



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



"REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL GÉNERO VIBRIO"

TESINA TEÓRICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

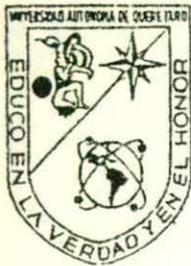
MARTHA CRISTINA LOPEZ REGALADO

J50701

QUERÉTARO, QRO. JUNIO DE 1992.

J50701





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



"REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL GÉNERO VIBRIO"

TESINA TEÓRICA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARTHA CRISTINA LOPEZ REGALADO

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLIOTECA

QUERÉTARO, QRO. JUNIO DE 1992.

No. Adq. 150701

No. Título _____

Clas. TS 616.93

L864r

NO. ADQ.

NO. TÍTULO



BIBLIOTECA

A G R A D E C I M I E N T O S

A DIOS:

Porque Dios da la sabiduría,
y de su boca viene el conocimiento
y la inteligencia. Pr. 2:6

Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría,
y que obtiene la inteligencia;
porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata,
y sus frutos más que el oro fino. Pr. 3:13-14

A mi Madre:

Carmen por su confianza, comprensión y
apoyo en todo momento.

A mi Esposo:

José Antonio que ha sido el
ideal en mi vida.

A mis Hijos:

Pepe, David y Daniel que son
estímulo para mi superación
personal.

Al Q.B. Sergio Pacheco Hernández.
Director de mis tesinas.

Q.B. Magaly Elizabeth Aguilar Ortiz.
Q.B. Patricia Villalobos Aguilera.
Sinodales.

A ellos mi más sincero Agradecimiento por
su ayuda y disposición que me brindaron.

A la Q.F.B. Olga Carballo Zamora.
Jefe del Laboratorio de Análisis
Clínicos de la U.M.F. # 16 del
I.M.S.S.

Q.F.B. Ma de Jesús Ferruzca Becerril.

Gracias por su ayuda, apoyo e impulso
que me dieron para la realización de
una más de mis metas.

A mis Amigos y Compañeros.

GRACIAS

C O N T E N I D O

I.	INTRODUCCION	1
II.	ANTECEDENTES HISTORICOS	2
III.	TAXONOMIA	4
IV.	CLASIFICACION	6
a).	CLASIFICACION EN EL LABORATORIO CLINICO	7
V.	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	9
VI.	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	11
VII.	PROPIEDADES GENERALES	12
a).	FISIOLOGIA Y METABOLISMO	13
b).	BIOLUMINISCENCIA	14
VIII.	PROPIEDADES DE CULTIVO	15
a).	PROCEDIMIENTOS DE ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO	16
IX.	PRUEBAS DE IDENTIFICACION	18
a).	PROCEDIMIENTOS PARA COMPROBAR CARACTERISTICAS ESPECIALES..	21
X.	V. CHOLERAЕ	23
a).	ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS	24
b).	DISTRIBUCION MUNDIAL	27
c).	AGENTE INFECCIOSO	31
d).	PATOGENIA	35
e).	CUADRO CLINICO	37
f).	DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE V. cholerae.....	39

g).	INVESTIGACION DE V. CHOLERAЕ EN AGUAS	55
h).	INVESTIGACION DE V. CHOLERAЕ EN ALIMENTOS	59
i).	TRATAMIENTO	60
j).	PROFILAXIS	64
XI.	VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS	66
a).	FUENTE DE INFECCION Y RESERVORIO	67
b).	AGENTE INFECCIOSO	68
c).	PATOGENIA	69
d).	CUADRO CLINICO	71
e).	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRELIMINAR DE V. PARAHAEMOLYTICUS	72
f).	TRATAMIENTO Y PROFILAXIS	82
XII.	APENDICE	83
XIII.	BIBLIOGRAFIA	97

I. INTRODUCCION

Las infecciones diarreicas producidas por el género *Vibrio*, han afectado a un sin número de personas en todo el mundo y durante muchos siglos; su importancia epidemiológica es indudable debido a la facilidad de contagio y rapidez con que se reproducen estas bacterias y por su presentación en países donde se había erradicado esta enfermedad.

El presente estudio trata de dos especies del género *Vibrio* que están más relacionadas con este padecimiento y son: *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, donde se analiza tanto sus características físicas, químicas y biológicas, como aspectos relacionados con la clínica.

Espero que esta información sea de utilidad y que los conceptos que aquí se tratan, sirvan como material de consulta.

II. ANTECEDENTES HISTORICOS

Las especies de *Vibrio* son probablemente muy raras en muchos laboratorios donde el contacto con el océano y los alimentos marinos es poco frecuente.

En contraste con algunas regiones subdesarrolladas del mundo donde son comunes el cólera y su agente causal, el *V. cholerae*. (15)

El bacilo del cólera fué aislado por Koch en 1884; el cólera asiático como se le denominaba a menudo en los primeros escritos probablemente existió en la India.

La diseminación del cólera asiático provino de siete grandes pandemias. La primera comenzó en 1816 hasta 1817; las otras seis pandemias comenzaron en los años 1829, 1852, 1863, 1881, 1889 y 1961.

El *V. cholerae* serogrupo 01 es el grupo de cepas que causan el cólera pandémico. El *V. cholerae* serogrupo no 01 puede causar una enfermedad de tipo colérico, pero también se ha aislado de pacientes con diarrea leve e infección extraintestinal, también se ha aislado del medio acuático. (14)

El *V. parahaemolyticus* ha sido conocido como causa de gastroenteritis aguda desde 1950 donde hubo un brote de intoxicación por alimentos en Osaka Japón. Su naturaleza halófila fué descubierta hasta 1955.

Mundialmente se producen brotes de gastroenteritis debida al *V. parahaemolyticus*. En Japón el *V. parahaemolyticus* es un agente diarreico sumamente importante, que causa 50 a 70% de los casos de enteritis por ingestión de pescado crudo o mariscos contaminados.

(6)

El *V. mimicus* es una nueva especie de vibrio asociada con diarrea tras el consumo de alimentos marinos en particular ostras crudas. Su aislamiento se dió durante la búsqueda de *V. cholerae* y otras especies de vibrio, encontrando reacciones bioquímicas atípicas y una baja relación sobre las diferencias fenotípicas lo que Davis y col. propusieron esta nueva especie. También se ha aislado de infecciones extraintestinales principalmente de oídos, en donde los pacientes estuvieron expuestos al agua de mar.

Otras especies de vibrio: el *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, también están relacionados con enfermedades gastrointestinales tras el consumo de alimentos marinos crudos.

El *V. vulnificus* ha sido reconocido como una especie distinta de vibrio desde 1976. Causa infecciones de heridas y septicemia.

El *V. damsela* también asociado a infecciones de heridas humanas se encuentra en el medio marino causando lesiones en la piel de ciertas especies marinas. Descubierta en 1981 por Love y col.

V. alginolyticus un microorganismo similar pero diferente al *V. parahaemolyticus* fue aislado del ambiente marino, pero no de pacientes con gastroenteritis; es una especie nueva aislada principalmente de heridas infectadas, oídos, ojos etc., luego de trauma y exposición al agua de mar.

V. metschnikovii aislado en 1884 de un ave de corral que había muerto de una enfermedad coleriforme. El *V. metschnikovii* es una vieja especie del género vibrio que ha sido aislado de aguas dulces y saladas, rara vez de muestras clínicas. (15)

III. TAXONOMIA

FAMILIA: Vibrionaceae.

GENERO: Vibrio.

El género Vibrio incluye bacilos Gram negativos no esporulados de una sola curva rígida (o bacilos rectos). Son móviles por medio de un solo flagelo polar, son citocromo (indofenol) oxidasa positivos y producen ácido sin gas con dextrosa por fermentación.

La familia Vibrionaceae incluye otros tres géneros: Photobacterium, Aeromonas y Plesiomonas. (1)

La relación guanina más citocina de los géneros de Vibrionaceae se pueden utilizar como primer paso para determinar la relación entre géneros. (ver cuadro 1).

El género Vibrio está estrechamente relacionado con el género Photobacterium debido a sus semejanzas fenotípicas, pero está más distantemente relacionado con el género Aeromonas y con la familia de Enterobacteriaceae. Más distante aun se encuentra el género Chromatium (bacteria fotosintética púrpura) y los géneros no fermentativos Pseudomonas y Acinetobacter.

La mayoría de las especies de Vibrio no están relacionadas entre sí en un sentido filogenético, de modo que Vibrio es un género heterogéneo, similar al Pseudomonas. (15)

CUADRO 1. PROPIEDADES DE LOS CUATRO GENEROS DE LA FAMILIA Vibrionaceae

Propiedad	Propiedad del género			
	Vibrio	Photobacterium	Aeromonas	Plesiomonas
Contenido de guanina + citosina del DNA (mol%)	38-51	40-44	57-63	51
Asociado con infecciones humanas	+	-	+	+
Na ⁺ necesario para desarrollo	+	+	-	-
Sensible al compuesto vibriostático 0129	+	+	-	-
Lipasa	+	V	+	-
Fermentación de D-manitol	+	-	+	-
Flagelos polares envainados	+	-	-	-
Acumula poli-B-hidroxibutirato pero no utiliza B-hidroxibutirato	-	+		

Un espacio en blanco indica que no se dispone de datos.

(15)

V = reacción variable para el género.

IV. CLASIFICACION

Una distinción muy significativa en la clasificación inicial de estos microorganismos es aquella entre los que pueden fermentar azúcares, y los que utilizan azúcares oxidativamente o no en absoluto.

(13)

Dentro de los grupos principales, fermentadores y no fermentadores los géneros pueden diferenciarse por sus características adicionales:

1. Las pruebas de reacción de oxidasa determinan la capacidad de la cadena de transporte de electrones para convertir ciertas aminas aromáticas en productos coloreados.

2. Los flagelos son peritricos, faltan o son polares.

3. Otras características diferenciales son sensibilidad a sales biliares o citrato (usado en agar Mac Conkey y SS), capacidad para reducir nitrato o nitrito a gas, y diversas reacciones de descarboxilasa.

(1)

a). CLASIFICACION EN EL LABORATORIO CLINICO

El género *Vibrio* reconoce sólo diez especies que son capaces de causar enfermedad en el humano, y considera a todas las otras especies de *Vibrio* como "especies marinas de *Vibrio*" ó "Vibrios marinos".

Se define un vibrio marino como una cepa de *Vibrio* o *photobacterium* que es oxidasa (+), fermenta D-glucosa, no desarrolla en caldo nutritivo sin añadir NaCl, pero sí desarrolla en caldo nutritivo con NaCl o "sales marinas". Requiere de 1-2% de NaCl para desarrollarse y temperaturas menores a 36°C. Algunos son bioluminiscentes.

Sus propiedades no coinciden con ninguna de las 10 especies clínicas del género *Vibrio*. (15)

Los grupos de Vibriones asociados con enfermedad humana son:

1). *V. cholerae*.

2). Vibriones no aglutinables o no del cólera, llamados NAG o NVC, bioquímicamente similares a *V. cholerae*, pero no aglutinados por antisuero *V. cholerae*.

3). *V. halófilos*, incluyendo *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y un Vibrión todavía sin nombre que fermenta lactosa (Lac +).

4). El microorganismo antes llamado *V. fetus*, ahora clasificado como *campylobacter fetus*. (ver cuadro 2). (13)

CUADRO 2. CLASIFICACION DEL GENERO VIBRIO Y ALGUNOS MICROORGANISMOS

RELACIONADOS.

Especies de Vibrio que se hallan en muestras clínicas humanas:

- V. alginolyticus
- V. cholerae
- V. damsela
- V. fluvialis
- V. furnissii
- V. hollisae
- V. metschnikovii
- V. mimicus
- V. parahaemolyticus
- V. vulnificus

Especies de Vibrio que no se hallan en muestras clínicas humanas:

- | | |
|-------------------|---------------------|
| V. aestuarianus | V. natrigens |
| V. anguillarum | V. nereis |
| V. campbellii | V. nigripulchritudo |
| V. costicola | V. ordali |
| V. diazotrophicus | V. orientalis |
| V. fischeri | V. pelagius |
| V. gazogenes | V. proteolyticus |
| V. harveyi | V. splendidus |
| V. logei | |

(15)

V. CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

Las especies de vibrio consisten en formas de bastones curvados o lineales, con una ultraestructura típica de la mayoría de las bacterias gram negativas.

Miden de 0.5 - 0.8 μm de ancho y 1.4 - 2.6 μm de largo.

Presentan formas de involución en cultivos viejos o bajo condiciones de cultivo adversos.

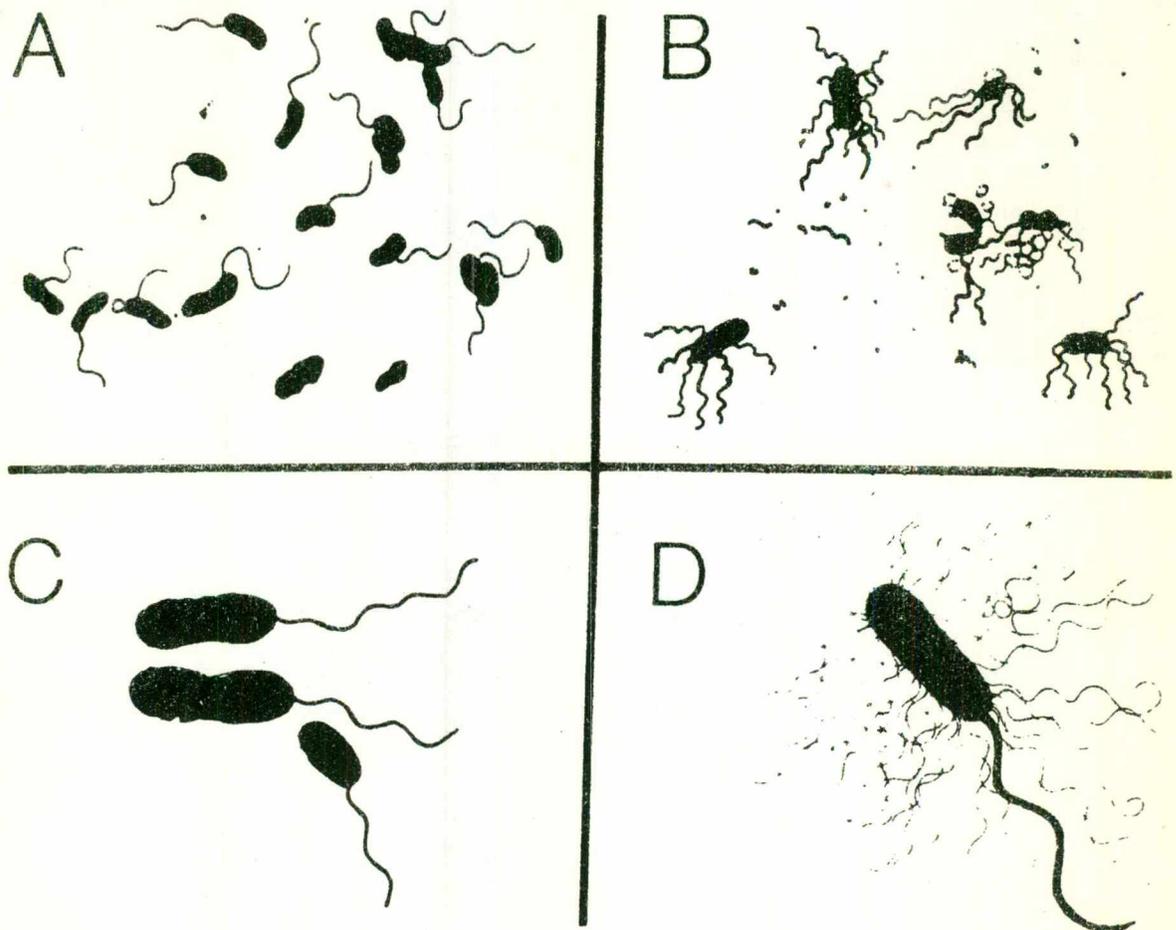
No forman endosporas o microcitos; cuando se cultivan en medios líquidos son móviles por medio de flagelos polares monotricos o multitricos que son envueltos por una cubierta continua con la membrana más externa de la pared celular. Cuando se cultivan en medios sólidos pueden sintetizar numerosos flagelos laterales con una longitud menor que el flagelo polar cubierto.

El flagelo polar de todas las especies de vibrio tienen de 24 a 30 nm de grosor por 14 a 16 nm de longitud.

Estudios con *V. cholerae* han mostrado que la cubierta del flagelo y la membrana externa de la pared celular contienen una proteína común denominada FLAGELINA, la cual difiere de los flagelos polares y laterales en cuanto a su composición de aminoácidos, propiedades antígenicas y comportamiento sobre columnas de hidroxapatita.

La difusión en medios sólidos parece estar asociada con la formación de células grandes con flagelos laterales y es afectada por factores físicos y químicos tales como: concentración de agar, complejidad del medio y temperatura. (ver fig. 1). (1)

FIG 1.



Morfología celular de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*.

A. *V. cholerae* de cultivos de 18 h en agar nutritivo.

B. Tinción flagelar de *V. parahaemolyticus*.

C. Micrografía electrónica de *V. parahaemolyticus* desarrollado en medio líquido. Obsérvese el único flagelo polar envainado.

D. Micrografía electrónica de *V. parahaemolyticus* desarrollado en medio sólido. Se observan flagelos polares y peritricos; nótese la diferencia en forma y tamaño de los flagelos peritricos comparados con el flagelo polar envainado.

VI. CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

La mayoría de las especies dan colonias elevadas, suaves, cremosas blancas y con bordes continuos. Variaciones en la morfología de las colonias pueden observarse en algunas especies, sobre todo después de trasposos repetidos y almacenamiento en medios complejos. Algunas veces pueden ser rugosas, tales colonias aparecen firmemente fijas al medio y no pueden ser emulsificadas. (1)

Luego de 18-24 horas de incubación a 35°C en aire las colonias de los vibriones fermentadores de lactosa presentan las siguientes características:

Agar TCBS.- forman colonias características grandes amarillas ligeramente convexas. Estas colonias se hacen frecuentemente verdes después de incubación prolongada, particularmente cuando el microorganismo es un vibrión biotipo El Tor.

Agar gelatina-taurocolato-Trypticasa-telurito (GTTA de Monsur).-

En este medio las colonias de vibriones son así:

- 1.- A las 24 horas: pequeñas, traslúcidas a transparentes, con centro negro grisáceo y halo turbio.
- 2.- A las 48 horas: colonias más grandes, de 3-4 mm, con centro negro y halo bien definido.

Agar nutriente.- colonias peculiares azuladas traslúcidas, vidriosas circulares, enteras y ligeramente levantadas, fácilmente distinguibles de las colonias coliformes opacas.

Medio de Wilson-Blair modificado.- colonias traslúcidas de centro grisáceo.

Medio de Aronson.- colonias transparentes rojo vivo. (23)

VII. PROPIEDADES GENERALES

Todos los vibriones son oxidasa positivos con excepción de *V. metschnikovii*.

Son anaerobios facultativos, capaces de utilizar ambas rutas metabólicas: fermentativa y aeróbica. Todos son quimiorganotrofos.

El oxígeno molecular es un aceptor universal de electrones; no desnitrifican o fijan nitrógeno molecular; la mayoría utiliza sales de amonio como fuente de N_2 .

La mayoría son capaces de crecer en un medio con minerales que contengan D-glucosa y NH_4Cl .

Unos cuantos requieren factores de crecimiento orgánicos probados como fuentes de energía y carbono. Tales compuestos incluyen: pentosas hexosas, disacáridos, azúcares ácidos, azúcares alcoholes, ácidos grasos monocarboxílicos ($C_2 - C_{10}$), ácidos tricarboxílicos intermedarios, aminoácidos y compuestos aromáticos monocíclicos.

El crecimiento de todas las especies de vibrio es estimulado por los iones de sodio y son un requerimiento absoluto para la mayoría.

La cantidad mínima para el óptimo crecimiento es de 5-15 mM para *V. cholerae* y *V. metschnikovii*. La concentración mínima necesaria para un desarrollo óptimo es de 5-700 mM.

La mayoría de las especies tienen hidrolasas extracelulares las cuales incluyen: amilasa, gelatinasa, lipasa, alginasa y desoxirribonucleasa.

Varias especies de vibrio tolerarán condiciones moderadamente alcalinas y crecerán a pH de 9.0, algunas como *V. cholerae* y *V. metschnikovii* crecerán a pH de 10.0. (1)

a). FISILOGIA Y METABOLISMO

Bajo condiciones anaerobias, especies de vibrio fermentan D-glucosa, por medio de una fermentación ácida mezclada. Los principales productos finales son: ácido fórmico, acético, láctico, succínico, pirúvico, así como alcohol etílico.

Hasta que se complete la fermentación, el pH del medio va de 4.6 a 5.8. Algunas especies producen acetoina y/o diacetilo así como 2,3 butanodiol. Algunas especies han mostrado tener una mezcla de H₂ y CO₂ (V. fluvialis, V. gazogenes).

Varias especies de vibrio utilizan p-hidroxibenzoato o quinato, compuestos que son degradados por medio de un camino alfa-cetoácido. La mayoría de las especies son oxidasa positivas, propiedad que correlaciona con la presencia de citocromos del tipo c. Citocromos de los tipos b y c han sido encontrados en la mayoría de las especies; algunas tienen un citocromo c aparentemente soluble con la capacidad de unir monóxido de carbono.

Algunas especies de vibrio tienen un sistema constitutivo de arginina-dihidrolasa, determinado por ensayos con ornitina producida de arginina bajo condiciones anaeróbicas.

Con la excepción de una sola cepa, todas las especies de vibrio tienen un superóxido dismutase que contiene hierro (SOD), como lo indica una banda de actividad en gel de poliacrilamida. La cepa ATCC 27519 que ha sido identificada como V. parahaemolyticus tiene dos bandas de actividad en geles de poliacrilamida. La banda mayor corresponde al superóxido dismutasa conteniendo hierro, la naturaleza del superóxido dismutasa en la banda menor no ha sido bien establecida.

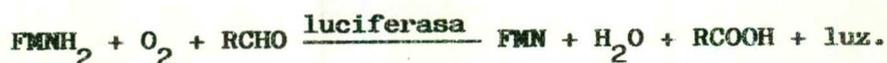
(1)

b). BIOLUMINISCENCIA

Algunas cepas de *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fischeri* y *V. logei* son capaces de emitir una luz de color azul-verdosa.

La reacción produce una emisión de luz catalizada por una enzima llamada **luciferasa**, que se ha mostrado igual en todas las procariotes.

Los substratos son reducidos a flavin mononucleótidos (FMNH_2) un aldehído de cadena larga (RCHO; probablemente tetradecanal) y oxígeno molecular el cual reacciona de acuerdo a la siguiente estequiometría:



La luciferasa bacteriana es un heterodímero que tiene un PM de cerca de 80,000 y consiste de subunidades alfa y beta con PMs cerca de 42,000 y 38,000 respectivamente. Las subunidades son funcionalmente distintas con el centro activo de la enzima localizada en la subunidad alfa.

La síntesis de luciferasa depende de la densidad de la célula en cultivo, la cual consiste en la síntesis y excreción en el medio de una substancia que ha sido purificado de *V. fischeri* y su estructura determinada es: **N-(3-oxohexanoil)-3-aminodihidro-2(3H)-furanosa - (N-B-cetohexanoil-homoserina lactona).** (1)

VIII. PROPIEDADES DE CULTIVO

Las especies de *Vibrio* de importancia médica desarrollan bien en medios no selectivos como agar sangre; y en medios selectivos como agar de Mac Conkey, agar sangre alcohol feniletílico, agar xilosa lisina desoxicolato y agar entérico Hektoen; y en caldo gram negativos (Hajna).

Los cultivos de *Vibrio* desarrollan bien en agar sangre, donde son beta-hemolíticos (*V. cholerae* no 01 y 01 o del biotipo El Tor), alfa-hemolítico (*V. vulnificus*) o no hemolíticos.

Los cultivos de *Vibrio* habitualmente desarrollan en agar de Mac-Conkey, pero algunas veces su eficiencia es reducida y aparecen colonias incoloras (Lac -).

La prueba de oxidasa se puede efectuar en colonias desarrolladas en agar sangre y en colonias (Lac -) en medios selectivos; sin embargo las colonias (Lac +) de medios selectivos pueden dar una reacción de oxidasa falsamente positivo.

Los cultivos de *Vibrio* no desarrollan bien en medios entéricos más selectivos.

El agar TCBS y el enriquecimiento en agua peptona alcalina selecciona especies de *Vibrio*, considerándose como técnicas especiales integradas en los procedimientos normales de laboratorio.

Una vez aislado el organismo se puede identificar por reacciones bioquímicas, y la identificación puede ser confirmada por la aglutinación con antisueros específicos. (1)

a). PROCEDIMIENTOS DE ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO

El medio más simple y el más ampliamente usado como enriquecimiento para *V. cholerae* es el (APW) agua de peptona alcalina, que contiene 1% (w/v) de peptona y 1% (w/v) de NaCl a pH 8.6. Cerca de 1 gr de materia fecal es inculada en 20 ml de APW y se incuba durante 6-8 horas a 37°C, después se pasa a un medio selectivo. (17)

El APW también se utiliza para *V. parahaemolyticus* y *V. fluvialis*. Muchas otras especies de vibrios se desarrollan en APW, sobre todo si se disminuye la temperatura. Para muestras de agua, alimentos y otras es necesario modificar concentración, T de incubación de acuerdo a cada vibrio en particular.

Agua de peptona alcalina con telurito y agua de peptona con tripticasa-telurito y taurocolato son también medios adecuados para el enriquecimiento de *V. cholerae* y otras especies.

Medios líquidos más específicos para aislamiento de *V. parahaemolyticus* son caldo de sal-glucosa-teepol y el caldo de sal colistina. No se usa para *V. cholerae* u otras especies.

El agar (TCBS) de sacarosa-citrato y sales biliares, es el agar selectivo más ampliamente usado, accesible comercialmente, fácil de preparar y usar, además es altamente selectivo.

Otros medios selectivos usados frecuentemente para el aislamiento de *V. cholerae* son el agar-alcalino de taurocolato-telurito y el agar de sales biliares. Parecen ser menos selectivos que el TCBS, ambos son solamente adecuados para su uso en investigación. (1)

Otra variante para aislar *V. cholerae* es el agar modificado de Sakazaki con azul de bromotimol (teepol).

Para aislar vibrios a partir de otras muestras biológicas (pus, sangre, secreciones) no presentan problemas en cuanto a procedimientos selectivos, el problema aquí es reconocerlos en vez de aislarlos ya que vibrios clínicamente importantes crecerán bien en medios comunmente usados como agar sangre y agar nutritivo. (1)

IX. PRUEBAS DE IDENTIFICACION

Estas pruebas pueden ser clasificadas en:

I.- Pruebas de identificación preliminares.

II.- Pruebas de identificación definitivas.

Dentro de las pruebas de identificación preliminares se deben tomar en cuenta los siguientes caracteres:

1.- Baja velocidad de desarrollo en:

a).- en agar sangre ó agar chocolate.

b).- rara vez desarrollan a temperatura ambiente.

c).- la velocidad de desarrollo se acrecienta aumentando el CO₂ y la húmedad en la cámara de incubación.

2.- Propiedades reacias en medios selectivos:

a).- no forman colonias visibles en agar Mac Conkey en 24 horas.

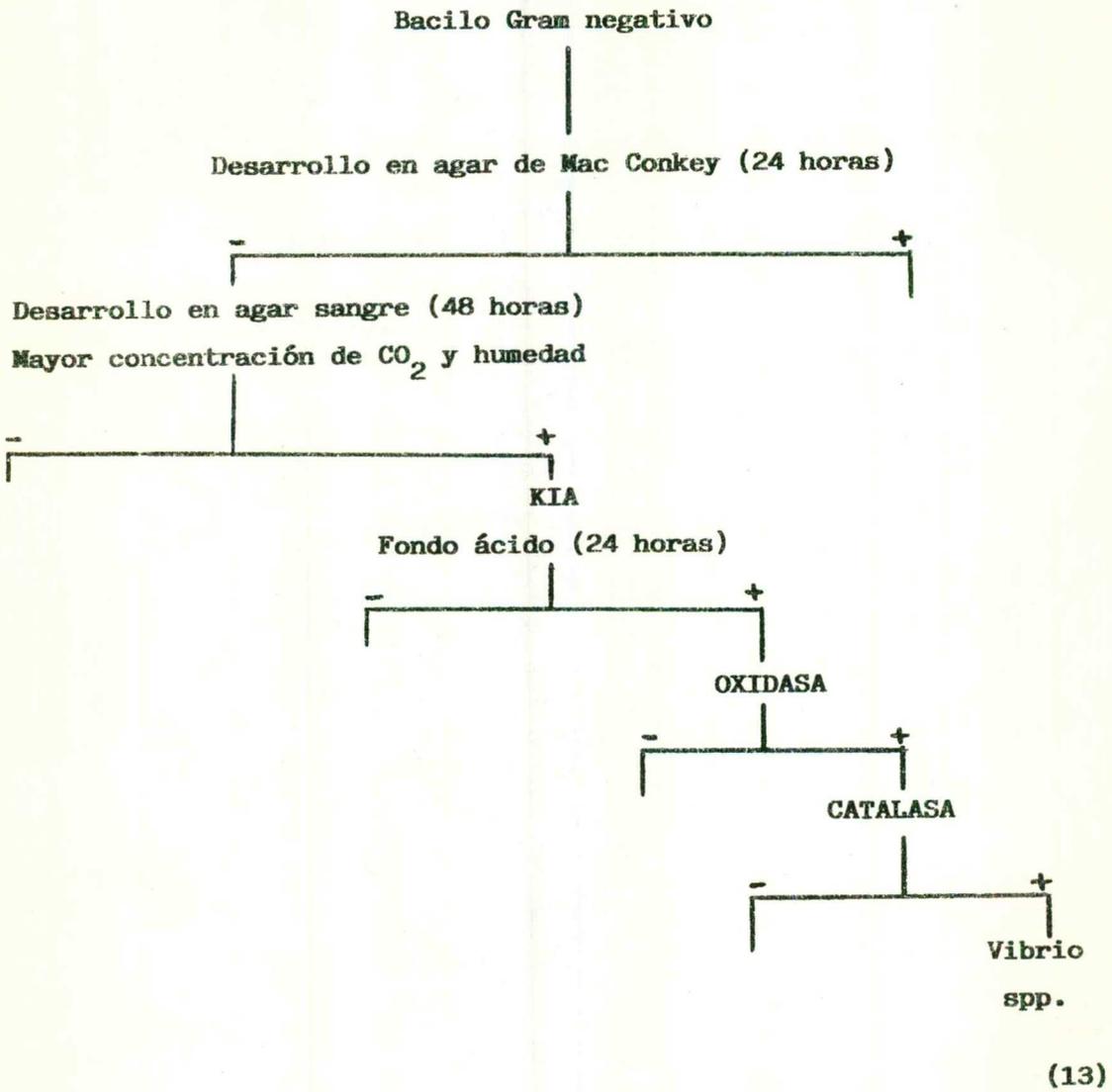
b).- no producen desarrollo visible en el pico de agar hierro de Kligler en 24 horas.

3.- La utilización no fermentativa de glucosa.

Por lo tanto, la identificación inicial de un aislamiento sospechoso consiste en observar su desarrollo en agar sangre y agar de Mac Conkey y si fermenta hidratos de carbono en agar hierro de Kligler (acidificación del fondo).

Además también puede ser útil determinar la capacidad de producir catalasa y citocromo oxidasa. (ver cuadro 3). (13)

CUADRO 3



II.- Pruebas de identificación definitivas:

La determinación de movilidad, reducción de nitrato, producción de indol, actividad de ureasa, producción de lisina y ornitina descarboxilasa y utilización de diversos hidratos de carbono, constituyen algunas de las características para la identificación definitiva de estos organismos. (13)

Todos los medios y pruebas utilizados para identificar cultivos de la familia Enterobacteriaceae funcionan bien para *V. cholerae* y *V. mimicus* porque estas especies tienen un ligero requerimiento de Na^+ , que es satisfecho por la cantidad de NaCl del medio.

Sin embargo, la mayoría de las especies halófilas de *Vibrio* requieren mucho más Na^+ para su desarrollo.

Se ha observado que más especies de *Vibrio* son indol positivas cuando el medio se cambia de agua peptona a caldo infusión de corazón y más cepas son Voges-Proskauer positivas cuando el reactivo para detectar acetil metil carbonil contiene alfa-naftol. (15)

a). PROCEDIMIENTOS PARA COMPROBAR CARACTERISTICAS ESPECIALES

Debido a que las diferentes especies de vibrio varían en sus requerimientos de iones, la mayoría de las pruebas deben llevarse a cabo en uno de los tres medios simples o complejos basados en el TBM=medio base terrestre (para *V. cholerae* y *V. metschnikovii*), BM=base medio o medio TBM y BM conteniendo 800 mM de NaCl para *V. costicola*.

Las temperaturas de incubación son entre 25-30°C excepto *V. marinus* que se incuba a 15°C.

La fermentación y producción de gas puede detectarse en un medio semisólido conteniendo 1% de D-glucosa y 2% de agar en (w/v). Estos ingredientes se agregan al TYEB=caldo de extracto de levadura terrestre o YEB=caldo de extracto de levadura, conteniendo 100 mM tris-HCl a pH=7.5. Después de licuar el agar, 10 ml de éste medio se coloca en tubos, se esteriliza y se inocula. Cerca de 5 ml de agar al 2% (w/v) esterilizado y enfriado a 41°C se adiciona al medio anterior gelificado. Los cultivos son incubados y observados para ver si hubo producción de gas o turbidez por 4 días a 25°-30°C ó por 6 días a 15°C. En este medio los anaerobios facultativos producen una gran turbidez y gas, que si se produce es atrapado en el medio semisólido. Los aerobios estrictos no crecerán o darán una turbidez ligera en este medio.

La prueba de Voges-Proskauer es importante en la identificación de varias especies. El medio usado es YEB conteniendo 100 mM de tris-HCl (pH=7.5) y 2% (w/v) de D-glucosa.

La prueba para requerimiento de Na^+ de una cepa se realiza incubando en BM conteniendo 2% (v/v) de glicerol, así como un medio equivalente a BM con cantidades equimolares de Na^+ y K^+ .

Sí la cepa requiere de Na^+ pero no requerimientos orgánicos, se observará buen desarrollo en el primer medio pero no en el segundo.

Para la mayoría de las cepas que requieren factores de crecimiento, estos dos medios pueden modificarse por la adición de 0.02-0.05% w/v de extracto de levadura. Para *V. costicola*, la concentración final de Na^+ se incrementa a 800 mM y es remplazado por cantidades equimolares de K^+ en el medio libre de Na^+ . Para *V. cholerae* que es capaz de crecer en ambos medios, una ligera turbidez es visible más temprano en el primer medio que en el segundo.

Para algunas cepas terrestres se debe realizar la prueba en TBM debido a los altos niveles de Na^+ o K^+ en el medio BM que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos. (1)

X. VIBRIO CHOLERAE

El cólera se ha difundido extensamente desde 1961 hasta afectar al menos 98 países. La amplia experiencia con la séptima pandemia de cólera, ha demostrado que es imposible de evitar la introducción del cólera en un país; sin embargo la propagación dentro de un país si puede contenerse mediante medidas apropiadas.

El cólera es un padecimiento infeccioso agudo, producido por el *Vibrio cholerae*, caracterizado por la aparición brusca de diarrea abundante que puede llevar a la deshidratación, choque hipovolémico y muerte en el curso de unas cuantas horas. (22)

Esta enfermedad había desaparecido de nuestro país hace más de un siglo, y durante mucho tiempo tampoco se registraron casos en el continente americano. Desafortunadamente, hace algunos meses reapareció en el área andina de Sudamérica y desde ahí se ha extendido lentamente a otros países de América.

En el mes de junio de 1991 se detectó la presencia de un pequeño brote en una localidad de la sierra sur del Estado de México, con 19 casos confirmados de cólera y ninguna defunción. (14)

La diseminación del cólera en México, en estos momentos, no depende de los factores que se sostenían hace dos siglos, es decir, la propagación básicamente era por caminos de herradura o a pie, lo que limitaba su avance en cuestión de meses o años. Actualmente, dados los medios de comunicación disponibles y la amplia variedad de actividades que se desarrollan, en particular en algunas zonas del país, el esquema ha cambiado. Los movimientos migratorios son intensos y amplios, colocando prácticamente a cualquier lugar del país como un área de riesgo. (17)

a). ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

El cólera ha sido reconocido históricamente como uno de los azotes de la humanidad, provocando tasas de letalidad hasta de 50% en las grandes epidemias. Actualmente, gracias a los adelantos en el manejo de los casos y las medidas de prevención, la letalidad ha disminuido a 1%. (22)

El cólera se puede presentar en las formas siguientes: casos importados, casos aislados, epidemia explosiva o de evolución lenta. En los casos importados y aislados es fácil realizar las medidas apropiadas de control si éstas son aplicadas en el momento oportuno. Las epidemias explosivas generalmente son causadas por una fuente común y son reconocidas con facilidad. Por lo común una gran cantidad de casos aparece en un lapso corto y se debe al agua o a alimentos contaminados. Si se descubre la fuente común de contagio oportunamente se puede controlar. Las epidemias de evolución lenta se caracterizan por la presencia de pocos casos diarios, a veces semanales o con intervalos mayores.

Si no se aplican las medidas de prevención y control en el momento preciso, el cólera se convierte en endémico con remisiones y exacerbaciones, situación en la que su control es casi imposible.

(17)

Se ha observado que los antibióticos acortan el período de transmisibilidad, aunque muchos pacientes aún eliminan vibriones unos días después de haber recibido tratamiento; cuando no se reciben antibióticos el período de eliminación se prolonga durante una a dos semanas. Se han descubierto portadores asintomáticos de cepas endémicas hasta por meses, incluso hay una forma de infección crónica biliar, con eliminación intermitente de vibriones hasta por años. Los estudios más cuidadosos no han descubierto portadores del biotipo Clásico. Asimismo, la transmisión se lleva a cabo por la ingestión de agua o alimentos contaminados con vibrios

provenientes de vómitos o heces de enfermos. Los pescados y mariscos marinos que se consumen crudos, especialmente los camarones y crustáceos procedentes de litorales poco profundos pueden estar contaminados. (14)

El cólera afecta principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico, cuya higiene es deficiente, y que no disponen de servicios sanitarios adecuados. En una epidemia la enfermedad afecta principalmente a los adultos con cuadros severos que requieren hospitalización. (22)

En las epidemias graves las tasas de ataque rara vez sobrepasan al 2%. La infección provoca el aumento del título de anticuerpos aglutinantes, vibriocidas y antitóxicos así como mayor resistencia a la reinfección, que persiste por más tiempo contra el serotipo homólogo. La resistencia puede depender también de la cantidad y el tipo de comida contenida en el estómago; también se ha demostrado que la lactancia materna confiere protección.

En las zonas endémicas, la mayoría de las personas adquieren los anticuerpos al inicio de la edad adulta. Existen vacunas anticoléricas, pero su uso tiene limitaciones, ya que no protegen contra la infección asintomática y su efecto no dura más de seis meses.

Dadas las características del agente, la diseminación de la enfermedad es favorecida por las condiciones deficientes de saneamiento básico, en especial por la falta de agua potable y la contaminación de los alimentos. (17)

Los estudios epidemiológicos han confirmado que el cólera es responsable de no más de 5 a 10% de todos los casos de diarrea aguda en las situaciones no epidémicas, además de esto, más de

90% de los casos de cólera son moderados y clínicamente indiferenciables de otras diarreas agudas.

Para establecer medidas de control específicas, se instituyó el Programa para el Control de Enfermedades Diarreicas (CED) como la mejor forma de prevención y control del cólera, ya que este padecimiento podría crear un problema de salud agudo por su alto potencial para ocasionar brotes, y debido a que causa la muerte por diarrea severa y deshidratación. (14)

b). DISTRIBUCION MUNDIAL

Durante las pandemias del siglo XIX, el cólera se diseminaba repetidamente de la India a casi todo el mundo. Durante la primera mitad del siglo XX la enfermedad estuvo confinada principalmente al Asia, aunque en 1947 ocurrió una epidemia grave en Egipto.

Desde 1961 la enfermedad se ha propagado a la mayoría de los países de Asia, Europa Oriental y Africa, y desde el norte de Africa a la península Ibérica y, en 1973 a Italia. En 1977 y 1978 ocurrieron brotes en Japón, y por primera vez apareció el cólera en el pacífico meridional. La enfermedad se ha extendido a Africa con 16 países reportando casos en 1989. En Asia, 12 países reportaron casos, tanto los tipo Clásico como El Tor en Bangladesh. (17)

Con excepción de dos casos adquiridos en el laboratorio en 1966 no han existido notificación de casos autóctonos en el hemisferio occidental entre 1911 y 1973, año en que ocurrió un caso de V. cholerae O1 El Tor serotipo Inaba en el estado de Texas, de origen desconocido. En 1978 se registraron infecciones de V. cholerae O1 El Tor serotipo Inaba, en Lousiana. En 1981 hubo un brote por la misma cepa en Texas. Se ha seguido informando casos asociados a consumo de mariscos crudos provenientes del Golfo de México.

En 1988, se registraron en el mundo 44,120 casos de cólera en 30 países. Para 1989, el número de países afectados fué de 35, reportándose 48,403 casos.

Hasta 1991, se consideraba que la región de América del Sur se encontraba libre de cólera. No se habían reportado casos autóctonos en ningún país de América. La epidemia de cólera en Perú fué la primera manifestación de ésta pandemia. (14)

El 29 de enero de 1991, la Oficina General de Epidemiología del ministerio de Salud de Lima, recibió reportes del incremento de gastroenteritis en Chancay. La investigación identificó un brote de enfermedad diarreica que comenzó el 23 de enero. Los casos iniciales de la enfermedad se caracterizaron por diarrea líquida abundante, vómito, postración y debilidad muscular. (22)

Se identificó al V. cholerae O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba, en las muestras de heces de los pacientes de Chancay; posteriormente se reportaron casos a lo largo de la costa norte de Perú. Se iniciaron medidas de vigilancia y control de alimentos y bebidas para evitar la propagación de la enfermedad, sin embargo, la presentación del problema fué en forma endemoepidémica en todo el país.

A continuación, se extendió hacia Ecuador y Colombia en forma epidémica en regiones limitadas, en Chile y Brasil en forma de brotes, y en Estados Unidos en brotes aislados. A cuatro meses de iniciada la pandemia se habían notificado 209,983 casos, y 1855 defunciones. (24)

La investigación intensiva estimulada por esta pandemia, ha contribuido al entendimiento de la epidemiología, patogénesis, manejo clínico y mecanismos inmunes acerca del cólera. En particular, el tratamiento ha mejorado, reduciendo la tasa de mortalidad con un manejo adecuado. Por otro lado, la vacunación masiva y la quimioprofilaxis no han demostrado ser efectivas para la prevención y control de una epidemia. (14)

CUADRO 1
COLERA EN AMERICA
 (Información disponible hasta el 4 de septiembre) 1991

PAIS	FECHA DE INICIO DE LA EPIDEMIA	CASOS ACUMULADOS	PROVINCIAS AFECTADAS	DEFUNCIONES ACUMULADAS	SITUACION EPIDEMIOLOGICA ACTUAL
PERU	23/I	246,246	25	2,416	ENDEMO-EPIDEMIA
ECUADOR	1/III	35,587	20	576	EPIDEMIA
COLOMBIA	10/III	5,477	16	113	EPIDEMIA
BRASIL	17/IV	92	2	1	BROTOS
CHILE	16/IV	41	5	2	BROTOS
ESTADOS UNIDOS	9/IV	18	4	0	CASOS AISLADOS
MEXICO*	13/VI	805	10	10	BROTOS AISLADOS
GUATEMALA	24/VII	330	10	2	EPIDEMIA
EL SALVADOR	16/VIII	7	2	0	BROTE AISLADO
BOLIVIA	27/VIII	18	1	2	BROTE AISLADO
TOTAL		288,621	95	3,122	

(2)

SITUACION DE LOS BROTES DE COLERA EN MEXICO
(24 DE AGOSTO AL 6 DE SEPTIEMBRE) 1991

	No. DE CASOS	No. DE DEFUNCIONES	SITUACION DEL BROTE
Valle de Tula (Hidalgo)	12	-	CONTROL EPIDEMIOLOGICO
Huasteca (Hgo. Ver.)	33	-	CONTROL EPIDEMIOLOGICO
Cd. Hidalgo (Chts.)	20	-	CONTROL EPIDEMIOLOGICO
Miahuatlán (Puc.)	66	-	PROCESO
Tajín (Ver.)	16	-	PROCESO
Campeche	6	-	CASOS AISLADOS
Tabasco	21	-	PROCESO
Distrito Federal	21	2	CASOS AISLADOS
Oaxaca	2	-	CASOS AISLADOS
Total	197	2	

(2)

c). AGENTE INFECCIOSO

El *Vibrio cholerae* es un bacilo aerobio, gram negativo, curvo, de extremos redondeados, en uno de los cuales tiene un flagelo que lo hace sumamente móvil.

Además, es un vibrio marino que tiene preferencia por las aguas contaminadas con material orgánico y se le encuentra con frecuencia en los estuarios.

El *V. cholerae* pertenece a la familia Vibrionasea, filogenéticamente cercana a las enterobacterias. Tiene más de 90 serogrupos, pero sólo el serogrupo O1 puede ocasionar cólera. Existen dos biotipos: el Clásico y El Tor, serológicamente indistinguibles. Dentro de cada biotipo hay tres serotipos, Inaba, Ogawa e Hykojima.

El biotipo Clásico da manifestaciones clínicas más graves, y el Tor es al que se le ha relacionado más directamente con las últimas epidemias.

Ambos elaboran la misma enterotoxina, el colerágeno, de tal forma que el cuadro clínico es semejante. Esta toxina es termolábil, se destruye a 56°C.

El vibrio cólera serogrupo O1 sobrevive por períodos de hasta 7 días fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos y templados. En el agua puede sobrevivir de unas cuantas horas a algunas semanas si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica, y tiene un pH entre 6 y 9. Es susceptible a la desecación, ebullición, cloro, desinfectantes y tetraciclinas, y en menor grado a la estreptomycinina y a las sulfamidas. (14)

Está demostrado que hay cepas más virulentas que otras. Los laboratorios colaboradores de la Organización Mundial de la Salud (OMS), están en condiciones de identificar las cepas mediante fagotipos, mapeo de nucleótidos y otras técnicas de biología molecular. (14)

DIFERENCIAS ENTRE EL *Vibrio cholerae* O1 TOXIGENICO DE SUDAMERICA Y EL DE LA COSTA DEL GOLFO EN ESTADOS UNIDOS

El cólera se detectó en Perú en enero de 1991 y se ha diseminado en la actualidad en los países vecinos. Este es el primer reporte de cólera en Sudamérica en este siglo. Es también el primer reporte de cólera adquirido en el hemisferio occidental fuera de los Estados Unidos, además de un posible caso en Cancún México en 1983.

En el área norteamericana de la costa del Golfo de México, las variedades de cólera toxigénico O1 son diferentes de los de la mayoría de las variedades El Tor aislados en países africanos y asiáticos causantes de la séptima pandemia y de los de la región del pacífico.

Las cepas aisladas de la costa del Golfo son hemolíticas y tienen el vibriofago VcA-3 y un patrón genético único para la toxina del cólera en el análisis de Southern Blot.

Los aislamientos de *V. cholerae* toxigénico O1 de varias localidades en el Perú, Ecuador y Colombia son como los aislados de la costa del Golfo, pertenecientes al serotipo Inaba, pero como la mayoría de los aislamientos de la séptima pandemia son no-hemolíticos, no tienen el vibriofago VcA-3 y tienen los genes de la toxina en un fragmento único de restricción subsecuente "Hind III".

Mediante análisis genético por Southern Blot de las cepas aisladas en Perú, Ecuador y Colombia, estas parecen tener el mismo patrón genético y ser indistinguibles del *V. cholerae* aislado en 1990 en Trucky Malawi (séptima pandemia); todos son distintos de los aislados en la costa del golfo.

Las cepas de *V. cholerae* de la actual epidemia en Perú no se relacionan con las aisladas previamente en la costa del Golfo. Pueden representar una clona diferente de las cepas endémicas del hemisferio occidental o representan una extensión de la epidemia que continúa afectando a los países africanos, asiáticos y aquellos en la región del Pacífico.

(26)

d). PATOGENIA

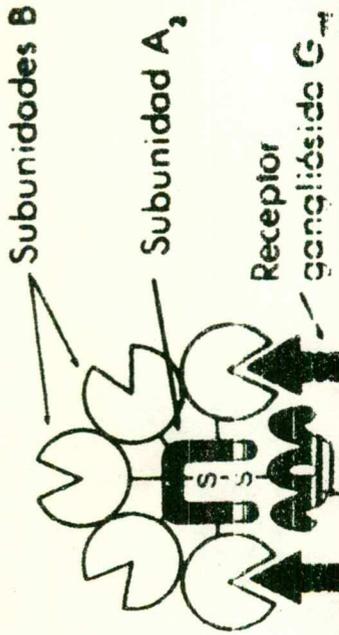
Vibrio cholerae produce una enterotoxina proteínica denominada colerágeno que causa todos los trastornos fisiopatológicos en el cólera. Esta enterotoxina de peso molecular de 84,000 está formada por dos subunidades, A y B. La subunidad A está compuesta por una molécula A_1 que es una fracción tóxica y una molécula A_2 que une una molécula de A_1 a 5 subunidades B. Esta última une la toxina a un receptor (un gangliósido, un glucolípido ácido) que se encuentra en la membrana de las células intestinales. Una vez que la toxina se ha fijado actúa sobre la enzima adenilciclase que cataliza la transformación de adenosín trifosfato (ATP) a adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Los mayores niveles de AMPC inducen a la célula a una activa secreción de iones hacia el lumen intestinal; para mantener el equilibrio osmótico las células deben secretar líquido en el lumen, el cual se obtiene de todo el depósito líquido del organismo. En consecuencia, los pacientes pueden deshidratarse rápidamente. (Ver fig 2). (5)

El *V. cholerae* se multiplica hasta alcanzar un número suficiente para producir toxina en el huésped, para lo cual la bacteria posee factores de movilidad y adherencia.

La secreción de líquidos y electrolitos inducida por la enterotoxina aparece sin que haya una lesión obvia de las células epiteliales intestinales, ni de las células endoteliales capilares de la lámina propia.

Las heces del paciente adulto con cólera son casi isotónicas, con concentraciones de sodio y de cloro ligeramente menores que las del plasma; la concentración de bicarbonato es aproximadamente el doble que la del plasma. El defecto fisiopatológico en el cólera es la deplección de líquidos extracelulares con el consiguiente choque hipovolémico, la acidosis por déficit de bases y la deplección progresiva de potasio. (10)

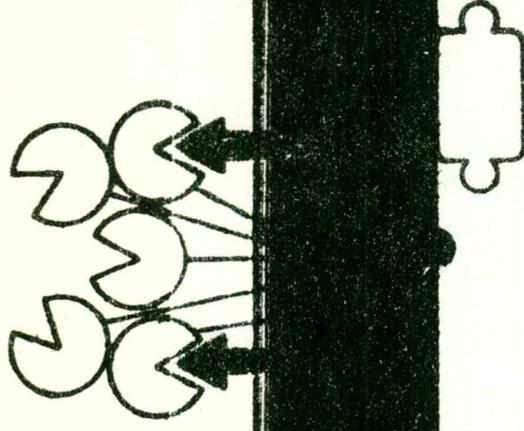
FIG. 2



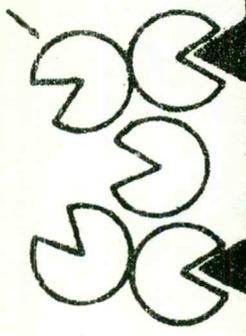
Subunidad A₁ Adenilciclasa

1.

1. La toxina del cólera se une a la membrana celular por sus subunidades B.
2. Las subunidades B alteran su conformación para permitir que las subunidades A penetren en la membrana.
3. Las subunidades A se disocian y A₁ activa la adenilciclasa.



Las unidades B permanecen unidas a la membrana



3.



e). CUADRO CLINICO

Después del período de incubación, aparece diarrea líquida sin otras molestias. En los casos más graves, las primeras evacuaciones pueden ser de más de 1000 ml., así que el paciente pierde varios litros de líquido isotónico en horas. A continuación suele aparecer el vómito no precedido de náusea y sin el menor esfuerzo.

Conforme progresa la deplección de sal aparecen calambres musculares intensos, principalmente en las pantorrillas.

A la exploración física, el típico paciente con cólera grave está cianótico, con facies hundida, abdomen escafoideo, poca turgencia de la piel y pulsos periféricos filiformes o ausentes. La voz es de tono alto y débil, frecuentemente inaudible, hay taquicardia, hipotensión y grados variables de taquipnea.

En todas las epidemias hay casos leves o subclínicos en los que la pérdida de líquido gastrointestinal no es lo suficientemente intensa para que requiera ser hospitalizados.

La enfermedad evoluciona de dos a siete días; posteriormente los signos y síntomas dependerán de lo adecuado de la substitución de líquidos y electrolitos. Si ésta se hace de inmediato, la recuperación es muy rápida y la mortalidad baja.

Las causas más importantes de muerte en los pacientes que no fueron tratados adecuadamente son choque hipovolémico, acidosis metabólica y uremia por necrosis tubular aguda. (11)

IMPORTANCIA DE *Vibrio* Y ESPECIES RELACIONADAS

TIPO DE INFECCION	ESPECIES ASOCIADAS
GASTROENTERITIS	<p><i>V. cholerae</i> serotipo 01 <i>V. cholerae</i> NO 01 <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. furnissii</i> <i>V. hollisae</i></p>
HERIDAS INFECTADAS	<p><i>V. alginolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. damsela</i>*</p>
SEPSIS	<p><i>V. cholerae</i> NO 01 <i>V. vulnificus</i></p>
INFECCION OTICA	<p><i>V. alginolyticus</i> <i>V. cholerae</i> NO 01 <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i></p>

**V. damsela* es ahora *Listonella damsela*.

(2)

f). DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE VIBRIO CHOLERAE

Los especímenes de heces se deben obtener al inicio de la enfermedad y preferentemente dentro de las primeras 24 horas y antes de que el paciente haya recibido agentes bactericidas. (15)

Aislamiento e identificación preliminar de V. cholerae:

1.- Exámen a simple vista de la muestra: En general las heces tienen aspecto de agua de arroz; un líquido blanquecino que contiene trocitos de epitelio sin ninguna materia fecal, de reacción alcalina y que emite un extraño olor a pescado.

2.- Exámen microscópico: Los microorganismos son gram negativos; un trocito desintegrado en portaobjetos, fijado y teñido con carbol-fuscina diluida 1:10, por 5 minutos, visualiza vibriones cortos en forma de coma.

3.- Recolección y cultivo de heces: Recoger muestras de heces las primeras 24 horas de la enfermedad. Pueden usarse hisopos rectales durante la fase aguda; en la convalecencia los hisopos no son seguros.

Los especímenes deben ser inoculados sobre placas de aislamiento con un retraso mínimo. (23)

La viabilidad de la especie de vibrio se mantiene bien a un pH alcalino; los vibriones son muy susceptibles a la desecación.

De haber un retraso en montar una placa de cultivo, se deben colocar los hisopos rectales en el medio de transporte semisólido de Cary y Blair, que mantienen la viabilidad de los vibriones hasta 4 semanas.

La solución amortiguada de glicerina, no es un medio de transporte satisfactorio. A falta de medios de transporte apropiados, se pueden mojar tiras de papel secante en las heces líquidas y guardarlas en bolsas plásticas a prueba de aire para impedir que se sequen; de esta manera el organismo permanecerá viable hasta 5 semanas. (5)

**MATERIA FECAL O
HISOPO RECTAL (CARY-BLAIR)**



MEDIOS DE TRANSPORTE

CARY - BLAIR

AMIES

STUART

MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO

AGUA DE PEPTONA ALCALINA

METODOS DE IDENTIFICACION

- 1.- CAMPO OSCURO.
- 2.- CONTRASTE DE FASES.
- 3.- CULTIVO.

Muchas técnicas empleadas en el laboratorio para el aislamiento de los organismos patógenos entéricos funcionan bien con el género *Vibrio*. Generalmente el organismo crece bien en los medios de agar sangre de oveja al 5% y agar Mac Conkey, pero su aislamiento mejora utilizando los medios y condiciones de crecimiento que lo favorecen. Un factor que hay que tomar en cuenta es la naturaleza halofílica de ciertas especies.

El medio selectivo más empleado es el agar tiosulfato citrato-sales biliares, sacarosas (TCBS), que puede ser sembrado con un inoculo abundante.

El agua de peptona alcalina (pH 8.4), es un caldo de enriquecimiento útil para la detección de un pequeño número de *V. cholerae*. Este caldo debe ser subcultivado al medio selectivo (TCBS) después de no más de 8 horas de incubación a 35°C para prevenir el sobrecrecimiento de las otras bacterias.

Cuando se sospecha la presencia de *V. cholerae* el caldo para enriquecimiento debe ser observado con microscopio con contraste de fase o con campo oscuro, para detectar la presencia de bacilos pequeños con su rápida movilidad característica. Si la movilidad es inhibida por el agregado de una gota de suero polivalente anti *V. cholerae* tipo 01, puede identificarse presuntivamente al microorganismo. (23)

Para el mejor aislamiento de los vibriones halófilos, los medios entéricos selectivos deben ser suplementados con NaCl al 3%, también pueden desarrollarse en caldo de infusión cerebro corazón y en agar sangre sin el agregado de sal. Las colonias de vibriones serán detectadas por su reacción positiva frente a la prueba de la oxidasa. La Organización Mundial de la Salud no recomienda el examen microscópico de heces para el diagnóstico de rutina. (5)

CARACTERISTICAS DE CULTIVO:

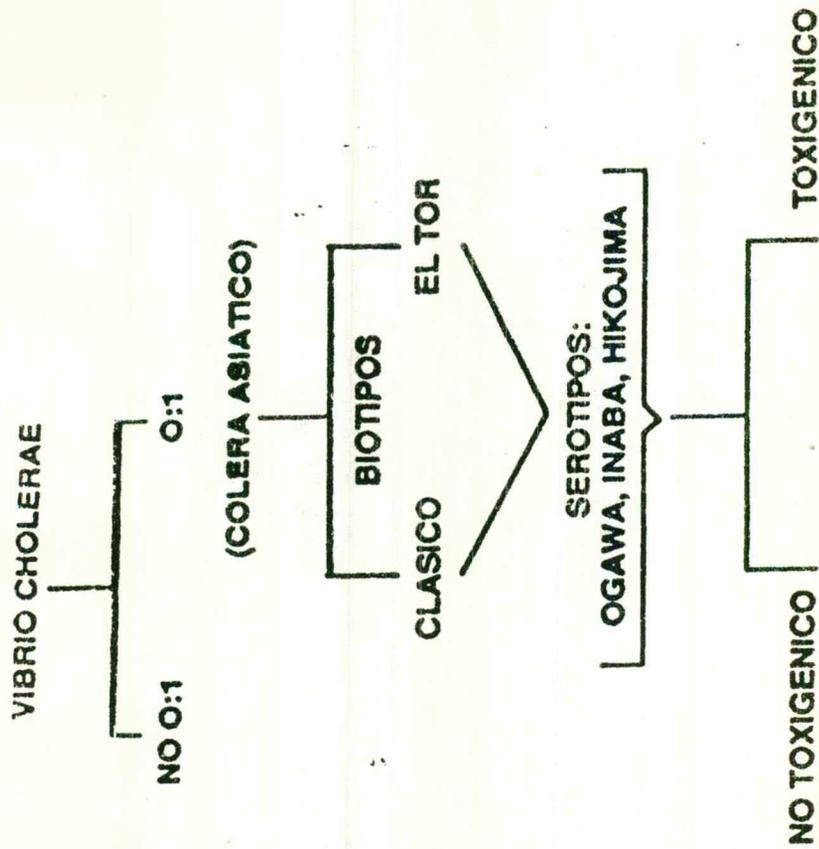
Luego de 18-24 horas de incubación a 35°C en aire, las colonias de los vibriones fermentadores de lactosa (*V. cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*) en el medio de TCBS serán de tamaño mediano, lisas, opacas, de bordes delgados y amarillas. Los otros vibriones con importancia clínica no fermentan la sacarosa y formarán colonias verde oliva.

Los cultivos de vibriones en agar Mac Conkey, aparecerán como colonias incoloras (Lactosas negativas). También crecerán en el agar sanguíneo, donde serán beta-hemolíticos (*V. cholerae* no 01, *V. cholerae* 01 del biotipo El Tor).

Una vez aislado, el organismo se puede identificar fácilmente por reacciones bioquímicas, y la identificación puede ser confirmada por la aglutinación con antisueros específicos. (23)

PRUEBAS BIOQUIMICAS PRELIMINARES:

El *V. cholerae* utiliza la glucosa por la vía fermentativa y produce acidificación del fondo en el agar KIA. También fermenta sacarosa produciendo una reacción: fondo ácido/pico ácido en el TSI. El agar lisina hierro mantiene un pico alcalino al ser inoculado con *V. cholerae*, que descarboxila lisina. El organismo produce indol, es rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer negativo. No utiliza citrato de Simmons y no produce ureasa. (16)



**SEROTIPOS DE VIBRIO CHOLERAE
BASADO EN ANTIGENOS SOMATICOS**

SEROTIPO	ANTIGENOS PRESENTES
OGAWA	AB
INABA	AC
HIKIJIMA	ABC

**PRUEBAS PARA DIFERENCIAR V. CHOLERAE CLASICO
DE V. CHOLERAE EL TOR**

TIPO	AGLUT. G.R POLLO	POLIMIXINA B	FAGO IV SUSCEPT.	VP	HEMOLISIS EN TUBO
V.CHOLERAЕ CLASICO	- (3)	+	+	- (2)	-
V.CHOLERAЕ EL TOR	+	-	-	+	+

(1) NO TODOS LOS BIOTIPOS EL TOR SON POSITIVOS

(2) LAS REACCIONES VP NO SIEMPRE SON TIPICAS

(3) RARAMENTE, UN V. CHOLERAЕ CLASICO PUEDE SER POSITIVO

PRUEBAS DIFERENCIALES

PRUEBA	V. CHOLERAЕ	V. PARAHAEVOLYTICUS	VIBRIO NO CHOLERAЕ
FERMENTACION DE GLUCOSA	+	+	+
FERMENTACION DE SACAROSA	+	-	+
ROJO DE METILO 37°C	+	+	-
SUPERFICIE TSI	A	R	R o A
FONDO TSI	A	A	A
H ₂ S EN TSI	-	-	-
CRECIMIENTO A 43°C	-	+	-
CALDO NUTRITIVO SIN NaCl	CRECE	NO CRECE	CRECE
CALDO NUTRITIVO CON 10% NaCl	NO CRECE	CRECE	NO CRECE

A = ACIDO R = ALCALINO N = NEGATIVO + = POSITIVO

DIFERENCIACION DE VIBRIO Y OTROS GRUPOS DE BACTERIAS

ORGANISMO	FONDO DEL TSI					OXIDASA *	LISINA DESCARB.	ARGININA DIHID.	ORNITINA DESC.	LIQ. GELA- TINA
	ACIDO	GAS	H ₂ S							
VIBRIO CHOLERAE	+	-	-			+	+	-	+	+
AEROMONAS HYDROPHILIA	+	d	-			d	+	-	-	+
PLESIOMONAS SHIGELLOIDES	+	-	-			+	+	+	+	-
ENTEROBACTERIAS	+	d	d			-	d	d	d	d

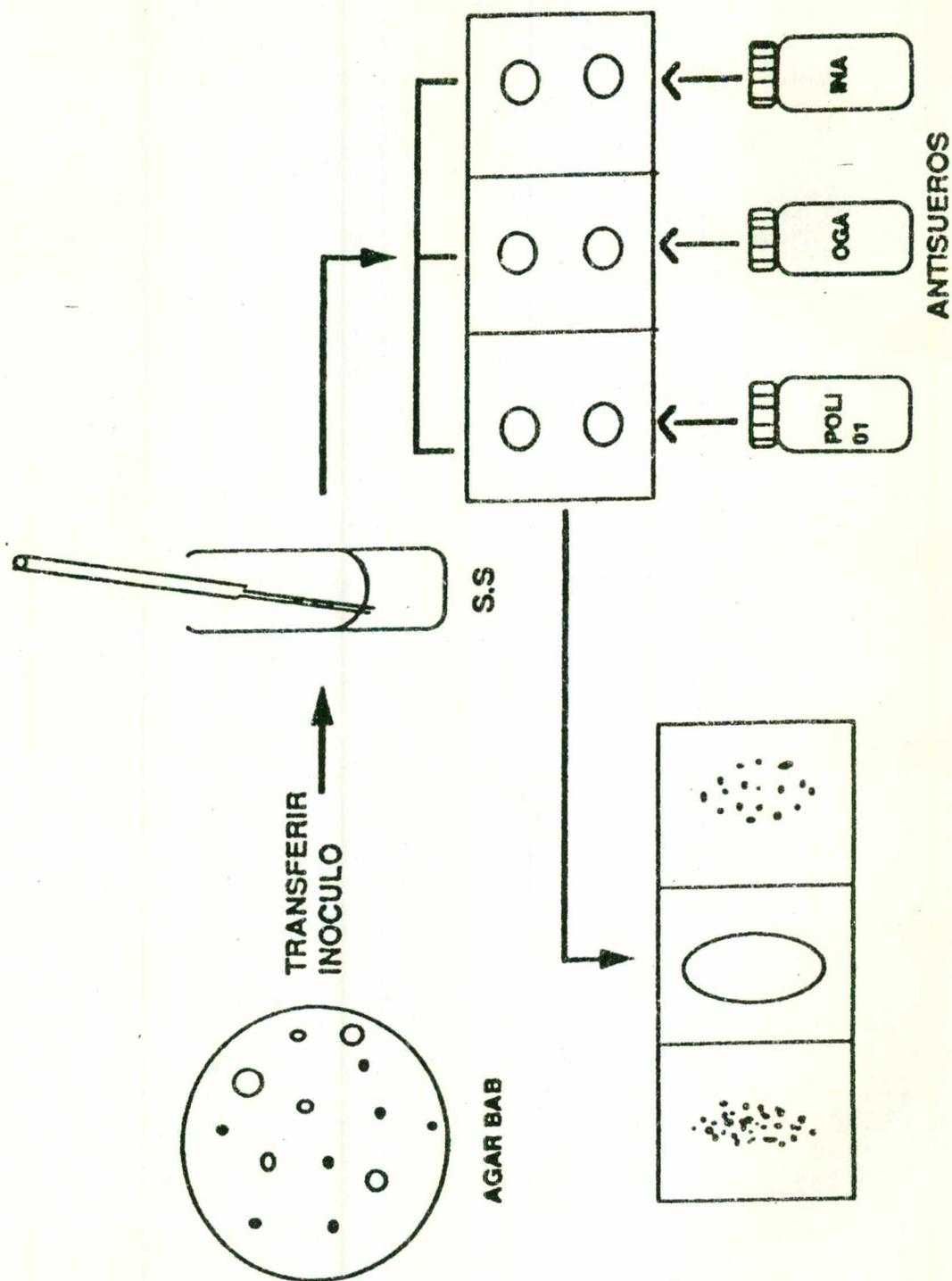
+ POSITIVO

- NEGATIVO

d DIFERENTE TIPO BIOQUIMICO

	V. COLERA	V. MIMICUS 1	V. PARAHEMOLYTICUS	V. ALGINOLYTICUS	V. VULNIFICUS 2	FLUVIALIS 3 (EF 6)	DAMSELA 4 (EF 5)	HOLLISAE 5 (EF 13)
	A/R/A	A/R/A	R/A	A/A	R/A/A	A/A	R/A	R/A
TSI	-	-	-	-	-	V	++	
GAS DE GLUCOSA	-	-	-	-	-	V	++	
GLUCOSA	A	A	A	A	A	A	A	A
LACTOSA	(A)	(A)	-	-	V (ONPG++)	-	-	-
SACAROSA	A	-	-	A	-	A	-	-
MANITOL	A	A	A	A	(-A)	A	-	-
CITRATO	++	++	++	++	++	++	-	-
GELATINA	+	+	+	+	+	+	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-	+	-
FENILALANINA	-	-	-	-	-	-	+	-
INDOL	+	+	+	+	-	-	-	-
RM	++	++	+	-	+	+	V	+(strong)
VP CLASICO	-	-	-	-	-	-	V	
EL TOR	+	-	-	+	-	-	-	
MOVILIDAD	+	+	+	+	+	+	+	(+) 7 Day
LISINA	+	+	+	+	+	-	V	
ARGININA	-	-	-	-	-	+	+	-
ORNITINA	+	+	+	+	+	-	-	-
CRECIMIENTO EN CALDO NUTRITIVO CON NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-
NaCl 6%	V	V	+	+	+	+	V	.
NaCl 10%	-	-	-	+	-	-	-	-

IDENTIFICACION SEROLOGICA DE V. CHOLERAE 01



PRUEBAS PARA DISTINGUIR VIBRIONES CLASICAS Y EL TOR

Prueba de hemólisis

1. Cultivar los cultivos sospechosos durante 18 hrs. en medio preparado añadiendo casitona 1% a cloruro de sodio isotónico en solución 0.85%. Dispensar en tubos y esterilizar a 121°C durante 15' o cultivar en caldo de infusión de corazón (HIB) durante 24 hrs.

2. Agregar a cada ml de cultivo 1 ml. de una suspensión 5% de eritrocitos de oveja lavados en solución fisiológica.

3. Incubar las mezclas a 37°C durante 2 hrs. y colocar en refrigerador a 4-6°C durante 24 hrs. La producción de hemolisina está indicada por la limpieza (lisis) de eritrocitos; leer pero no agitar los tubos.

Las cepas de El Tor aisladas, actualmente no son en general hemolíticas en esta prueba, pero casi todas son hemolíticas cuando se prueban en la misma forma después de cultivarlas en caldo infusión de corazón que contiene 1% de glicerol como estabilizador.

(23)

Prueba de "soga"

Emulsionar en portaobjeto una pequeña cantidad de crecimiento de un cultivo de plano inclinado de agar de 24 hrs., o se usa placa de agar gelatina, en una gota de solución salina 0.5% de desoxicolato de sodio. Examinar la gota para una "soga" como de mucus que se extiende desde la gota al asa cuando se levanta esta última del portaobjeto. Pueden observarse las siguientes formas:

1. + + : se observa inicialmente una cuerda que todavía puede producirse 45-60 segundos. Todos los cultivos de *V. cholerae* y casi todos los de biotipo El Tor dan esta clase de reacción, y la soga tardía es más fuerte que la inicial. Casi todas las especies de *Vibrio* dan una reacción demorada más débil que la que se produce inicialmente.

(23)

2. + -: al principio se forma una sogá pero desaparece a los 45-60 segundos después. Casi todas las especies de Vibrio dan esta forma.

3. - -: no hay sogá inicial ni tardía.

Prueba de hemoaglutinación directa

Glóbulos rojos de pollo y oveja pueden usarse para este propósito.

1. Hacer una suspensión 2.5% de células lavadas 3 veces en solución salina 0.85% y centrifugarlas.

2. Dividir un portaobjetos de vidrio limpio en varias columnas y poner un asa de 3 mm de suspensión en cada cada columna.

3. Agregar una pequeña porción de crecimiento de planos inclinados de agar a los glóbulos rojos con aguja o asa y mezclar bien. Los glóbulos rojos se agrupan a los pocos segundos en los casos positivos.

Cepas conocidas hemoaglutinantes (El Tor) y no hemoaglutinantes (clásicas) deben usarse como controles para cada nueva suspensión de glóbulos rojos. (23)

Prueba de sensibilidad a la polimixina

1. Cultivar las cepas a probar durante 20-24 hrs en caldo nutriente.

2. Extender el inóculo de cultivo de caldo sobre la superficie de una placa de agar nutriente y colocar sobre esta última un disco de 50 unidades de polimixina B.

3. Después de incubar 24 hrs a 37°C observar zonas de inhibición en las placas.

El biotipo clásico de V.cholerae es sensible y el biotipo El Tor es resistente. (23)

Sensibilidad al bacteriófago del cólera grupo IV

El bacteriófago del cólera (mukerjee) grupo IV, usado en concentración de rutina para pruebas, lisa cultivos de V. cholerae clásico pero no lisa cepas El Tor. Los cultivos a probar se inoculan en una serie de toques sobre una placa de agar nutriente. (23)

Quando los toques se secan se coloca un asa de bacteriófago IV sobre cada toque. Después de incubar observar lisis en la placa.

Serología de *V. cholerae*

Están presentes antígenos O somáticos y antígenos H flagelares. Los verdaderos vibriones del cólera han sido agrupados de acuerdo a sus antígenos O. El antígeno A es común a todos, que poseen además un segundo antígeno O, Ogawa (B) o Inaba (C). Así las fórmulas de las formas O (grupos sub-O) son:

Ogawa AB
Inaba AC
HikojimaABC (23)

Sueros O: Calentar los cultivos de Inaba, Ogawa e Hikojima por separado, durante 2 horas y media a 100°C para inactivar los antígenos H. Tratar con alcohol absoluto 4 hrs. a 37°C, lavar con acetona, secar y moler en polvo fino. Volver a suspender el antígeno en polvo en solución fisiológica y dar a los conejos 4 inyecciones a intervalos de 4 días. La primera inyección consiste en 0.5 ml de suspensión con la densidad de un cultivo de caldo de 24 hrs.; luego se dan 1, 2 y 3 ml aumentando también la densidad.

Antisueros absorbidos: Usar crecimiento de 10 cajas de petri estándar por cada ml de antisuero no diluido. Absorber antisuero Inaba con cepa Ogawa e Hikojima, respectivamente, en absorciones separadas. Absorber antisuero Ogawa con cepa Inaba.

Prueba de aglutinación en portaobjetos: Un asa de crecimiento de plano inclinado de agar KIA o nutriente fresco se emulsiona en unos 0.2 ml de solución de yoduro mercúrico en tubos pequeños. Un asa de esta suspensión densa se coloca en el portaobjetos dividido; luego un asa o una gotita de antisuero se coloca en la lámina por debajo de cada gotita de suspensión. La suspensión y el antisuero de cada división se mezclan por separado. Observar la presencia de aglutinación. Siempre deben usarse controles apropiados para asegurar que la aglutinación no sea espontánea.

g). INVESTIGACION DE V. CHOLERAЕ EN AGUAS

El exámen de agua potable debe ser frecuente y regular. La frecuencia dependerá de la calidad de la fuente, el tratamiento del agua, los riesgos de contaminación y el tamaño de la población servida.

Las muestras de agua deben ser tomadas en ciertos puntos fijos, tales como estaciones de bombeo, tanques de almacenamiento o sitios que al haber sido muestreados con anterioridad hayan revelado problemas de contaminación. El muestreo debe incrementarse cuando se presenten epidemias, en tiempo de lluvias etc.

Se debe recolectar por lo menos un litro de agua en un recipiente estéril que contenga dos cucharadas cafeteras llenas de NaCl. Después se ajusta el pH a 9.2 con NaOH 1N, antes de ser transportada al laboratorio. La incubación es igual que para las muestras clínicas, lo mismo que las pruebas bioquímicas que se utilizan. (2)

Enriquecimiento doble en agua peptonada:

Se emplean frascos de boca ancha de 500 ml con tapón de rosca.

Se le añaden 50 ml de agua peptonada concentrada alcalina conteniendo 10% de peptona y 10% de NaCl.

Se ajusta el pH a 9.0 con NaOH 10N y se esteriliza en autoclave.

Los frascos son enviados al sitio del problema, en donde se colectan aproximadamente 450 ml de agua blanca, quedando diluido el medio 1:10.

Se incuba durante 6 horas o toda la noche a 37°C.

Con un hisopo se toma una muestra de la superficie del frasco y se siembra en medio selectivo de TCBS. Este mismo hisopo se coloca en un tubo que contenga 10 ml de agua peptonada alcalina con pH de 9.0, con 1% de peptona y 1% de NaCl.

Tanto la caja como el tubo se incuban a 37°C, la primera de 18 a 24 horas, y el tubo durante 6 horas.

A partir del crecimiento en tubo, se siembra otra placa de medio TCBS y se incuba de 18 a 24 horas, para aislar colonias amarillas sospechosas. (2)

**HISOPO DE MOORE PARA EL MUESTREO DE AGUAS NEGRAS O DE CORRIENTE
PARA EL AISLAMIENTO DE V. CHOLERAЕ.**

Los hisopos de Moore pueden contruirse empleando pedazos de gasa de algodón de malla cerrada (15 cm de ancho y 60-120 cm de largo), doblándolo de forma longitudinal por varias ocasiones para formar rollos cilíndricos compactos, atando el centro firmemente con un alambre. Se envuelve el hisopo en papel y se esteriliza a 15 lb/15min.

Los alambres que sostienen las gasas están unidos a cables de pescar de nylon o bien se usa otro pedazo de alambre; se sumergen los hisopos en las aguas negras para obtener la muestra dejándolos 24 horas.

Se quitan las gasas, se separan los alambres e inmediatamente se sumergen en 500 ml de agua peptonada alcalina con pH de 8.5 a 9.0.

El transporte al laboratorio debe hacerse con refrigerantes; en el laboratorio se ajusta el pH antes de proceder a la incubación y se hacen resiembras después de 18 horas a 37°C en 2 ó 3 cajas de TCBS.

Por tratarse de un material altamente contaminado, se hace un doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina, ya que éste procedimiento permite una mejor recuperación de V. cholerae.

El muestreo de aguas blancas y aguas negras también es útil para la detección de otros enteropatógenos como S. typhi, S. paratyphi, Campylobacter, etc., empleando otros medios específicos para su aislamiento. (2)

FIGURA #3
SISTEMA DE TRANSPORTE DE CARY BLAIR

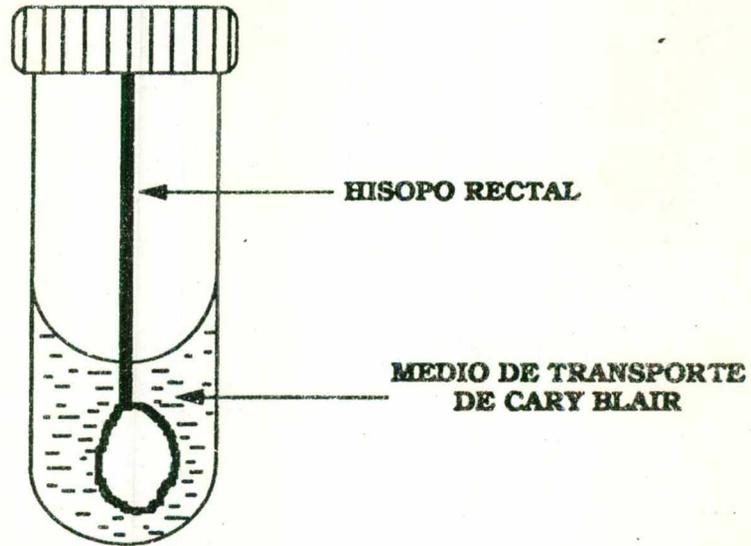
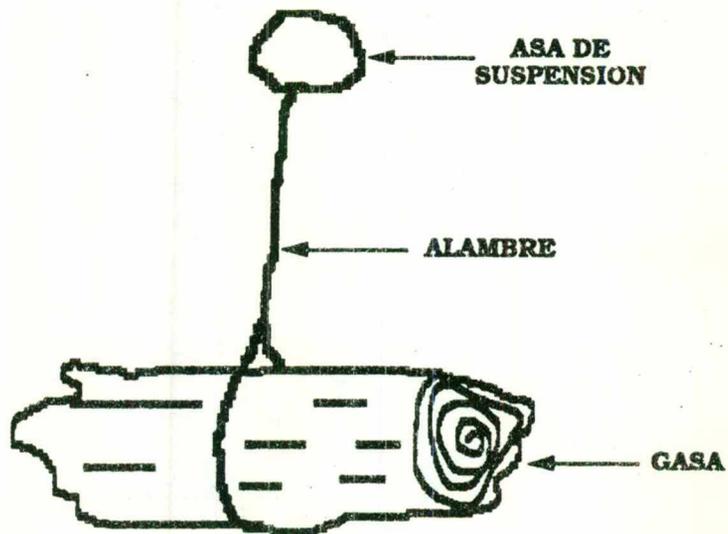


FIGURA #4
HISOPO DE MOORE



(2)

h). INVESTIGACION DE V. CHOLERAЕ EN ALIMENTOS

Las muestras de alimentos sospechosos se recolectan al azar y se trituran en agua peptonada alcalina en proporción de 1:10 utilizando una licuadora estéril. También se pueden pesar 50 gramos del alimento que se desmenuza finamente con un cuchillo estéril en 500 ml de agua peptonada alcalina. Posteriormente se incuba durante 6 a 8 horas a 37°C para después sembrarla en el medio selectivo de TCBS.

Se recomienda el método de doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina pH 9.0, con 1% de NaCl, con resiembra a TCBS después de 6 horas de incubación.

Los alimentos enlatados o envasados al alto vacío se empacan en condiciones estériles, por lo que no se espera recuperar *V. cholerae*, ni ninguna otra bacteria contaminante, a excepción de que hubiera habido fallas en el control de calidad del producto.

(2)

i). TRATAMIENTO

Terapia de rehidratación:

La deshidratación, la acidosis y la reducción de potasio durante el cólera, son causados por la pérdida de agua y sales a través de las heces y los vómitos. El tratamiento consiste en restituir el agua y los electrolitos en las proporciones perdidas. Para la rehidratación oral se recomienda una solución de sales de rehidratación oral (SRO). Se dispone de SRO empacadas en sobres para preparar un litro de solución, esto es ideal para pacientes ambulatorios. Los pacientes con cólera, requieren rehidratación endovenosa con más frecuencia que los pacientes con diarrea debido a otras causas. (19)

La solución de Ringer Lactato (Solución Hartman), es la solución recomendada para la rehidratación endovenosa ya que, por lo general, está disponible comercialmente y su composición es adecuada para el tratamiento de todas las diarreas agudas en pacientes de todas las edades.

Durante un brote, por lo general es posible tratar de 80 a 90% de los pacientes sólo con rehidratación oral. A la mayoría de pacientes que al inicio requieren la administración de suero endovenoso, se les completa la rehidratación con SRO, hasta que cese la diarrea.

Deberá permitirse a los pacientes de cólera beber agua, el alimento debe administrarse después de 3 a 4 horas de tratamiento, cuando se ha concluido la rehidratación. En los lactantes deberá fomentarse la práctica de seguir alimentandolos al pecho materno. (10)

Antibióticos: En varios casos de cólera, los antibióticos pueden reducir el volumen y duración de la diarrea y acortar el tiempo durante el cual se excrete *V. cholerae*. Los antibióticos deberán administrarse por vía oral tan pronto como cecen los vómitos, lo que generalmente ocurre pocas horas después de iniciada la rehidratación. No hay ventaja alguna en utilizar antibióticos inyectables, los cuales son costosos.

La tetraciclina es el antibiótico preferido en la mayoría de los lugares. La doxicilina, una forma de tetraciclina de acción prolongada que se administra una sola vez al día, se prefiere cuando se dispone de ella, debido a las ventajas de una sólo administración al día. (7)

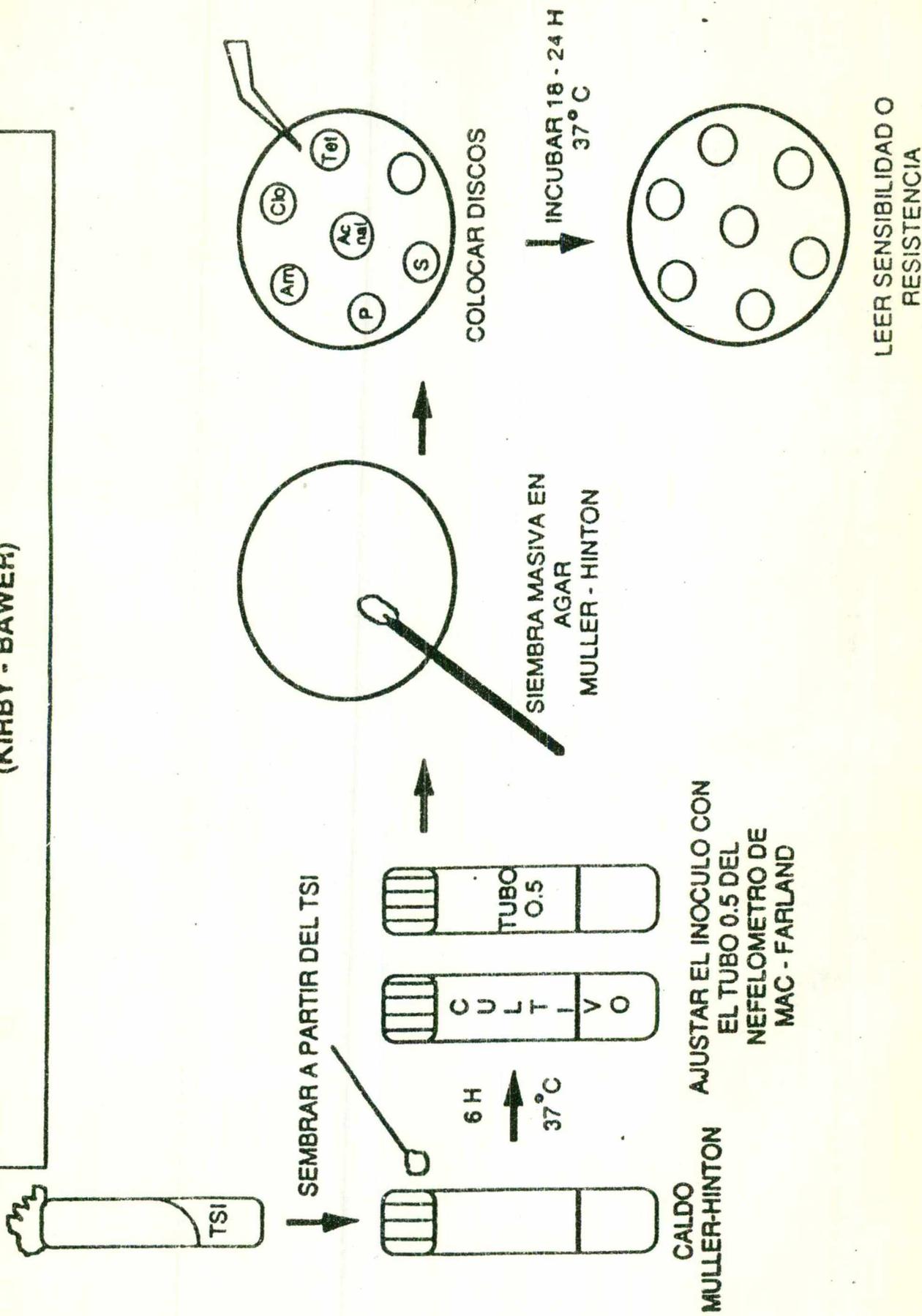
En algunos lugares el *V. cholerae* ha adquirido resistencia a la tetraciclina y otros antibióticos, por lo que es necesario realizar pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. (Ver pag sig.).

Cuando las cepas de *V. cholerae* son resistentes a la tetraciclina, pueden utilizarse la furazolidona, trimetropin-sulfametoxazol, eritromicina ó cloranfenicol. Para los niños de corta edad cuando no se dispone de jarabe de tetraciclina, puede utilizarse trimetropin-sulfametoxazol.

La sulfadoxina (Fanasil), no es efectiva y puede ocasionar reacciones graves e incluso mortales en una sola dosis.

No deberán utilizarse para tratar el cólera otros productos antidiarreicos, antieméticos, antiespasmódicos o corticosteroides. (19)

**ANTIBIOGRAMA: PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS
(KIRBY - BAWER)**



MEDICAMENTO	DOSIS	
	NIÑOS	ADULTOS
TETRACICLINA	12.5mg xKg. x día cada 6 hrs. x 3 días	500mg. cada 6 hrs. x 3 días
DOXICICLINA		300mg dosis única

(En caso de cepas resistentes a tetraciclinas)

TRIMETROPIN CON SULFAMETOXASOL	TMP 5mg.x kg.x día SMX 25mg.xKg.x día cada 12 hrs.x 3días	TMP 160 mg. SMX 80 mg. cada 12 hrs.x 3 días
FURAZOLIDONA	1.25mg. x Kg.x día cada 6 hrs.x 3 días	100mg. cada6 hrs. x 3 días
CLORAMFENICOL	25mg x Kg. x día cada 6hrs.por 3 días	750mg.cada 6 hrs. por 3 días
ERITROMICNA	7.5mg x Kg. x día cada 6 hrs.x 3 días	500mg.cada 6 hrs. x 3 días

(19)

j). PROFILAXIS

Las personas contraen el cólera por beber o comer alimentos contaminados con *V. cholerae*. La prevención se basa en reducir las posibilidades de ingerir los vibrios. Cuando el cólera aparece en una comunidad, debe intensificarse la promoción de la eliminación adecuada de las heces humanas, el abastecimiento higiénico del agua y buenas prácticas de alimentación, además deberán aplicarse las medidas siguientes:

1.- Deberá mantenerse a la comunidad activamente educada e informada acerca de la extensión de la gravedad del brote, deberá utilizarse todos los canales posibles de difusión para informar al público acerca de la eficacia y simplicidad de los métodos actuales de tratamiento de la enfermedad.

2.- La ropa sucia de los pacientes, camas y la utilizada por el personal de salud, deberá ser depositada en bolsas de plástico cerradas e identificadas para su manejo especial en lavandería, dónde deberá ser manipulada en forma separada para ser hervida y lavada en forma inmediata.

3.- Se debe verificar la desinfección de camas, cómodos, bacinicas, lavabos, escusados y utensilios utilizados por los enfermos. El inodoro deberá ser desinfectado en cada ocasión que se use, aplicando de 30 a 40 ml de hipoclorito de sodio al 10% ó cloro comercial al 6% para el manejo de heces o vómitos antes de su eliminación. Los pisos una vez efectuado su barrido deberán ser trapeados con cloro o sustancias germicidas. (17)

LACTANCIA MATERNA EN LA PREVENCION DEL COLERA

Se ha demostrado en áreas endémicas que en niños que se encuentran amamantando, la concentración de IgA contra toxina de cólera y lipopolisacáridos presente en la leche materna existe una menor probabilidad de desarrollar diarrea por *V. cholerae* cuando se presenta un caso de cólera en la familia. (8)

En otro estudio llevado también en Bangladesh, se encontró que la lactancia materna reducía en un 70% el riesgo de desarrollar cólera grave. Esta protección disminuía con la edad de los niños pero se mantenía hasta los 30 meses de edad. (3)

Por otro lado, se ha propuesto que la lactancia materna si bien protege al niño de infección sintomática, no lo protege de colonización por *V. cholerae* O1 y en consecuencia de excretar la bacteria hacia el exterior. De esta manera, los miembros de la familia se exponen a concentraciones mayores de *V. cholerae*, principalmente si no se adoptan medidas de higiene apropiadas. (8)

Riley y cols. encontraron que el desarrollo de diarrea por *V. cholerae* se asociaba con la existencia en la familia de un niño lactante que además se encontraba colonizado en forma asintomática por *V. cholerae*. (20)

XI. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

El *V. parahaemolyticus* constituye otro de los microorganismos de incorporación reciente a la relación de patógenos plenamente identificados como agentes etiológicos de gastroenteritis aguda.

Fué aislado y descrito por primera vez en Japón por Fujino y colaboradores en 1950, a raíz de un brote de gastroenteritis originado a partir de la ingesta de alimentos marinos.

No fué sino hasta 1958, al presentarse en la población numerosos brotes consecutivos a la ingesta de pescado, que ocupó la atención de las autoridades sanitarias de Japón.

También se ha comprobado posteriormente su amplia distribución en los Estados Unidos de Norteamérica, a partir de 1969 se han presentado 16 brotes, algunos de los cuales han sido debidamente confirmados por diagnóstico de laboratorio al aislar al microorganismo de alimentos y especímenes humanos.

También se han notificado brotes de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* en otros países tales como Canadá, Panamá, Inglaterra, Togo y Australia, incluso en barcos y aviones durante su travesía.

En todos los casos anteriormente mencionados el alimento involucrado consistió en alimentos marinos tales como: camarones, jaibas, langostinos y peces. (6)

a). FUENTE DE INFECCION Y RESERVORIO

El habitat natural del *V. parahaemolyticus* es el agua de mar (específicamente, las aguas que se encuentran en las áreas próximas a los litorales); la frecuencia de aislamiento del microorganismo disminuye a medida que se recolectan muestras de aguas cada vez más alejadas de las costas. Lo anterior se encuentra relacionado con las bajas temperaturas de las aguas existentes en las áreas pelágicas que son incompatibles con la vida del microorganismo; esto último da lugar a una variación estacional en lo referente a la prevalencia del germen en las costas (agua, animales marinos, plancton y sedimentos), con máximos durante los meses calientes del año. (15)

El *V. parahaemolyticus* se encuentra, aparentemente en forma muy constante, a lo largo de las costas en todo el mundo cuando la temperatura se eleva por encima de los 20°C; se le ha podido aislar en países de América: Estados Unidos de Norteamérica y Brasil; de Europa: Gran Bretaña y España; de Africa: Togo; y Asia: Golfo Pérsico; de hecho, en donde quiera que se ha realizado su búsqueda.

En México ha sido estudiado en la ciudad de Puebla, lográndose identificar, tanto bioquímica como serológicamente, seis cepas aisladas de 103 muestras de mariscos y peces; cuatro de estas seis cepas fueron positivas a la prueba de Kanagawa.

Adicionalmente se detectaron cepas en las heces de adultos del sexo masculino con cuadro clínico de gastroenteritis aguda y con antecedentes de ingesta previa de mariscos crudos. (6)

b). AGENTE INFECCIOSO

El *V. parahaemolyticus* es un bacilo gram negativo enteropatógeno no esporulado, halófilo, ligeramente curvo, mostrando pleomorfismo; es móvil mediante un flagelo polar, anaerobio facultativo, con condiciones óptimas de crecimiento en 30 y 37°C y concentración de NaCl de 3 a 7%, responsable de brotes de gastroenteritis por consumo de carne cruda de pescado y mariscos insuficientemente cocidos.

Se ha observado que las cepas enteropatógenicas aisladas de heces humanas presentan actividad hemolítica en un medio especial (Wagatsuma), este fenómeno comúnmente no lo presentan los alimentos en mariscos. (13)

El microorganismo es patógeno para ratones, perros, gatos, así como para animales marinos. Su incidencia aumenta en los meses de verano.

Otros factores de riesgo asociados a la aparición de brotes son: la defectuosa refrigeración que favorece la multiplicación del microorganismo, y el manejo inadecuado de los alimentos en las cocinas, que propicia la contaminación cruzada de los alimentos marinos crudos a los cocidos. (6)

V. parahaemolyticus se ha aislado también de muestras de origen extraintestinal, incluso sangre. (5)

c). PATOGENIA

V. parahaemolyticus produce citotoxinas (toxinas que destruyen las células de mamíferos en que penetran).

Las citotoxinas actúan destruyendo la mucosa intestinal y causando una colitis inflamatoria. La mera presencia de estos microorganismos en la luz del sistema gastrointestinal no es suficiente para causar síntomas. La mayoría de los microorganismos prefieren adherirse a un sustrato y en el tracto intestinal la adherencia es importante para las manifestaciones clínicas evidentes de la enfermedad.

El fenómeno de la adherencia ha sido estudiado en una variedad de microorganismos, particularmente E. coli. Estas y otras bacterias forman fimbrias, u organelas proteicas, que se adhieren específica o no específicamente a una variedad de células de mamíferos. A veces se identifican como factores colonizantes.

Las organelas adherentes son mediadas por plásmidos y son diferentes de los pelos sexuales implicados en la transmisión del factor de fertilidad o en la transferencia de resistencia antimicrobiana y de variaciones fisiológicas.

En el caso de E. coli estas fimbrias han sido subclasificadas en base a su capacidad para ser inhibidas o no por la manosa. Otras bacterias causantes de diarrea muestran evidencias de mecanismos similares para la adherencia de los microorganismos a las superficies de células mucosas lumbinales.

La prueba actualmente disponible para determinar la capacidad de invadir y destruir las células epiteliales del lumen colónico es la de Sereny, que necesita la demostración de conjuntivitis en el cobayo después de la introducción de los elementos sobrenadantes del cultivo. Esta capacidad de invadir y destruir células puede relacionarse con el antígeno O, nombre que se da a los polisacáridos somáticos presentes en la pared celular de las bacterias Gram negativas. La alteración química de estos polisacáridos resulta en modificaciones del poder invasor y, por lo tanto, lleva a la conclusión de su participación en la demostración de esta propiedad.

No se puede descartar la posibilidad de que las exotoxinas citotóxicas puedan causar un efecto similar, como lo sugiere la destrucción celular causada por vibrios, shigelas, estafilococos y clostridios.

(12)

d). CUADRO CLINICO

El V. parahaemolyticus causa gastroenteritis con náuseas, vómitos, calambres abdominales, hipotermia y escalofríos. La diarrea es generalmente líquida pero a veces con sangre. La enfermedad es por lo general benigna y autolimitada pero puede ser fatal.

Existe una buena correlación entre patogenicidad y la prueba de Kanagawa positiva. (15)

e). AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRELIMINAR DE

V. parahaemolyticus

Cultivo inicial: Deben obtenerse muestras de heces, hisopos rectales o vómitos en los brotes del microorganismo. Las muestras deben tomarse a la primera oportunidad porque el estado de portador dura poco tiempo.

Nota: No refrigerar las muestras, porque el organismo es sensible a temperaturas menores.

1. Si el tiempo en tránsito es mucho mayor de 8 horas:

- a) Colocar la muestra de heces en medio de transporte de Cary-Blair.
- b) En el laboratorio diseminar un asa en agar TCBS, además de otros medios entéricos empleados.
- c) Incubar a 35°C durante 24-48 horas.

(No descartar las placas como negativas antes de 48 horas.)

2. Si el tiempo en tránsito es de 8 horas o menos:

- a) Colocar la muestra de heces en agua de peptona alcalina.
- b) Después de 8 horas de incubación diseminar un asa en agar TCBS.
- c) Incubar a 35°C durante 24-48 horas.

3. Muestra de hisopo rectal:

- a) Diseminar la muestra (preferiblemente con hisopo de punta de fibra poliéster) contenida en 7 ml de medio de transporte, con un asa en agar TCBS y otros agares entéricos.
- b) Incubar las placas a 35°C durante 24-48 horas.

Nota: Todos los medios deben contener por lo menos 3% de NaCl a menos que se especifiquen otras concentraciones. (23)

Aspecto de *V. parahaemolyticus* en placas de agar

TCBS

1. Las colonias son redondas, de 2-3 mm de diámetro, de centro verde o azul (la falta de color amarillo indica que no hay producción de ácido con sacarosa lo que diferencia a este microorganismo del *V. cholerae*).
2. Las colonias de *V. alginolyticus* aparecen más grandes y amarillas.
3. Los coliformes, proteus y enterococos, si están presentes, aparecen como colonias pequeñas y translúcidas. (23)

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Recoger con aguja 2 o más colonias típicas o sospechosas, si existen, de placas de agar TCBS a los siguientes medios:

Plano inclinado de agar TSI

1. Diseminar el plano y punzar el fondo.
2. Incubar hasta el día siguiente a 35°C
3. *V. parahaemolyticus* produce plano alcalino y fondo ácido; no se forma gas y el crecimiento de cultivo en plano de TSI es negativo para H₂S. (Esta es una reacción típica de *Shigella*). (16)

TSB (caldo soja tripticasa con 3% de NaCl) y TSA (plano inclinado de agar soja tripticasa con 3% de NaCl)

1. Inocular TSB y TSA e incubar hasta el día siguiente a 35°C.
2. Usar estos cultivos como fuente de inóculo para otras pruebas, coloración de Gram y exámenes microscópicos.
3. *V. parahaemolyticus* es un organismo pleomórfico Gram negativo que muestra bacilos curvos o rectos con flegelos polares. (16)

Medio de prueba de movilidad

1. Inocular el tubo de medio de prueba de movilidad punzando la columna de medio a una profundidad aproximada de 5 mm.
2. Incubar 24 horas a 35°C.
3. El crecimiento circular difuso desde la línea de punción constituye una prueba positiva.
4. *V. parahaemolyticus* es móvil. (23)

Caldo de tripticasa sal (STB), halofilia

1. Usando cultivo en plano inclinado de TSA inocular 4 tubos de base STB conteniendo 0, 6, 8 y 10% de NaCl respectivamente.
2. Incubar a 35°C durante 24 horas.
3. *V. parahaemolyticus* crece bien en concentraciones de 6 y 8% de NaCl, pero no crece o crece mal en 0 y 10% de NaCl.

Otras caracterizaciones consideradas como mínimas para aislamientos fecales en medio TCBS incluyen:

Sacarosa no fermentada.

Oxidasa-positiva.

Lisina descarboxilasa- positiva.

Voges-Proskauer- negativa.

Urea generalmente negativa, ocasionalmente rápida positiva. (16)

Según Twedt, una lista mínima para selección de características capaz de asegurar la presencia presuntiva de *V. parahaemolyticus* debe incluir lo siguiente:

1. Morfología; bacilo asporógeno curvo Gram negativo.
2. Aspecto en TSI: plano alcalino/fondo ácido, gas negativo, H₂S-negativo.
3. Prueba Hugh-Leifson: Glucosa-O/F positivo, gas negativo.
4. Citocromo oxidasa: positivo.
5. Prueba de arginina dehidrolasa: negativa. (13)

6. Prueba de lisina descarboxilasa: positiva.
7. Prueba de halofilia: 0% NaCl negativa; 6%, 8% NaCl positiva; 10% NaCl negativa o pobre.
8. Crecimiento a 42°C: positivo.
9. Voges-Proskauer: negativa.
10. Fermentación de sacarosa: negativa.

(13)

**ESQUEMA DE IDENTIFICACION
PARA VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS**

Muestra de heces
Mac Conckey
XLD
TCBS
(Colonias, lactosa y sacarosa negativas)

Kligler	LIA	MIO	UREA
(K/A)	(E, S/D)	(E, S/D)	(V)

↓
Oxidasa (+)

↓
Vibrio (Indol + = 100%)
Pseumonas (Indol - = 100%)

Caldo Nutritivo (ó Mueller-Hinton)	Caldo N (0 M-H)	Caldo N (ó M-H)	Caldo N (ó M-H)	LIA (NaCl : 1%)	MIO 1%
0% de NaCl	1% NaCl	8% NaCl	10% NaCl		
(-)	(+)	(+)	(-)	(K/K)	(+ / + / +)

↓
V. parahaemolyticus

V = variable

E = escaso

S/D = sin desarrollo

Kligler	LIA	MIO	Crec. (+)
K/A	s/d	s/d	V. Cholerae
			V. mimicus

OXIDASA

(-)

V. metschnikovii

(+)

V. hollissae V. furnissii
 V. damsela V. anginolyticus
 V. fluvialis V. vulnificus
V. parahaemolyticus

ORNITINA



- V. hollisae
- V. damsela
- V. fluvialis
- V. furnissii

- V. alginolyticus
- V. vulnificus
- V. parahaemolyticus

VOGES PROSKAUER

(-)

V. vulnificus

V. parahaemolyticus

(+)

V. alginolyticus

CRECIMIENTO EN

NaCl al 8%

(+)

V. parahaemolyticus

V. vulnificus

(-)

10%	8%	6%	1%	0%	NaCl
-	-	+	+	+	<i>V. cholerae</i>
-	-	+	+	+	<i>V. mimicus</i>
-	+	+	+		<i>V. metschnikovii</i>
		+	+		<i>V. hollisae</i>
		+	+		<i>V. damsela</i>
	+	+	+		<i>V. fluvialis</i>
	+	+	+		<i>V. furnissii</i>
+	+	+	+		<i>V. alginolyticus</i>
	+	+	+		<i>V. parahaemolyticus</i>
		+	+		<i>V. vulnificus</i>

FENOMENO DE KANAGAWA

La reacción de Kanagawa prueba la presencia de una hemolisina específica en agar Wagatsuma. Una reacción positiva tiene estrecha correlación con la patogenicidad de aislamientos de *V. parahaemolyticus*.

Los aislamientos que han causado enfermedad humana son casi siempre Kanagawa positivos, pero aislamientos recuperados de mariscos son casi siempre Kanagawa negativos. (23)

PRUEBA DE KANAGAWA

1.- Hacer un toque con un asa de cultivo de 18 horas en caldo tripti-
casa soya NaCl 3% en una placa bien seca de agar Wagatsuma.
(Pueden hacerse varios toques en forma circular en una sola placa).

2.- Incubar a 35°C.

3.- Observar los resultados en menos de 24 horas.

4.- La prueba positiva consiste en B-hemólisis: zona de claridad
transparente de células sanguíneas alrededor de la colonia.

5.- Es muy importante recordar que ninguna observación después
de 24 horas es válida en esta prueba. (23)

f). TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

La rehidratación es usualmente el único tratamiento necesario, pero en algunos casos severos el paciente requiere intervención.

La terapia antimicrobiana puede ser beneficiosa y la tetraciclina parece ser la droga de elección.

Se ha mostrado que las especies de *Vibrio* son sensibles a cloramfenicol, gentamicina, tetraciclinas y se ha sugerido que las quinolonas (oxfloxacin, norfloxacin, enoxacin, pefloxacin y ciprofloxacín), son de utilidad.

La ciprofloxacín fué la más activa de las quinolonas, solamente un aislamiento de *V. parahaemolyticus* fué resistente a 1 mg/l. (7)

PROFILAXIS: El mismo que para *V. cholerae*. (ver pag 64).

XII. A P E N D I C E

INTRODUCCION

Los medios de cultivo empleados en el laboratorio clínico se encuentran disponibles en el comercio bajo la forma de productos deshidratados y brindan la facilidad de su preparación, cada medio de cultivo se utiliza con el propósito de favorecer el desarrollo de algunos microorganismos o de inhibir el de otros, dependiendo de la composición química de cada medio, por lo que resulta de gran utilidad en el aislamiento de gérmenes patógenos.

En muchas ocasiones se descuida seguir las instrucciones del fabricante para su preparación y por lo tanto sufren alteraciones indeseables que disminuyen la oportunidad de aislamientos y se fracasa en la interpretación correcta de los microorganismos.

Se considera de mucha utilidad práctica concentrar los principales medios de cultivo, incluyendo medios de transporte, de enriquecimiento selectivos y diferenciales que se utilizan con más frecuencia en nuestro medio.

Además es conveniente tomar en cuenta cuando una muestra (materia fecal) no puede ser sembrada inmediatamente después de su recolección corre el riesgo de perder aislamientos, por lo que se recomienda el uso de medios de transporte.

Se tratara de exponer los aspectos generales de su preparación y fórmula.

Soluciones de transporte y enriquecimiento para *V. cholerae*.

SOLUCION PRESERVADORA DE MONSUR

Tripticasa o casitona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Taurocolato de sodio	5 g
Carbonato de sodio	1 g
Agua destilada (neutra)	1,000 ml

- 1.-Esterilizar a 121°C 20 min.
- 2.- Cuando se enfríe añadir 0.002% telurito de potasio (concentración 1:200,000)- pH alrededor de 8.5
- 3.- Depositar cantidades de 25 ml en frascos de rosca de 80 ml.
- 4.- Inocular con muestras de heces. (23)

AGUA DE PEPTONA ALCALINA

Peptona (bacto o equivalente)	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	1.000 ml

- 1.- Ajustar el pH a 8.4-8.6
- 2.-Depositar cantidades de 7 ml en tubos de rosca de 9 ml y esterilizar 10 min. a 121°C (15)

SOLUCION PRESERVADORA DE GOHAR

Agua de peptona (pH 7.8-8.0) 100 ml

- 1.- Después de esterilizar 15 min. a 121°C, agregar 0.2ml de solución acuosa 1% de telurito de potasio.
- 2.- Depositar cantidades de 25 ml en frascos de rosca de 80 ml.
- 3.- Inocular con muestras de heces.

Nota: cualquiera de las tres soluciones mencionadas puede guardarse en tubos en pequeñas cantidades (0.5-1.0 ml), para el transporte de muestras tomadas con hisopos rectales en casos activos. (23)

MEDIOS DE TRANSPORTE

MEDIO DE TRANSPORTE DE CARY y BLAIR

Tioglicolato de sodio	1.5 g
Fosfato dosódico	1.1 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	5.0 g
Agua destilada o desmineralizada	991 ml

- 1.- Suspender 12.6 g del polvo deshidratado en 991 ml de agua destilada, caliente sin dejar de agitar hasta que se disuelva.
- 2.- Enfríe a 50°C, agregar 9 ml de CaCl 1% acuoso recién preparado y ajustar el pH aproximadamente a 8.4
- 3.- Distribuir volúmenes de 7 ml en tubos con tapón de rosca previamente enjuagados y esterilizados.
- 4.- Esterilizar a vapor por 15 minutos, enfriar y apretar las tapas de rosca.
- 5.- Puede almacenarse a temperatura ambiente, en refrigeración se mantiene por más tiempo. (15)

MEDIO DE TRANSPORTE DE AMIES

a) Agregar 4 gr. de agar a un litro de agua destilada, calentar hasta disolución y mientras está caliente agregar:

Cloruro de sodio	3.0 gr.
Cloruro de potasio	0.2 gr.
Tioglicolato de sodio	1.0 gr.
Fosfato disódico anhidro	1.15 gr.
Fosfato monopotásico	0.20 gr.
Cloruro de calcio al 1%	10.0 ml.
Cloruro de magnesio. $6H_2O$ al 1%	10.0 ml.

pH final = 7.3

b) Remover hasta que se disuelva y agregar 10 gr. de carbón neutro farmacéutico. Distribuir en tubos con tapa de rosca, en volúmenes de 5 a 6 ml., agitando frecuentemente para mantener la suspensión de carbón. Evitar enfriar o gelificar. (21)

MEDIO DE TRANSPORTE DE STUART

Tioglicolato de sodio	1.0 gr.
Glicerofosfato de sodio	10.0 gr.
Cloruro de calcio	0.1 gr.
Azul de metileno	0.0020 gr.
Agar	3.0 gr
Agua desmineralizada	1000 ml.

pH final = 7.3

Suspender los componentes en el agua, remojar 10 minutos y hervir con agitación constante por un minuto. Distribuir el medio en tubos con tapón de rosca y esterilizar a $121^{\circ}C$ por 10 minutos. (21)

Medios para aislamiento:

Medio agar TCBS (pH 8.6)

Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Citrato de sodio	10 g
Tiosulfato de sodio	10 g
Oxgall (bilis vacuna)	5 g
Colato de sodio	3 g
Sacarosa	20 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul bromotimol	0.04 g
Azul timol	0.04 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 ml

- 1.- Suspender los ingredientes en agua y calentar suavemente hasta disolver el agar. Hervir 1-2 minutos.
- 2.- Enfriar hasta unos 50°C y depositar en cajas Petri.
- 3.- No debe ser colocada en el autoclave, y su pH final debe ser 8.4

(15)

Medio agar extracto de carne (agar nutriente)

Extracto de carne (Bacto o equivalente)	3 g
Peptona (bacto o equivalente)	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar (Difco o equivalente)	20 g
Disolver en agua hasta	1.000 ml

- 1.-Ajustar a pH 7.6 con hidróxido de sodio 1N.
- 2.- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y depositar en cajas de Petri.

(23)

Medio agar taurocolato gelatina

Tripticasa (o equivalente)	10 g
Gelatina (bacto o equivalente)	30 g
Taurocolato de sodio	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 ml

- 1.- Esterilizar a 121°C, 15 minutos y depositar en cajas Petri.
- 2.- El medio puede usarse sin agregarle taurocolato de sodio. (21)

Agar Monsur

Tripticasa (BBL o equivalente)	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Taurocolato de sodio	5 g
Carbonato de sodio	1 g
Gelatina (Difco o equivalente)	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 ml

- 1.- Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.
- 2.- Cuando está enfriado hasta unos 50°C, agregar telurito de potasio en concentración de 0.002% (1:200,000).
- 3.- Depositar en cajas Petri.
- 4.- El pH final del medio es alrededor de 8.5 (16)

Medio de Aronson

- 1.- a) Extracto de carne, preparado con 3% de contenido de agar, pH 7.4-7.6
 - b) Solución alcohólica saturada de fucsina básica.
 - c) Carbonato de sodio anhidro solución 10%
 - d) Sacarosa solución 20%
 - e) Dextrina solución 20%
 - f) Sulfito de sodio anhidro solución 10%
- 2.- Derretir agar (1a) y a cada 100 ml agregar 5 ml de solución carbonato (1c).
- 3.- Esterilizar en flujo de vapor 15 minutos.
- 4.- Mientras todavía está caliente agregar por orden 5 ml de solución sacarosa (1d), 5 ml de solución dextrina (1e), 0.4 ml de solución fucsina (1b) y 2 ml de solución sulfito de sodio (1f).
- 5.- Hervir unos minutos y depositar en placas. Guardar en la oscuridad y usar dentro de los 3 días. (23)

Agar TSI. Agar de hierro triple azúcar con 25 g de NaCl agregados a la fórmula (por litro).

Peptona	20 g
Cloruro de sodio	25 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Dextrosa	1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Rojo fenol	0.025 g
Agar	13 g

1.- Se suspenden 79.4 g del material deshidratado en un litro de agua destilada, mezclar bien.

2.- Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto.

3.- Vertir en tubos, llenándolos más o menos a 1/3 de su capacidad.

4.- Esterilizar a no más de 118°C durante 15 minutos.

5.- Los tubos deben enfriarse en posición inclinada para que se formen declives con fondo profundo. (21)

TSA-NaCl 3% Agar tripticasa soya con 25 g de NaCl agregados a la fórmula (por litro).

Manitol	10 g
Peptona tripticasa	15 g
Peptona	5 g
Cloruro de sodio	25 g
Agar	15 g
Sulfato de neomicina	0,5 g
Rojo fenol	25 g

- 1.- Suspender 70 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclando perfectamente.
- 2.- Calentar con frecuente agitación y hervir durante un minuto.
- 3.- Distribuir y esterilizar de 118°C a 121°C por 15 minutos.
- 4.- Enfriar de 45 a 48°C y adicionar 5% de sangre desfibrinada estéril.
- 5.- Colocar en placas.
- 6.- pH final = 7.3

(23)

TSB-NaCl 3%. Caldo tripticasa soya con 25 g de NaCl agregados a la fórmula (por litro).

Tripticasa	17 g
Fitona	3 g
Cloruro de sodio	25 g
Difosfato de potasio	2.5 g
Dextrosa	2.5 g

- 1.- Suspender 50 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- 2.- Mezclar bien.
- 3.- Calentar suavemente hasta completar la solución.
- 4.- Vertir y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- 5.- Puede agregarse de 0.5 a 1.0 g de agar/l de caldo antes de esterilizar.

(23)

Caldo púrpura bromocresol

Peptona	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	25 g
Púrpura de bromocresol	0.04 g

- 1.- Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada. Dividir en 5 partes iguales.
- 2.- Agregar 2 g de glucosa a la primera parte, 1 g de adonitol a la segunda, 1 g de celobiosa a la tercera, 1 g de arabinosa a la cuarta, y 1 g de sorbitol a la quinta; revolver para disolver.
- 3.- Vertir porciones de 8 ml en tubos de 16X150 mm que contienen ampollas de Durham invertidas.
- 4.- Esterilizar a 121°C por 10 minutos.
- 5.- El pH final es 7.0[±] 0.2

(16)

Medio de prueba rojo metilo

El medio se usa también para la prueba de Voges-Proskauer RM-VP.

Polipeptona (BBL) o peptona con buffer (Difco)	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g

- 1.- Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada por calentamiento suave.
- 2.- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. (21)

Medio de Watson

- 1.- Preparar caldo de taurocolato de sodio 0.5% agregando 5 g de taurocolato de sodio a 1 litro de caldo (infusión).
- 2.- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 3.- Agregar 100 unidades de estreptoquinasa por cada ml de medio. (23)

Medio de prueba de movilidad

Este medio es recomendado por Ewing para la prueba de movilidad con miembros de la familia enterobacteriáceas.

Extracto de carne	3 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	4 g

- 1.- Disolver en 1 litro de agua destilada.
- 2.- Ajustar el pH a 7.4
- 3.- Distribuir unos 8 ml/tubo.
- 4.- Esterilizar a 121°C por 15 minutos. (16)

Medio de Wilson-Reilly para aislamiento de *V. cholerae* de fuentes naturales.

Solución A:

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	20 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 9.1 con solución 14% de carbonato de sodio y dejar en autoclave en cantidades de 100 ml.

Solución B:

Sulfito de sodio anhidro 20 g en 100 ml de agua hirviendo; agregar 0.1 g de citrato de amonio de bismuto disuelto en 10 ml de agua hirviendo, enfriar y agregar 100 ml de solución de glucosa 20%.

A cada 100 ml de solución A añadir 10 ml de solución B y 1 ml de alcohol absoluto antes de inocular. Se usa en la misma forma que agua de peptona alcalina. Para hacer placas de Wilson-Reilly agregar 2% de agar al medio descrito. (23)

Agar Wagatsuma;

Extracto de levadura	3 gr.
Bacto-peptona	10 gr.
Cloruro de sodio	70 gr.
Fosfato dipotásico	5 gr.
Manitol	10 gr.
Cristal violeta	0.001 gr.
Bacto agar	15 gr.
Agua destilada	1,000 ml.

Ajustar a pH 8 sin autoclave. Vaporizar 30 minutos y templar a 50°C. Agregar 2 ml de suspensión de glóbulos rojos humanos citratados recién extraídos (aproximadamente 0.5%) previamente lavados 3 veces en solución fisiológica. Verter las placas y dejar endurecer. Secar bien las placas antes de usar. Las placas deben usarse lo más pronto posible.

(23)

XIII. BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. Bergey's., Family Vibrionacea, Manual of Sistematic Bacteriology 1984; Vol-1, Baltimore MD 21202. Edit Board R.G.E.
2. Boletín de COLERA/DIARREAS INFECCIOSAS, Editado: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la S S A ; Año 1 N° 11, Septiembre de 1991, México.
3. Clemens, J. D.; Sack, D.A.; Harris, J.F, et al. Breast feeding and the risk of severe cholera in rural Bangladesh children. Am J Epid 1990, 131.
4. Enciclopedia Salvat., Cólera, 1989, Vol-2, Editorial Salvat, Pamplona España.
5. Finegold, M.S., Ellen, J.E. Familia Vibrionaceae, Diagnóstico Microbiológico. 1989. Editorial Médica Panamericana, Séptima edición.
6. Franco-Monsreal M. y Col., PREVALENCIA DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS EN ALIMENTOS MARINOS, Mayo-junio de 1989, Vol-31, N° 3, Salud Publica de México.
7. French, G.L.; Antibiotics for marine Vibrios. The Lancet, 1990, Vol. 336, N° 8714.
8. Glass, R.T.; Swennerholm, A.M.; Stoll, B.J., et al. Protection against cholerae in breast fed children by antibodies in breast milk. N. Engl J Med 1983, Vol. 306.
9. Giono, C.S., Gutierrez, G.L. e Hinojosa, A.M. Manual de Procedimientos para Aislamiento y Caracterización de Vibrio cholerae O1. Publicación Técnica del INDRE, S S A. 1991.

10. Harrison,; Cólera, Principios de Medicina Interna, 1987, Editorial Interamericana Mc. Graw-Hill, Undécima edición.
11. Hill MK, Sanders CV. Localized and Systemic infection due to *Vibrio* species. infect Dis Clin North Am, 1987, Vol.1.
12. Isenberg, H.D., Ph.D.; Actualización sobre la enfermedad diarreica En: Memorandum de Microbiología, 1989, DM projects in Medicine, Oyster Bay, Nueva york.
13. Koneman, E.W.; Bacilos Gram negativos poco frecuentes, Diagnóstico Microbiológico, 1990, Editorial Médica Panamericana, 2da. reimpresión.
14. Kumate, R.J., Manual para la Vigilancia epidemiológica del Cólera en México, Noviembre 1991, Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, México D.F.
15. Lennette, E.H. *Vibrio*, Manual de Microbiología Médica 1989. Editorial Médica Panamericana. 4ta. edición.
16. MacFaddin, F.J. Pruebas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, 1984, Editorial Médica Panamericana, México D.F.
17. Pautas para el Control del Cólera, Control de Enfermedades Diarreicas, Programa de Salud Materno Infantil, Organización Panamericana de la Salud, OMS, 1991.
18. Philip W. Lowry., *Vibrio* Gastroenteritis in Louisiana; A prospective study among attendees of Scientific Congress in New Orleans. The Journal of Infectious Diseases, 1989, Vol.160, N° 6.
19. Programa de Control de Enfermedades Diarreicas OPS/OMS módulo: Manejo del Paciente con Diarrea. Programa HPM/CDD. OPS, 1991. Washington, D.C. U.S.A.

20. Riley, L.E.; Waterman, S.H.; Fruque A.S.G.; et al. Breast-feeding children in the household as a risk factor for cholera in rural Bangladesh: An hypothesis. Trop. Geog. Med 1987;39.

21. Rohde, P.(1974) In: Manual of Products and Laboratory Procedures BBL. Becton, Dickinson & Co. S.A.

22. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Información sobre el Cólera, Febrero 1991.

23. Sonnenwirth, A.C., Jarett,C.; Vibrio, Métodos y Diagnósticos de Laboratorio Clínico, 1987, Tomo II, Editorial Médica Panamericana. Octava edición.

24. Suplemento de Bioquímica. Diagnóstico de Cólera en el Laboratorio. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica A.C., Mayo-Junio 1991, Nº 11.

25. Vibrio cholerae O1 Adherence to Human Small Intestinal M Cells In Vitro. The Journal of Infections Diseases, July 1989, Vol.160 Nº 1.

26. Wachmuth, J.K.; Bopp,C.A.; Fields, P.A. Difference between toxigenic Vibrio cholerae O1 from South America and US gulf coast. Lancet 1991;337Ñ.