



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CAMPUS

IZTACALA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio cholerae*
EN PESCADOS DE AGUA DULCE, EN VALLE DE
BRAVO ESTADO DE MÉXICO

BO 1317/97
e.2

T E S I S

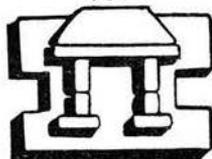
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I O L O G A

P R E S E N T A

MARIBEL PULIDO VALDOVINOS

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
REVISORES: M en C. ÁNGEL DURÁN D. y M en C. VÍCTOR OLVERA V.



IZTACALA

México, D. F., 1997



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 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.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Control de Calidad del Agua (CIECCA) en coordinación con el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), dentro del convenio de beca IMTA-ENEPI.

A MIS PADRES:

Cecilio Pulido H.

Porque en el último momento de tu vida mediste
toda tu fortaleza para seguir en la vida con coraje
y nunca pensar en la derrota.

Evelia Valdovinos R.

Por ser quien me ha dado amor
y paciencia, por estar a mi lado, mil gracias.

Con todo mi amor para mi gran amigo y esposo **Miguel Ángel Sandoval**, por
apoyar todos mis sueños, por tu amor, tu comprensión y paciencia, porque sin ti
no habría podido llegar mil gracias amor.

A mis Hermanas:

Anita Pulido.

Por apoyarme para que pudiera
seguir adelante y estar a mi lado cuando
más ayuda necesitaba.

Camila Pulido.

Por darme tu ayuda y tus palabras
de esperanza.

Con cariño para:

Eva, Guille, Elivier y Luz gracias por formar parte de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento para el **M. en C. Pedro Ramírez**, por guiarme en forma tan singular, por tus comentarios y paciencia, por tu amistad, gracias.

M. en C. Ángel Durán D. por tu apoyo y tu amistad mil gracias
Q.F.B. Esperanza Robles, M. en C. Elizabeth Ramírez Flores, M. en C. Alfonso Lugo Vázquez al Biól. Mario Chávez Arteaga, gracias por sus comentarios y ayuda

Ángel Flores C. por haberme ayudado a formar los cimientos y compartir tantos años de tu vida, por tu amistad y cariño, mil gracias.

Para el **Dr. Jesús García y la M. en C. Juana Cortés**, por darme la oportunidad de pertenecer a un equipo tan maravilloso, por su apoyo.

Patricia Memije N., por guiarme durante la realización del trabajo, por tu amistad, por tener siempre un momento y una sonrisa, gracias.

Con mucho afecto para los tres mosqueteros Víctor, Luis y Javier:
Víctor Olvera, por apoyarme desde el inicio de este sueño, por tu amistad, por ser quien eres, gracias.

Luis Bravo, por ser una persona tan maravillosas y apoyarme para poder realizar este trabajo, gracias.

Javier Sánchez, porque eres un ser humano excepcional, por tu apoyo y amistad, mil gracias.

Para **Teodora Rosas**. por estar a mi lado brindarme tu amistad y alegría por apoyarme y confiar en mí, mil gracias.

Catalina Maya, por ayudarme en la realización del trabajo, gracias.

A mis amigas **Isaura Yañez, Rocío Thompson, Anabell Ruiz y Margarita Lobato** gracias por su ayuda y amistad.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN -----	1
2. ANTECEDENTES -----	3
2.1. Generalidades del género <i>Vibrio</i> -----	5
2.1.1. Característica de <i>V. cholerae</i> -----	5
2.1.2. Morfología de las colonias-----	6
2.1.3. Serovar O:1-----	6
2.1.4. Otros serovares No O:1-----	6
2.1.5. <i>V. cholerae</i> en el ambiente dulceacuícola-----	7
2.1.6. <i>Vibrio</i> en los peces-----	8
2.1.7. <i>Vibrio</i> en pescados para consumo humano-----	10
2.2. Importancia del área de estudio -----	11
2.2.1. Ubicación geográfica del área de estudio-----	12
3. OBJETIVOS -----	15
3.1. Objetivo general -----	15
3.2. Objetivos particulares -----	15
4. MATERIAL Y MÉTODO -----	16
4.1. Colecta y transporte de muestras -----	16
4.2. Identificación de las especies de pescado obtenidas -----	16
4.3. Aislamiento de <i>V. cholerae</i> en pescado por la técnica de doble enriquecimiento -----	17
4.3.1. Concentración de la muestra-----	17
4.3.2. Primer enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina-----	17
4.3.3. Segundo enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina-----	18
4.3.4. Aislamiento en agar Tiosulfato-Citrato- sales Bilis-Sacarosa-----	18
4.3.5. Aislamiento en agar kligler-----	18
4.4. Identificación de <i>V. cholerae</i> -----	20
4.4.1. Identificación tradicional de <i>V. cholerae</i> con pruebas bioquímicas-----	20

4.4.2	Identificación de <i>V. cholerae</i> con el sistema miniaturizada API-20E-----	23
4.4.3	Procedimiento de 18 a 24 horas con el sistema API-20E-----	23
4.5.	Prueba de oxidasa-----	26
4.6.	Prueba de String o Hilo mucoso-----	26
4.7.	Pruebas bioquímicas confirmativas-----	27
4.7.1.	Serología-----	27
4.8.	Toma de muestras para el análisis de bacterias asociadas a pescados de Valle de Bravo, Edo. de Méx.-----	28
4.9.	Análisis estadístico-----	28
5.	RESULTADOS-----	29
5.1.	Identificación de pescados obtenidos en el embalse de Valle de Bravo, Estado de México-----	29
5.2.	Aislamiento e identificación de <i>V. cholerae</i> en pescados de Valle de Bravo, Estado de México-----	29
5.3.	Evaluación del sistema miniaturizado API-20E contra identificación tradicional con bioquímicas-----	30
5.4.	Frecuencia de <i>V. cholerae</i> en diferentes especies de pescado comestible del embalse de Valle de Bravo, Estado de México-----	31
5.5.	Frecuencia de <i>V. cholerae</i> en diferentes órganos de pescado-----	33
5.5.1.	<i>V. cholerae</i> en tilapia, (<i>Oreochromis sp</i>)-----	33
5.5.2.	<i>V. cholerae</i> en lobina (<i>M. salmonides</i>)-----	35
5.5.3.	<i>V. cholerae</i> en mojarrita (<i>L. macrochirus</i>)-----	36
5.5.4.	<i>V. cholerae</i> en charal (<i>Ch. bartoni</i>)-----	38
5.5.5.	<i>V. cholerae</i> en carpa (<i>C. carpio</i>)-----	39
5.6.	Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a pescados de Valle de Bravo, Estado de México-----	40
6.	DISCUSIÓN-----	42
7.	CONCLUSIONES-----	48
8.	RECOMENDACIONES-----	49
9.	BIBLIOGRAFÍA-----	50
10.	APÉNDICE-----	57
11.	ANEXO-----	71

INTRODUCCIÓN

México cuenta con una amplia base de recursos naturales; el inventario nacional de cuerpos de agua registra la existencia de 1.3 millones de hectáreas de aguas continentales que pueden ser aprovechadas para el cultivo de especies como tilapia, carpa, bagre y trucha, entre las más importantes, además de los terrenos situados en las riberas de los ríos y embalses (Ocampo y Auró, 1996).

La presa de Valle de Bravo destaca por ser un sitio de abastecimiento para agua potable y además un importante centro turístico, en el cual desde 1973 se han introducido peces para consumo, (trucha, tilapia, charal y lobina) con el fin de fomentar la pesca comercial y deportiva, todo esto lo hace un lugar especial para la economía de las poblaciones de Valle de Bravo y Avándaro asentadas junto al embalse, las que se alimentan por la venta y autoconsumo de los peces extraídos (Olvera, 1990). Sin embargo estas actividades se han practicado en forma indiscriminada descuidando los aspectos de sanidad acuícola (Kinkelin *et al.*, 1985; Ocampo y Auró, 1996)

En los peces no se ha logrado establecer con precisión una flora microbiana específica, no obstante lo que se ha determinado es que las bacterias aisladas de branquias, piel y órganos internos, reflejan la composición bacteriana del agua en donde se encuentran. Las bacterias en los peces se ponen en contacto principalmente por la contaminación de los cuerpos de agua con descargas de aguas negras, el acarreo de éstas por el agua de lluvias asociadas a heces de animales de sangre caliente, incluido el hombre (Kinkelin *et al.*, 1985; Ocampo y Auró, 1996).

Las enfermedades bacterianas en los peces son un conjunto considerable de la patología, en donde la importancia no está solo en las pérdidas económicas que ocasionan en todo el mundo, sino por su impacto en las poblaciones naturales de peces y por la amenaza sanitaria que representan algunas bacterias para la salud humana, tal es el caso del género *Vibrio*, que ocasiona en el hombre cuadros diarreicos leves ocasionados por algunas cepas de *V. cholerae* No O1 o bien cuadros diarreicos agudos ocasionados por *V. cholerae* O1, que provoca el cólera, en donde la persona afectada puede morir si no se le atiende adecuadamente. Se sabe que los peces en vida libre albergan cepas de bacterias patógenas en las que juegan el papel de reservorios naturales (Feachem *et al.*, 1983, Kinkelin *et al.*, 1985, Equihua *et al.*, 1992).

La presa de Valle de Bravo no escapa a la contaminación por descargas de aguas residuales provenientes de los poblados de Valle de Bravo y Avándaro, así como por las descargas de turistas que acuden a este centro para vacacionar, lo que sitúa a la presa como un reservorio natural de una gran variedad de especies bacterianas, mismas que se verán reflejadas en la ictiofauna presente en el cuerpo de agua.

Debemos tomar en cuenta que el conocimiento general de la ictiofauna es el punto de partida para el desarrollo de futuras investigaciones, base para el conocimiento de su biología, fomento pesquero, piscicultura y pesca deportiva, así también un punto importante para evitar la propagación de enfermedades en el hombre.

2 ANTECEDENTES

Feachem *et al.*, en 1983 observaron que *Vibrio cholerae* biotipo clásico, dio origen a 6 pandemias, mientras que el biotipo El Tor es el causante de la séptima y actual pandemia.

Probablemente nunca se sabrá con certeza como se inició la séptima pandemia, ni como se introdujo la enfermedad en los distintos países (Barua *et al.*, 1971). Sin embargo se cree que la propagación de *Vibrio* se debe principalmente a viajeros y turistas, razón por la cual en la actualidad el cólera está presente en un mayor número de países. La actual pandemia se presenta en América, con un alto índice de introducción por diversos factores, entre los que destacan la falta de abastecimiento de agua para consumo humano y el gran rezago en lo que se refiere a la disposición y tratamiento de excretas (Feachem *et al.*, 1983, Equihua *et al.*, 1992).

Pese a que algunos países no han facilitado información epidemiológica, se considera que 1970 fue el año con mayor número de casos de ésta pandemia. Se extendió considerablemente por la cuenca oriental del Mediterráneo e hizo su aparición en la URSS (tanto en la parte asiática como en la europea), en los países del norte y del oeste de África. En el último decenio se ha registrado la presencia de cólera en 40 territorios por lo menos y en algunos de esos países ha penetrado repetidas veces después de haber estado ausente durante algunos años, mientras que en otros ha adoptado un carácter endémico. (Barua *et al.*, 1971).

En 1978, se presentaron 8 casos esporádicos en el estado de Luisiana, EUA en donde se detectaron 3 enfermos asintomáticos; desde entonces continúan apareciendo casos autóctonos. (Organización Panamericana de la Salud, 1991).

Entre febrero y abril de 1991, se han confirmado casos de cólera en Perú, Ecuador, Colombia, Chile, Brasil y México, incorporándose así el continente Americano a la lista de las regiones por donde se ha extendido la séptima pandemia (Sánchez, 1991; OPS, 1991).

Cuando se tuvieron noticias de la epidemia de cólera en Perú, en nuestro país se tomaron medidas para prevenir la entrada de la enfermedad, no obstante, y pese a los esfuerzos realizados por el gobierno y la Secretaría de Salud, el 23 de junio de 1991, se reportaron los primeros casos de cólera en México, en el poblado de San Miguel Totolmoloya en el río de la Goleta, estado de México, región en la que se detectó un brote de 17 personas infectadas y una fallecida. Sin embargo se pensó que la bacteria era importada, ya que la Comisión Nacional del Agua (CNA) al revisar el curso del río San Miguel, comprobó que no estaba contaminado (Periódicos, Financiero y Universal, 26 de junio de 1991).

Los análisis socioeconómicos gubernamentales señalan que en prácticamente todas las zonas del país hay pobreza y desnutrición, sin embargo esto se observa con mayor agudeza en las zonas montañosas que parten de Chiapas y pasan por Oaxaca, Veracruz, Puebla, Guerrero parte del Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Michoacán, Colima, parte de Nayarit y Jalisco, considerándose por tal motivo zonas de alto riesgo (OPS, 1991).

En algunos estados de la república la Secretaría de Salud, puso en marcha “cordones sanitarios” con el fin de prevenir posibles brotes de cólera en esas zona, así mismo se dio inicio a la aplicación de un programa de muestreo y cloración de las fuentes de abastecimiento para prevenir la dispersión de la bacteria (OPS, 1991).

Se ha determinado que la actual pandemia presenta una ruta por contaminación del agua y alimentos, principalmente a través de pescados y mariscos capturados en aguas contaminadas, sin embargo los trabajos realizados en pescados para relacionarlos con *V. cholerae* enteropatógeno son muy escasos y sólo toman en cuenta a las especies de *Vibrio* que son patógenos para peces tales como: *V. fluvialis*, *V. damsela* y *V. ordali* entre otros. De estas consideraciones resalta la importancia de realizar estudios en cuerpos de agua continentales para observar la relación entre el agua contaminada y la presencia de *V. cholerae* en pescados de agua dulce para tomar medidas preventivas que alerten a la población sobre el riesgo que existe si se consume pescado crudo o que no ha sido sometido a cocción completa.

2.1. Generalidades del género *Vibrio*

Los vibrios son bacilos Gram-negativos, no esporulados, móviles mediante flagelos bipolares incluidos dentro de una vaina. Son catalasa positivos, utilizan fermentativamente los carbohidratos y rara vez producen gas salvo una de las especies *Vibrio metschnikovii*. Son oxidasa y nitrataza positivos, sensibles a los discos con 150- μg del agente vibriostático 2-4-diamino-6-7-di-isopropil-pteridina (0/129). La mayoría de las cepas licúan la gelatina e hidrolizan el ácido desoxirribonucleico. Los vibrios se presentan en agua dulce y salada en forma natural; incluyen algunas especies patógenas para el hombre (Freeman, 1983, Collins y Lyne, 1989,).

Dentro de estas destaca *Vibrio cholerae*, que es móvil con un solo flagelo polar y se caracteriza por ser el más móvil de todas las especies patógenas. Es ligeramente curvado y mide de 0.5 μ a 0.8 μ de diámetro y 1.4 μ a 2.6 μ de largo. (Sandoval, 1991, Collins y Lyne, 1989).

2.1.1. Características de *Vibrio cholerae*

Es aerobio facultativo, forma ácido pero no gas de glucosa y sacarosa (medio fermentativo de Hugh y Leifson), ni de arabinosa o lactosa; descarboxila la lisina y la ornitina, no hidroliza la arginina. (Collins y Lyne, 1989).

Puede crecer hasta temperaturas de 40.5°C y perfectamente en condiciones alcalinas, pero sin ser éste un requerimiento necesario. Estas propiedades sirven para diferenciarlo de otras especies del género vibrio. (Sandoval, 1991).

Todas las cepas poseen el mismo antígeno flagelar H termolábil, pero pueden diferenciarse en serovares por el antígeno somático O. (Collins y Lyne, 1989).

2.1.2. Morfología de las colonias

En placas de agar *V. cholerae* se observa generalmente como colonias amarillas, planas, ligeramente convexas, pegajosas, con centro opaco y periferia translúcida; con un tamaño promedio de 2-3 mm. (Giono *et al.*, 1991, Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

2.1.3. Serovar O:1

Es el causante del cólera epidémico o asiático, aglutina con el antisuero cólera O:1 específico, se diferencian dos subtipos de *V. cholerae* O:1 el Ogawa e Inaba, pero no son completamente estables, pueden presentarse variaciones *in vivo* e *in vitro*. (Freeman, 1983, Collins y Lyne, 1989, Equihua *et al.*, 1992).

Hay dos biotipos de *V cholerae* O:1, clásico (no hemolítico) y El Tor (hemolítico), el clásico en la actualidad es casi inexistente. Ambos biotipos presentan los serotipos Ogawa, Inaba e Hikojima, siendo este último muy raro. (Freeman, 1983, Collins y Lyne, 1989, Equihua *et al.*, 1992).

2.1.4. Otros serovares No O:1

Tienen características bioquímicas idénticas a *V cholerae* O:1 y el mismo antígeno H, pero posee diferentes antígenos O y no aglutina con el suero O:1 por tal se les llama no O:1 (Freeman, 1983, Collins y Lyne, 1989).

Algunas de estas cepas son sin duda potencialmente patógenas y producen una toxina similar, si no idéntica a la del vibrión del cólera. Han causado algunos brotes, aunque la mayoría de los aislamientos provienen de casos esporádicos; estos vibrios se encuentran muy difundidos en aguas dulces y salobres de muchas partes del mundo; sin embargo no causan el verdadero cólera epidémico. (Freeman, 1983, Collins y lyne, 1989, Equihua *et al.*, 1992).

2.1.5. *Vibrio cholerae* en el ambiente dulceacuícola

Últimamente se ha incrementado el estudio de *V. cholerae* O1 y no O1, en el ambiente. El punto de vista convencional que se tenía sobre *V. cholerae*, era el de un organismo que se encontraba en el medio ambiente relacionado solamente con la presencia de casos de infección humana y que sólo sobrevivía alrededor de 5 días fuera del huésped, este criterio se empieza a revisar ampliamente con relación a su distribución y comportamiento como una bacteria integrante de los circuitos microbianos en ambientes acuáticos (Feachem *et al.*, 1983).

La relación de *V. cholerae* y el agua, ha sido el punto principal de algunas investigaciones, lo cual es de gran importancia para el entendimiento de la epidemiología (Feachem *et al.*, 1983, Equihua *et al.*, 1992).

La presencia de *V. cholerae* en aguas proviene principalmente de dos fuentes: a) de ríos, tanques, pozos y de aguas para consumo humano relacionadas con la presencia de brotes y b) de sitios alejados en donde no se conocen casos de infección por *V. cholerae* en humanos (Feachem *et al.*, 1983).

Colwell *et al.*, (1977) reportaron el aislamiento de *V. cholerae* No O1 en varias partes de la Bahía de Chesapeake (USA) posteriormente, Kaper *et al.*, (1979), describieron la ecología de *V. cholerae* No O1, en la misma Bahía, en donde observaron que no hay correlación con respecto a *V. cholerae* y el conteo total de bacterias coliformes, coliformes fecales o *Salmonella*; así también que *Vibrio* no está específicamente asociado al sedimento o a los moluscos; Ventura *et al.*, (1992) realizaron muestreos de plantas que crecen en lagunas de aguas residuales y observaron que *V. cholerae* no O1 presenta un patrón cíclico asociado con las variaciones estacionales de *Aeromonas sp.* y coliformes fecales.

Se ha aislado *V. cholerae* O1 y no O1 en varios sistemas de agua continental, salada y de desechos en Australia, Bangladesh, Brasil, Inglaterra, Alemania, Japón, E.U. y la entonces URSS, (WHO, Scientific King Group 1980, citado por Feachem *et al.*, 1983), en Perú (Ventura *et al.*, 1992), pero esos aislamientos correspondían a grupos no patógenos ni toxigénicos, no obstante *Vibrio* O1 (Inaba) y no O1 han sido aislados en la Bahía de Chesapeake, también en Luisiana, los cuales mostraron evidencias de producción de toxina (Feachem *et al.*, 1983).

En Apalachicola, Florida se reportaron casos de gastroenteritis en noviembre de 1980, debidos a la ingesta de ostras detectándose a *Vibrio cholerae* no O1 como el agente causal (Madden *et al.*, 1982, Islam *et al.*, 1992).

Durante los períodos interepidémicos de *Vibrio cholerae*, no es fácil aislarlo con los métodos tradicionales de cultivo, es necesario utilizar la técnica de anticuerpos monoclonales fluorescentes, o bien realizar varios enriquecimientos para poder aislarlo (Hanna *et al.*, 1992, Brayton *et al.*, 1987). Los resultados de laboratorio han demostrado que *V. cholerae* O1 y no O1, se adapta a las células expuestas y a las condiciones ambientales con bajas concentraciones de nutrientes y baja temperatura. Sin embargo inicia su crecimiento y se multiplica cuando los nutrientes y la temperatura se incrementan. (Miyaki *et al.*, 1967; Singleton *et al.*, 1982; Colwell *et al.*, 1984, Huq *et al.*, 1990).

2.1.6. *Vibrio* en los peces

La flora viva que se encuentra en un pez dependerá fundamentalmente del contenido microbiológico del agua en donde vive así como el lodo que llega a cubrir su superficie externa, en donde se han encontrado bacterias de los géneros *Sarcina*, *Serratia*, *Vibrio* y bacilos. Desde el punto de vista de salud pública, hay que considerar, que dentro de los patógenos de peces se encuentran algunos miembros que son también patógenos oportunistas para el hombre y otros animales homeotermos, entre éstos encontramos a las diferentes especies de *Vibrio* (Feachem *et al.*, 1983, Kinkelin *et al.*, 1985; Chen y Hanna, 1992, Ocampo y Auró, 1996).

En cuanto a las enfermedades causadas por bacterias en peces, se han descrito especies patógenas en una gran variedad de grupos bacterianos, representando los bacilos Gram-negativos el porcentaje más elevado (Kinkelin *et al.*, 1985).

Los vibriones son considerados componentes de la flora autóctona del medio acuático (Huq *et al.*, 1990, Biosca y Amaro, 1991) sin embargo existen pocos estudios desde el punto de vista epizootológico con el fin de conocer los posibles reservorios o focos de infección.

Hay estudios que han demostrado una asociación entre el medio ambiente acuático, *Vibrio* sp. y un grupo de organismos quitinosos del zooplancton, los copépodos. (Feachem *et al.*, 1983, Colwell *et al.*, 1984, Huq *et al.*, 1990, Islam *et al.*, 1992), de

esto hay que tomar en cuenta que los copépodos son parte de la alimentación de los peces (Muus y Dahlstrom, 1978). Se ha observado una correlación entre la incidencia de copépodos y la distribución de *V. cholerae*, en el ambiente acuático. (Feachem *et al.*, 1983, Colwell *et al.*, 1984, Huq *et al.*, 1990, Islam *et al.*, 1992, Ventura *et al.*, 1992); así también se les ha encontrado adheridos a la superficie de las plantas, cubierta muscilaginosa de algunas algas, en sedimento.

El mecanismo de infección en los peces no está determinado claramente, se requiere primeramente la colonización y penetración del patógeno a través de los tejidos del hospedero, con el consiguiente daño a los diferentes órganos internos mediante la acción de hemolisinas y proteasas (Kinkelin *et al.*, 1985; Ocampo y Auró 1996).

Se ha demostrado que la principal puerta de entrada del patógeno en los peces son las branquias (Kinkelin *et al.*, 1985, Chen y Hanna, 1992). El intestino de los peces es la fuente para encontrar bacterias, los fluidos intestinales pueden contener cerca de mil a 100 mil millones de células por mililitro. Los peces sanos pueden constituir un reservorio de infección, se han realizado estudios de laboratorio con peces aparentemente sanos y se reportó que el 17% de éstos eran portadores de *Vibrio*. Cabe señalar que para el aislamiento de las formas cultivables es necesario emplear técnicas de enriquecimiento y medios selectivos para su detección (Feachem *et al.*, 1983, Chen y Hanna, 1992).

Los peces afectados por una vibriosis muestran hemorragia en la base de las aletas y cola, alrededor del ano y en la boca, decoloración de la piel, lesiones necróticas en la musculatura, que cuando alcanza la epidermis puede dar lugar a úlceras, exoftalmia y opacidad corneal. Internamente el hígado aparece pálido y ocasionalmente el intestino puede contener un líquido viscoso. (Kinkelin *et al.*, 1985, Itami *et al.*, 1989).

Otros factores que contribuyen a la aparición de vibriosis son la mala calidad del agua y deficiencias en la manipulación de los peces, por ejemplo en las piscifactorías (Toranzo *et al.*, 1984; Kinkelin *et al.*, 1985).

2.1.7. *Vibrio* en pescados para consumo humano.

Las aguas contaminadas con desechos humanos, son causa importante para la propagación de *Vibrio cholerae*. Los animales acuáticos se contaminan cuando en el medio se presenta el agente causal de la enfermedad (OMS/OPS, 1991 a, b).

Las epidemias ocurridas en el pasado, sobre todo en los países asiáticos, se atribuyen principalmente al consumo de agua contaminada, y en menor grado al consumo de alimentos. (OMS/OPS, 1991 a, b).

Por otra parte, los episodios de transmisión a través de los alimentos son actualmente frecuentes. Estos comprenden desde brotes epidémicos extendidos (Iolno en Italia, Sicilia), por el consumo de moluscos, hasta brotes circunscritos, como en viajes aéreos (OMS/OPS, 1991 a, b).

Las pruebas de transmisión alimentaria, explican de manera consistente la actual epidemia de cólera en Perú. Esta propagación/transmisión alimentaria, está relacionada con los hábitos alimenticios, la situación socioeconómica y especialmente con las condiciones sanitarias de la población afectada (OMS/OPS, 1991 a, b, Swerdlow *et al.*, 1992).

La venta de alimentos en lugares públicos, incluida la calle, han sido una práctica tradicional en América Latina, durante los últimos decenios, ésta actividad ha aumentado por diversas razones, entre estas la baja situación socioeconómica y especialmente las condiciones sanitarias de la población afectada situación que requiere la atención prioritaria de las autoridades responsables.(OMS/OPS, 1991 a, b).

La congelación de los alimentos, no necesariamente implica la muerte y ausencia de *V. cholerae*; este organismo puede sobrevivir largos períodos de tiempo a bajas temperaturas en presencia de materia orgánica. Los crustáceos y moluscos tienen más probabilidad de portar vibriones, lo que plantea un alto riesgo cuando se consumen crudos o mal cocinados (Pesigan *et al.*, 1967, Hoover, 1985, Feachem *et al.*, 1983, OPS, 1991).

Se ha reportado en algunos estudios realizados por la OMS/OPS (1991 a), una supervivencia de *V. cholerae* en alimentos refrigerados (Pescados y mariscos) a

temperaturas de entre 5 y 10°C por períodos de 7 a 14 días, aún cuando los alimentos ya no servían para consumo humano.

La viabilidad de los vibriones fuera del huésped humano, tiene una gran importancia epidemiológica; el cólera es una enfermedad típicamente hidrottransmisible y que además utiliza la ruta fecal-oral mediante la cual una persona puede infectar a otra (Pesigan *et al.*, 1967. Barua *et al.*, 1971; Hoover, 1985).

La supervivencia de los vibriones en el medio ambiente depende de varios factores: temperatura 37°C óptima, pH de 6-8, presión osmótica de 250mOsm-700mOsm, grado de humedad, concentración de sales e hidratos de carbono, presencia de materia orgánica y de otras bacterias (Miyaki *et al.*, 1967; Barua *et al.*, 1971).

Estudios realizados por Broek *et al.*, (1984) en filetes de pescado fresco obtenido en los mercados de Holanda, demostraron que éstos pueden contaminarse por la manipulación de personas infectadas y el mal almacenamiento.

Con respecto a los alimentos contaminados en el lugar de origen debemos considerar seriamente que continuarán en ese estado probablemente, hasta el momento de su consumo. Los pescados y mariscos procedentes de aguas contaminadas no deberán utilizarse para consumo humano cuando estalle o aparezca un brote de cólera (Barua *et al.*, 1971). Hay reportes en los cuales los pescados y mariscos han sido causantes de brotes de cólera (OPS, 1991).

2.2 Importancia del área de estudio

Los estudios en Valle de Bravo son escasos, Olvera *et al.* en 1992 citan los realizados por la SARH en 1973, en su boletín hidrológico No. 49, en donde se presenta la morfología e hidrología de la presa, el trabajo de López en 1971, describiendo el basamento calcáreo de la cuenca donde se construyó la presa, actualmente cubierta por materiales volcánicos; el trabajo realizado por Bueno y Márquez en 1975, sobre insectos acuáticos, el estudio realizado por la Comisión de Aguas del Valle de México SARH en 1979, sobre el sistema Cutzamala; un trabajo de Olvera en 1992, sobre limnología, monitoreo de *V. cholerae* y manejo de la cuenca de Valle de Bravo y tres tesis sobre plancton de la presa, (Franco, 1981;

Elias, 1982 y Chávez, 1986) y la tesis de maestría de Olvera en 1990, sobre la eutroficación del embalse.

Además de abastecimiento, la presa Valle de Bravo es un centro turístico importante, siendo vital para la economía de las poblaciones de Valle de Bravo y Avándaro, asentadas junto al embalse, desde 1973 se han realizado siembras de diversas especies de importancia comercial (Trucha, Tilapia, Charal y Lobina) para fomentar la pesca deportiva y comercial (Franco, 1981).

De acuerdo con Deguchi *et al.*, (1980), la ictiofauna introducida a la presa Valle de Bravo está compuesta por trucha arcoiris, charal, carpa común, carpa Israel, Kingyo, mojarra agalla azul, mojarra verde y mojarra africana.

Los ríos, canales y embalses, plantean difíciles problemas de inspección y saneamiento, por el hecho de que las poblaciones ribereñas utilizan el agua para todas sus necesidades (bañarse y beber) así como extraer de ésta el pescado que incluyen en su dieta (Barua *et al.*, 1971).

Esto significa que además de la amenaza que representan para la salud los abastecimientos de agua potable y cultivos alimenticios irrigados, existe la amenaza por pescado y mariscos, que generalmente se comen crudos o no se cocinan lo suficiente (OPS. 1991).

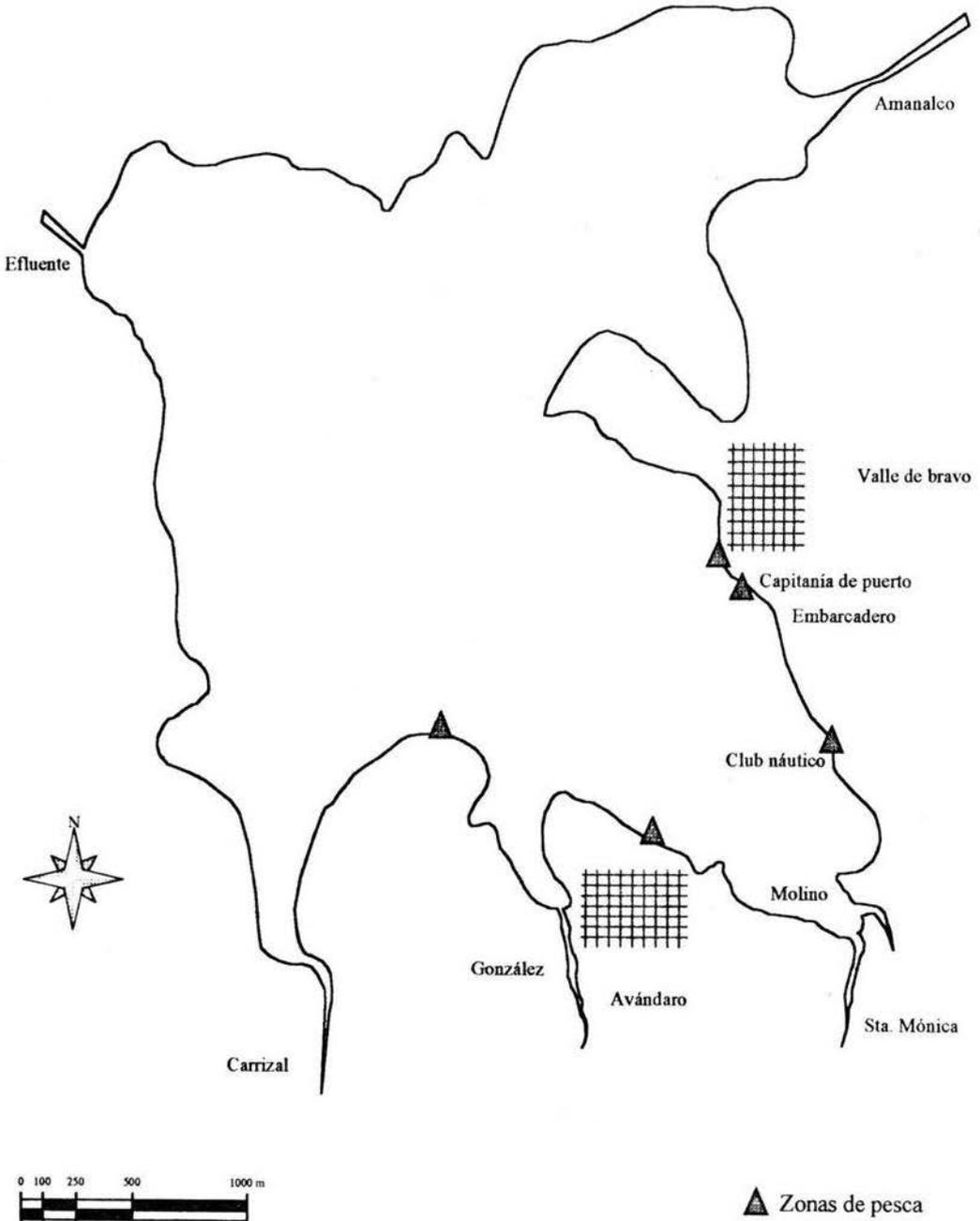
Considerando Valle de Bravo como uno de los centros turísticos más importantes en el Estado de México, es necesarios realizar estudios de la ictiofauna presente, ya que ésta es el punto de partida para el desarrollo de futuras investigaciones, base para el conocimiento de su biología, fomento pesquero, piscicultura y pesca deportiva base para el adecuado mantenimiento de las poblaciones de peces y por ende el de la población que se alimenta de ellas.

2.2.1. Ubicación geográfica del área de estudio

La presa Valle de Bravo (Figura 1) se localiza en el municipio del mismo nombre en el estado de México, a 19°21'30" latitud norte y 100°11'00" longitud oeste a 1830 msnm; captando el agua de una cuenca de 546.9 Km². La cuenca presenta un clima (A) C(W1) (W) o sea, templado subhúmedo y semicálido con temperatura media anual mayor de 18°C y la del mes más frío menor a 18°C, con un cociente

P/T entre 43.2 y 55.3 y una precipitación invernal menor del 5% anual. Fisiográficamente se constituye de lomeríos con mesetas, el suelo dominante es acrisol órtico y andosol húmico de textura media con lecho rocoso entre 10 y 50 cm. de profundidad. La vegetación consiste de bosque de pino-encino, vegetación secundaria y agricultura de temporal (SPP., 1981).

Figura 1: Mapa del embalse de Valle de Bravo, Estado de México.



3 OBJETIVOS:

3.1. Objetivo general

Aislar e identificar *Vibrio cholerae* en peces de agua dulce, del embalse de Valle de Bravo, Estado de México.

3.2. Objetivos particulares

Evaluar el sistema miniaturizado API-20E, con respecto a las pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de *V. cholerae* en pescado.

Evaluar la frecuencia de *V. cholerae* en diferentes especies comestibles de pescado de Valle de Bravo, Estado de México.

Evaluar la frecuencia de *V. cholerae* en diferentes partes de pescado (músculos, branquias, intestinos e hígados)

4 MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Colecta y transporte de muestras

De junio a diciembre de 1992 se realizaron 8 muestreos en el embalse de Valle de Bravo, estado de México, durante éstos se obtuvieron directamente con los pescadores ribereños de la zona pescados para consumo, según la época de veda establecida por la secretaría de pesca para el lugar y en los lugares que los pescadores utilizan normalmente para pescar (Ver figura 1)., obteniéndose en total 48 muestras que contenían en promedio cinco pescados de la misma especie cada una, contenidos en bolsas de plástico con medio de transporte Cary-blair, correspondiendo 8 a tilapia (*Oreochromis sp*), 14 para lobina (*Micropterus salmonides*), 10 de mojarrita (*Lepomis macrochirus*), 6 de charal (*Chirostoma bartoni*) y 10 de carpa (*Cyprinus carpio*), de estas muestras se aislaron 1800 cepas de las que se descartaron como negativas para *V. cholerae* 1473 quedando sólo 327 cepas presuntivas positivas para *V. cholerae* que se analizaron con dos métodos: el de identificación tradicional con bioquímicas y con el sistema miniaturizado API-20E, en forma paralela.

Las muestras, se transportaron en bolsas de plástico estériles conteniendo aproximadamente 300 mL de medio de transporte Cary-blair con pH de 8.2, se depositaron en hieleras para evitar la descomposición del pescado y proliferación de otras bacterias (Gram, *et al* 1986), las bolsas se etiquetaron con los datos de la localidad, fecha de colecta, número de la muestra y nombre vulgar del pescado y se trasladaron al laboratorio del Centro de Investigación y Estudio de Control de Calidad del Agua-Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (CIECCA-IMTA) en la ciudad de México para su procesamiento (Sánchez, 1991).

4.2. Identificación de las especies de pescado obtenidas

En el laboratorio, con ayuda de claves para la identificación de peces mexicanos de Alvarez, (1970) se observaron las características morfológicas de cada uno de los pescados para identificarlos hasta género y especie.

4.3. Aislamiento de *V. cholerae* en pescado por la técnica de doble enriquecimiento.

4.3.1 Concentración de la muestra

En el laboratorio, a la muestra se le quitaron las escamas con una pinza estéril y la piel con tijeras, posteriormente las aletas y cola utilizando tijeras estériles. La branquias y vísceras se eliminaron manualmente y para quitar el músculo se utilizó una navaja de disección estéril. Todo lo anterior se realizó utilizando guantes estériles, cubrebocas y charola de disección o papel aluminio estéril. (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991) (Ver figura 2, secc. 1).

Se prepararon macerados de las siguientes partes del pescado: Branquia, músculo, intestino y hígado-riñón, (en resultados sólo se manejará como hígado por conveniencia).

Se obtuvieron 50 g tomando proporciones de varios pescados de la misma especie, se licuó en una licuadora Osterizer en alta velocidad durante cinco minutos aproximadamente, esto en condiciones estériles y conteniendo 150 mL de agua peptonada alcalina estéril pH 9.2 (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991,).

En el caso de branquia, hígado-riñón, se pesó la muestra obtenida en proporción de varios pescados de la misma especie y se adicionó un gramo de muestra por cada 10 mL de APA y se procedió a macerar en las mismas condiciones (Giono *et al.*, 1991).

4.3.2. Primer enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina (APA)

El macerado se filtró con gasa estéril para evitar exceso de materia orgánica, el líquido filtrado se colocó en un frasco estéril llevándolo a un volumen total de 500 mL de APA concentración doble y pH 9.2 (se realizaron muestras piloto para observar la acidificación del medio con la muestra, y se determinó que el pH de 9.2 era el adecuado para mantener el medio alcalino durante la incubación). en el caso de branquia, hígado-riñón, se pesó la muestra obtenida y se adicionó un gramo de muestra por cada 10 mL de APA, se incubó a 37°C durante 8 horas. Se realizó en

forma paralela la inoculación con *V. cholerae* O1, 12-CDC como cepa control, (Giono *et al.*, 1991; Sandoval, 1991).

4.3.3. Segundo enriquecimiento en APA

Se realizó el segundo enriquecimiento en APA, de la siguiente forma: de los primeros frascos de APA con macerado ya incubados, se tomaron 2 mL de muestra de la parte superficial con una pipeta pasteur estéril y se colocaron en 10 mL de APA concentración simple con un pH de 9.2 en matraz erlenmayer de 250 mL con tapa de papel aluminio, se etiquetaron con los datos correspondientes y se incubaron a 37°C durante 8 horas. (Sandoval, 1991; Sánchez, 1991).

4.3.4. Aislamiento, en agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sacarosa (TCBS)

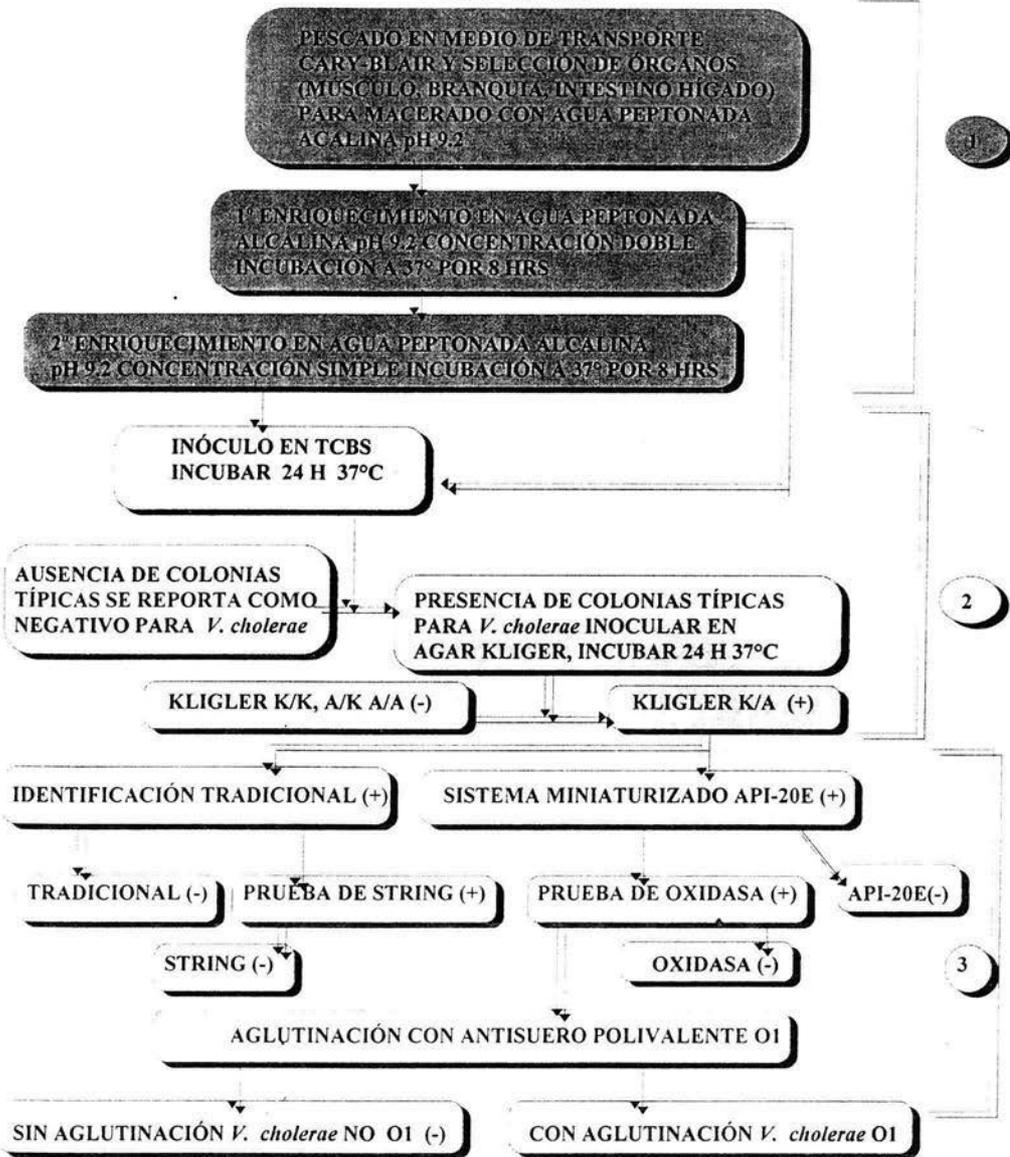
Después de incubar tanto en el primero como en el segundo enriquecimiento se formó en la superficie una biopelícula (generalmente en esta se encuentran los vibrios) ésta se tomó con un isopo estéril y se descargó en la caja con medio selectivo TCBS, sembrando por estría cruzada, el asa se flameó en cada estriado con el objeto de obtener colonias aisladas, este procedimiento se realizó por duplicado. (West *et al.*, 1982; Giono *et al.*, 1991; Sandoval, 1991) (Ver figura 2, sección 2).

Las placas inoculadas se invirtieron, se marcaron con los datos que corresponden a la muestra y la fecha de sembrado, incubándolas a 37°C durante 18 horas, cuando el crecimiento era insuficiente el periodo de incubación se continuó hasta completar las 24 horas (West *et al.*, 1982; Giono *et al.*, 1991; Sandoval, 1991).

4.3.5. Aislamiento en agar Kligler

Las colonias típicas en el medio TCBS para *V. cholerae*, deben ser: Amarillas planas, ligeramente convexas, pegajosas con centro opaco y periferia translúcida, con un tamaño promedio de 2-3 mm (West *et al.*, 1984, Giono *et al.*, 1991, Sánchez, 1991, Sandoval, 1991) (Ver figura 2, sección 2).

Figura 2: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio cholerae*



1 =CONCENTRACIÓN, 2 =AISLAMIENTO, 3 =IDENTIFICACIÓN,
A=ÁCIDO, K=ALCALINO.

De cada caja de medio selectivo TCBS se aislaron en promedio cinco colonias típicas para *V. cholerae* sacarosa positiva y negativa y se transfirieron a tubos de ensaye previamente preparados con medio Kligler inclinado, inoculando por estría y picadura, se incubaron a 37°C durante 24 horas. (Se tomaron también algunas colonias verdes sacarosa negativa, como sugerencia personal de la Dra. Sánchez, durante el proceso ya que existen algunas cepas que se consideran lentas para fermentar este azúcar, por lo tanto producen colonias verdes) (Giono *et al.*, 1991, Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

Después de la incubación se seleccionaron los tubos de agar Kligler, con reacción alcalina/ácida (K/A), los cuales son considerados como posibles positivos para *V. cholerae* (se realizó un análisis previo de los tubos A/A A/K, observándose que éstos pertenecían a otras bacterias) (Sánchez, 1991).

4.4. Identificación de *V. cholerae*

La identificación se realizó sólo con las cepas que dieron reacción presuntiva positiva para *V. cholerae* en Kligler (K/A). La identificación de *V. cholerae* se realizó utilizando dos métodos, el tradicional con bioquímicas que incluyeron: agar de hierro y triple azúcar (TSI), agar de hierro y lisina (LIA), medio para movilidad, indol y ornitina (MIO), caldo arginina o base Möeller y caldo triptófano, utilizados en el CIECCA-IMTA y el otro método fue con el sistema miniaturizado Analytical Profile Index para 20 pruebas para enterobacterias (API-20E), para posteriormente aplicar las pruebas de oxidasa, y bioquímicas confirmativas, la prueba de string solo se aplico a la identificación tradicional con bioquímicas.

4.4.1. Identificación tradicional de *V. cholerae* con pruebas bioquímicas.

De cada tubo con agar kligler seleccionado como positivo para *V. cholerae* K/A se tomó una cantidad suficiente de crecimiento bacteriano para inocular los cinco tubos que conforman la serie bioquímica iniciando con los caldos, siguiendo con el medio semisólido y finalmente con los medios sólidos (Figura 2 secc. 3 y figura 3).

a) Caldo arginina o base Möeller

Es un medio básico al cual se le añadieron los aminoácidos, con el fin de determinar cuales son las bacterias que pueden descarboxilarlos (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 991).

El inóculo se sembró por asada y se incubó de 1 a 4 días a 37°C, para poder darlo como prueba negativa.

En este medio se determinó la descarboxilación de la arginina en anaerobiosis, este caldo se selló con aceite mineral estéril (0.5 mL) para evitar el contacto con el aire (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991).

b) Caldo de Triptófano

Se utilizó para observar la producción de indol. Se sembró por asada y se incubó a 37°C durante 24 horas, para la lectura se agregaron 5 gotas del reactivo de Erlich (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991).

c) Medio para Movilidad, Indol y Ornitina (MIO)

Es un medio semisólido que se sembró por picadura, se incubó a 37°C durante 24 horas, sirve para leer movilidad y descarboxilación de la ornitina (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991).

d) Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)

Es un medio que se prepara inclinado, se sembró por picadura y estría y se incubó a 37°C. Este medio sirve para determinar la fermentación de la 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 adquiriendo un color negro en el fondo del tubo o a lo largo de la picadura (Sandoval, 1991).

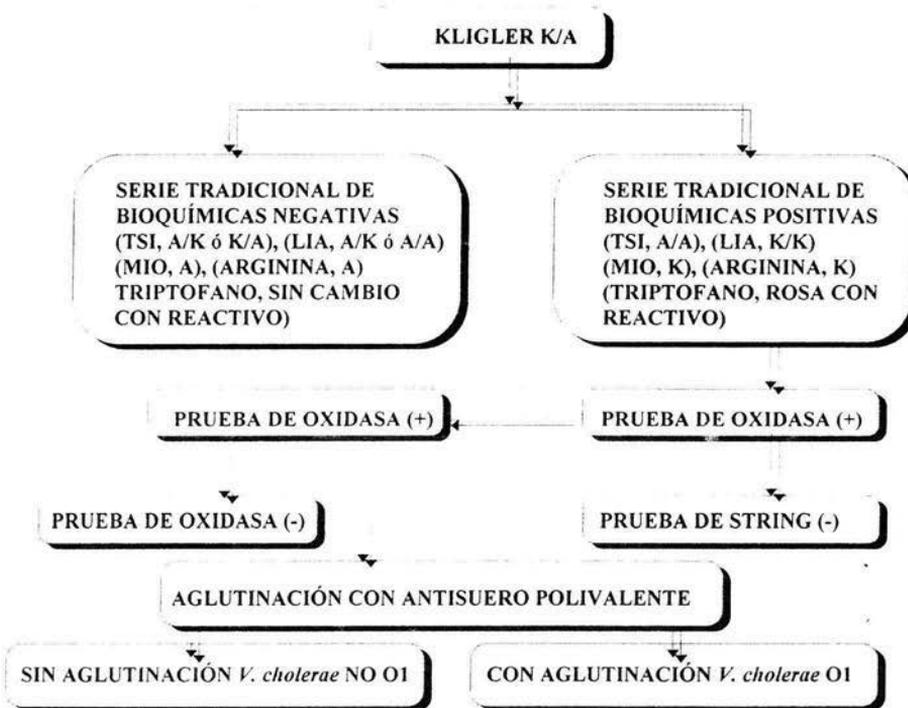
La fermentación de la glucosa se lleva a cabo en anaerobiosis, por lo que la prueba se debe leer en el fondo del tubo (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991).

e) Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Es un medio que se prepara inclinado, se inoculó por doble picadura y estría en la superficie. Se inoculó a 37°C durante 24 horas. En este medio se determinó 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 (Giono *et al.*, 1991, Sandoval, 1991).

En las primeras horas de incubación el medio adquiere coloración amarilla, más después del periodo total previsto para la incubación éste adquiere el color violeta inicial. (Giono *et al.*, 1991).

Figura 3 IDENTIFICACIÓN TRADICIONAL DE *V. cholerae* CON BIOQUÍMICAS



A=ácido, K=alcalino.

4.4.2. Identificación de *V. cholerae* con el sistema miniaturizado API-20E

Este sistema de pruebas miniaturizado, es originalmente desarrollado para la identificación de bacterias entéricas Gram-negativas de laboratorios clínicos, no obstante la utilización de éste sistema se ha ido incrementando desde la pasada década, para la identificación de organismos patógenos de peces de agua dulce y marina (Holmes *et al.*, 1978; Kaper *et al.*, 1979; Veys *et al.*, 1989; Grisez *et al.*, 1991; Schindler y Metz, 1991) (figura 4).

El sistema miniaturizado API-20E, se compone de tiras reactivas que permiten la identificación de las bacterias aisladas mediante 20 pruebas bioquímicas, más 6 pruebas complementarias.

Cada prueba bioquímica en el sistema API-20E ya sea negativa o positiva, proporciona un número para formar un código de 7 dígitos que se consulta en el catálogo del mismo sistema, esto nos permite la identificación de la bacteria aislada hasta género y especie.

4.4.3. Procedimiento de 18 a 24 horas con el sistema de API-20E

De cada tubo con agar kligler seleccionado como positivo para *V. cholerae* K/A se tomó una cantidad suficiente de crecimiento bacteriano para inocular en agar nutritivo para obtener un cultivo puro y fresco de 24 horas (Manual API-20E, 1986) (Figura 2, sección 3 y figura 4).

a) Preparación de la suspensión bacteriana

En un tubo de ensaye se adicionaron 5 mL de solución salina 0.85% con pH 7.0 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Con un asa flameada para inoculación, se tomó un número suficiente de colonias y se emulsificó en la solución salina previamente esterilizada. La suspensión se comparó con el estándar nefelométrico de McFarland (BaSO_4), hasta que la suspensión fue equivalente al tubo número 1 de la escala.

b) Preparación de las tiras reactivas.

Se colocó la bandeja de inoculación y se anotó en la pestaña de ésta el número de la muestra, la clave y la fecha de inoculación.

Se vertieron 5 mL de agua destilada en la cámara de la bandeja de incubación para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.

c) Inoculación de las tiras reactivas

El API-20E, contiene 20 microtubos cada uno de los cuales consiste de un microtubo y una cápsula.

Del tubo que contenía la suspensión bacteriana se tomaron 5 mL con una pipeta Pasteur estéril y se procedió al llenado de cada uno de los microtubos, colocando la punta de la pipeta en la pared de la cúpula teniendo cuidado de que no se formaran burbujas.

Las secciones que corresponde al ADH, LDC, ODC, H₂S y URE, se llenaron ligeramente por debajo de la marca del microtubo.

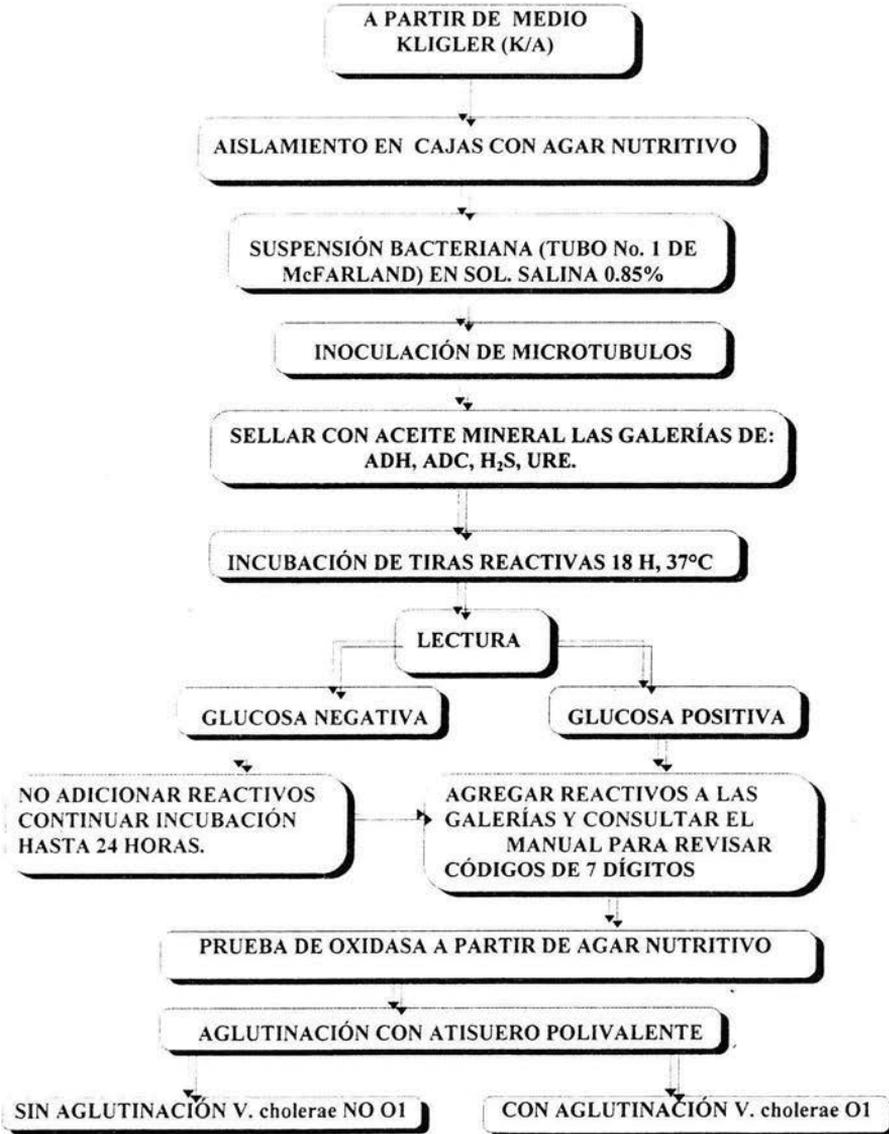
Los microtubos correspondientes a CIT, VP y GEL se llenaron tanto la sección del microtubo como la cápsula.

Después de la inoculación se sellaron con aceite mineral la cúpula de los microtubos correspondientes a: ADH, LDC, ODC, H₂S y URE.

d) Incubación de las tiras reactivas

Después de la inoculación se colocó la tapa de plástico sobre la bandeja conteniendo la tira reactiva previamente inoculada y se incubó a 38°C durante 18 a 24 horas.

**Figura 4: IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio cholerae* CON API-20E
PROCEDIMIENTO DE 18 A 24 HORAS**



e) Lectura de las tiras reactivas de API-20E

Después de la incubación se procedió a la lectura de las tiras reactivas, tomando como patrón de referencia la reacción de los azúcares, principalmente la glucosa, se le adicionaron los reactivos según lo indica la guía para obtener el código de siete dígitos y consultarlos en el índice para determinar el género y especie de la bacteria en cuestión.

4.5. Prueba de Oxidasa

Esta prueba se efectuó en un cultivo de crecimiento fresco, procedente de Kligler para identificación tradicional con bioquímicas y de agar nutritivo para API-20E (las colonias se deben investigar de un medio no selectivo) (Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

Sobre un pedazo de papel filtro, colocado en una caja petri se añadieron de 1 a 2 gotas de reactivo de oxidasa, en seguida se extendió el cultivo sobre el papel húmedo con la ayuda de un aplicador de madera estéril y se esperó 30 segundos para observar el viraje del indicador que debe ser a morado o violeta en el caso de *V. cholerae* (Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

4.6. Prueba de String o Hilo mucoso

Se colocó una gota del reactivo de desoxicolato de sodio al 0.5% sobre un portaobjetos y con un asa de siembra se tomó una colonia aislada a partir de un medio de cultivo fresco de Kligler del tubo presuntivo positivo para *V. cholerae* y se resuspendió en el reactivo, la cual después de 30 segundos se torna viscosa y al momento de levantar el asa de siembra se formó un hilo con la suspensión (Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

Los cultivos negativos se desecharon como no válidos, los cultivos positivos se separaron para realizar las pruebas, serológicas confirmativas.

4.7. Pruebas bioquímicas confirmativas.

A las cepas con lectura de las reacciones bioquímicas efectuadas en agar LIA, TSI, MIO Caldo Arginina y Caldo triptófano, que dieron reacción positiva para *V. cholerae* se les realizaron las pruebas bioquímicas confirmativas así también a los API que presentaron los códigos positivos para *V. cholerae* (Giono *et al.*, 1991, Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

4.7.1. Serología

En un portaobjetos limpio se colocaron en un extremo dos gotas separadas de solución salina al 0.6% (para inactivar a las bacterias), utilizando un asa de siembra recta se tomó parte del cultivo desarrollado en agar TSI (K/A), recientemente incubado de la muestra problema y en cada una de las gotas contenidas en el portaobjetos se colocó una asada del mismo, emulsificando el inóculo, se realizó la mezcla efectuando movimientos circulares durante 30 segundos y verificando que la suspensión fuera uniforme. (Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

A una de las gotas se le adicionó una gota de suero polivalente anti-*V. cholerae* O1 y a la otra una gota de solución fisiológica al 0.85%, se efectuó el homogenizado de ambas gotas por separado durante 30 segundos.

Se realizó la lectura comprobando si ocurría o no aglutinación, si la bacteria en prueba era *V. cholerae* O1 ocurría una reacción antígeno anticuerpo que se visualizaba por la aglutinación del cultivo al cual se le agregó el antisuero y ausencia de aglutinación en donde se agregó la solución salina al 0.85%. Si el cultivo en prueba provenía de cepas rugosas, se presentaba aglutinación en ambas gotas (Sánchez, 1991, Sandoval, 1991).

4.8. Toma de muestras para el análisis de bacterias asociadas a pescados de Valle de Bravo, Estado de México.

Para conocer las diferentes bacterias asociadas a los pescados de Valle de Bravo se realizaron aislamientos de los diferentes crecimientos bacterianos que se presentaron en las cajas de TCBS y Kligler A/K y A/A analizándose con el sistema miniaturizado API-20E.

4.9. Análisis Estadístico

Para establecer la relación entre pruebas bioquímicas tradicionales y el sistema miniaturizado API-20E se calculó el coeficiente de correlación para variables en escala nominal dicotómica. Para determinar si la presencia de *V. cholerae* estaba relacionada con la especie de pescados y los órganos (músculos, branquias, intestinos e hígados) se aplicaron pruebas de Ji-cuadrada (X^2) (Zar, 1974), para realizar los cálculos estadísticos se utilizó el paquete de cómputo microstat versión 1, 1984.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de pescados obtenidos en el embalse de Valle de Bravo estado de México.

Tabla 1: Especies de pescado obtenidas en el Embalse de Valle de Bravo

<i>Nombre vulgar</i>	<i>Nombre científico</i>
Tilapia, mojarra negra	<i>Oreochromis sp</i>
Lobina	<i>Micropterus salmonides</i>
Mojarrita, mojarra verde	<i>Lepomis macrochisu</i>
Charal	<i>Chirostoma bartoni</i>
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>

Identificación realizada siguiendo las claves para peces mexicanos (Alvarez, 1970).

5.2. Aislamiento e identificación de *V. cholerae* en pescados de Valle de Bravo, estado de México.

Se obtuvieron en total 48 muestras integradas cada una en promedio por cinco pescados de la misma especie, correspondiendo 8 a tilapia (*Oreochromis sp*), 14 para lobina (*Micropterus salmonides*), 10 de mojarrita (*Lepomis macrochirus*), 6 de charal (*Chirostoma bartoni*) y 10 de carpa (*Cyprinus carpio*), de estas muestras se obtuvieron en promedio 1800 cepas hasta el paso de aislamiento con agar kligler y se descartaron como negativas para *V. cholerae* (A/K, K/K) 1373 cepas quedando sólo 327 cepas como presuntivas para *V. cholerae* a partir de agar kligler éstas cepas se analizaron por dos métodos, bioquímicas y API-20E, en forma paralela y con los que se detectó la presencia de *V. cholerae* no O1 infectando músculo, branquia, intestino e hígado, esto nos indica que el 100% de los pescados analizados se encontraron contaminados por *V. cholerae* o por otras bacterias de importancia médica para el hombre.

Para el análisis estadístico y comparación entre los dos métodos utilizados solo se consideraron las 327 cepas que se tomaron como presuntivas para *V. cholerae*, después de realizar la selección con agar kligler.

5.3. Evaluación del sistema miniaturizado API-20E contra identificación tradicional con bioquímicas en pescado.

Se realizó la comparación de bioquímicas contra el sistema miniaturizado API-20E para determinar la presencia de *V. cholerae* y establecer las diferencias existentes entre éstos dos métodos para la determinación de ésta bacteria. Se analizaron 327 cepas que se identificaron por dos métodos: identificación tradicional con pruebas bioquímicas y API-20E paralelamente, obteniéndose los siguientes resultados: 135 (42.28%) de las cepas analizadas resultaron positivas para *V. cholerae* no O1 por el sistema API-20E e identificación tradicional y 126 (38.53%) dieron reacción negativa en ambas pruebas y sólo 66 (20%) tuvieron diferencia en los resultados obtenidos. Para estos datos se trabajó con un coeficiente de correlación dicotómico, obteniéndose una correlación de 0.60 ($r=0.60$) con una probabilidad de 3.67×10^{-7} ($P=3.67 \times 10^{-7}$) y una Ji-cuadrada de 25.86 ($\chi^2=25.86$) lo cual nos indica que hay correlación entre ambas pruebas (Tabla 2, figura 4).

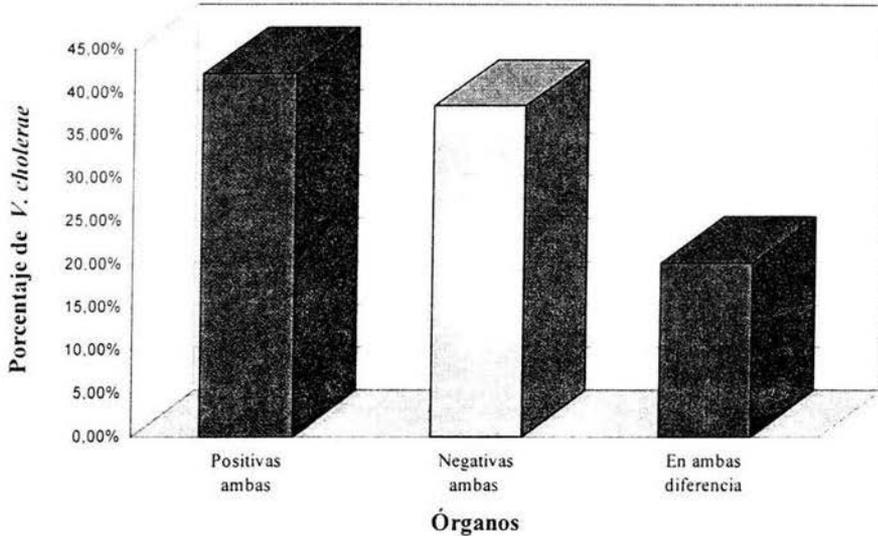
Tabla 2: Relación de presencia de *V. cholerae* determinado por identificación tradicional con bioquímicas y API-20E, en pescados de Valle de Bravo, Edo. de México.

Ambas Pruebas Positivas	Ambas Pruebas Negativas	Diferencias en Ambas Pruebas	
TRAD(+) API(+)	TRAD(-) API(-)	TRAD(+)API(-)	Total
135	126	66	327
42.28%	38.53%	20.18%	100%

$\chi^2=25.86$; $P=3.67 \times 10^{-7}$; $r=0.60$

TRAD= IDENTIFICACIÓN TRADICIONAL CON BIOQUÍMICAS

Figura 5: Comparación de la presencia de *V. cholerae* determinado con método tradicional y API-20E



5.4. Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes especies de pescado comestible del embalse de Valle de Bravo, estado de México.

Tomando las cinco especies de pescado obtenidas del embalse se analizó la presencia de *V. cholerae* para determinar en cual de ellos era más frecuente aislar *Vibrios*. De tilapia (*Oreochromis sp*) se analizaron en total 57 (17.42%) cepas obtenidas de muestras compuestas, de éstas 40 (12.23%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y 17 (5.19%) cepas fueron negativas para *Vibrio*; para lobina (*Micropterus salmonide*) se procesaron en total 72 (22.01%) cepas, 46 (14.06%) resultaron positivas para *V. cholerae* no O1 y 26 (7.95%) fueron negativas; para mojarrita (*Lepomis macrochirus*) de un total de 81 (24.77%) cepas analizadas, 48 (14.67%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1, mientras que sólo 33 (10.09%) dieron reacción negativa, para charal (*Chirostoma bartoni*) de un total de 56 (17.12%) cepas analizadas 43 (13.14%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1, mientras que 21 (6.42%) resultaron negativas y para Carpa (*Cyprinus carpio*) se revisaron un total de 61 (18.65%) cepas, de las cuales 40 (12.23%) dieron reacción positiva para *V. cholerae* no O1, y 21 (6.42%) resultaron negativas.

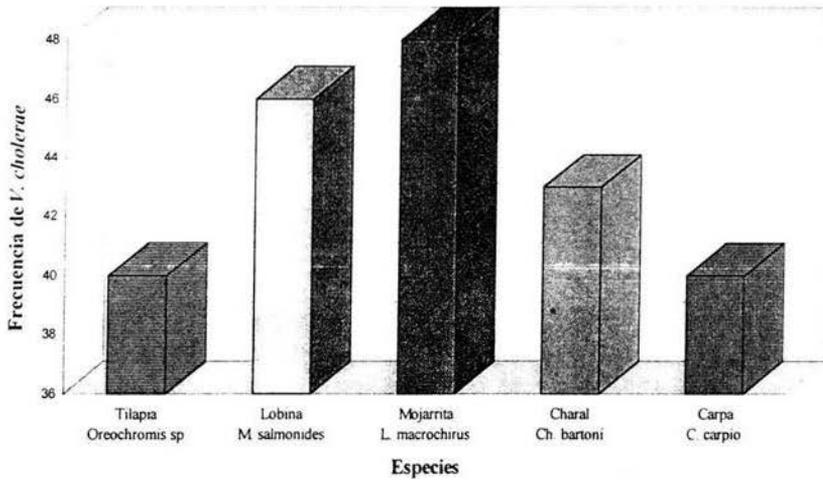
Para determinar si *Vibrio* muestra preferencia para infectar alguna especie de pescado en particular, se aplicó a los resultados obtenidos una prueba de Ji cuadrada y la probabilidad, para analizar que relación guardan entre sí, de lo anterior se obtuvieron los siguientes resultados: Ji-cuadrada de 5.14 ($X^2=5.14$) con una probabilidad de 0.27 ($P=0.27$), éstos resultados nos indican que no existe relación estadísticamente significativa entre *V. cholerae* no O1 y las especies de peces del embalse. *Vibrio* no presenta especificidad hacia alguna de las especies extraídas del embalse

Tabla 3. Frecuencia de *V. cholerae* en muestras de pescado de Valle de Bravo, Edo. de México (Músculo, branquia, intestino, hígado)

	Tilapia <i>Oreochromis</i> <i>sp</i>	Lobina <i>Micropterus</i> <i>salmonides</i>	Mojarrita <i>Lepomis</i> <i>macrochirus</i>	Charal <i>Chirostoma</i> <i>bartoni</i>	Carpa <i>Cyprinus</i> <i>carpio</i>	Total
Presencia (+)	40 12.23%	46 14.06%	48 14.67%	43 13.14%	40 12.23%	217 66.36%
Ausencia (-)	17 5.19%	26 7.95%	33 10.09%	13 3.97%	21 6.42%	110 33.64%
Total	57 17.42	72 22.01	81 24.77	56 17.12	61 18.65	327 100%

$X^2=5.14$; $P=0.27$

Figura 6: Frecuencia de *V. cholerae* en pescados de Valle de Bravo, Estado de México



5.5. Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes órganos de pescados

Cada una de las especies obtenidas del embalse se examinaron por separado para determinar con precisión en que región del pescado se localizaba *Vibrio*, se revisaron músculos, branquias, intestinos e hígados de cada una de las cinco especies obtenidas en el embalse, preparando en todos los casos muestras compuestas de varios pescados de la misma especie.

5.5.1 Presencia de *V. cholerae* en tilapia

Para tilapia (*Oreochromis sp*) se aislaron en total 57 (100%) cepas; correspondiendo a músculo 12 (21%), de los cuales 11 (19.3%) fueron positivos para *V. cholerae* no O1 y solo 1 (1.7%) resultó negativa; para branquia se analizaron un total de 17 (29.8%) cepas, de éstas 10 (17.5%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y 7 (12.2%) dieron reacción negativa; de intestino, se analizaron 12 (21%) cepas, de las que 9 (15.7%) dieron resultados positivos para *V. cholerae* no O1, mientras que sólo 3 (5.2%) fueron negativas y para hígado se analizaron 16 (28%) cepas en total y de éstas 10 (7.5%) presentaron reacción positiva para *V. cholerae* no O1, mientras que 6 (28.6%) fueron negativas.

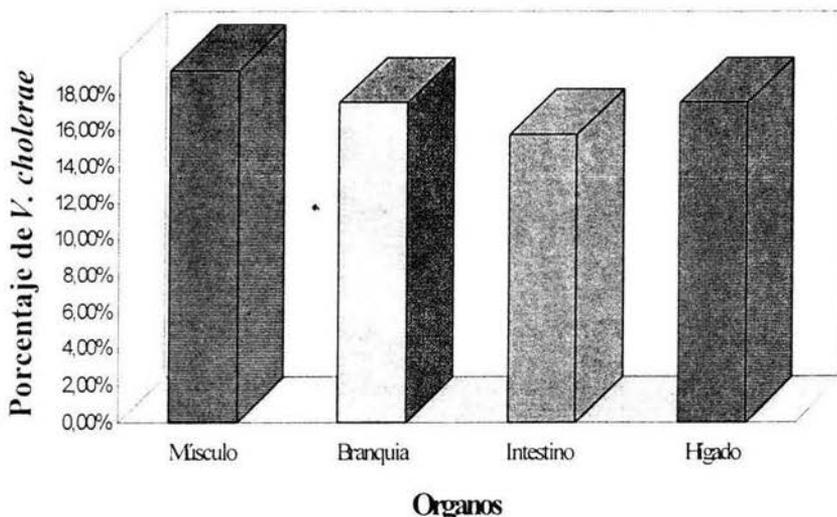
Del análisis estadístico se obtuvo una Ji-cuadrada de 4.28 ($\chi^2 = 4.28$) y una probabilidad de 0.23 ($P=0.23$), éstos resultados nos indican que no existe correlación estadísticamente significativa entre *V. cholerae* no O1 y el órgano del pescado infectado; esto es que *Vibrio* no presenta ninguna tendencia a infectar un órgano en particular (Tabla 4, Figura 6).

Tabla 4: Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes órganos de Tilapia (*Oreochromis sp*)

	<i>Músculo</i>	<i>Branquia</i>	<i>Intestino</i>	<i>Higado</i>	<i>Total</i>
Presencia (+)	11 19.30%	10 17.54%	9 15.78%	10 17.54%	40 70.2%
Ausencia (-)	1 1.75%	7 12.28%	3 5.26%	6 10.52%	17 29.82%
Total	12 21.05%	17 29.82%	12 21.04%	16 28.06%	57 100%

$\chi^2=4.28$; $P=0.23$

Figura 7: Frecuencia de *V. cholerae* en órganos de Tilapia (*Oreochromis sp*)



5.5.2. Presencia de *V. cholerae* en lobina

En el caso de lobina (*M. salmonides*) se aislaron un total de 72 cepas, de éstas correspondieron a músculo 21 (29%), siendo 13 (18%) positivas para *V. cholerae* no O1 y 8 (11%) negativas; para branquia se revisaron 13 (18%) cepas, de las que 10 (14%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y 3 (4%) dieron reacción negativa para ésta bacteria; de intestino se analizaron 19 (26%) cepas en total, de las cuales 13 (18%) fueron a positivas para *V. cholerae* no O1 y sólo 6 (8%) fueron negativas. Finalmente para hígado se analizaron 19 (26%) cepas de las que 10 (14%) son positivas para *V. cholerae* no O1 y 9 (12%) resultaron negativas.

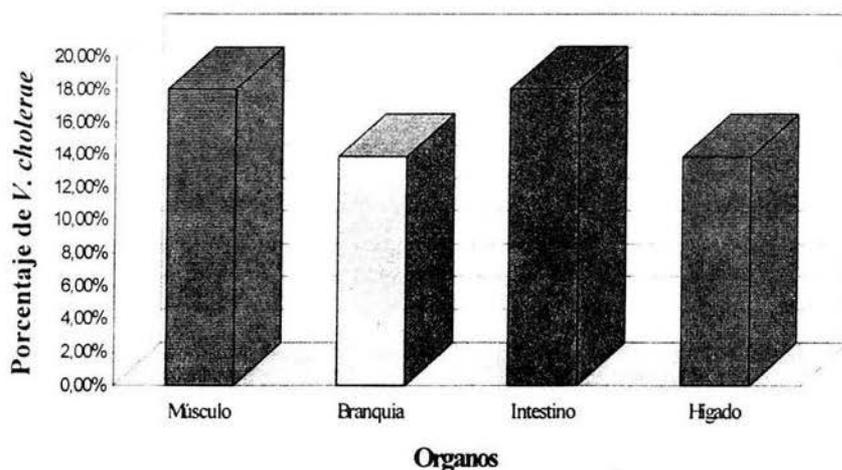
Del análisis estadístico efectuado se obtuvo una Ji-cuadrada de 2.21 ($\chi^2=2.21$) con una probabilidad de 0.53 ($P=0.53$), esto nos indica como en el caso anterior que *V. cholerae* no O1 no presenta una correlación estadísticamente significativa, lo anterior lo podemos observar en la (Tabla 5, Figura. 7), ya que los datos obtenidos son muy uniformes comparando un órgano con otro.

Tabla 5: Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes órganos de Lobina (*Micropterus salmonides*)

	<i>Músculo</i>	<i>Branquia</i>	<i>Intestino</i>	<i>Hígado</i>	<i>Total</i>
Presencia (+)	13 18.05%	10 13.88%	13 18.05%	10 13.88%	46 63.88%
Ausencia (-)	8 11.11%	3 4.16%	6 8.33%	9 12.5%	26 36.11%
Total	21 29.16%	13 18.04%	19 26.38%	19 26.38%	72 100%

$\chi^2=2.21$; $P=0.53$

Figura 8: Frecuencia de *V. cholerae* en órganos de Lobina (*Micropterus salmonides*)



5.5.3. Presencia de *V. cholerae* en mojarrita

Para mojarrita (*L. macrochirus*) se analizaron 81 cepas correspondiendo a músculo 22 (27.1%), de las cuales 12 (14.8%) dieron reacción positiva para *V. cholerae* no O1 y 10 (12.3%) fueron negativas. De las muestras de branquia se analizaron 21 (25.9%) cepas de las que 11 (13.5%) se presentaron como positivas para *V. cholerae* no O1 y 10 (12.3%) fueron negativas; para intestino se analizaron 17 (22%) cepas, correspondiendo 12 (14.8%) a reacciones positivas para *V. cholerae* no O1, mientras que solo 5 (7.4%) dieron reacción negativa; en el caso de hígado se analizaron 21 (25.9%) cepas, de las que 13 (16%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y 8 (9.2%) presentaron reacción negativa.

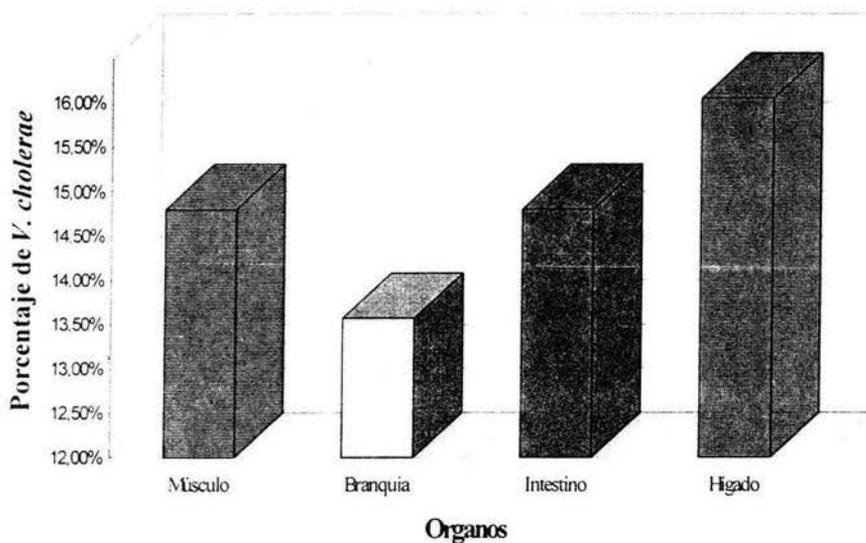
Del análisis estadístico se obtuvo una Ji-cuadrada de 1.60 ($\chi^2=1.60$) con probabilidad de 0.66 ($P=0.66$), lo que nos indica que *V. cholerae* no O1 no presenta ninguna tendencia a infectar un órgano del pez en específico. (Tabla 6, Figura 8).

Tabla 6: Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes órganos de Mojarrita (*Lepomis macrochirus*)

	<i>Músculo</i>	<i>Branquia</i>	<i>Intestino</i>	<i>Hígado</i>	<i>Total</i>
Presencia (+)	12 14.81%	11 13.58%	12 14.81%	13 16.05	48 59.26%
Ausencia (-)	10 12.35%	10 12.35%	5 7.40%	8 9.28%	33 40.74%
Total	22 27.16%	21 25.93	17 22.21%	21 25.92%	81 100%

$\chi^2=1.60$; $P=0.66$

Figura 9: Presencia de *V. cholerae* en órganos de Mojarrita (*Lepomis macrochirus*)



5.5.4. Presencia de *V. cholerae* en charal

En charal (*Ch. bartoni*) se analizaron 56 cepas en total, de éstas correspondieron a músculo 16 (28.5%), de las que 10 (17.8%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y 6 (10.7%) resultaron negativas para *Vibrio*; de branquia se revisaron 14 (25%) cepas, de las que 11 (19.6%) presentaron reacción positiva para *V. cholerae* no O1, mientras que 3 (5.3%) fueron negativas, para intestino se analizaron en total 11 (19.6%) cepas, de éstas 10 (17.8%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1, y sólo 1 (1.7%) dio reacción negativa; finalmente para hígado se analizaron en total 15 cepas equivalentes al (17.7%), de éstas 12 (12.4%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y únicamente 3 (5.3%) fueron negativas.

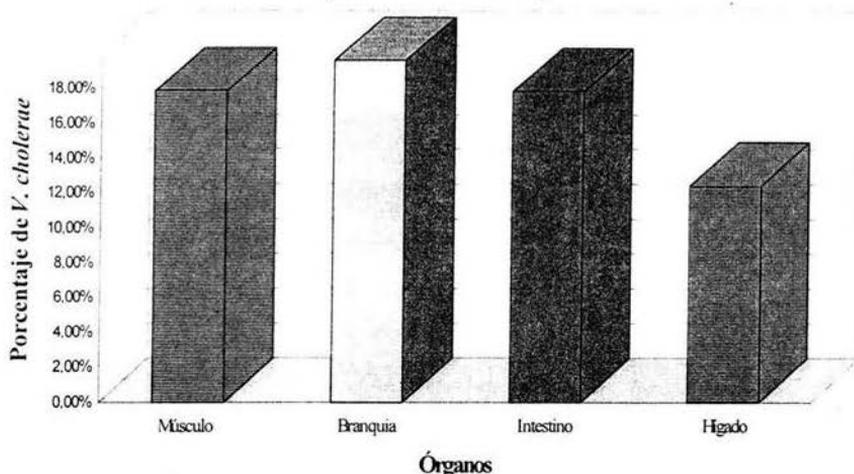
Del análisis estadístico realizado se obtuvo una Ji-cuadrada de 3.18 ($X^2=3.18$) con probabilidad de 0.37 ($P=0.37$), estos resultados como en el caso anterior nos indican que no existe una tendencia de *V. cholerae* no O1 a infectar un órgano de pescado en particular, no existe una correlación (Tabla 7, Figura 9).

Tabla 7: Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes órganos de Charal (*Chirostoma bartoni*)

	<i>Músculo</i>	<i>Branquia</i>	<i>Intestino</i>	<i>Hígado</i>	<i>Total</i>
Presencia (+)	10 17.86%	11 19.64%	10 17.86%	12 12.43%	43 76.79%
Ausencia (-)	6 10.71%	3 5.36%	1 1.78%	3 5.36%	13 23.21%
Total	16 28.57%	14 25%	11 19.64%	15 17.79%	56 100%

$X^2=3.18$; $P=0.37$

Figura 10: presencia de *V. cholerae* en órganos de Charal (*Chirostoma Bartoni*)



5.5.5. Presencia de *V. cholerae* en carpa

Para carpa (*C. carpio*) se aislaron en total 60 cepas, correspondiendo a músculo 19 (31.6%), de éstas 11 (18.3%) fueron positivas para *V. cholerae* no O1 y 8 (13.3%) dieron reacción negativa, de branquia se analizaron 14 (23.3%) cepas de las cuales 10 (16.6%) correspondieron a positivas para *V. cholerae* no O1 y 4 (6.6%) fueron negativas para intestino se analizaron 12 (18.3%) cepas siendo 9 (15%) positivas para *V. cholerae* no O1 y 2 (3.33%) negativas para *Vibrio* finalmente para hígado se analizaron 16 (26.6%) cepas, 10 (16.6%) fueron a positivas para *V. cholerae* no O1 y 6 (10%) resultaron negativas para ésta bacteria.

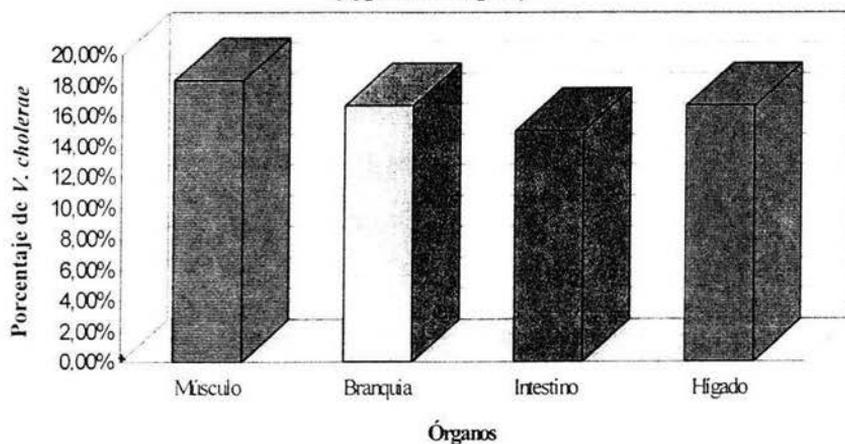
Del análisis estadístico se obtuvo una Ji-cuadrada de 2.06 ($\chi^2=2.06$) con probabilidad de 0.56 ($P=0.56$). estos resultados nos confirman que *V. cholerae* no O1 no presenta ninguna tendencia a infectar un órgano en particular de *C. carpio*, esto es que no existe correlación entre *Vibrio* y los órganos del pez (Tabla 8, Figura 10).

Tabla 8: Frecuencia de *V. cholerae* en diferentes órganos de Carpa (*Cyprinus carpio*)

	<i>Músculo</i>	<i>Branquia</i>	<i>Intestino</i>	<i>Higado</i>	<i>Total</i>
Presencia (+)	11 18.33%	10 16.66%	9 15%	10 16.66%	40 66.66%
Ausencia (-)	8 13.33%	4 6.66%	2 3.33%	6 10%	20 33.33%
Total	19 31.66%	14 23.33%	12 18.33%	16 26.66%	60 100%

$\chi^2=2.06$; $P=0.56$

Figura 11: Presencia de *V. cholerae* en órganos de Carpa (*Cyprinus carpio*)



5.6. Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a pescados de Valle de Bravo, Estado de México.

Con el fin de determinar las bacterias asociadas a los pescados además de *V. cholerae*, se realizaron aislamientos de los diferentes crecimientos bacterianos a partir de los tubos de agar Kligler, y cajas de agar TCBS, la identificación se

realizó utilizando el sistema API-20E obteniendo los resultados expresados en la siguiente tabla:

Tabla 9: Bacterias identificadas en pescados de Valle de Bravo, Estado de México.

Bacteria identificada	Patogenicidad en peces	Patogenicidad en humanos**
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Vibriosis o septicemia hemorrágica	Infecciones de oídos, heridas, tejidos blandos y otros sitios extraintestinales, todos raros.
<i>Vibrio damsela</i>	Vibriosis o septicemia hemorrágica	Infecciones de oídos, heridas, tejidos blandos y otros sitios extraintestinales, todos raros.
<i>Vibrio fluvialis</i>	Vibriosis o septicemia hemorrágica	Infecciones de oídos, heridas, tejidos blandos y otros sitios extraintestinales, todos raros.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	No hay reporte en peces	Gastroenteritis y posibles infecciones extraintestinales.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Septicemias	Infecciones en heridas por contacto con agua dulce (septicemias), se ha encontrado en la sangre de personas que tienen alteraciones graves de las defensas inmunitarias o endocarditis, se ha aislado del excremento de personas con diarrea.
<i>Enterobacter agglomerans</i>	No reportada para peces	Semejante a los factores inespecíficos de la enfermedad producida por <i>E. coli</i>
<i>Proteus sp</i>	No reportada para peces	Produce infecciones solo cuando migra del tracto digestivo, en personas debilitadas.
<i>Proteus penneri</i>	No reportada para peces	Produce infecciones solo cuando migra del tracto digestivo, en personas debilitadas.
<i>Proteus vulgaris</i>	No reportada para peces	Patógeno nosocomial importante.
<i>Providencia stuartii</i>	No reportada para peces	Infecciones en vías urinarias.
<i>Providencia rettgeri</i>	No reportada para peces	Infecciones en vías urinarias.
<i>Klebsiella ozaenae</i>	No reportada para peces	Ocena (Atrofia séptica fétida progresiva de la mucosa)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No reportada para peces	Neumonías bacterianas

**Tomado de Jawetz, 1992

6. DISCUSIÓN.

Con base en los resultados obtenidos durante los 8 muestreos realizados en el embalse de Valle de Bravo, Estado de México, podemos observar que *Vibrio cholerae* no O1 se encuentra infectando al 100% de los pescados extraídos del embalse, por lo que juega un importante papel en el ambiente acuático, ya que en estudios realizados en otros países se ha logrado aislar de sedimento, plancton, fitoplancton, invertebrados y peces, Kinkelin *et al.*, (1985), Contreras (1988), Tamplin *et al.*, (1990), Islam *et al.*, (1992) y Popovic, *et al.* (1993), ellos mencionan que estando los organismos acuáticos en un medio contaminado, éstos se encontrarán infectados por las bacterias presentes en el ambiente.

Trabajos realizados por Barua *et al.*, (1971), Starr *et al.*, (1981) y la Organización Mundial de la Salud (1991,b), muestran que la falta de higiene personal, en la preparación de alimentos, la irresponsabilidad en la disposición de excretas y el arrojar desechos al agua contaminándola, por ende contamina a los organismos acuáticos, convirtiéndolos en un vehículo de transmisión espacial de las epidemias de cólera y gastroenteritis, situación que se presenta en forma aguda la presa de Valle de Bravo ya que los poblados de Avándaro y Valle de Bravo tienen descargas al cuerpo de agua.

Un punto que resultó de gran importancia en el aislamiento de *V. cholerae* fue la utilización del agar kligler, paso que fue implementado por Sánchez (1991) y en el que se logra descartar más de mitad de las cepas negativas, aislados a partir del agar TCBS como colonias verdes o amarillas típicas para *V. cholerae*, en este trabajo en particular se lograron descartar 1373 cepas negativas para *V. cholerae*, de un total de 1800 lo que se traduce en un ahorro de tiempo y material al continuar con la identificación ya sea con el método tradicional de bioquímicas o con el API-20E.

En lo que respecta a la comparación que se efectuó con los métodos de identificación tradicional con bioquímicas y el sistema miniaturizado API-20E se observó que con ambas pruebas se obtuvieron resultados muy similares; el 42.28% coincidieron dando reacciones positivas, el 38.53% dio reacciones negativas y sólo un 20.18% no coincidieron en los resultados obtenidos, esto nos indica que el sistema miniaturizado API-20E, es un excelente alternativa para el análisis de muestras ambientales, en este caso provenientes de pescados, comprobándose esto

con el análisis estadístico, en donde se observó que la diferencia entre ambas técnicas no es de importancia significativa.

En trabajos previos con diferentes especies de pescados de importancia económica realizados por Holmes *et al.*, (1978), Kaper *et al.*, (1979) y Grizes *et al.*, (1991), coinciden en que los resultados de los análisis obtenidos con el sistema miniaturizado API-20E fueron rápidos y precisos, ayudando de ésta forma a conocer la bacteria que está afectando a los organismos y poder tomar medidas correctivas o preventivas en un menor tiempo.

Los resultados obtenidos en este trabajo en la identificación tradicional con pruebas bioquímicas y el sistema miniaturizado API-20E nos indican que prácticamente todo resultado que nos de positivo con las pruebas bioquímicas se corrobora satisfactoriamente utilizando el sistema miniaturizado API-20E. Además proporciona una identificación hasta género y especie sin tener que realizar pruebas complementarias como sucede cuando se utilizan únicamente las pruebas bioquímicas, lo que se traduce en un ahorro de tiempo y material en general, otra de las ventajas de este sistema miniaturizado, es que no sólo nos proporciona la identificación de *V. cholerae* sino también identifica con precisión otros vibrios como son: *V. alginolyticus*, *V. damsela* y *V. fluvialis*, y bacterias como *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus sp.* *P. penneri*, *P. vulgaris*, *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *Klebsiella ozaenae* y *K. pneumoniae*.

Para conocer si *Vibrio* tenía afinidad hacia alguna de las especies de peces presentes en el embalse se analizaron muestras de pescados que se colectaron en el embalse directamente con pescadores ribereños: tilapia, lobina, mojarrita, charal y carpa, observamos que en general todos los peces presentaban *V. cholerae* no O1, esto nos indica que *Vibrio* no presenta afinidad hacia alguna especie en particular. Cabe señalar que de los pescados que se analizaron más muestras fueron lobina, mojarrita y carpa con esto observamos que se guarda una relación entre el número de muestras y el de aislamientos positivos de *V. cholerae*, como lo podemos ver en la figura 5 en donde aparentemente éstas especies son las más contaminadas si no tomamos en cuenta el número de muestras analizadas, como ya se mencionó anteriormente y nos corrobora que estando la bacteria presente en el agua los peces se contaminarán.

Los organismos que se colectaron no mostraban signos evidentes de enfermedad al observarlos externamente que nos pudiera indicar que se encontraban infectados

por *Vibrio* o alguna otra bacteria, esto incrementa el riesgo de contagio por consumo de pescado crudo o con temperatura de cocción por debajo de los 60°C, ya que la gente no lo advierte al ingerir sin ningún cuidado el pescado. Starr *et al.*, (1981), Tison *et al.*, (1982), Biosca y Amaro, (1991) mencionan que *Vibrio* es una bacteria común de la microflora natural de los peces, crustáceos y moluscos pero que existen algunas especies patógenas para éstos y para el hombre, como es el caso de *V. cholerae* no O1 que es considerado como agente potencial de enfermedades, como: diarreas y gastroenteritis en el hombre, ocasionadas por algunas cepas toxigénicas las que en pruebas de laboratorio se han podido neutralizar utilizando el antisuero para la toxina del cólera. Así también en trabajos realizados por Hofer, (1978), Starr *et al.*, (1981), Islam *et al.*, (1992) y Tu, (1992) en estudios realizados en diversos componentes de ecosistemas acuáticos y en diferentes especies de pescados de interés comercial observaron que existen cepas de *V. cholera* no O1 que producen un toxina similar a la del cólera epidémico pero que tiene otro mecanismo de patogenicidad, Biosca y Amaro, (1991) menciona que algunas cepas de *V. cholerae* deben su factor de virulencia a la habilidad para utilizar el hierro de los fluidos del hospedero así también indica que las cepas no O1 producen un hidroxamato similar al de *V. cholerae* O1, por tal motivo es que se deben realizar estudios de toxigenicidad en las cepas de *V. cholerae* no O1 que se aíslen del embalse de Valle de Bravo, y tomar en consideración que *V. cholera* no O1 aunque no produzca el cólera epidémico es causante de una gran variedad de problemas de salud en el hombre entre los que se pueden citar: problemas en ojos, oídos, fluidos peritoneales, tracto biliar, sangre, apendicitis y otras enfermedades no intestinales, así también que actúa como patógeno oportunista en personas debilitadas como lo indican en diversos estudios Hofer, (1978), Madden *et al.*, (1982), Feachem *et al.*, (1983) y Tu, (1992).

Se sabe que los pescadores y personas que viven cerca de los ríos están más propensas al contagio ya que la contaminación en humanos ocurre después de estar en contacto con el agua o haber ingerido alimentos que se encuentran en aguas contaminadas por lo que Valle de Bravo toma un papel muy importante pues se practican deportes acuáticos, pesca deportiva y comercial, incrementando de manera significativa los riesgos de contagio por contacto con agua contaminada o bien por la ingesta de pescado contaminado.

Se ha mencionado por otros autores Feachem *et al.*, (1983), Hofer, (1978), Colwell *et al.*, (1984), Ventura *et al.*, (1992) e Isalm *et al.*, (1992), que *Vibrio* presenta estacionalidad, pese a estos reportes nosotros encontramos *V. cholerae* no O1 en

todos los meses y con una marcada uniformidad tanto en los meses calurosos como fríos, esto puede deberse a que Valle de Bravo presenta una temperatura media anual de 18°C a temperatura ambiente y en agua en la parte superficial del embalse se presentan temperaturas entre 21 a 23°C mientras que en el fondo presenta temperaturas promedio de 18°C como lo menciona Olvera *et al.*, (1992), en un trabajo realizado en el mismo período de muestreo que el presente trabajo. Tamplin y Colwell, (1986), menciona que las variaciones naturales en los parámetros ambientales de los ecosistemas inducen a la respuesta fisiológica y metabólica de la población bacteriana (concentración de iones, concentración de nutrientes, la variación en la composición de nutrientes o la variación natural asociada con la estaciones del año, clima y geografía), pueden reflejarse en los factores conocidos por la virulencia y patogenicidad (producción de toxina), por tal en ciertos climas y durante estaciones o condiciones meteorológicas específicas, hace que aumente o disminuya la patogenicidad; Miyaki *et al.*, (1967), Singleton *et al.*, (1982), Colwell *et al.*, (1984), Tamplin y Colwell, (1986) y la OMS (1991, a) en estudios realizados sobre la ecología de *Vibrio* menciona que a temperaturas entre los 20 a 24°C y con una aportación de nutrientes en el medio ésta bacteria puede sobrevivir con temperatura adecuada de 20 a 24°C, pH de 6-8, contenido de sal y carbohidratos, condiciones que se presentan en la presa, Olvera, *et al.* (1992) define a este cuerpo de agua como mesotrófico (contaminación media). Por otra parte Popovic *et al.*, (1993) dice que al encontrarse *V. cholerae* en cuerpos de agua que han sido contaminados, estos se convierten en reservorios naturales, por lo que es de vital importancia el continuar realizando estudios de monitoreo de *V. cholerae* y otras bacterias de importancia médica en la presa de Valle de Bravo, para evitar en lo posible brotes infecciosos de gastroenteritis o cólera.

Trabajos realizados por Rahim *et al.*, (1984), Leblanc *et al.*, (1981) y Kinkelin *et al.*, (1985) mencionan que los principales órganos para buscar bacterias en un pescado son las branquias y el hígado, posteriormente el intestino y finalmente músculo o zonas superficiales de la musculatura, Chen y Hanna, (1992), menciona que los *Vibrios* se adhieren fuertemente a diferentes partes del tejido de truchas, como son la mucosa bucal, agallas, escamas, aletas, branquias e intestinos.

Con el objeto de conocer el grado de contaminación de los peces y los lugares en donde podía ser más frecuente que se albergara *V. cholerae*, se analizaron branquias, intestinos, hígados y músculos, y lo que encontramos fue que *V. cholerae* no O1, no presenta afinidad hacia ningún órgano en particular, así también observamos pequeñas variaciones entre especies lo cual puede deberse a

los hábitos alimenticios y al comportamiento de éstas dentro del cuerpo de agua, como lo indicaron los análisis estadísticos no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en órganos; observamos nuevamente que estando la bacteria en el medio el pez tiende a contaminarse, con las bacterias presentes en el agua y como ya lo mencionamos anteriormente, siendo los peces solo un reflejo de la calidad microbiológica del agua que los rodea Kinkelin *et al.*, (1985), Contreras (1988).

En los trabajos realizados por Singleton *et al.*, (1982), Colwell *et al.*, (1984) y Huq *et al.*, (1990), se ha visto que *V. cholerae* O1, presenta una fuerte relación con organismos planctónicos, en especial con los copépodos por la cubierta quitinosa, a la que *Vibrio* se adhiere, Islam *et al.*, en 1992, realiza estudios en muestras de agua, plancton, fitoplancton y sedimento, encontrando cepas de *V. cholerae* no O1 toxigénicas, esto nos sugiere especial atención ya que los copépodos son parte de la dieta de la mayoría de los peces, por lo que se hace necesario el realizar técnicas más sensibles para la detección de *V. cholera* O1 y no O1 toxigénico.

Como ya se mencionó el que no se haya logrado aislar cepas de *V. cholerae* O1 no significa que no este presente en el embalse, pues al ser Valle de Bravo un lugar turístico no se descarta la posibilidad de contaminación por turistas o bien por los desechos de los poblados de Valle de Bravo y Avándaro que se localizan junto a la presa. trabajos realizados por Brayton *et al.*, (1987), Colwell *et al.*, (1984) y Hanna *et al.*, (1992), han mostrado que se requieren métodos de mayor precisión para poder aislar *V. cholerae* O1, pues éste presenta etapas en las que no es posible aislarlo con los métodos tradicionales, esta puede ser una de las razones por la cual no se logró aislar con los métodos utilizados en este trabajo ya que puede estar en una etapa no cultivable en el embalse y por tal requiere de técnicas alternativas de mayor precisión como la inmunofluorescencia, anticuerpos policlonales o monoclonales, aunque estas son costosas.

Es de especial interés el número de bacterias que se lograron aislar a partir de los pescados extraídos del embalse, pues todas presentan riesgos de enfermedad en el hombre, una que llamo la atención en especial fue *V. parahaemolyticus* que puede ocasionar infecciones extraintestinales y gastroenteritis en el hombre, y la cual fue aislada en dos períodos de muestreo, coincidiendo con los meses de mayor calor; en lo que respecta a peces sólo Chen y Hanna, (1992), lo reporta como patógeno, éste *Vibrio* se conoce como una especie de aguas salobres y marinas, pero que puede ser aislado de agua dulce cuando al lugar han asistido personas con gastroenteritis,

ocasionada por ingerir alimentos marinos contaminados, esto nos indica que la contaminación por turistas en la presa de Valle de Bravo es de importancia considerable.

Otra bacteria que se encontró con frecuencia fue *Aeromonas hydrophila*, la que se reporta como cosmopolita, pero principalmente como patógeno de peces. Hazen *et al.*, en 1978, observa que cuando la temperatura oscila entre los 20 a 72°C con un óptimo de 35°C y con rango de pH de 5.2 a 9.8 y con aporte de nutrientes *A. hydrophila* puede encontrarse en forma constante en el cuerpo de agua una vez que éste ha sido contaminado, convirtiéndose éste en un reservorio natural, condiciones físico-químicas con las cuales cumple el embalse de Valle de Bravo, Leblanc *et al.*, en 1981 menciona que puede ocasionar la muerte en los peces infectados, Rahim *et al.*, en 1984, reportan cepas enterotoxigénicas las cuales ocasionan grandes pérdidas económicas, situación a la que no escapa la presa de Valle de Bravo viéndose mermada de ésta manera la producción de peces de éste cuerpo de agua ya que no se cuenta con controles sanitarios para prevenir infecciones en los peces, además de ocasionar septicemias leves y agudas en peces en el hombre provoca diarreas y septicemias en heridas por contacto con agua contaminada, Jawetz *et al.*, (1992).

Las especies de *V. damsela* y *V. fluvialis*, son muy estudiadas en cultivos de peces de interés comercial por causar septicemias hemorrágicas y grandes pérdidas económicas en cultivos extensivos de peces Toranzo *et al.*, (1984), Hoover, (1985), Grizes *et al.*, (1991). En la presa de Valle de Bravo lo que se pretendía al sembrar peces de importancia económica era aumentar la pesca deportiva para los turistas que acuden a la zona y en el renglón comercial para las poblaciones aledañas al embalse, por lo que se deben realizar estudios al respecto con el fin de proteger las especies que aquí habitan y poder mantener la pesca, ya que de ésta se alimentan parte de las poblaciones al incluir el pescado dentro de la dieta y al venderlo en el mercado de la localidad, pero lo que podemos observar es que si no se toman las medidas necesarias para el control de infecciones en peces la pesca puede verse seriamente afectada y por ende las personas.

Otras bacterias encontradas fueron *Enterobacter agglomerans*, *Proteus sp.* y *P. penneri*, los cuales no se reportan como patógenos de peces, pero sí como indicadores de contaminación y como patógenos oportunistas para el hombre Jawetz *et al.*, (1992).

7. CONCLUSIONES

- ⇒ El 100% de los pescados analizados del embalse de Valle de Bravo, se encontraron infectados por *Vibrio cholerae* no O1 en mayor o menor grado.
- ⇒ Las cepas aisladas del embalse fueron *V. cholerae* No O1, mientras que la serología resultó negativa para *V. cholerae* O1 en todos los casos.
- ⇒ Es adecuada la utilización de agar kligler para el aislamiento de cepas de *V. cholerae*, este paso reduce el número de falsos positivos aislados a partir de agar TCBS.
- ⇒ Se comprobó que el sistema miniaturizado API-20E puede utilizarse para la identificación de *V. cholerae* en pescados, además de lograrse la identificación de otros vibrios hasta género y especie.
- ⇒ La utilización del sistema miniaturizado API-20E reduce el tiempo de identificación a 3 días (utilizando el método tradicional de bioquímicas se requieren 6 días), así como la carga de trabajo (horas hombre), reactivos y los materiales en general.
- ⇒ La utilización del sistema miniaturizado API-20E, es sencilla, pero requiere de un cierto período de capacitación.
- ⇒ *V. cholerae* no O1 no se aloja específicamente en ninguna de las especies de pescado analizadas del embalse.
- ⇒ *V. cholerae* no O1 no presenta especificidad para infectar un órgano en particular, puede ser aislado con seguridad de músculos, branquias, intestinos e hígados, siempre y cuando el agua en donde se encuentren esté contaminada.
- ⇒ El 100% de los pescados analizados se encontraron además infectados por otras bacterias de importancia en acuicultura como *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis* y *A. hydrophila*, así como de importancia médica para el hombre como son *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila*, *Proteus sp*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella ozaenae* y *K pneumoniae*

8. RECOMENDACIONES

⇒ Los pescados extraídos del embalse de Valle de Bravo, deben estar bien cocinados y evitar comerlos crudos.

⇒ Realizar campañas de educación y concientización en prácticas sanitarias para prevenir brotes epidémicos en la localidad.

⇒ Implantar un programa de monitoreo del agua de la presa de Valle de Bravo para la determinación *V. cholerae*.

⇒ En caso de brotes realizar monitoreos constantes de la ictiofauna presente en el embalse así como de la flora y fauna acompañante para la determinación de *V. cholerae* O1 y no O1 toxigénico así como de otras bacterias patógenas de importancia médica.

⇒ Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre las bacterias asociadas a los pescados del embalse de Valle de Bravo, se determina que el agua del embalse no es apta para el consumo humano, por lo que requiere evitar que los pobladores ribereños utilicen el agua sin un tratamiento de potabilización.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez V. J., 1970. Peces mexicanos (Claves) Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras, p 113 México, D: F:
- 20E, Analytical Profile Index, 1989. Enterobacteriaceae and other gram-negative bacteria, 9 ed. Division of Sherwood Medical, New York.
- Bailey-Scott, 1989. Diagnóstico microbiológico, 7ª ed., Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. p-192.
- Barua B, Burrows W. y Gallut C. J., 1971. Lucha contra el cólera. Prontuario y guía práctica en: Principios y prácticas de la lucha contra el cólera. Cuaderno de Salud Pública No. 40, OMS.
- Bent J. M. and Preben D., 1978. Fresh water fishes of britain and europe. Ed. Collins Clear-Type Press. London p.32-35.
- Biosca E. G., & Amaro C., 1991. Siderophores and related outer membrane proteins in *Vibrio spp.* wich are potential pathogens of fish and shellfish. Journal of Fish Diseases. 14, 249-263.
- Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, 1992. Epidemia de cólera en Perú y pautas para su control (Informe especial), Organización Panamericana de Salud.
- Brayton P. R., Tamplin, M. L, Huq, A. and Colwell, R. R., 1987. Enumeration of *Vibrio cholerae* O1 in bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count. Applied and Enviromental Microbiology. 2862-2865.
- Broek M. I. M., Mossel A. D., and Mol H., 1984. Microbiological quality of retail fresh fish fillets in the netherlands. International Journal of food Microbiology. 53-61
- Collins C. H. y Lyne M. P., 1989. Métodos microbiológicos, Ed. Acribia, Zaragoza, España. 323-330

- Colwell R. R., Kaper, J. and Joseph S. W., 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198, 394-396.
- Colwell R. R., Bradford B. H., Hood A. M., Hatem B. M., Roberts C. N., Seidler J. R., Seibeling J. R., 1984. Vibrios in the environment, Ed. John Wiley & Sons. New York. 277-283; 521-534.
- Contreras F. L. E., 1988, Manual de prevención de enfermedades que afectan a los organismos en cultivo, Secretaría de Pesca.
- Chávez A. M., 1986. Estudio a la contribución del plancton en la presa de Valle de Bravo, Méx. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Chen D., Hanna, P. J., 1992. Attachment of *Vibrio* pathogens to cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of fish diseases, 15, 331-337
- Deguchi Y., Nakasawa A. and Gutiérrez. C. H., 1980. Studies on interspecific relation of fishes in the dam Valle de Bravo, México-I. Col. Agr. & Vet. Med., Nihon. Univ. 37: 254-259.
- Eliás G. M., 1982. Contribución al conocimiento de los cladóceros del estado de México, con algunas notas ecológicas, Tesis de licenciatura ENEP-Iztacala, UNAM.
- Equihua L., Jiménez B., Cortés J., Ramírez P., Memije P., 1992. El cólera como enfermedad diarreica. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua 2ª Ed.
- Franco L. J., 1981. Contribución al conocimiento de la estructura y composición de las comunidades planctónicas de Valle de Bravo, Edo. de México, Tesis de licenciatura ENEP-Iztacala, UNAM.
- Freeman B. A., 1983. Tratado de microbiología de burrows, De. Interamericana, México. 549-563.

- Feachem G. R. Bradley, J. L. Garelick, H. Mara, D. D., 1983. Sanitation and disease. health aspects of excreta and wastewater management, John Wiley & Sons, U.S.A.
- Giono C. S., Gutiérrez C. L., Hinojosa A. A., 1991. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), Secretaría de Salud, Méx.
- Gram L., Trolle G., and Llus H. H., 1986. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperature. Journal of Food Microbiology, 59-66.
- Grizes L., Ceusters R. & Olliver F., 1991. The use of API-20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. Journal of Fish Diseases, 14: 359-365.
- Hanna P. J., Altmann K., Chen D., Smith A., Cosic S. & Moon P., 1992. Development of monoclonal antibodies for the rapid identification of epizootic *Vibrio* species. Journal of Fish Diseases. 15. 63-69.
- Hazen C. T., Flermans B. C., Hirsch P. R. and Esch W. G., 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the united states. Applied and Environmental Microbiology, 36:5. 731-738.
- Hofer E., 1987. *Vibrio cholerae* Não O1 associado á infecção entérica humana no estado da Bahia, Brasil. Rev. Microbiol. 18:1, 1-4.
- Holmes B., Willcox R. W. and Laplage P.S., 1978. Identification of *Enterobacteriaceae* by the API-20E system. Journal of Clinical Pathology, 31, 22-30.
- Hoover G. D., 1985. Review of isolation and enumeration methods for *Vibrio* species of food safety significance. Journal of Food Safety, 7; 35-42.
- Huq. A. E., Colwell R. R., Rahman R., Ali A., Chowdhury R. A. M., Parveen S., Sack A. D. and Cohen R. E., 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in

the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:8, 2370-2373.

- Islam S. M., Alam J. M. and Neogi B. P. K., 1992. Seasonality and toxigenicity of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from different components of pond ecosystems of Dhaka City, Bangladesh. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8. 160-163.
- Itami T., Takahashi Y., and Nakamura Y., 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kamura prawns *Penaeus japonicus*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1:238-242.
- Jawets M. D, Melnick L. J., Adelberg A. E., 1992. *Microbiología médica*. 14^a ed. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V. México.
- Kaper J., Seidler J. R., Lockman H. and Colwell R. R., 1979. Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 38:5. 1023-1026.
- Kinkelin P., Ch. Michel., Ghitino P., 1985. *Tratado de las enfermedades de los peces*. Ed. Acirbia, Zaragoza. 85-110.
- Leblanc D., Mittal K. R., Oliver G. and Lallier R., 1981. Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolates from health and moribund fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 42:1, 56-60.
- Madden M. J., McCardell A. B. and Read B. R., 1982. *Vibrio cholerae* in shellfish from U. S. coastal waters, *Food Technology*. 93-95
- Miyaki K., Iwahara S., Sato K., Fujimoto S., & Aibara K., 1967. Basic studies on the viability of El TOR *Vibriosis*. *Bull. Org. Mond. Santé, Bull. Wid Hlth Org.* 773-779.
- Muus J. B., Dahlstrom P., 1978. *Freshwater fish of Britain and Europe*. Ed. Collins Clear-Type Press, London and Glasgow.

- Oficial Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists. 1990, 15th. ed. Ed. Kenneth Helrich. Arlington, Virginia. E. U. 492-494, 476-478.
- Ocampo L. Auró A., 1996. Terapéutica de las enfermedades de los peces. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM
- Olvera V. V., 1990. Estudio de la eutroficación del embalse Valle de Bravo, México. Tesis de maestría en ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Olvera V. V., Bravo I. L., Sánchez Ch. J., 1992. Limnología, monitoreo de *Vibrio cholerae* y manejo de cuenca de la presa Valle de Bravo, México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).
- Organización Panamericana de la Salud, 1991. Boletín epidemiológico. La situación del cólera en las Américas. V-12 No.1. 24.
- Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 1991,a. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington, D. C. 1-23.
- Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 1991,b. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington, D. C. 1-23.
- Paul A. W., Estelle R., Phillis R. B., and Colwell R. R., 1982. Statical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar. Journal of Clinical Microbiology, 12, 1110-1116.
- Pesigan T. P., Plantilla J. & Rolda M., 1967. Applied studies on the viability of EL TOR *Vibrios*. Bull Org. Mond. Santé. Bull Wld Hlth Org. 37: 779-786.
- Periódico. Financiero, Junio 26 de 1991.
- Periódico, Universal, Junio 26 de 1991.

- Popovic T., Olsvik O., Blake A. P., and Wachsmuth K., 1993. Cholerae in the Americas: Foodborne aspects. *Journal of Food Protection*. 56:9. 811-821.
- Rahim Z., Sanyal S. C., Aziz K. M. S, Huq M. I. and Chowdhury A. A., 1984. Isolation of enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophyla* strains from infected fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 48:4. 865-867.
- Sanchez S. P., 1991, Manual de metodos de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en aguas. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) Brasil. 68.
- Sandoval A. M., 1991. Identificación y clasificación de *Vibrio cholerae*. Manual No. 8. 1ª ed. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Méx., 48.
- Secretaría de Programación y Presupuesto, 1981. Síntesis geográfica del estado de México, (con anexo cartográfico), (INEGI) México.
- Schindler R. G. P., and Metz H., 1991. Coliform bacteria in drinking water from south Bavaria: identification by the API-20E-system and resistance patterns. *Wat. Sci. Tech.* 24:2. 81-84.
- Sherwood Medical, 1986. Manual para el sistema API-20E.
- Singleton L. F., Attwell R., Jangi S. and Colwell R. R., 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:5, 1047-1058.
- Swerdlow L. D., Mintz D. E., Rodríguez M., Tejada E., Ocampo C., Espejo L., Greene D. K., Saldana W., Seminario L., Tauxe V. R., Wells G. J., Bean H. N., Ries A. A., Pollack M., Vertiz B., Blake A. P., 1992. Waterborne transmission of epidemic cholerae in Trujillo, Perú: Lessons for a continent at risk. *The Lancet*, 340: 28-33.
- Starr P. M., Stolp H., Trüper G. Hans B. A., Schlegel G. H., 1981. The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Vol. II Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 1272-1301.

- Tamplin L. M. and Collwell R. R., 1986. Effects of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 52:2. 279-301.
- Tamplin L. M., Gauzens A., Huq A., Sack A. D. and Colwell R. R., 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:6, 1977-1980.
- Tison L. D., Nishubichi M., Greenwood D. J. and Seidler J. R., 1982. *Vibrio vulnificus* biogruppo 2: New biogruppo pathogenic for eels. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:3. 640-646.
- Toranzo E. A., Combarro P., Lemos L. M. and Barja L. J., 1984. Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:4. 872-877.
- Tu A. T., 1992. Food poisoning, handbook of natural toxins, Volume 7, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York. 156-170.
- Ventura G., Roberts L., and Gilman R., 1992. *Vibrio cholerae* NON-O1 in sewage lagoons and seasonality in Perú cholerae epidemic. *The Lancet*, 339: 937-938.
- Veys A., Callewaert W., Waelkens E. and Abbeele V. K., 1989. Application of Gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting gram-negative bacteria in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 27:7. 1538-1542.
- West A. P., Russek E., Brayton R. P. and Colwell R. R., 1982. Statical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose agar. *Journal of Clinical Microbiology*. 16:6. 1110-1116.
- Zar J. H., 1974. Bioestadistical analysis, Prantice-Hall Inc. U.S.A.

10. APÉNDICE

10.1. Medio de transporte Cary-blair

Medio semisólido para conservación de muestras fecales. El pH alcalino y la presencia de cloruro de sodio favorecen la supervivencia de *V. cholerae* que puede permanecer viable hasta 22 días en este medio. El tioglicolato de sodio actúa como agente reductor, manteniendo un bajo potencial de oxidación-reducción, previniendo la formación de peróxidos en el medio, que normalmente son letales para los microorganismos.

10.2. Agua Peptonada Alcalina (APA)

Medio líquido de pH alcalino (9.3) utilizado para el enriquecimiento de *V. cholerae* y que favorece el desarrollo rápido e inhibe el crecimiento de otras bacterias.

El período de incubación no debe ser prolongado (8 a 12 horas), para que no predominen otras bacterias.

10.3. Agar Tiosulfato-Citrato-sales Biliares-Sacarosa (TCBS)

Medio selectivo diferencial principalmente utilizado para el aislamiento de *V. cholerae* y otros vibrios patógenos. *V. cholerae* utiliza la sacarosa, acidificando el medio y produciendo colonias amarillas, debido al cambio de los indicadores de pH, azul de timol y bromotimol.

Las sales biliares actúan en la inhibición del crecimiento de la mayoría de las bacterias gram-positivas.

El citrato de sodio retarda el desarrollo de los microorganismos gram-positivos y sirve para restringir algunos organismos gram-negativos que son incapaces de utilizar el citrato de sodio como fuente de carbono.

El tiosulfato de sodio y el citrato férrico, permiten la diferenciación de los vibrios de las bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

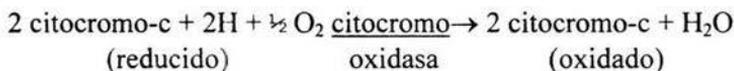
10.4. Agar Kligler con hierro (Kligler Iron Agar)

- Glucosa (dextrosa), *V. cholerae* fermenta la glucosa, con producción de ácido, el que determina la aparición de una coloración amarilla del medio, según el cambio del indicador de pH. En la superficie del medio, la proliferación es muy abundante y la acidez resultante de la fermentación de la glucosa es neutralizada por los productos del metabolismo proteico, lo que determina la aparición de color rojo. En la base del medio, donde el crecimiento es menor con relación a la superficie, los productos del metabolismo proteico no son suficientes para neutralizar la acidez permaneciendo la coloración amarilla del medio.
- Lactosa, *V. cholerae* no fermenta la lactosa, permaneciendo inalterable el ápice del medio (coloración roja).
- Sulfuro de Hidrógeno (H_2S) *V. cholerae* es incapaz de reducir el tiosulfato a sulfuro de hidrógeno, por tanto, no habrá formación de sulfato férrico, resultante de la combinación del ion hierro presente en el sulfato ferroso amoniacal con el sulfato de hidrógeno, responsable del ennegrecimiento del medio.
- Gas. *V. cholerae* no produce gas, por tanto no presentará ninguna formación de burbuja en el medio.
- Indol, *V. cholerae* produce una enzima triptofanasa, siendo por tanto, capaz de degradar el aminoácido heterocíclico triptófano y formar el indol. La formación de indol es verificada por la presencia de color rojo en la superficie al agregar el reactivo paradimetil-amino-benzaldehído.

10.5. Agar de Lisina Hierro (LIA)

- Lisina, *V. cholerae* descarboxila éste aminoácido a través de la enzima L-lisina descarboxilasa, dando formación de la amina respectiva cadaverina. La amina formada neutraliza la acidez del medio proveniente de la fermentación de la glucosa y lo alcaliza lo suficiente para hacer que el indicador púrpura de bromocresol vire a color violeta con este pH.
- Glucosa (dextrosa) (ver punto 10.4)^{o1°1}
- Gas (ver punto 10.4)
- Sulfuro de Hidrógeno (ver punto 10.4)
- L-triptófano desaminasa (LTD), *V. cholerae* no posee la L-triptófano desaminasa, siendo incapaz de desaminar el Triptófano y producir el ácido indol pirúvico, por tanto, el ápice de LIA se presentará azul.
- Ureasa, *V. cholerae* es ureasa negativa, por tanto, no degrada la urea en amonio (NH₂) y dióxido de carbono (CO₂), no presentando color azul en la parte inferior, característica de las bacterias ureasa positivas.
- Sacarosa, *V. cholerae* fermenta la sacarosa, por tanto, la parte profunda del LIA se observa de color amarillo.

10.6. Oxidasa, *V. cholerae* tiene citocromo oxidasa, enzima que oxida el citocromo-c en la cadena respiratoria, de acuerdo a la siguiente reacción:



En esta prueba, el citocromo-c oxidado, cataliza la oxidación de tetrametil-p-fenilenodiamina, la descarboxilación de la ornitina se lleva a cabo en anaerobiosis. observándose la aparición de un color púrpura intenso,

- Motilidad, *V. cholerae* posee flagelos polares, presentando por tanto crecimiento difuso en agar semisólido.
- Indol (ver punto 10.4)

11. Preparación de medios de cultivo

11.1. Medio de transporte Cary-blair

Fórmula:

Tioglicolato de sodio	1.5 g
Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4)	1.1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	5.0 g
Agua destilada	991.0 mL

Preparación:

Pesar 12.6 g de medio deshidratado “Cary-blair” y agregar 991 mL de agua destilada fría dejando en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar, agitando frecuentemente hasta disolverlo completamente y sin llegar a la temperatura de ebullición. Estabilizar en baño maría a 50°C. Agregar asépticamente 9 mL de una solución de cloruro de calcio al 1% (estéril). Homogenizar y esterilizar el medio a vapor fluente durante 15 minutos, dejando el recipiente medio abierto y cerrándolo inmediatamente después de esterilizado. Distribuir asépticamente 300 mL en bolsas de plástico de 20 litros. Sellar y almacenar en la oscuridad a una temperatura de 2 a 8°C, pH final después de esterilizar: 8.4 ± 0.2

Observaciones:

Este medio de transporte puede ser utilizado por un largo período después de preparado (18 meses) preservándolo de manera adecuada.

11.2. Agua Peptonada Alcalina (APA) (concentración simple)

Fórmula:

Bacto peptona	10 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación:

Pesar la peptona y el cloruro de sodio y agregar 1000 mL de agua destilada dejándolos reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio se disuelva completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Ajustar el pH a 9.3 con una solución 1N de hidróxido de sodio (NaOH). Distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de ensaye, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, pH final: 8.8 ± 0.2 a 25°C

11.3. Agua Peptonada Alcalina (APA) (concentración doble)

Fórmula:

Bacto peptona	20 g
NaCl	20 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación:

Pesar la peptona y el cloruro de sodio y agregar 1000 mL de agua destilada dejándolos reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio se disuelva completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Ajustar el pH a 9.3 con una solución 1N de hidróxido de sodio (NaOH). Distribuir volúmenes de 500 mL en frascos de 1 litro, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

11.4. Agar Tiosulfato-Citrato-sales Biliares-Sacarosa (TCBS)

Fórmula:

Extracto de levadura	5.0 g
Peptona proteasa (o peptona)	10.0 g
Citrato de sodio ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	10.0 g
Tiosulfato de sodio (NaS_2O_3)	10.0 g
Bilis de buey deshidratada	8.0 g
Sacarosa	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g
Citrato férrico	1.0 g

Azul de bromotimol	0.04 g
Azul de timol	0.04 g
Agar I	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Suspender 89 g del medio deshidratado “TCBS Agar” y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta su completa disolución, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir de 12 a 15 mL en cajas petri de (15X100mm), previamente esterilizadas. Las placas con agar TCBS deben mantenerse en refrigeración de 2 a 8°C.

El medio TCBS no se esteriliza y se recomienda prepararlo en baño de agua.

11.5. Agar Kligler con hierro

Fórmula:

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	15.0 g
Peptona proteasa	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Sulfuro ferroso (FeSO ₄)	5.0 g
Tiosulfato de sodio (NaS ₂ O ₃)	0.3 g
Rojo fenol	0.024 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar 55 g de medio deshidratado “Kligler Iron Agar” y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejándolo en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta disolver completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 6 a 7 mL en tubos de ensayo (12X120 mm),

tapar y esterilizar en autoclave a 21°C durante 15 minutos. Después de esterilizado dejar enfriar inclinado, de tal manera que la base sea aproximadamente de media altura del fondo del tubo. Almacenar en refrigeración de 2 a 8°C, pH final: 7.4 ± 0.2 a 25°C

11.6. Agar nutritivo (agar para manutención)

Fórmula:

Extracto de carne	5.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar los ingredientes y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 6 a 7 mL en tubos de (12X120mm), tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizar, aún caliente colocar en posición inclinada hasta que el medio solidifique, pH final: 7.4 ± 0.2 a 25°C

11.7. Base Möeller para descarboxilar arginina

Fórmula:

Peptona	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Glucosa	0.5 g
L-arginina	10.0 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g
Rojo cresol	0.005 g
Piridoxal	0.005 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar 10.5 g del medio deshidratado “Descarboxilase Base Möeller” y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Agregar al medio el aminoácido L-arginina y agitar hasta que se disuelva. Distribuir en volúmenes de 3 a 4 mL en tubos de ensayo 12X120 mm tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Mantener en refrigeración de 2 a 8°C, pH final: 6.0 ± 0.2 a 25°C

11.8. Agar lisina-hierro (LIA) para descarboxilación de lisina

Fórmula:

Extracto de levadura	3.0 g
Bacto peptona	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Hidrocloruro L-lisina	10.0 g
Sulfato ferroso	0.2 g
Citrato de amonio férrico	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar 34.5 g del medio deshidratado y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos, calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir en volúmenes de 6 a 7 mL en tubos de ensayo 12X120 mm tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizar, aún caliente colocar en posición inclinada hasta que el medio solidifique. Mantener en refrigeración de 2 a 8°C, pH final 6.7 ± 0.2 a 25°C.

11.9. Medio para movilidad-indol (MIO)

Fórmula:

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona de gelatina	10.0 g
Peptona de caseína	10.0 g
L-ornitina	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	2.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar 31 g del medio deshidratado y agregar 1000 mL de agua destilada fría, deja reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir de 3 a 4 mL en tubos de ensayo de 12X120 mm, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, dejarlos enfriar en posición vertical, guardar en refrigeración de 2 a 8°C. pH final 6.5 ± 0.2 a 25°C

12. Preparación de soluciones

12.1. Solución de Hidróxido de sodio 1N (NaOH)

Fórmula:

Hidróxido de sodio (NaOH)	40.0 g
Agua bidestilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar 40 g de hidróxido de sodio y disolver en 1000 mL de agua bidestilada, agitar hasta su completa disolución. Almacenar en frasco ámbar con tapón de rosca.

12.2. Reactivo para Indol o reactivo de Erlich

Fórmula:

P-dimetil-amino-benzaldehído	1.0 g
Ácido ortofosfórico	20.0 mL
Alcohol etílico absoluto	50.0 mL
Agua bidestilada	100.0 mL

Preparación:

Pesar el p-dimetil-amino-benzaldehído y agregar 50 mL de alcohol etílico absoluto. Agregar el ácido ortofosfórico al agua y adicionar el o-p-dimetilamino disuelto en alcohol, almacenar en frasco ámbar con tapón esmerilado o de rosca.

12.3. Reactivo para Oxidasa

Fórmula:

Clorhidrato de N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina	1.0 g
Agua bidestilada	100.0 mL

Preparación:

Pesar 1.0 g de clorhidrato de N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina y agregar 100 mL de agua bidestilada, homogenizar bien hasta la completa disolución del reactivo. Guardar la solución en frasco ámbar y refrigeración de 2 a 8 °C, máximo 2 días.

Nota:

La adición de ácido ascórbico a esta solución (en concentración de 0.1%) retarda la auto-oxidación del reactivo.

12.4. Reactivo de Kovacs

Fórmula:

P-dimetil-amino-benzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico o isoamílico	75.0 mL
Ácido clorhídrico concentrado (HCl)	25.0 mL

Preparación:

Pesar 5 g de P-dimetil-amino-benzaldehído y disolver en 75 mL de alcohol isoamílico, después adicionar 25 mL de ácido clorhídrico y agitar cuidadosamente. El reactivo debe presentar coloración amarilla.

12.5. Solución fisiológica o solución salina

Fórmula:

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000.0 mL

Preparación:

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio y disolver en 1000 mL de agua destilada, homogenizar hasta la completa disolución. Distribuir 5 mL en tubos de ensayo, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

12.6. Solución de alfa-naftol al 5%

Fórmula:

Alfa.-naftol	5.0 g
Alcohol etílico absoluto	100.0 mL

Preparación:

Pesar 5 g de alfa-naftol y diluir en 100 mL de alcohol etílico absoluto. Preparar la solución al momento de usar.

12.7. Solución d hidróxido de potasio al 40%

Fórmula:

Hidróxido de potasio (KOH)	40.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Preparación:

Pesar 40 g de hidróxido de potasio y diluir en 100 mL de agua destilada. Guardar en frasco hermético, ámbar y en oscuridad.

12.8. Solución de desoxicolato de sodio al 0.5%

Fórmula:

Desoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO_4$)	0.5 g
Agua destilada	100.0 mL

Preparación:

Pesar 0.5 g de desoxicolato de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar en frasco gotero ámbar.

12.9. Estándar Nefelométrico de McFarland

12.9.1. Ácido sulfúrico al 1%

Fórmula:

Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	1.0 mL
Agua destilada	100.0 mL

Preparación:

Vaciar 1.0 mL de ácido sulfúrico en un matraz y aforar a 100 mL con agua destilada, homogenizar suavemente.

12.9.2. Cloruro de Bario al 1%

Cloruro de bario ($BaCl_2$)	1.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Preparación:

Agregar 1.0 g de cloruro de bario en un matraz y aforar a 100 mL con agua destilada y agitar hasta su completa disolución.

12.9.3. Preparación de tubos.

Preparar 10 tubos de ensayo de igual tamaño, perfectamente lavados y colocar en cada tubo las cantidades de solución de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1% como se indica en la siguiente tabla. (cada tubo tendrá un volumen final de 10 mL), al finalizar los tubos se sellan y guardan para uso posterior.

Tabla 10: Para la preparación del estándar nefelométrico de McFarland

Tubo No.	mL de H ₂ SO ₄	mL de BaCl ₂	Densidad celular (Aproximada)
1	9.9	0.1	300X10 ⁶
2	9.8	0.2	600X10 ⁶
3	9.7	0.3	900X10 ⁶
4	9.7	0.4	1200X10 ⁶
5	9.6	0.5	1500X10 ⁶
6	9.5	0.6	1800X10 ⁶
7	9.4	0.7	2100X10 ⁶
8	9.3	0.8	2400X10 ⁶
9	9.2	0.9	2700X10 ⁶
10	9.0	1.0	3000X10 ⁶

Tomado de Bailey/Scott, 1989.

ANEXO

TABLA 11: SISTEMA API-20E LECTURA DE REACCIONES EN LA GALERÍA

TUBO	LECTURA POSITIVA	LECTURA NEGATIVA	OBSERVACIONES
ONPG	Amarillo	Incoloro	1)Un matiz amarillo es una reacción positiva 2)El tubo VP antes de la adición del reactivo puede ser utilizado como control negativo.
ADH	Rojo o naranja	Amarillo	Un matiz anaranjado puede considerarse como reacción positiva
LDC	Rojo o naranja	Amarillo	Un matiz anaranjado puede considerarse como una reacción positiva
ODC	Rojo o naranja	Amarillo	Un color naranja después de 24 H de incubación debe considerarse negativo
CIT	Turquesa o azul oscuro	Verde brillante o amarillo	Tubo y cúpula pueden ser útiles. La reacción se lee en la cúpula.
H₂S	Depósito negro	Sin depósito negro	La producción de H ₂ S muchas veces pasa de un depósito negro pesado a una línea negra alrededor del fondo del tubo. Un castaño en el medio es una reacción negativa a menos que un depósito negro esté presente.
URE	Naranja	Amarillo	<i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> y <i>Yersinia</i> dan rutinariamente una reacción positiva
TDA	Adicionando una gota de FeCl ₃ Café	Adicionando una gota de FeCl ₃ Amarillo	Reacción inmediata. Muchos organismos Indol + (que producen Indol) presentan un color anaranjado dorado, debido a la producción de Indol, esta es una reacción negativa.
IND	Adicionar una gota del reactivo de Kovacs Rojo (superficial)	Adicionar una gota del reactivo de Kovacs. Amarillo	La reacción puede leerse después de dos minutos de la adición del reactivo de Kovacs. Después de unos minutos el HCl presente en el reactivo de Kovacs muchas veces reacciona con el plástico de la cúpula resultando un cambio de un negativo (amarillo) a un café o rojo, esta es una reacción negativa.
VP	Adicionar una gota de KOH al 40% y luego una gota de alfa-naftol. Rojo.	Adicionar una gota de KOH al 40% y luego una gota de alfa-naftol. Amarillo.	Espere 10 minutos antes de considerar la reacción negativa. Un color rosa pálido después de 10 minutos será interpretado como negativo. La presencia de un color rosa pálido inmediatamente después de la adición de los reactivos, pero con tonos rosa oscuro o rojo después de los 10 minutos será interpretado como positivo.
GEL	Difusión del pigmento	Sin difusión	Las partículas de la gelatina se pueden difundir por todas partes del tubo después de la inoculación. A menos que la difusión ocurra la reacción es negativa. Cierta grado de difusión es una reacción positiva.
Fermentación MAN, IND, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA.	Amarillo	Azul Azul-verdoso	Oxidación gram-negativas. La utilización de la oxidación de carbohidratos comienza en la porción aérea del tubo, por tanto esta reacción sólo puede ser leída de la superficie hacia el fondo del tubo. Un color amarillo en la porción superior del tubo y un azul en el fondo indican una utilización oxidativa del azúcar, esta reacción puede considerarse positiva sólo para las no enterobacterias, bacilos Gran-negativos, esta es una reacción negativa para organismos fermentadores de semejantes a enterobacterias.
Fermentación GLU	Después de leer la reacción GLU adicionar dos gotas de ácido sulfanílico 0.8% y dos gotas de N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5 N	Después de leer la reacción GLU adicionar dos gotas de ácido sulfanílico 0.8% y dos gotas de N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5 N	Antes de adicionar reactivo observe el tubo GLU positivo o negativo para burbujas. Las burbujas son indicadores de la reducción de nitratos a nitrógeno N ₂ . Una reacción positiva puede tomar de 2 a 3 min. para que el color rojo aparezca. Confirme una prueba negativa añadiendo polvo de Zinc o granular. Un color rosa-anaranjado después de 10 min. confirma una reacción negativa. Una reacción de color amarillo indica la reducción de nitratos a nitrógeno N ₂ .

TABLA 11: SISTEMA API-20E LECTURA DE REACCIONES EN LA GALERÍA

TUBO	LECTURA POSITIVA	LECTURA NEGATIVA	OBSERVACIONES
Reducción de Nitratos GLU	Rojo NO ₂ burbujas amarillas N ₂ después del reactivo y Zinc	Amarillo Naranja después del reactivo y Zinc	Las burbujas pueden tomar de 1 a 2 minutos en aparecer. El mejor resultado se obtiene de la prueba en tubos que no han tenido gas de fermentación.
MANINO SOR CATALASA	Después de leer la reducción de carbohidratos adicionar una gota de H ₂ O ₂ al 15%. Presencia de burbujas.	Después de leer la reducción de carbohidratos adicionar una gota de H ₂ O ₂ al 15%. Ausencia de burbujas	

TABLA 12: ABREVIATURAS PARA EL SISTEMA API-20E

ABREVIATURA	SUBSTRATOS	REACCIONES ENZIMATICAS
ONPG	Ortonitrofenol-galctósido	Arginina dehidrolasa
ADH	Arginina	Arginina dehidrolasa
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa
CIT	Citrato sódico	Utilización de citrato
H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S
URE	Urea	(Ureasa) Hidrólisis de urea
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa
IND	Triptófano	Producción de Indol
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoína
GEL	Gelatina Kohn	(Gelatinasa) Hidrólisis de gelatina
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación
INO	Inositol	Fermentación/oxidación
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación
MEL	Melibiosa	Fermentación/oxidación
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación
OX	Sobre papel de filtro	Citocromo oxidasa

Tomado de boletín para lectura y preparación de API-20E, Merck, 1992, p. 20.

Tabla 13: Para la lectura de reacciones en Pruebas Bioquímicas tradicionales para *V. cholerae*

MEDIO	REACCIONES A OBSERVAR PARA <i>Vibrio</i>
TSI	<p>Glucosa positiva, fondo amarillo (ácido) Sacarosa y lactosa positiva, superficie amarilla (ácido)</p> <p>Producción de gas negativa, sin formación de burbujas en el medio.</p> <p>Ácido sulfhídrico negativo, sin precipitado negro en el fondo del tubo o en la picadura.</p>
LIA	<p>Descarboxilación de lisina positiva, el fondo del tubo es púrpura (alcalino).</p> <p>Desaminación de lisina negativa, superficie del tubo púrpura o sin cambio en el medio (alcalino).</p>
MIO	<p>Movilidad positiva, se presenta turbiedad en el medio o crecimiento extendido a partir de la línea del inóculo.</p> <p>Descarboxilación de la ornitina positiva, el fondo del tubo se alcaliniza y se presenta un color púrpura.</p> <p>Reacción de indol positiva, al momento de agregar unas gotas del reactivo de Kovacs cambia a rojo o rosa intenso.</p>
CALDO ARGININA O BASE MÖELLER	<p>Descarboxilación de la arginina positiva, todo el caldo adquiere un color púrpura (alcalino).</p>
CALDO TRIPTÓFANO	<p>Reacción de indol positiva, al agregar unas gotas del reactivo de Erlich, éste toma un color rosa intenso o rojo.</p>