángulo (CIT, VP y GEL) se llenaron en su totalidad (hasta la cúpula). Figura 6

5. Se adicionó agua destilada al contenedor inferior y encima se colocó la tira de API 20E llena y se incubó a 37 °C 18-24 h .

6. Transcurrido el tiempo de incubación se leyó si la glucosa y 3 ó más pruebas

Figura 6. Identificación de cepas bacterianas por el sistema API - 20E para enterobacterias



daban positivas (sin agregar reactivos) se consideraba que la tira se podía leer y se adicionaban reactivos. En el caso de que la glucosa y otras tres pruebas fueran negativas la tira se reincubó otras 24 h a 37 °C y se anexaron las siguientes pruebas OF, nitratos, motilidad y crecimiento en Mac Conkey.

7. Al tubo V-P se le adicionó 1 gota de ∞ -naftol y 1 gota de KOH al 40% y al tubo marcado TDA se le agregó 1 gota de cloruro férrico al 10%

8. Se leyeron las pruebas bioquímicas de acuerdo con las instrucciones del manual API 20E, a una prueba positiva se le dió un valor de 1 y una prueba negativa se consideró como cero. Se sumaron los valores de las pruebas bioquímicas en grupos de 4 en 4.

9. El código obtenido se buscó en el manual del sistema el cual está codificado por computadora y se determinó a que microorganismo correspondió a dicho código.

VIII. Resultados.

La tabla 11 resume las características de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 aisladas en muestras de ostiones inoculados intencionalmente. Se seleccionaron un máximo de 30 colonias características de *Vibrio cholerae*, todas las cepas que se lograron aislar tuvieron el mismo comportamiento bioquímico y serológico, en los diferentes inóculos, diluciones y temperaturas a las que se sometieron. Todos los aislamientos fueron colonias amarillas mucoides en agar TCBS, todos fueron oxidasa positiva y formaron hilo mucoso, tuvieron buen desarrollo en agar tripton a 1 y 3 % de NaCl, siendo inhibido su crecimiento en agar tripton a 6 % de NaCl y serológicamente correspondieron al serotipo Inaba.

Los resultados de la tabla 12 corresponden a los promedios del número de colonias contadas a partir de un inóculo de 0.1 ml de un cultivo ajustado al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (150×10^6 microorganismos por ml) siendo 450 ml de APA y 50 g de ostión el volumen total de muestra (factor de dilución 1:10) considerando el factor de dilución de la muestra (10^{-1} a 10^{-6}) y el factor de dilución del inóculo (1:20 a 1:100), utilizando dos temperaturas de incubación diferentes (37 y 42°C) para los métodos de la FDA y LNSP.

La tabla 12 muestra también las unidades formadoras de colonias en los inóculos iniciales después de la incubación a 37 °C y 42 °C. En la tabla se puede observar que por el método del INDRE se aislaron cepas de *Vibrio cholerae* en los tres inóculos empleados (A, B, y C) aún cuando se maneja una sola dilución (10^{-1}) y una temperatura (37 °C) lo que implica ahorro de tiempo, material y medios de cultivo. En las placas inoculadas en el segundo enriquecimiento de 6 horas las muestras presentaron menor contaminación y se facilitó el aislamiento de *Vibrio cholerae*

Los resultados en la tabla 12 muestran que la recuperación de *Vibrio cholerae* con inóculo A para la FDA se pudieron recuperar cepas aún en la dilución 1×10^6 en todos los experimentos.

Tabla 11 Características de las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas por los métodos del INDRE, LNSP y FDA.

Morfología en TCBS	amarilla mucóide
Oxidasa	+
Hilo mucóide	+
Serología	Inaba
TSI S/F (H ⁺ / G)	K/A(- / -)
LIA S/F (H ⁺ / G)	K/A(- / -)
MIO	+++
CP (indol)	+
Arg	-
TCBS.- agar de tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa	Arg.- arginina
TSI.- agar triple azúcar hierro	K/A.- alcalino/ácido
LIA.- aga de lisina hierro	H ⁺ .- ácido sulfhídrico
CP.- caldo peptonado para producción de indol	G.- gas

Tabla 12. Unidades formadoras de colonias/ ml / g de ostión en las técnicas del INDRE, FDA y LNSP

Método	Dilución del inóculo	Dilución de muestra	Sin incubar UFC/ml	6h/37°C UFC/ml	18h/37°C UFC/ml	6h/42°C UFC/ml	18h/42°C UFC/ml
INDRE	1:100	1 x 10 ⁻¹	3 x 10 ²	INC	INC	NR	NR
FDA	0.5 NF	1 x 10 ⁻⁶	p < 0.3	1.65 x 10 ⁹	1.40 x 10 ⁹	2.1 x 10 ⁹	1.55 x 10 ⁹
		1:20	1 x 10 ⁻³	15	INC	INC	3.0 x 10 ⁶
	1:100	1 x 10 ⁻⁴	p < 1.5	INC	INC	0	1.00 x 10 ⁸
		1 x 10 ⁻⁵	p < 0.15	5.50 x 10 ⁹	INC	0	0
		1 x 10 ⁻⁶	p < 0.015	0	3.80 x 10 ¹⁰	0	0
		1 x 10 ⁻³	3	3.50 x 10 ⁷	4.50 x 10 ⁸	1.15 x 10 ⁸	1.80 x 10 ⁸
	1:100	1 x 10 ⁻⁴	p < 0.3	0	0	0	0
		1 x 10 ⁻⁵	p < 0.03	0	0	0	0
		1 x 10 ⁻⁶	p < 0.003	0	0	0	0
		1:20	1 x 10 ⁻³	151	INC	INC	2.00 x 10 ⁷
1:100	1 x 10 ⁻³	3	9.50 x 10 ⁷	2.40 x 10 ⁸	2.30 x 10 ⁸	2.35 x 10 ⁸	

INC = INCONTABLE

NR = NO SE REQUIERE

UFC = UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

En el método de la FDA se observa diferencia en la eficiencia de recuperación en el inóculo B, cuando se incubaba a 37 °C durante 18 y 6 h, siendo mejor la incubación por 18 h. Las muestras incubadas a 42 °C presentaron menor número de contaminantes pero también disminuyó la posibilidad de recuperar *Vibrio cholerae*. En el inóculo C no se observa diferencia en la dilución 10⁻³ incubada a diferentes tiempos y temperaturas.

Cuando se empleó el método de los LNSP no se observó diferencia en la recuperación de *Vibrio cholerae* en los inóculos A y B a excepción del inóculo de 6 h a 42 °C en donde se pudieron contabilizar las colonias. En el inóculo C los resultados fueron semejantes presentándose una diferencia de un logaritmo en las muestras incubadas 6 h a 37 °C.

En la tabla 13 se puede observar y comparar la sensibilidad obtenida en cada uno de los métodos utilizados, así se tiene que el método del INDRE es tan sensible como los otros dos métodos con los que se comparó, ya que se considera que un método que se va a emplear en el diagnóstico debe ser entre 70 y 100 % sensible para considerarse aceptable, y la sensibilidad del método del INDRE fué del 92.3 % mientras que el método empleado por el FDA cuando se incubó a 37 °C la sensibilidad fué de 68 % y de 92.3 % a 42 °C y los LNSP muestran una sensibilidad del 100 % a las dos temperaturas.

La tabla 14 muestra las especies de *Vibrio* aisladas de las 1041 muestras procesadas por el método del INDRE a las 18 y 6 h de incubación, encontrándose que el mayor porcentaje de aislamientos correspondió a *Vibrio cholerae* No 01 con el 13 % de aislamientos a las 18 h y 21.5 % a las 6 h de incubación. *Vibrio cincinnatiensis* 8.8 % a las 18 h y 7.8 % a las 6 h de incubación, *Vibrio alginolyticus* 7 y 3.9 % respectivamente. *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae* O1 Inaba se aislaron en porcentaje bajo (0.7 % y 0.1 % respectivamente) a las 18 h y 1.8 y 0.1 % respectivamente a las 6 h.

La tabla 15 muestra los porcentajes de aislamientos de los otros dos miembros de la familia *Vibrionaceae* (*Aeromonas* y *Plesiomonas*) y de otras enterobacterias que no se reportan frecuentemente como causantes de diarreas.

Tabla 13. Determinación de la sensibilidad de los métodos del INDRE, FDA y LNSP para la recuperación de las cepas de *Vibrio cholerae* O1

	INDRE*	FDA*		LNSP*	
	37°C	37°C	42°C	37°C	42°C
A	120	110	120	140	100
B	0	0	0	50	20
C	10	50	10	0	0
D	0	0	0	0	0
S	92.3%	68.0%	92.3%	100.0%	100.0%

$$S = \% \text{ de sensibilidad} = \frac{A}{A + C} \times 100$$

* = inóculo C

Tabla 14. *Vibrio cholerae* y *Vibrio spp.* aislados de 1041 muestras de pescados y mariscos provenientes de una central de abasto de la Ciudad de México

Microorganismo	No. de aislamientos 18 h	%	No. de aislamientos 6 h	%
<i>Vibrio cholerae</i> O1 INABA	1	0.1	1	0.1
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	129	13	185	21.5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7	0.7	16	1.8
<i>Vibrio alginolyticus</i>	47	4.7	34	3.9
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	87	8.8	67	7.8

Tabla 15. Frecuencia de aislamientos de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y otras enterobacterias de muestras de pescados y mariscos.

Microorganismo	No. de aislamientos 18 h	%	No. de aislamientos 6 h	%
<i>Aeromonas</i>	3	0.3	4	0.4
<i>Plesiomonas</i>	6	0.6	10	1.1
Enterobacterias	691	70	536	62.4

Tabla 15. Frecuencia de aislamientos de *Aeromonas*, *Plesiomonas* y otras enterobacterias de muestras de pescados y mariscos.

Microorganismo	No. de aislamientos 18 h	%	No. de aislamientos 6 h	%
<i>Aeromonas</i>	3	0.3	4	0.4
<i>Plesiomonas</i>	6	0.6	10	1.1
Enterobacterias	691	70	536	62.4

La tabla 16 muestra la sensibilidad del método de doble enriquecimiento en APA que realiza el INDRE para la recuperación de *Vibrio cholerae* O1 a partir de las 1041 muestras de pescados y mariscos siendo ésta de 0 % y de 32.06 % en la recuperación de *Vibrio cholerae* No O1.

Tabla 16. Sensibilidad del doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina pH 9 en el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 a partir de muestras de pescados y mariscos.

Aislamiento de *Vibrio cholerae* a diferente tiempo

18 h \ 6 h	+	-
+	0 (A)	1 (B)
-	1 (C)	1039 (D)

$$S = \frac{A}{A+C} \times 100 = \frac{0}{0+1} \times 100 = 0 \% \text{ sensibilidad}$$

$$E = \frac{D}{B+D} \times 100 = \frac{1039}{1+1039} \times 100 = 99.9 \% \text{ especificidad}$$

A = Aislamiento a las 18 h y a las 6 h

B = Aislamiento a las 18 h pero no a las 6 h

C = Aislamiento a las 6 h pero no a las 18 h

D = No aislamiento

Tabla 17. Sensibilidad del doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina pH 9 en el aislamiento de *Vibrio cholerae* No O1 a partir de muestras de pescados y mariscos.

Aislamiento de *Vibrio cholerae* a diferente tiempo

18 h \ 6 h	+	-
+	59(A)	69 (B)
-	125 (C)	788 (D)

$$S = \frac{A}{A + C} \times 100 = \frac{59}{59 + 125} \times 100 = 32.06 \% \text{ sensibilidad}$$

$$E = \frac{D}{B + D} \times 100 = \frac{788}{69 + 788} \times 100 = 94.14 \% \text{ especificidad}$$

A = Aislamiento a las 18 h y a las 6 h

B = Aislamiento a las 18 h pero no a las 6 h

C = Aislamiento a las 6 h pero no a las 18 h

D = No aislamiento

IX. Discusión

A raíz de que el cólera se inició, en México en 1991 se consideró la necesidad de vigilar el agua y los alimentos como vehículos de transmisión de la enfermedad (18) y se requirió de un método bacteriológico rápido, accesible, específico y sensible que pudiera estar al alcance de cualquier laboratorio de salud pública estatal.

Los moluscos bivalvos, que son consumidores filtrantes, pueden estar expuestos y acumular bacterias y los virus potencialmente patógenos además de las toxinas naturales. Los crustáceos pueden acumular bacterias patógenas en las superficies de la concha y la branquia y en el estómago.

En Estados Unidos, las investigaciones epidemiológicas han asociado la enfermedad causada por *Vibrio cholerae* con la ingestión de cangrejos, langostinos y ostras crudas provenientes del Golfo (28).

El INDRE propuso un método de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en muestras de pescados y mariscos diferente al método seguido por los LNSP y FDA ya que solo considera una dilución de trabajo y una temperatura de incubación, con esto se tiene un gran ahorro de insumos y tiempo de trabajo a diferencia de los otros dos métodos que utilizan un gran número diluciones de trabajo y dos temperaturas de incubación diferente (12, 18).

Todos los aislamientos realizados crecieron en 1 y 3 % de NaCl y no crecieron en 6 % de NaCl, esto confirmó que el microorganismo aislado fué *Vibrio cholerae* ya que de acuerdo al manual editado por el FDA ningún *Vibrio cholerae* crece a concentraciones de 6 % de NaCl en adelante (12), el manual de técnicas de los LNSP apoya lo anterior ya que nos indica que las bacterias que no son *Vibrio* y que presentan reacciones similares a las de *Vibrio cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T₁N₃ y la mayoría de las especies de la familia *Vibrionaceae* crece solamente en T₁N₃.

La técnica de los LNSP (12) recomienda la prueba del hilo mucoso para seleccionar probables cepas de *Vibrio cholerae* las cuales son positivas y descartar *Aeromonas* que generalmente son negativas (4) y que también pueden ser recuperadas de productos marinos (33).

Las colonias amarillas mucosidades características de *Vibrio cholerae* fueron sembradas en el juego de bioquímicas utilizado de rutina en el INDRE y los resultados junto con la prueba de oxidasa positiva confirmaron que se trataba de *Vibrio cholerae*; este juego de bioquímicas utilizado apoya aún más la identificación de *Vibrio cholerae* ya que los LNSP y el FDA solamente inoculan TSI para confirmación (12, 33) con lo cual solamente pueden descartar *Pseudomonas* (oxidación de la glucosa) que comúnmente son aisladas de pescados y mariscos con los métodos que generalmente se utilizan para aislar especies de *Vibrio*.

El total de las cepas confirmadas como *Vibrio cholerae* aglutinaron con el suero polivalente O1 y con el monovalente Inaba con lo que se confirma la recuperación de la cepa de referencia inoculada ya que en las muestras fueron los testigos negativos no se aisló ninguna cepa de *Vibrio cholerae*.

En la técnica del INDRE partiendo de un inóculo inicial de 3×10^2 UFC/ml y a la temperatura de 37°C con una sola dilución se pudieron aislar e identificar cepas de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico, además se observó una buena recuperación de colonias (incontables) a 37°C después de 6 y 18 h de incubación. El segundo enriquecimiento de 6h es necesario ya que las muestras presentaron menos contaminación y mayor número de colonias puras aisladas, facilitando el aislamiento de *Vibrio cholerae* (31).

El método de la FDA sirvió para aislar *V. cholerae* O1 toxigénico en muestras de ostión inoculado inicialmente con 3 UFC/ml e incubado 6 y 18 h a 37 y 42°C en todas las diluciones empleadas exceptuando la dilución 10^{-6} para el inóculo B y las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} para el inóculo C. También se observó un decremento en los contaminantes al aumentar la dilución y la temperatura y hubo menos contaminantes a 42°C que a 37°C.

De Paola comprobó que de 222 cultivos de *Vibrio cholerae* que estudió para crecer a 35 y 42 °C en APA, 222 cultivos de *Vibrio cholerae* produjeron crecimiento visible a los 35 °C (100 %) y 219 (98.6 %) produjeron crecimiento visible a los 42 °C. Los tres que no crecieron a 42 °C fueron aislamientos del serogrupo No O1 de la costa del golfo con perfiles bioquímicos atípicos. El crecimiento a 42 °C distingue a *Vibrio cholerae* de muchas otras especies bacterianas litorales por esto la incubación de *Vibrio cholerae* en APA a 42 °C aumenta su especificidad para *Vibrio cholerae* inhibiendo la microflora interfiriente (8), pero cabe señalar que aún en presencia de contaminantes a 37 °C se pudo aislar al *Vibrio cholerae*. El tiempo de incubación influye ya que al comparar los resultados de la FDA se observa que incubando la muestra 6 h la cuenta bacteriana contaminante disminuye (8).

Aún cuando es poco probable que los peces de mar profundo se hayan infectado en su hábitat si podrían contaminarse en la manipulación posterior. Estos alimentos teóricamente, plantean un riesgo de transmisión de cólera en los casos de que se coman crudos o se permita que contaminen otros alimentos. Los crustáceos y los moluscos tienen mayor probabilidad de albergar el *Vibrio cholerae* (6).

El mayor porcentaje de aislamientos correspondió a *Vibrio cholerae* No O1 ya que fácilmente se encuentra en aguas y alimentos marinos, dependiendo del pH, temperatura, el grado de contaminación, las sustancias orgánicas presentes, el contenido de sal y la presencia de otras bacterias (2), ha sido asociado con el consumo de numerosos tipos de productos de pesca incluyendo: moluscos y crustáceos (ostras, almejas, mejillones) y se debe considerar ahora en el monitoreo de alimentos del mar (30) el *Vibrio cholerae* O139 perteneciente al grupo de los *Vibrio cholerae* No O1 que es capaz de sintetizar una toxina semejante a CT (13), por lo que se debe tener presente en adelante que hay que tipificar serológicamente los *Vibrio cholerae* No O1 para no dejar pasar el O139 como posible causa de diarrea, como se hace mención en el manual de los LNSP con respecto a que se aislaron cepas de *Vibrio cholerae* No O1 en 13 (2.7%), de 479 personas entre las personas que comieron ostras crudas 4% de tenían *Vibrio cholerae* No O1 y solamente 2(15%) fueron asintomáticas (32).

Los porcentajes de aislamiento de *Vibrio cholerae* No O1 por el método del INDRE son muy semejantes a los reportados por De Paola y Presnell siguiendo el método del FDA(6). De Paola aisló 24.9% de *Vibrio cholerae* No O1 de 213 muestras y solamente un aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 lo que concuerda con el INDRE el cual de 1041 muestras solamente aisló 1 *Vibrio cholerae* O1 Inaba (0.1%) y 185(21.5%) de *Vibrio cholerae* No O1 (5).

Los vibrios halofílicos son frecuentes en ambientes marinos y de ellos *Vibrio parahaemolyticus* es el principal causante de problemas de diarrea (2) y existen reportes de que estos microorganismos son aislados en porcentajes semejantes a los obtenidos empleando el método del INDRE (10).

Vibrio parahaemolyticus es un agente causal de diarrea al igual que cólera o *Salmonella* (2), reconocido mundialmente (12) por ser su hábitat natural el mar y específicamente las áreas próximas a los litorales (3) y aún cuando su aislamiento no fue más que del 0.7% (18h) y del 1.8% (6h), sin embargo Gil y col. 1974 en Puebla (14) investigaron la incidencia de este microorganismo en 103 pescados y mariscos crudos encontraron una incidencia de 6 % y Villanueva en 1977 al analizar 150 muestras de ostiones encontró 5 % de *Vibrio parahemolyticus*, éste bajo porcentaje podría ser explicado por el hecho de que su pH óptimo de aislamiento es de 7.4-8.6 y una concentración del 2% de NaCl en caldo de enriquecimiento (14) o como Fernandez y col. afirman que factores como el manejo durante la pesca, conservación y transporte desde la bodega pudieran favorecer el desarrollo de la flora microbiana asociada y enmascarar de este modo el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*; cuando se realiza el aislamiento a partir de fuentes marinas; su presencia constituye un riesgo al ingerirse el pescado crudo o mal cocido contaminado con *Vibrio parahaemolyticus* ya que sobrevive largos periodos a -5 °C y a 4 °C; en ostiones, puede sobrevivir 3 semanas (7). Oberhofer y Podgore identificaron un caso de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Singapur en un hombre de 60 años que había consumido previamente ostiones y Nolan y col. en 1984 documentaron en Oregon y Washington 6 casos de individuos que desarrollaron

gastroenteritis después de ingerir ostiones (10).

Vibrio alginolyticus y *Vibrio cincinnatiensis* son microorganismos muy comunes en el ambiente marino (2) y son dos de los vibrios halofílicos que fueron aislados en mayor porcentaje pero solamente *Vibrio alginolyticus* ha sido reportado como agente causal de enfermedades gastrointestinales (9).

Las *Aeromonas* son productoras de una toxina causante de diarrea y junto con las *Plesiomonas* forman parte de la familia *Vibrionaceae* pero no fueron aisladas en un número importante (2).

Por el método de doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina se obtuvieron en este trabajo 691 aislamientos de enterobacterias entre ellas *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* principalmente y aún cuando a las 6h de incubación disminuyó ligeramente el número de aislamientos de las mismas, ninguna de ellas tuvo un reporte previo asociado a enfermedades gastrointestinales (2). Fernandez indica que si bien *Proteus* se considera como flora normal de los pescados *Klebsiella* y *Enterobacter* no por lo que su presencia confirma que existió contaminación de los pescados desde su captura. Lo anterior confirma que al realizar el doble enriquecimiento en APA el número de microorganismos contaminantes disminuye siendo el tiempo óptimo de incubación toda la noche a 37 °C (14).

X. Conclusiones.

El método del INDRE es tan efectivo como los métodos empleados por la FDA y los LNSP para el aislamiento de *V. cholerae* O1 toxigénico a partir de muestras de ostiones.

El doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina a pH 9 disminuye los contaminantes y facilita el aislamiento de los vibrios de otras especies.

La técnica del INDRE se puede realizar con menor cantidad de equipo y material que las técnicas del FDA y LNSP.

Siguiendo la metodología del INDRE se ahorra suero ya que solamente son aglutinados los *Vibrio cholerae* que han sido identificados bioquímicamente, hecho que es importante en nuestro país ya que para los laboratorios estatales es difícil de obtener suficiente infraestructura, necesaria para su producción, y por su alto costo.

Los *Vibrio cholerae* No O1 es necesario monitorearlos por la posible presencia de O139.

No se requiere modificar el método del INDRE para aislar vibrios halofílicos (*Vibrio parahaemolyticus*).

La presencia de *Vibrio parahaemolyticus* debe considerarse potencialmente riesgosa como causa de enfermedades diarreicas.

XI. Apéndice

11.1 Preparación del Nefelómetro de Mc Farland con estándar de sulfato de bario.

Tubo	cloruro de bario al 1% (ml)	Ac. sulfúrico al 1% (ml)	Densidad aprox. corres- pondiente de bacterias (millones/ ml)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

1) Preparar una solución acuosa al 1 % de BaCl_2 y H_2SO_4 .

2) Agregar las cantidades indicadas en la tabla a tubos limpios y secos. Los tubos deben tener el mismo diámetro de los tubos que se van a utilizar para determinaciones

11.2. Medio TCBS (Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa)

Fórmula:

Extracto de levaduras.....	5	g
Proteosa peptona.....	10	g
Citrato de sodio.....	10	g
Tiosulfato de sodio.....	10	g
Bilis de buey.....	8	g
Sacarosa.....	20	g
Cloruro de sodio.....	10	g
Citrato férrico.....	1	g
Azul de bromotimol.....	0.04	g
Azul de timol.....	0.04	g
Agar.....	15	g
Agua destilada.....	1000	ml

Disolver todos los ingredientes por ebullición. Ajustar el pH a 8.6. Enfriar a 55 °C y llenar cajas de Petri estériles. NO ESTERILIZARSE EN AUTOCLAVE. Almacenar máximo 24-48 h a 4-6 °C.

Nota: Prepararlo inmediatamente antes de usarse.

11.3. Agua Peptonada Alcalina

Fórmula:

Peptona.....10.0 g
Cloruro de sodio.....10.0 g
Agua destilada.....1000 ml

ESTA
SALIDA
DE LA
PESIS
NO
DEBE

Ajustar el pH a 9.0 con NaOH y envasar 10 ml en tubos de vidrio de 16 x 150 con tapón de rosca, o bien, envasar 450 ml en frascos de plástico de 1 litro con tapa de rosca. Esterilizar 15 lb 15 minutos. Enfriar y tapar bien para evitar que el pH descienda, guardar en refrigeración hasta el momento de usarlos.

11.4. Reactivo para Oxidasa

Fórmula:

N,N,N',N'-tetrametil p-fenilendiamina1.0 g
Agua destilada100 ml

Disolver , preparar inmediatamente antes de usar.

11.5. Caldo Nutritivo (0, 1, 3, 6, 8, 10 % de NaCl)

Fórmula:

Caldo Nutritivo.....10 g
Cloruro de sodio..... 0,3,6,8 ó 10 g
Agua destilada.....1000 ml

Disolver los ingredientes, distribuir en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C.

11.6. Agar Triptona y Agar Triptona Sal (T₁N₀, T₁N₁, T₁N₃)

Fórmula:

Triptona o Tripticasa.....	10	g
Cloruro de sodio.....	0, 10 ó 30	g
Agar.....	20	g
Agua destilada.....	1000	ml

Disolver los ingredientes y hervir hasta disolución del agar, si se desea inclinado, distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C. Dejar solidificar los tubos inclinados, para placas enfriar el medio de 45 - 50 °C y distribuir en cajas Petri estériles.

11.7. Solución Salina 0.85 %

Fórmula:

NaCl.....	8.5	g
Agua destilada.....	1000	ml

Disolver el NaCl en el agua, distribuir en tubos (5 ml) y esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C.

11.8. Medio Gelosa Especial

Fórmula:

Base de gelosa sangre.....	20.0	g
Peptona.....	2.5	g
Agar.....	15.5	g
Extracto de carne.....	1.5	g
Agua destilada.....	1000	ml

Disolver todos los ingredientes, si es necesario hervir hasta disolución total.

Distribuir en viales de 3 ml de capacidad, Esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C.

Si lo requiere inclinar los viales.

Nota: Una vez inoculados y desarrollada la cepa adicionar aceite mineral estéril y conservar los viales a temperatura ambiente.

11.9. Cloruro Férrico al 10 %

Fórmula:

Cloruro férrico.....	10	g
Agua destilada.....	100	ml

Disolver el cloruro en el agua y almacenar en frasco gotero.

11.10. Reactivo de Ehrlich

Fórmula:

p-dimetilaminobenzaldehído.....	2	g
Alcohol etílico (absoluto).....	190	ml
HCl (concentrado).....	40	ml

11.11. Reactivo de Kovacs

Fórmula:

Alcohol amílico o isoamílico (puede sustituirse por alcohol butílico).....	150	ml
p-dimetilaminobenzaldehído.....	10	g
HCl (concentrado).....	50	ml

Disolver el aldehído en el alcohol. Agregar lentamente el ácido a la mezcla aldehído-alcohol. Guardar ambos reactivos en el refrigerador (4 °C) mientras no se utilizan. Su estabilidad es variable.

11.12. alfa-naftol al 5 % (intensificador de color)

Fórmula:

Alfa-naftol (1-naftol)	5	g
Alcohol etílico (absoluto).....	100	ml

Disolver el alfa naftol en menos de 100 ml de alcohol etílico absoluto. Trasvasar la solución a un frasco volumétrico de 100 ml y agregar alcohol etílico absoluto csp. 100 ml

11.13. Hidróxido de potasio al 40 % (agente oxidante)

Fórmula:

KOH.....40 g
Agua destilada.....100 ml

Pesar rápidamente el KOH y disolverlo en menos de 100 ml de agua destilada. Este reactivo es muy higroscópico.

Colocar el vaso en un baño de agua fría circulante para controlar la temperatura.

Enfriar y trasvasar la solución de KOH a un frasco volumétrico de 100 ml agregando agua destilada csp 100 ml.

Guardar en un frasco para reactivos de vidrio recubierto de polietileno o parafina.

Nota: El KOH puede ser sustituido por NaOH

11.14. Desoxicolato de sodio al 0.5%

(String test)

Fórmula:

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

XII. Referencias.

- 1.- Almeida, R.J., D.N. Cameron, W.L. Cook & I.K. Wachsmuth. 1992. *Vibrio* phage VcA-3 as an epidemic strain marker for the US gulf coast *Vibrio cholerae* O1 clone. *J. Clin. Microbiol.* 30:300-304.
- 2.- Ballows, A., W.J. Hausler, K.L. Hermann, H.D. Isenberg, H.J. Chadomy. 1991. *Manual of Clinical Microbiology*. p 360-383. 5th ed. Ed. ASM. Washington. USA.
- 3.- Blake, P.A., Allegra, D.T., Snyder, J.D., Barrett, T.J., Mc. Farland, I., Caraway, C.T., Feeley, J.C., Craig, J.P., Lee, J.V., Puhr, N.D. and Feldman, R.A. 1980. Cholera a possible endemic focus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 302:305
- 4.- Centers for Disease Control and Prevention (eds). 1994. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae*. Pan American Health Organization, World Health Organization, USA.
- 5.- De Paola, A., M.W. Presnell., M.L. Motes., J.S. Zywno. 1983. Non-1 *Vibrio cholerae* in shellfish, sediment and waters of the U.S. Gulf Coast. *J. of Food Protec.* 46 (9):802-806.
- 6.- De Paola, A. 1981. *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: A literature review. *Env. Microbiol.* 53(5): 1183
- 7.- De Paola, A., Capers, G.M., Motes, M.L., Olsvik, O., Fields, P.I., Wells. 1992. Isolation of Latin American epidemic strain of *Vibrio cholerae* from US Gulf Coast. *Lancet.* 339(7):624
- 8.- De Paola, A., Kaysner, C.A. y Merrill, R.M. 1987. Elevated temperature method

for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters (*Crassostrea gigas*). Appl. Env. Microbiol. 53(5):1181-1182

- 9.- **Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US. Food and Drug Administration.** 1991. Bacteriological Analytical Manual. 7th Edition. (En impresión).
- 10.- **Dowel, S.F., Groves, C., Kirkland, K.B., Cicirello, H.G., Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J.R., Monroe, S.S., Humphrey, C.D.** 1995. A multistate Outbreak of Oyster-associated gastroenteritis: Implications for interstate tracing of contaminated shellfish. J. Infect. Dis. 171:1497-1503.
- 11.- **Dutt, A.K., Alwi, S. y Velauthan, T.** 1971. A shellfish-borne cholera outbreak in Malaysia. Trop. Med. Hig. 65(6):815-818
- 12.- **Elliot, E.L., C.A. Kaysler & M.L. Tamplin.** 1991. Bacteriological Analytical Manual. 7th ed. Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition US, Food and Drug Administration, USA.
- 13.- **Fields, P.I., T. Popovic, K. Wachsmuth & O. Olsvik.** 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strain from the Latin American cholera epidemic. J. Clin. Microbiol. 30: 2118-2121.
- 14.- **Fernandez, R.E., L.M. Nava, L. Mota de la Garza.** 1988. Ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado crudo. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 30(2):91-96
- 15.- **Fernandez, E.E.** 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y alimentos. Vol. I. Ed. EDUG/Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. p 535-569.
- 16.- **Galen J, Trucksis M, Michalson J. Fasano , and Kaper J.** 1992. Accessory cholera enterotoxin (ACE, a new enterotoxin of *Vibrio cholerae* . In: "Abstracts of

92nd general meeting of the American Society for Microbiology ". New Orleans, Luisiana. USA. pp 74.

- 17.- Gallardo, R.R., M.C. Rodríguez & P.A. Vargas-Tapia (eds). 1992. Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos. Secretaria de Salud. Subsecretaria de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública, México.
- 18.- Giono, C.S., L. Gutierrez, A.M. Hinojosa. 1991. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. Publicación técnica del INDRE #10. Subsecretaria de Organización y Desarrollo. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México.
- 19.- Gutierrez G., Guiscafre H., Bronfma M., Martínez M., Padilla G., Muñoz O. Estrategia para mejorar los patrones terapéuticos utilizados en diarrea aguda en unidades de atención médica primaria. Arch Invest. Med. (Mex) 19:335-444, 1988.
- 20.- Honda, T., M. Yoh., U. Kongmuang and T. Miwatani. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Clin. Microbiol. 22(3):383-386.
- 21.- Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos. Boletín Mensual de Cólera/Diarreas Infecciosas, SSA, México, 1991-1993.
- 22.- Jawetz, E., J.L. Melnick., E.A. Adelberg. 1987. Microbiología Médica. p 140 - 146. 12ª ed. Ed. El Manual Moderno. México D.F.
- 23.- Klontz, K.C. 1990. Fatalities associated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1 infections in Florida (1981 a 1988). South. Med. J. 83:500
- 24.- Klontz, K.C., Tauxe, R.V., Cook, W.L., Riley, W.H. and Wachsmuth, K. 1987.

Cholera after the consumption of raw oysters. *Ann. Intern. Med.* 107:846.

- 25.- **Koch, W.K., Payne, W.L., Wntz, B.A. and Cebula T.A.** 1993. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59 (2): 556-560.
- 26.- **Lowry, P.W., Pava, A.T., Mc Farland, L.M., Pettier, B.H., Barret, T.J., Bradford, H.B.** 1988. Cholera en Louisiana. *Arch. Intern. Med.* 146:2079-2084
- 27.- **Mac Faddin, J.F.** 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2ª ed. Williams, Wilkins, Baltimore. pp 325.
- 28.- **Mota H.F.** Abuso de antimicrobianos y otros conceptos erróneos en el tratamiento de diarreas en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex* 44:577-579, 1987.
29. **Norma Técnica No. 339 para la prevención, control, manejo y tratamiento del cólera.** 1991. *Diario Oficial, México.* 13(8):22-29.
- 30.- **OMS.** Pautas para el Control del Cólera. Organización Mundial de la Salud, Programa de Control de Enfermedades Diarreicas WHO/CDD/SER/80.4 REV 3, 1992.
- 31.- **Ortega, D.Y., F. Quevedo.** 1991. Garantía de la calidad de los laboratorios de microbiología alimentaria. p 34 Ed. HARLA y Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud.
- 32.- **Overman, T., J. Kessler and J.P. Seabolt.** 1985. Comparison of API 20 E, API Rapid E and API Rapid NIT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 22(5):778-781.
- 33.- **Pavia, A.T., Campbell, J.F., Blake, P.A., Smith, J.D., Mckinley, T.W., and**

- Martin, D.L.** 1987. Cholera from raw oysters shipped interstate. J. Amer. Med. Assoc. **258**: 2374.
- 34.- **Popovic T, Olsvick O, Blake P and Wachsmuth.** 1993. Cholera in the americas: Foodborne aspects. J. Food . Protec. (manuscrito).
- 35.- **Ristaino, A.P., M.M. Levine & R.C. Young.** 1983. Improved GM1 enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. **18**:808-815.
- 36.- **Rodríguez-Angeles, M.G.** 1993. Exotoxinas. p 84-98. In: S. Giono, A. Escobar & J.L. Valdespino (eds). Manual de Laboratorio en el Diagnostico de Enterobacterias. Secretaria de Salubridad, México.
- 37.- **Rodríguez-Angeles G., S. Giono-Cerezo, A. Moreno-Escobar y J.L. Valdespino-Gómez.** 1994 La técnica de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR) para la identificación de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico en ostiones. Rev. Lat-Amer. Microbiol. **36**(4):295-306
- 38.- **Secretaría de salud. Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública.** 1992. Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos.
- 39.- **Secretaría de salud. Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública.** 1992. Manual de procedimientos para la toma y manejo de muestras para análisis bacteriológico.
- 40.- **Sistema Nacional de Salud, México, Dirección General de Epidemiología.** Vigilancia Epidemiológica Internacional, Cólera **5**(14):13-14, 1991.
- 41.- **Valdespino, J.L., L. García, L. Gutierrez, S. Giono, R. Arminda y J. Sepúlveda.**

1991. Manual sobre cólera para personal de salud. Publicación Técnica del I.N.D.R.E.
11, SSA, México.

- 42.- **Wachsmuth K.** 1986. Molecular epidemiology of bacterial infections examples of methodology and investigations of outbreaks. *Rev. Infec. Dis.* 8:682-692.
- 43.- **WHO:** Epidemic diarrhoea due to *Vibrio cholerae* No O1 WER 68:141, 1993.
- 44.- **Yolken, H.R., H.H. Greenberg, H.M. Merson, S.R. Bradley & A.Z. Kapikian.** 1977. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 6 :439-444.