



COMISION NACIONAL
DEL AGUA



PROGRAMA AGUA LIMPIA
PROGRAMA AGUA LIMPIA

LIBRARY
INTERNATIONAL REFERENCE CENTRE
FOR COMMUNITY WATER SUPPLY AND
SANITATION (ICWS)

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE *VIBRO CHOLERA*



COMISION NACIONAL
DEL AGUA

ADiestRAMIENTO PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN EL SECTOR AGUA

BARCODE 9091
245.11 91AD

MANUAL No. 8
**IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION
DE *VIBRIO CHOLERA***
1a. edición, 1991

IMTA
INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA



Coordinación de Tecnología Hidráulica Urbano-Industrial
Subcoordinación de Calidad del Agua

CIECCA

Autor:

Ana María Sandoval

Participantes:

Alejandro Ordóñez, Martha Millán

Revisor:

Blanca Jiménez

PROLOGO

El Programa Agua Limpia tiene como objetivo apoyar la estrategia puesta en marcha el 5 de abril en San Luis Potosí por el Lic. Carlos Salinas de Gortari referente a la atención de los problemas de contaminación del agua.

El Programa, en su primera etapa, se basa en cuatro acciones:

1. Proporcionar agua desinfectada en todos los sistemas de distribución.
2. Evitar que se rieguen hortalizas que se consumen crudas con aguas residuales no tratadas.
3. Garantizar que los hielos y el agua embotellada tengan la calidad adecuada para consumo humano.
4. Asegurar que las plantas de tratamiento de aguas residuales funcionen correctamente y que sus efluentes no contaminen los cuerpos receptores.

Estas medidas seguramente influirán en la disminución de las enfermedades diarreicas en el país. Sin embargo, éstas aún pueden propagarse a nivel de epidemia y en ocasiones provocar situaciones de emergencia.

Para capacitar a quien debe tomar decisiones en forma rápida y eficaz, el INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA ha preparado el curso ADIESTRAMIENTO PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN EL SECTOR AGUA que tiene como material de apoyo una serie de manuales, los primeros de ellos se citan a continuación:

1. Las enfermedades diarreicas.
2. Acciones para el control de enfermedades diarreicas en el sector agua.
3. Medidas prácticas de Ingeniería Ambiental para combatir enfermedades diarreicas.
4. Organización del trabajo y muestreo en campo.
5. Habilitación de un laboratorio de emergencia.
6. Determinación del cloro residual.
7. Determinación de coliformes fecales.
8. Identificación y cuantificación de Vibrio cholerae 01.
9. Sistema de información.

Debido a la situación que vive actualmente el país, en esta primera etapa se hace énfasis en el cólera. En manuales subsecuentes se abordarán otras enfermedades diarreicas que en su momento tengan carácter prioritario.

C O N T E N I D O

No.		Pág.
1	INTRODUCCION	8
	1.1 Historia	8
	1.2 El cólera	8
2	OBJETIVOS.	9
3	CARACTERISTICAS GENERALES DE <u>V. cholerae</u>	9
4	TECNICA ANALITICA.	11
	4.1 Tipo de muestra	11
	4.1.1 Agua	11
	4.1.2 Peces	11
	4.1.3 Vegetales	11
	4.2 Concentración de la bacteria.	
	4.2.1 Para análisis cualitativo.	12
	4.2.1.1 Hisopo de Moore.	12
	4.2.1.2 Tierra de Diatomeas.	12
	4.2.1.3 Filtro de Membrana.	12
	4.2.2 Para análisis cuantitativo.	13
	4.2.2.1 Tierra de Diatomeas.	13
	4.2.2.2 Número Más Probable (NMP).	13
	4.3 Incubación	16
	4.4 Siembra en TCBS.	16
	4.5 Aislamiento en Kligler	17
	4.6 Pruebas bioquímicas	17
	4.6.1 Medio MIO	17
	4.6.2 Agar TSI (Triple azúcar hierro).	18
	4.6.3 Agar LIA (lisina y hierro).	19
	4.6.4 Caldo Arginina.	19
	4.6.5 Pruebas bioquímicas confirmativas.	19
	4.6.5.1 Prueba de oxidasa.	19
	4.6.5.2 Prueba de String (hilo mucoso).	20
	4.6.6 Serología.	20
5	BIBLIOGRAFIA.	31
ANEXO 1.	Tablas para la determinación del NMP.	32
	TABLA No 3.	32
	TABLA No 4.	34
	TABLA No 5.	36
ANEXO 2.	Formato para el reporte de los resultados analíticos de <u>V. cholerae</u>	37

ANEXO 3. Tablas para identificación de <u>V. cholerae</u>	38
TABLA 7.	38
TABLA 8.	39
ANEXO 4. Normas de bioseguridad.	40
ANEXO 5. Soluciones y medios de cultivos.	42
ANEXO 6. GLOSARIO	48

I N D I C E D E F I G U R A S

FIG. 1	Preparación de medios de enriquecimiento (agua peptonada).....	23
FIG. 2	Medio de enriquecimiento con hisopo de Moore.....	23
FIG. 3	Concentración de <u>Vibrio cholerae</u> por el método de Tierra de diatomeas.....	24
FIG. 4	Incubación de placas de TCBS.....	25
FIG. 5	Colonias típicas de <u>Vibrio cholerae</u> en TCBS.....	26
FIG. 6	Selección de colonias de <u>Vibrio cholerae</u> en TCBS.....	26
FIG. 7	Aislamiento en Kligler.....	27
FIG. 8	Reacción de <u>Vibrio cholerae</u> en Kligler (alcalina/ácida).....	28
FIG. 9	Reacción de <u>Vibrio cholerae</u> en TSI (alcalina/ácida).....	28
FIG. 10	Reacción de <u>Vibrio cholerae</u> en caldo arginina (color amarillo).....	29
FIG. 11	Prueba de oxidasa positiva para <u>Vibrio cholerae</u> lado izquierdo negativa.....	29
FIG. 12	Prueba del String positiva para <u>Vibrio cholerae</u>	30
FIG. 13	Serología de <u>Vibrio cholerae</u> utilizando suero polivalente. Lado izquierdo positiva, lado derecho negativa.....	30

I N D I C E D E T A B L A S

TABLA 1.	Volumen de muestra de agua a filtrar para la cuantificación de <u>Vibrio Cholerae</u>	13
TABLA 2.	Volumen de muestra de agua para la cuantificación de <u>Vibrio cholerae</u>	15
TABLA 3.	Números más probable por 100 mL. Usando un tubo de 50 mL, cinco tubos de 10 mL y cinco tubos de 1 mL.....	33
TABLA 4.	Números más probable por 100 ml. Usando cinco tubos de 10 mL.....	34
TABLA 5.	Números más probable por 100 ml. Usando tres tubos de 10 mL, tres tubos de 1 mL y tres tubos de 0.1 mL.....	36
TABLA 6.	Formato para el reporte analítico de <u>Vibrio cholerae</u> cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.....	37
TABLA 7.	Reacciones de algunos vibrios relacionados con otros microOrganismos en KLIGLER, TSI (triple-azúcar-hierro) y LIA (lisina-hierro).....	38
TABLA 8.	Comparación de reacciones bioquímicas de <u>Vibrio cholerae</u> , <u>Vibrio parahaemolyticus</u> , <u>Vibrio alginolyticus</u> y <u>Vibrio vulnificus</u>	39

1 INTRODUCCION

1.1 Historia

El cólera, en su forma epidémica, se originó en la India en el sur de la península de Bengala. Esta zona y el valle del Yang Tse Kiang, China, han sido focos de donde la enfermedad se ha diseminado a otras regiones de la tierra.

Durante el siglo pasado y a través de las rutas terrestres y marítimas, se presentaron siete pandemias de extrema gravedad que afectaron, a todos los países de Asia y Europa. A manera de ejemplo, se puede reseñar la primera pandemia que se originó en Jessore, India, en 1817. En 1820 había atacado a toda la India, Ceilán, China e Irán; tres años más tarde, se había diseminado al Asia menor, Rusia, y Londres, al año siguiente se extendió a Francia, España e Italia y en 1835 hubo recrudescencia con grave extensión a Arabia, Turquía, Egipto y Norte del Africa. El fin de esta epidemia fue en 1837.

La primera noticia de ocurrencia de cólera en América data de 1832 cuando se presentó una epidemia en Quebec y más tarde, en Nueva York. La literatura menciona varias epidemias en Norte y Centro América durante la década de 1830 y se ha mencionado la ocurrencia en Cartagena, Colombia en 1849.

Durante el presente siglo se han producido dos pandemias, la primera se originó en las islas Célebes en 1961 y afectó 23 países del Extremo Oriente, Indonesia, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas y el Golfo Pérsico, su fin fue en 1965. La segunda se originó en Tunez en 1970, atravesó el Sahara e invadió Nigeria, los países del Africa Occidental, Etiopía y la URSS.

En enero de 1991 aparece la segunda pandemia en el Perú, casi, difundiéndose posteriormente a Chile, Brasil, Ecuador y Colombia. Las condiciones que permitieron la rápida propagación de esta enfermedad son resultados de la crisis económica, la pobreza y el subdesarrollo de América Latina.

1.2 El cólera

Esta enfermedad ocasiona una infección gastrointestinal aguda, grave y transmisible. Se presenta tanto en forma endémica como epidémica. Se caracteriza clínicamente por diarrea acuosa severa, vómito, deshidratación rápida, acidosis y colapso circulatorio. El agente causal es la bacteria Vibrio cholerae biotipos: clásico y el Tor. Los vibrios cholerae se encuentran muy difundidos en aguas dulces y salobres en muchas partes del mundo pero no todos son toxicogénico.

Como se menciono los biotipos clásico y el Tor pueden producir la enfermedad, sin embargo, el último favorece el contagio ya que un 80 % de los casos sólo tienen manifestaciones leves o

asintomáticos que eliminan el bacilo y perpetúan la infección. Además, el Tor permanece viable más tiempo en los alimentos (aproximadamente 10 días) e indefinidamente en el agua, especialmente si ésta es salobre.

El hombre es el único reservorio natural de esta bacteria y el agua su principal vehículo de transmisión directa o indirecta. En un país como el nuestro, en que el 31 % de la población no tiene acceso a, agua limpia y/o potable y el 53 % no disfrutan de servicios de saneamiento adecuado, el riesgo de contraer dicha enfermedad es grande.

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

Este aislamiento en ocasiones se complica por dos razones: la primera, por la aplicación casi nula de la técnica en forma rutinaria y, la segunda, por el número relativamente pequeño de *Vibrios* en comparación el de *Coliformes* encontradas en la misma muestra, ó con las encontradas en análisis clínicos.

Por ello, el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua a través del Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua (CIECCA) y de su Area de Laboratorio de Microbiología editan el presente manual para contribuir a subsanar estas deficiencias e iniciar una capacitación en cascada para la identificación y cuantificación del *Vibrio cholerae* O1. Con esta acción se espera apoyar la toma de decisiones preventivas y/o correctivas para controlar el desarrollo de esta enfermedad.

2 OBJETIVOS.

- Describir los métodos analíticos para el aislamiento, identificación y cuantificación de *Vibrio cholerae* en agua.
- Definir el equipo, material y reactivos necesarios para la identificación y cuantificación de *Vibrio cholerae*.

3 CARACTERISTICAS GENERALES DE *V. cholerae*.

El género *Vibrio* son bacilos Gram-negativos, no esporulados, móviles mediante flagelos bipolares incluidos dentro de una vaina. Son catalasa positivos, utilizan fermentativamente los carbohidratos y rara vez producen gas. Salvo una especie (*Vibrio metschnikovii*) todos son oxidasa y nitrataza positivos. La mayoría de las cepas licúan la gelatina e hidrolizan el ácido desoxirribonucléico.

Los vibrio incluyen algunas especies patógenas para el hombre y peces.

Dentro de estas destaca el Vibrio cholerae, que es móvil con un sólo flagelo polar, y que se caracteriza por ser el más móvil de todas las especies patógenas. Es ligeramente curvado y mide de 0.5 a 0.8 μm de diámetro y 1.4 a 2.6 μm de largo. Las características principales de esta especie son:

- Anaerobio facultativo y por lo tanto presenta metabolismo respiratorio y fermentativo.
- Formar ácido pero no gas de la glucosa y sacarosa.
- No producir ácido sulfhídrico.
- Dar positiva la reacción de oxidasa, descarboxilar la lisina y la ornitina.
- No hidrolizar la arginina..
- Crecer hasta temperaturas de 40 $\frac{1}{2}$ C; y preferentemente en condiciones alcalinas, pero sin ser esto un requerimiento necesario. Esta propiedad sirve para diferenciarlo de otras especies del género Vibrio.
- Soportar mal ciertas condiciones ambientales desfavorables como la sequedad, exposición al sol y la presencia de otros gérmenes.
- Vivir largo tiempo en agua; siempre y cuando no contengan gran cantidad de otras bacterias.
- Poseer el mismo antígeno H termolábil y poder diferenciarse en serovariedades:

Serovar O1 (Patógeno).

Organismo causante del cólera epidémico o asiático; aglutina con el antisuero O1 específico, se diferencian dos biotipos: "clásico (no hemolítico)" y "el tor (hemolítico)", el primero de ellos es virtualmente inexistente. Ambos biotipos presentan los siguientes serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima, este último es muy raro.

Serovar NO O1 (Potencialmente patógeno).

Son organismos que no aglutinan con el suero O1. Algunas cepas son potencialmente patógenas por producir una toxina similar y/o idéntica a la del Serovar O1. Se encuentran muy difundidos en aguas dulces y salobres en muchas partes del mundo; sin embargo, no causan el verdadero cólera epidémico.

4 TECNICA ANALITICA.

4.1 Tipo de muestra

4.1.1 Agua

Para la identificación de Vibrio cholerae se recomienda el empleo del Hisopo de Moore, y para la cuantificación la toma directa de un volumen determinado en el cuerpo de agua en estudio con un frasco previamente esterilizado (Ver Referencia del Manual 08 de esta serie).

El cuerpo de agua en estudio puede ser cualquiera de los siguientes: corriente de agua superficial (río, presa, canal, acequia, etc.), agua subterránea, marina o salobre.

4.1.2 Peces

A la muestra es necesario quitarle primeramente las escamas, posteriormente las aletas y la cola, utilizando unas tijeras grandes. Las branquias y vísceras se eliminan utilizando los dedos y, para quitar el músculo una navaja de disección o cuchillo. Todo lo anterior se realiza utilizando guantes estériles, cubreboca y una charola de disección o un papel aluminio limpio.

El producto obtenido se deposita en un recipiente (vaso de licuadora o molino) estéril se tapa e inmediatamente se procede a su molido.

De este molido (ya sea de uno o varios pescados) se pesan 50 gramos utilizando un papel aluminio esterilizado o limpio. Posteriormente se coloca en un frasco esterilizado con 500 mL de agua peptonada alcalina de simple concentración y un pH igual a 9.0.

4.1.3 Vegetales

De las muestras recolectadas se seleccionan diferentes partes de la misma y se pesa 50 gramos. Se depositan en un recipiente (vaso de licuadora o molino) estéril y se añaden 100 mL de agua peptonada alcalina de simple concentración tapando con un recipiente previamente esterilizado. Inmediatamente se procede a su licuado, se pasa a un frasco esterilizado y enseguida se enjuaga el vaso con 100 mL de agua peptonada alcalina de simple concentración y se recoge el enjuage en el mismo frasco. Esta operación se repite tres veces más con la finalidad de limpiar perfectamente el recipiente.

4.2 Concentración de la bacteria.

4.2.1 Para análisis cualitativo.

4.2.1.1 Hisopo de Moore.

Se recibe en el laboratorio el hisopo y en condiciones de esterilidad se ajusta el pH a un valor de 9.0 con solución 1N de NaOH. Bajo estas condiciones se favorece la supervivencia de Vibrio cholerae y se inhibe el desarrollo de otras bacterias. Pasar inmediatamente a incubación, (Ver FIG. 1, 2)

4.2.1.2 Tierra de Diatomeas.

Este es un procedimiento que utiliza la elevada capacidad de filtración de la tierra de diatomeas para concentrar flora microbiana a partir de grandes volúmenes de agua. La fabricación del lecho filtrante se inicia colocando un cojinete en la unidad de filtración tipo Millipore. Enseguida se agregan 20 mL de suspensión de tierra de diatomeas y se aplica el vacío. Posteriormente, se toma un volumen de muestra que oscila entre 500 y 5,000 mL (aguas residuales o superficiales respectivamente) y se inicia el filtrado.

Para este tipo de análisis, el lecho filtrante deberá colocarse en un frasco previamente esterilizado y que contenga 275 mL de agua peptonada alcalina a doble concentración y se incuba, (Ver FIG. 3).

4.2.1.3 Filtro de Membrana.

Esta técnica es de empleo limitado, debido a la obstrucción de la superficie porosa cuando se utilizan grandes volúmenes de muestra ó pequeños pero turbios. Su empleo se recomienda en aguas cuyo contenido orgánico y de partículas sea muy reducido.

La preparación del equipo filtrante se inicia colocando una membrana estéril con poros de 0.45 μ m sobre la malla del portafiltros utilizando pinzas esterilizadas, sobre la membrana se coloca un embudo estéril, el cual se asegura firmemente mediante pinzas; enseguida se filtra el mismo volumen recomendado para la técnica de "Tierra de diatomeas" (Tabla No 1). Después de realizada la filtración se quita el embudo, y con las pinzas previamente esterilizadas, se toma la membrana y se coloca en un frasco que contenga 250 mL de agua peptonada alcalina y de pH de 9.0.

4.2.2 Para análisis cuantitativo.

4.2.2.1 Tierra de Diatomeas.

Se procede idénticamente al tipo de análisis cualitativo hasta el lecho filtrante; ya que en análisis cuantitativo, el lecho filtrante debe ser colocado en un frasco previamente esterilizado conteniendo 105.5 mL de agua peptonada alcalina de doble concentración, se introduce un magneto y se agita vigorosamente para que los microorganismos concentrados se distribuyan uniformemente en la solución. De esta solución y, de acuerdo a la Tabla No 1 se toman los siguientes volúmenes:

- 50 mL y se colocan en un matraz que debe contener el mismo volumen de agua peptonada alcalina de doble concentración (50 mL).
- 5 volúmenes de 10 mL cada uno, los cuales deben colocarse en 5 tubos de ensayo que contengan 10 mL cada uno de agua peptonada alcalina de doble concentración.
- 5 volúmenes de 1 y 0.1 mL respectivamente que se colocarán en 10 tubos de ensayo que contienen 10 mL c/uno de agua peptonada alcalina de simple concentración.

Inmediatamente después debe iniciarse el proceso de incubación.

TABLA No 1. Volumen de muestra de agua a filtrar para la cuantificación de Vibrio Cholerae.

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN FILTRAR	Nº TUBOS Y VOLUMEN DE MUESTRA EMPLEADA			
		1/50 mL	5/10 mL	5/10 mL	5/10 mL
Agua potable Sin cloro	2 a 3	X	X	X	X
Agua clorada	4 a 5	X	X	X	X
Agua residual	0.5	X	X	X	X

4.2.2.2 Número Más Probable (NMP).

Con este método se estima la densidad del Vibrio cholerae utilizando tubos múltiples; el empleo del mismo requiere conocer previamente la densidad probable del Vibrio, lo cual puede ser inferida a través de la "Siembra en TCBS" descrita en el punto 4.4.4 de este mismo manual.

Antes de iniciar el sembrado, el frasco que contiene la muestra debe agitarse fuertemente - más o menos 25 veces - y con una pipeta esteril iniciar; cuando así se requiera; la preparación de las diluciones (Tabla No 2) conforme al procedimiento que a continuación se describe:

- Dilución A.

De la muestra original se toman 50 mL y se transfieren a un matraz que contiene 50 mL de agua peptonada alcalina de doble concentración. Inmediatamente después proceder a la incubación.

- Dilución B.

De la muestra original se toman 10 mL cinco veces, mismos que se transfieren a una serie de cinco tubos que contienen 10 mL de agua peptonada alcalina de doble concentración. Inmediatamente después proceder a la incubación.

- Dilución C.

De la muestra original se toman 1 mL cinco veces, mismos que se transfieren a una serie de cinco tubos que contienen 10 mL de agua peptonada alcalina de simple concentración. Inmediatamente después proceder a la incubación.

- Dilución 10^{-1} .

De la muestra original se toman 10 mL y se transfieren a un frasco que contenga 90 mL de solución tampon de fosfatos.

$$\frac{\text{Volumen de muestra}}{\text{90 mL sol. tampon + volumen de muestra}} = \text{Dilución } 10^{-1} \quad (1)$$

$$\text{Dilución } 10^{-1} = (10 / 90+10) = (10 / 100) = 0.1$$

$$1 \text{ mL de la muestra original} = 0.1 \text{ mL de esta dilución} \quad (2)$$

- Dilución 10^{-2} .

Homogenizar el frasco de la dilución 10^{-1} y con una pipeta esterilizada transferir 10 mL a otro con 90 mL de solución tampon de fosfatos

$$1 \text{ mL de la muestra original} = 0.01 \text{ mL de esta dilución} \quad (3)$$

La concentración final de bacterias se calcula de acuerdo con:

$$\begin{aligned} &\text{Concentración} \\ &\text{final de bact} = (\text{Dilución } 10^{-1}) \times (\text{Dilución } 10^{-2}) \\ &\text{en esta dilu-} \\ &\text{ción} \end{aligned}$$

$$= (10 / 100) \times (10 / 100)$$

$$= (0.1) \times (0.1)$$

$$= 0.01$$

(4)

Procediendo de forma similar para obtener las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Se debe tener la precaución de etiquetar cada frasco con la dilución correspondiente.

Cada una de las diluciones obtenidas deben ser sembradas en cuatro series de cinco tubos cada una. Cada uno de estos doce tubos contiene 10 mL de agua peptonada alcalina de simple concentración y se le debe añadir 1 mL de la dilución problema.

Este procedimiento se repite para todas las diluciones seleccionadas conforme a la Tabla No 2. Recomendandose iniciar con la dilución menor (10^{-5}) y, siempre emplear una pipeta esterilizada para cada dilución. Inmediatamente después proceder a la incubación.

TABLA No 2. Volumen de muestra de agua para la cuantificación de Vibrio cholerae.

TIPO DE MUESTRA	DILUCIONES			RECOMENDADAS	
	A	B	C	D	E
Superficial					10^{-1}
Residual	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

Este método se basa en la hipótesis de que las bacterias se hallan homogéneamente distribuidas en un medio líquido; es decir, que al repetir muestras del mismo tamaño y del mismo universo, se debe esperar contengan el mismo número de gérmenes como promedio dentro de una distribución normal. El valor promedio se interpreta como el NMP. Esta técnica principalmente se usa para la estimación de bacilos coliformes, pero también puede utilizarse para otra clase de gérmenes, si se ve el crecimiento.

Por ello, es posible calcular el NMP/100 mL con cualquier combinación de resultados obtenidos a partir de varias muestras, empleando las Tablas 3, 4 y 5 (Anexo 1). Para volúmenes de 50, 10 y 1 mL respectivamente por muestra debe emplearse la Tabla No 3; cuando los volúmenes seleccionados sean de 10, 1 y 0.1 mL respectivamente, debe utilizarse la Tabla No 4 cuando la serie de tubos sea de cinco, si esta serie es de tres, debe emplearse la Tabla No 5.

Por ello, cuando las diluciones empleadas sean menores a las usadas en las Tablas No 4 y 5; debe utilizarse el "Factor de multiplicación".

La mejor forma de encontrarlo es multiplicar las diluciones empleadas (p. ej., 0.1, 0.01 y 0.001) por el factor que permita transformar estos valores a 10.0, 1.0 y 0.1 para que con el número de tubos por serie, poder utilizar la Tabla adecuada, obteniendo el valor, este valor deberá multiplicarse por el mismo factor empleado para transformar las diluciones.

Ejemplo:

Diluciones empleadas: 0.01, 0.001 y 0.0001

Factor de multiplicación: 1,000

Dilución después de: 10 1 0.1
la multiplicación

No. de tubos positivos: 5 3 1
(Serie de cinco)

Valor obtenido en: 110
Tabla No 4

Valor a reportar: $(110) \times (1,000)$

110,000 NMP/100 mL

4.3 Incubación

Consiste en colocar los tubos en una incubadora durante 6 a 8 horas a una temperatura de $35 \pm 2 \frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. Es muy importante respetar el intervalo de temperatura y verificar periódicamente que se cumpla.

4.4 Siembra en TCBS.

Después de la incubación, en la superficie se forma una biopelícula (generalmente en esta se encuentran los Vibrios). Y se transfiere un inóculo por asada y sembrar por estria cruzada en placas de TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa). Se flamea la asa entre cada estriado con el objeto de obtener colonias aisladas y se repite tres veces el procedimiento anteriormente descrito. Las placas ya inoculadas, se invierten y se incuban a $35 \pm 2 \frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas si el crecimiento es suficiente, en caso contrario proseguir hasta completar 24 horas, (Ver FIG. 4).

4.5 Aislamiento en Kligler

Después de la incubación se observan las cajas y si no existe crecimiento se reporta como ausencia de V. cholerae conforme al formato presentado en el Anexo 2.

Si hay crecimiento, debe reportarse utilizando el formato presentado en el Cuadro No 1, Anexo 2. Se analiza la morfología de las colonias obtenidas. Las colonias de Vibrio cholerae son PEQUEÑAS (1 a 2 mm de diámetro), AMARILLAS, PLANAS, LIGERAMENTE CONVEXAS, "PEGAJOSAS", CON CENTRO OPACO Y PERIFERIA TRANSLUCIDA, (Ver FIG. 5).

De cada placa se procede a aislar dos colonias típicas de Vibrio cholerae por medio de su transferencia a "tubos de vidrio", previamente preparados con medio Kligler, inoculando por picadura y estria sobre la superficie. Se incuban a una temperatura de 35 +/- 2 ½C de 18 a 24 horas. Cuando el análisis es de tipo cuantitativo y se utiliza la técnica de NMP, la interpretación de los resultados se debe efectuar conforme se describe en el ejemplo, desarrollado en el apartado 4.4.4.2.2.2 de este mismo manual, (Ver FIG. 6, 7)

4.6 Pruebas bioquímicas

De los tubos se seleccionan únicamente los cultivos que presentan una reacción alcalina/ácida (cambio de pH del medio: parte superior neutro a alcalino, manifestandose con un color rojo; ; fondo del tubo neutro a ácido, el color amarillo indica este cambio), sin producción de gas (no existe desplazamiento del medio) ni de H₂S (precipitado oscuro). Los tubos positivos se reportan indicando el número de tubos positivos obtenidos y se agrega K/A (alcalina/ácida), (Ver FIG. 8). En el caso de los tubos negativos únicamente se informan como no validos. En ambos casos se utiliza la Tabla 6.

Los cultivos positivos (o seleccionados) se separan con el objeto de realizar las siguientes pruebas bioquímicas:

4.6.1 Medio MIO

En un tubo de vidrio con el medio en posición vertical se transfiere el inóculo por picadura alcanzando las 3/4 partes de la columna. Se incuba a una temperatura de 35 +/- 2 ½C durante un lapso de 18 a 24 horas.

Las reacciones a observar son:

a) Movilidad.

Positiva: Es cuando hay turbiedad en el medio o crecimiento extendido a partir de la línea de inoculación.

Negativa: El crecimiento es únicamente en la línea de inoculación.

b) descarboxilación (reacción de anaerobiosis).

Positiva: Se observa color violeta púrpura en el fondo del tubo.

Negativa: Hay color amarillo en el fondo del tubo.

c) Indol.

Se requiere agregar 5 gotas de reactivo de Erlich o de Kovacs al tubo después de la incubación.

Positivo: Aparece color rosa o rojo en el reactivo.

Negativo: Se mantiene el color original del reactivo de Kovacs ó Erlich (amarillo).

4.6.2 Agar TSI (Triple azúcar hierro).

Se emplea un tubo de vidrio con medio en posición inclinada. Se transfiere a este un inóculo por picadura y estria y se incuba a $35 \pm 2 \frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas, (Ver FIG. 9). Las reacciones a observar son:

a) Fermentación de la glucosa.

Pico de flauta: Es una reacción alcalina, que se manifiesta por un color rojo.

Fondo del tubo: Es una reacción ácida y el color observado es amarillo.

b) Fermentación glucosa/lactosa/sacarosa.

Pico de flauta: Para la reacción ácida, se observa color amarillo.

Fondo del tubo: Es una reacción ácida. Color amarillo

c) Ausencia de fermentación glucosa/lactosa/sacarosa.

Se observa un color rojo, tanto en el pico de flauta como en el fondo del tubo; debido a la ausencia de la fermentación de los azúcares, manifestandose una reacción alcalina.

d) Producción de sulfhídrico.

Se observa un precipitado de color negro en la parte profunda del tubo. Esta puede ser variable dependiendo del microorganismo.

e) Producción de CO_2 .

Hay presencia de burbujas, ligera muesca sobre el costado del tubo o desplazamiento del medio del fondo dejando un espacio libre.

4.6.3 Agar LIA (lisina y hierro).

Tubo de vidrio con medio en posición inclinada el cual se inocula por doble picadura y estria y se incuba a $35 \pm 2 \frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

Las reacciones que se deben observar son:

a) Descarboxilasa.

Positivo: El fondo del tubo es de color púrpura.

Negativo: El fondo del tubo es de color amarillo; sólo hay fermentación de la glucosa.

b) Desaminación.

Positiva: Aparece color rojo vino en la parte inclinada.

Negativa: Hay color púrpura en la parte inclinada o sin cambio.

4.6.4 Caldo Arginina.

Tubo de vidrio con Caldo Arginina, el inóculo se siembra por asada. Se sella con 0.5 mL de aceite comestible estéril para evitar el contacto con el aire y se incuba a $37 \pm 2 \frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ de 1 a 4 días, (Ver FIG. 10).

Las reacciones a observar son:

a) Descarboxilasa.

Positiva: Todo el caldo adquiere un color púrpura.

Negativa: El caldo es de color amarillo y significa que sólo hay fermentación de la glucosa.

Las reacciones observadas en el Medio MIO, Agar TSI, Agar LIA y Caldo Arginina deben ser concentradas en el Tabla 6.

4.6.5 Pruebas bioquímicas confirmativas.

La lectura de las reacciones bioquímicas efectuadas en medio MIO, Agar TSI, Agar LIA y Caldo Arginina se concentran en el Cuadro No 1, y únicamente en aquellos cultivos que coincidieron en un 100% con las características bioquímicas del Vibrio cholerae se les realiza las pruebas bioquímicas confirmativas.

4.6.5.1 Prueba de oxidasa.

Esta prueba se efectúa con un cultivo de crecimiento fresco procedente de un cultivo en LIA, debido a que se deben investigar las colonias en un medio no selectivo.

Sobre un pedazo de papel filtro colocado en una caja Petri se añaden de 1 a 2 gotas de reactivo de oxidasa, enseguida se extiende el cultivo sobre el papel húmedo con una asa de platino o con un aplicador de madera, (Ver FIG. 11). Las reacciones son las siguientes:

Positiva: La colonia toma un color rosado, después marrón y finalmente púrpura obscuro al término de 10 seg. Cuando se emplea una mezcla de reactivo dimetil-p-fenilendiamina-Á-naftol, la reacción está indicada por un color azul.

Negativa: No se produce cambio de color en las colonias, o sólo adquieren un color rosado pálido por el reactivo.

4.6.5.2 Prueba de String (hilo mucoso).

Se coloca una gota de desoxicolato de sodio al 0.5 % sobre un portaobjetos, y con un asa bacteriológica se toma una colonia del microorganismo a partir de un cultivo fresco en Medio Kligler y se resuspende en el reactivo. Cuando la reacción es positiva, como en el caso de los vibrios, se observa la producción de una suspensión extremadamente viscosa la cual se hace aparente al levantar el asa y formar un hilo el cual es más grueso a los pocos segundos después de realizar la suspensión, (Ver FIG. 12).

Al igual que en las pruebas bioquímicas anteriores, los resultados obtenidos se concentran en el Tabla No 6, Anexo 2, el cual debe compararse con la Tablas No 7 y 8, Anexo 3; si las bioquímicas realizadas coinciden con las características establecidas en dichas Tablas, podemos afirmar la existencia de Vibrio cholerae.

4.6.6 Serología.

Esta prueba se efectúa conforme a lo descrito en la Fig. No 1 (anexa). En el portaobjetos limpio se colocan en el extremo izquierdo dos gotas separadas de solución salina formalinizada al 0.6% (para inactivar a la bacteria). Utilizando una asa recta se recoge parte del cultivo desarrollado en Agar TSI -- (K/A) recientemente incubado de la muestra problema -- y en cada una de las gotas contenidas en el portaobjetos se pone una asada del mismo, emulsificando el inóculo. Se realiza bien la mezcla efectuando movimientos circulares durante 30 s, y se verifica al mismo tiempo que la suspensión sea uniforme. Si este cultivo autoaglutina (forma grumos) no puede ser serotipificado.

En caso contrario, en el extremo derecho del mismo portaobjetos se colocan otras dos gotas: una de solución salina formalinizada 0.6% y la otra de suero polivalente 01 (el cual se rehidrata con solución salina 0.85%). Y utilizando otra asa recta se recoge parte del mismo cultivo utilizado para la prueba anterior; y en

cada una de estas gotas se pone una asada del cultivo. Se emulsifica y realiza bien la mezcla con movimientos circulares durante 30 s, y se verifica que la suspensión sea uniforme sin permitir que se mezclen las gotas. Si la aglutinación se da en la gota que contiene el antisuero polivalente indica la presencia V. cholerae 01, (Ver FIG. 13)

Si se desea tipificar el serotipo se utiliza un portaobjetos limpio y se colocan dos gotas: una de solución salina formalinizada 0.6% y la otra de suero monoespecífico (OGAWA y/o INABA). Se utiliz otra asa recta para recojer parte del cultivo utilizado para la prueba anterior; y se pone en cada una de las gotas una asada. Se emulsifican y realiza bien la mezcla con movimientos circulares durante 30 s, verificando que la suspensión sea uniforme sin permitir que se mezclen las gotas.

Los resultados obtenidos se reportan conforme a la Tabla No 8.

Tabla No 8. Serología de Vibrio cholerae 01

Solución Formalinizada	ANTISUEROS			Interpretación
	Polivalente	OGAWA	INABA	
AGLUTINACION				NO EXISTE <u>V. cholerae</u>
SIN AGLUTINACION	AGLUTINACION			PRESENCIA DE <u>V. cholerae</u> 01
SIN AGLUTINACION	AGLUTINACION	AGLUTI NACION	NO AGLUTI NACION	<u>V. cholerae</u> se rotipo OGAWA
SIN AGLUTINACION	AGLUTINACION	NO AGLUTI NACION	AGLUTI NACION	<u>V. cholerae</u> se rotipo INABA
SIN AGLUTINACION	AGLUTINACION	AGLUTI NACION	AGLUTI NACION	<u>V. cholerae</u> se rotipo HIKOJIMA

Si la aglutinación con el suero polivalente 01 es dudosa, deberá repetirse la prueba. Siendo recomendable utilizar simultáneamente cultivos positivos y negativos, empleando cepas de referencia.

Todas las cepas diagnosticadas bioquímica y serológicamente como Vibrio cholerae 01, deben ser enviadas en tubos de Base Agar Sangre (BAS) o en Agar Nutritivo inclinado, sembradas por estria y picadura, con papel parafilm alrededor del tapón; debidamente etiquetado y, con la siguiente información anexa:

- Nombre de la institución remitente.
- Cuerpo de agua estudiado (Río, Laguna, Estero, Pozo profundo)

- Estación de muestreo (Estado, Municipio, Localidad, Vía de acceso)
- Tipo de muestra (Directa o Hisopo de Moore)
- Fecha de muestreo
- El Cuadro No 1 debidamente llenado.

Todo ello deberá ser empacado dentro de un recipiente seguro (preferentemente de plástico o metal), con las paredes y el fondo acolchonado (emplear algodón o papel) para evitar roturas del tubo; el sellado debe ser hermético. A efecto de poder ser verificadas.

El paquete será remitido a:

+-----+
| INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA
| COORDINACION DE TECNOLOGIA HIDRAULICA URBANO E INDUSTRIAL
| SUBCOORDINACION DE CALIDAD DEL AGUA
| AV. SAN BERNABE No 549, COL. SAN JERONIMO LIDICE
| MEXICO D.F., C.P. 10200
| TEL. 91 (5) 683 17 10
+-----+



FIG. 1 Preparación de medios de enriquecimiento
(agua peptonada alcalina pH 9.0)

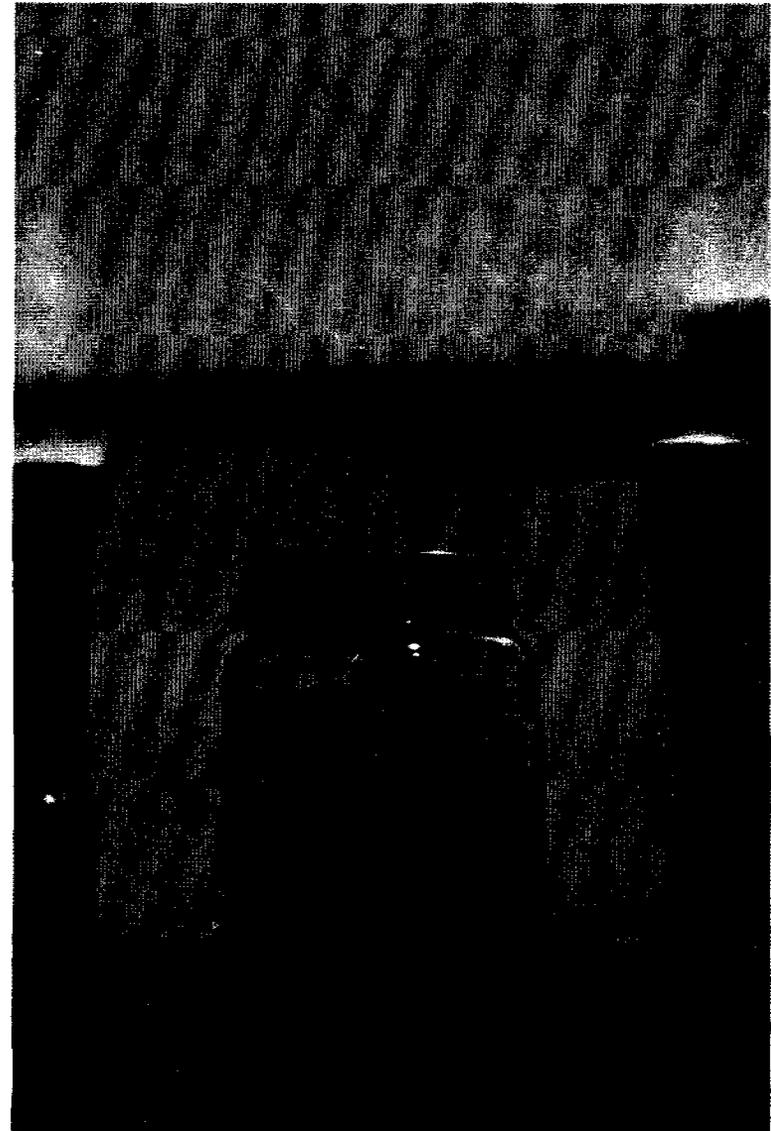


FIG. 2 Medio de enriquecimiento con el hisopo
de Moore

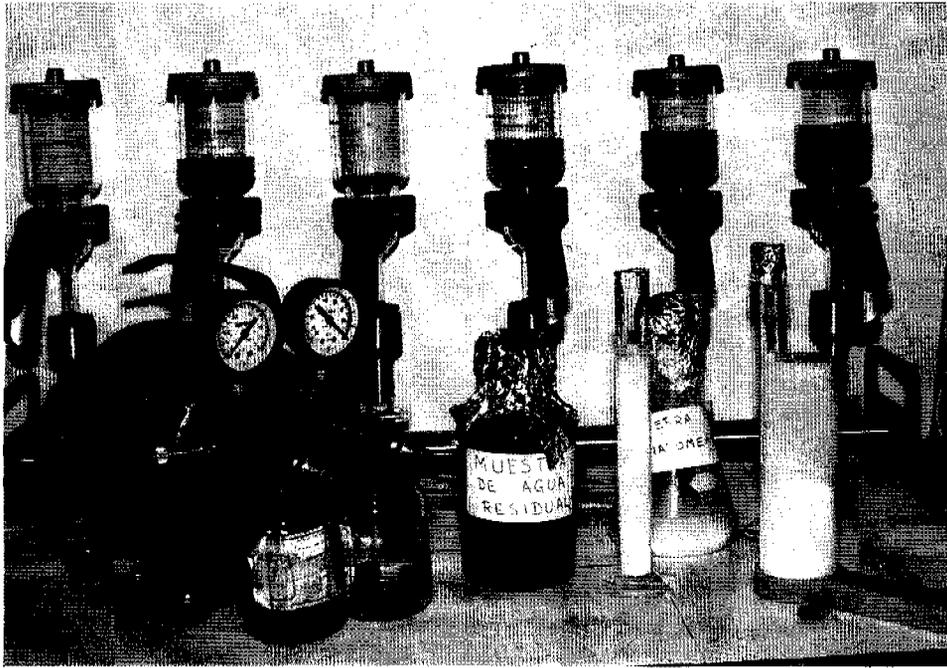


FIG. 3 Concentración de Vibrio cholerae por el método de Tierra de diátomeas.

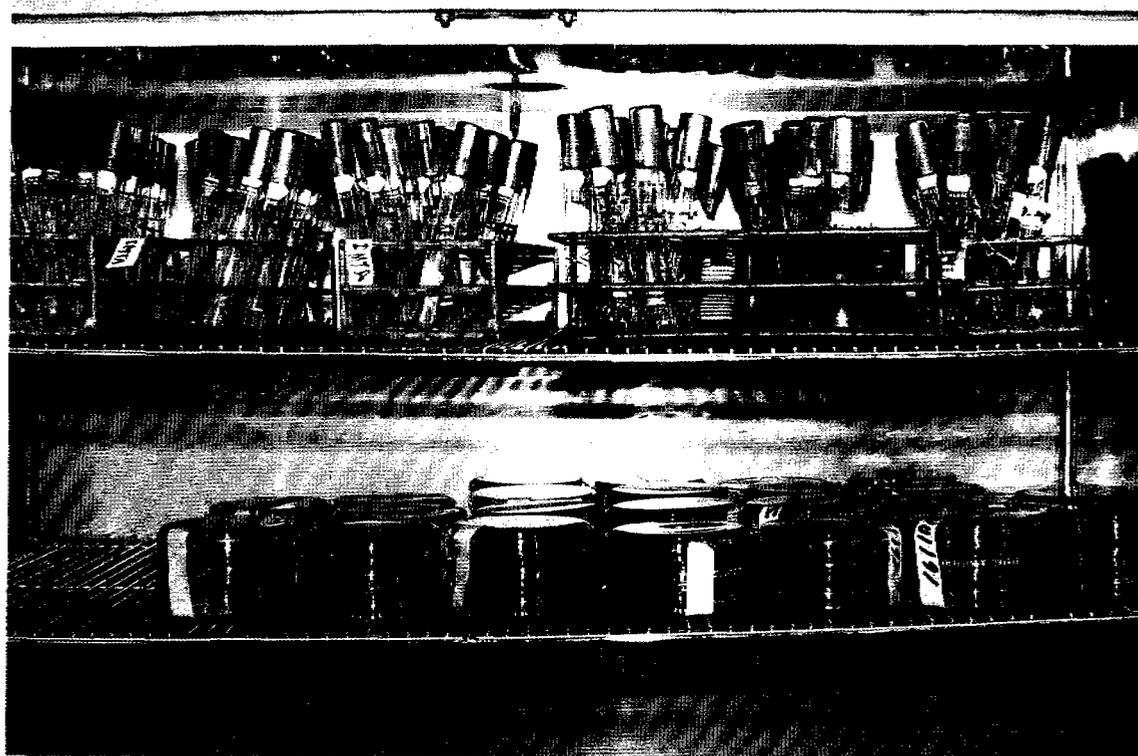


FIG. 4 Incubación de placas de TCBS a 35 ± 2 °C.

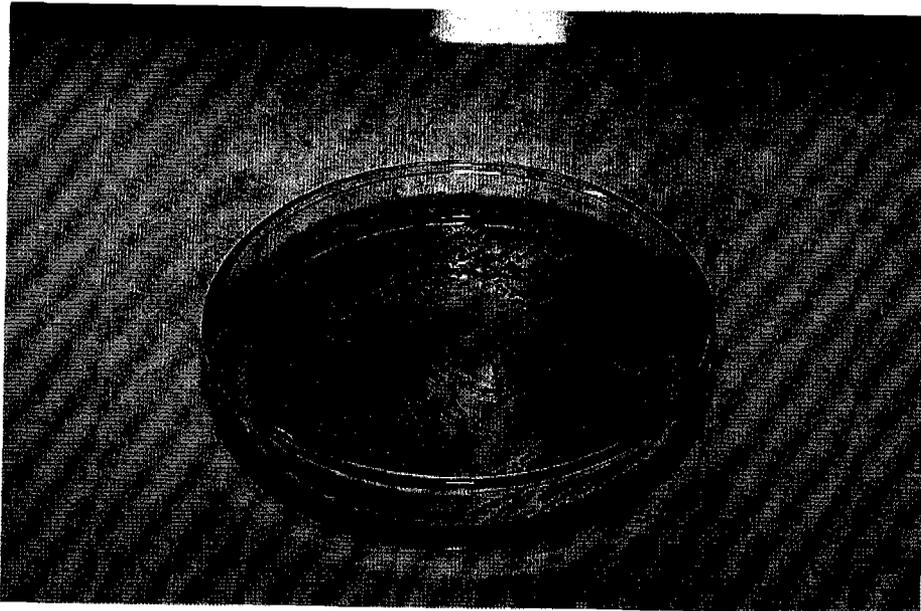


FIG. 5 Colonias típicas de Vibrio cholerae en agar TCBS.



FIG. 6 Selección de colonias de Vibrio cholerae en agar TCBS.



FIG. 7 Aislamiento en Kligler (picadura y estría)

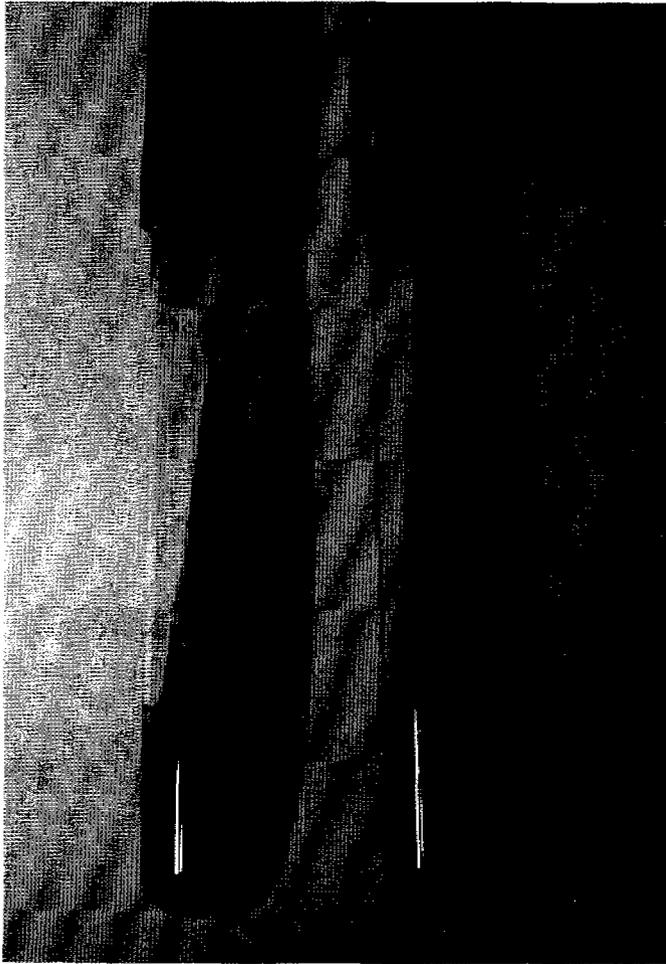


FIG. 8 Reacción de Vibrio cholerae en medio Kligler (alcalina/ácida).

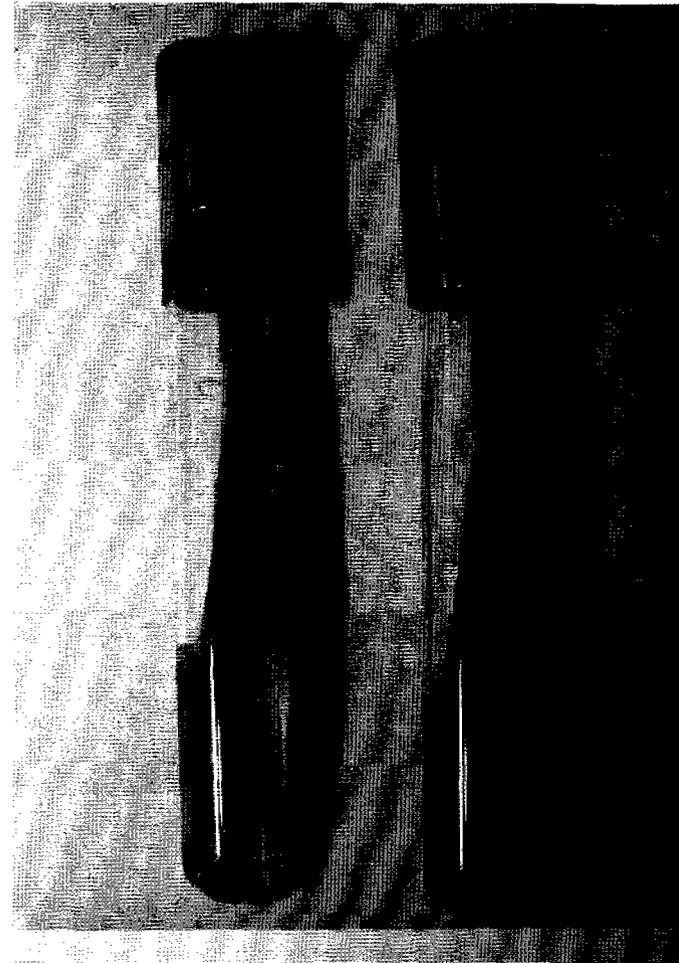


FIG. 9 Reacción de Vibrio cholerae en agar TSI (alcalina/ácida).

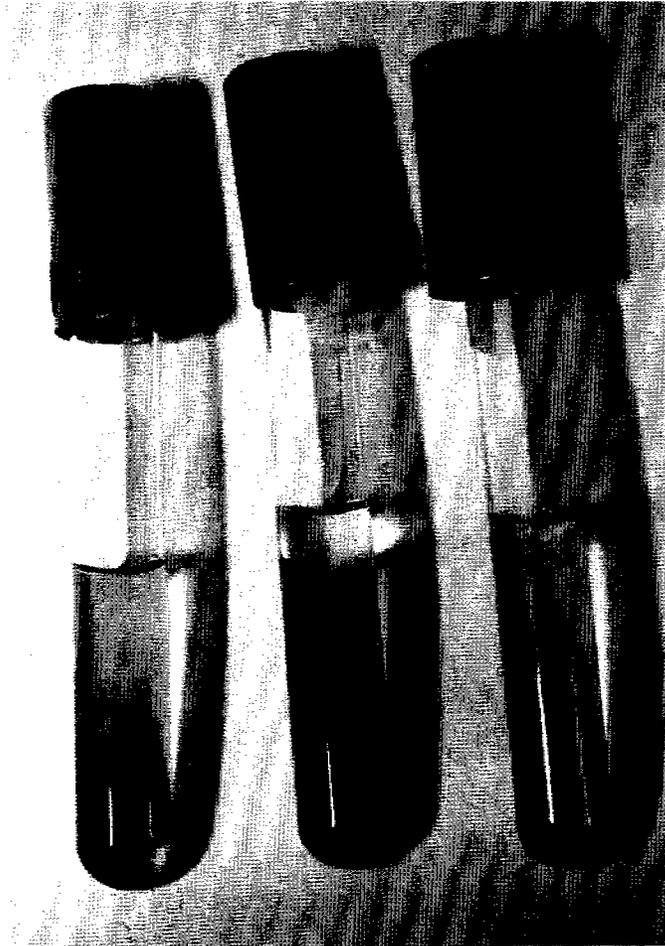


FIG. 10 Reacción de Vibrio cholerae en caldo arginina (color amarillo)

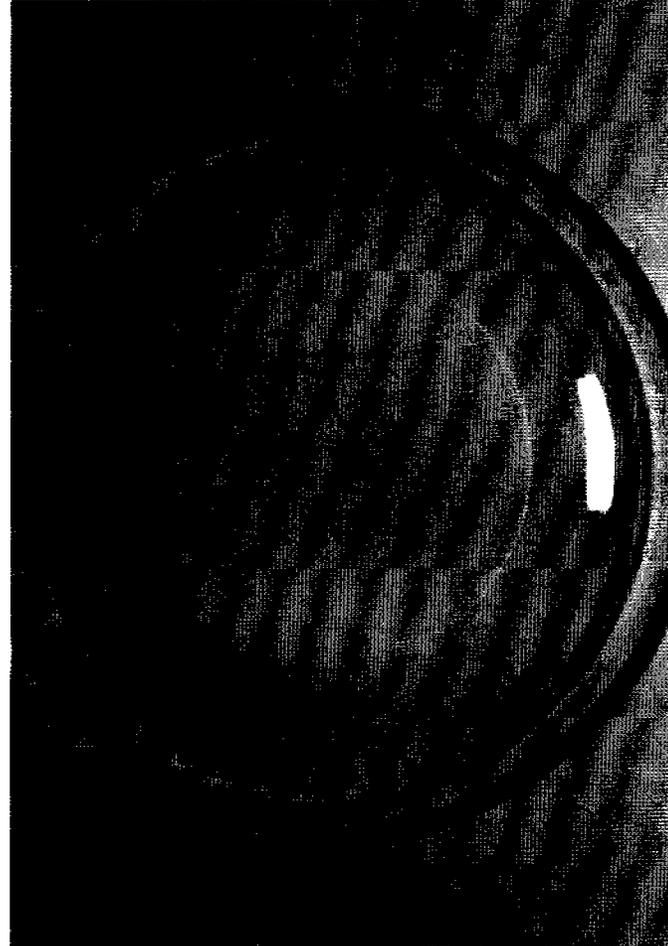


FIG. 11 Prueba de oxidasa positiva para Vibrio cholerae, lado izquierdo prueba negativa.

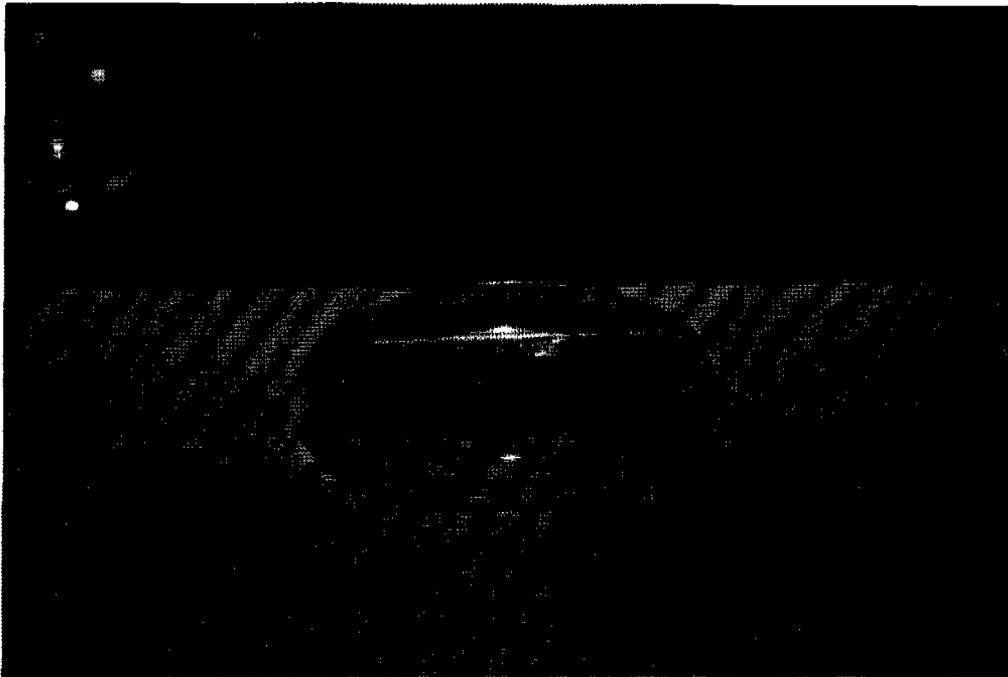


FIG. 12 Prueba del String positiva para V. cholerae



FIG. 13 Serología de V. cholerae utilizando suero poli
valente. Lado izquierdo prueba positiva, lado
derecho prueba negativa.

Collins. C. H y Lyne Patricia. (1989) "Métodos Microbiológicos" Ed. Acribia, España, 524 pags. 322-332.

De Mayo Vargas, Carmen. (1991) "Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Vibrio cholerae en Agua Potable, Aguas Superficiales y Residuales". S/P Imprenta, CEPIS, 37 pags.

R. Pollitzer, M.D. (1959) Cholera". World Health Organization. Genova, 1001 pags 97-201.

"Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections". World Health Organization.

American Public Health Association. (1989) "Methods for the examination of water and wastewater", 17ed, APHA.

Instituto Nacional de Salud. (1991) "Cólera". Serie Documento Técnico No. 19. Bogotá, Colombia .

Division of Microbiology Center for Food Safty and Applied Nutrition U.S. Food and Drug Administration. (1984) "Bacteriological Analytical Manual" 6th Edición, USA.

Ministerio de Salud Pública. (1971) "Lucha contra el cólera". BA.

Organización Panamerican de la Salud. Organización Mundial de Salud. (1991). "Conferencia sobre el cólera" 17 pags.

Marvin L. Speck. (1984) "Compendio de métodos para el análisis microbiológico en alimentos" 2a. edición. USA.

Instituto Nacional de Salud. (1991) "Manual de laboratorio cólera". Serie de notas técnicas No. 2. Lima, 31 pags.

Guinea, Sancho, Páres. (1979) "Análisis microbiológico de aguas aspectos aplicados" España, 122 pags.

Jean F. MacFaddin. (1980) "Biochemical tests for identification of medical bacteria" 2a. ed. USA. 523 pags.

ANEXO 1. Tablas para la determinación del NMP.

TABLA No 3. Números más probable por 100 mL. Usando un tubo de 50 mL, cinco tubos de 10 mL y cinco tubos de 1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 1		
0 - 0 - 1	1	< 0.5	4
0 - 0 - 2	2	< 0.5	6
0 - 1 - 0	1	< 0.5	4
0 - 1 - 1		< 0.5	6
0 - 1 - 2		< 0.5	8
0 - 2 - 0	2	< 0.5	6
0 - 2 - 1	3	< 0.5	8
0 - 2 - 2	4	< 0.5	11
0 - 3 - 0	3	< 0.5	8
0 - 3 - 1	5	< 0.5	13
0 - 4 - 0	5	< 0.5	13
1 - 0 - 0	1	< 0.5	4
1 - 0 - 1	3	< 0.5	8
1 - 0 - 2	4	< 0.5	11
1 - 0 - 3	6	< 0.5	15
1 - 1 - 0	3	< 0.5	8
1 - 1 - 1	5	< 0.5	13
1 - 1 - 2	7	1	17
1 - 1 - 3	9	2	21
1 - 2 - 0	5	< 0.5	13
1 - 2 - 1	7	1	17
1 - 2 - 2	10	3	23
1 - 2 - 3	12	3	28
1 - 3 - 0	8	2	19
1 - 3 - 1	11	3	26
1 - 3 - 2	14	4	34
1 - 3 - 3	18	5	53
1 - 3 - 4	21	6	66
1 - 4 - 0	13	4	31
1 - 4 - 1	17	5	47
1 - 4 - 2	22	7	69
1 - 4 - 3	28	9	85
1 - 4 - 4	35	12	100
1 - 4 - 5	43	15	120
1 - 5 - 0	24	8	75

Tabla No 3. Números más probable por 100 mL. Usando un tubo de 50 mL, continuación cinco tubos de 10 mL y cinco tubos de 1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
1 - 5 - 1	35	12	100
1 - 5 - 2	54	18	140
1 - 5 - 3	92	27	220
1 - 5 - 4	160	39	450
1 - 5 - 5	≥ 240		

TABLA No 4. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 2		
0 - 0 - 1	2	< 0.5	7
0 - 1 - 0	2	< 0.5	7
0 - 2 - 0	4	< 0.5	11
1 - 0 - 0	2	< 0.5	7
1 - 0 - 1	4	< 0.5	11
1 - 1 - 0	4	< 0.5	11
1 - 1 - 1	6	< 0.5	15
1 - 2 - 0	6	< 0.5	15
2 - 0 - 0	5	< 0.5	13
2 - 0 - 1	7	1	17
2 - 1 - 0	7	1	17
2 - 1 - 1	9	2	21
2 - 2 - 0	9	2	21
2 - 3 - 0	12	3	28
3 - 0 - 0	8	1	19
3 - 0 - 1	11	2	25
3 - 1 - 0	11	2	25
3 - 1 - 1	14	4	34
3 - 2 - 0	14	4	34
3 - 2 - 1	17	5	46
3 - 3 - 0	17	5	46
4 - 0 - 0	13	3	31
4 - 0 - 1	17	5	46
4 - 1 - 0	17	5	46
4 - 1 - 1	21	7	63
4 - 1 - 2	26	9	78
4 - 2 - 0	22	7	67
4 - 2 - 1	26	9	78
4 - 3 - 0	27	9	80
4 - 3 - 1	33	11	93
4 - 4 - 0	34	12	93

Tabla No 4. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de
Continuación de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
5 - 0 - 0	23	7	70
5 - 0 - 1	31	11	89
5 - 0 - 2	43	15	110
5 - 1 - 0	33	11	93
5 - 1 - 1	46	16	120
5 - 1 - 2	63	21	150
5 - 2 - 0	49	17	130
5 - 2 - 1	70	23	170
5 - 2 - 2	94	28	220
5 - 3 - 0	79	25	190
5 - 3 - 1	110	31	250
5 - 3 - 2	140	37	340
5 - 3 - 3	180	44	500
5 - 4 - 0	130	35	300
5 - 4 - 1	170	43	490
5 - 4 - 2	220	57	700
5 - 4 - 3	280	90	850
5 - 4 - 4	350	120	1,000
5 - 5 - 0	240	68	750
5 - 5 - 1	350	120	1,000
5 - 5 - 2	540	180	1,400
5 - 5 - 3	920	300	3,200
5 - 5 - 4	1,600	640	5,800
5 - 5 - 5	≥ 2,400		

TABLA No 5. Número más probable por 100 mL. Usando tres tubos de 10 mL, tres tubos de 1 mL y tres tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 3		
0 - 0 - 1	3	< 0.5	9
0 - 1 - 0	3	< 0.5	13
1 - 0 - 0	4	< 0.5	20
1 - 0 - 1	7	1	21
1 - 1 - 0	7	1	23
1 - 1 - 1	11	3	36
2 - 0 - 0	9	1	36
2 - 0 - 1	14	3	37
2 - 1 - 0	15	3	44
2 - 1 - 1	20	7	89
2 - 2 - 0	21	4	47
2 - 2 - 1	28	10	150
3 - 0 - 0	23	4	120
3 - 0 - 1	39	7	130
3 - 0 - 2	64	15	380
3 - 1 - 0	43	7	210
3 - 1 - 1	75	14	230
3 - 1 - 2	120	30	380
3 - 2 - 0	93	15	380
3 - 2 - 1	150	30	440
3 - 2 - 2	210	35	470
3 - 3 - 0	240	36	1,300
3 - 3 - 1	460	71	2,400
3 - 3 - 2	1,100	150	4,800
3 - 3 - 3	≥ 2,400		

ANEXO 2. Formato para el reporte de los resultados analíticos de V. cholerae

TABLA 6. Formato para el reporte analítico de Vibrio cholerae

ESTADO	MUNICIPIO	LOCALIDAD					
L. MUESTREO	CUERPO RECEPTOR						
FECHA DE MUESTREO.	F. DE RECEPCION						
PRUEBAS	NUMERO DE CODIGO DE LA MUESTRA						
DIFERENCIALES							
T C B S							
CRECIMIENTO							
NO CRECIMIENTO							
KLIGLER							
POSITIVO							
NEGATIVO							
ORNITINA							
MOVILIDAD							
INDOL							
AGAR TSI							
ACIDO							
GAS							
H ₂ S							
AGAR LIA							
LISINA DESCARBOXILASA							
CALDO ARGININA							
ARGININA DIHIDROLASA							
OXIDASA							
PRUEBA DEL STRING							
SEROLOGIA							
TIPO DE BACTERIA							

ANEXO 3. Tablas para identificación de V. cholerae

TABLA No 6. Reacciones de algunos vibrios relacionados con otros microorganismos en KLIGLER, TSI (triple-azúcar-hierro) y LIA (lisina-hierro).

MICROORGANISMO	KLIGLER		TSI		LIA	
	SUPERFICIE	FONDO	SUPERFICIE	FONDO	SUPERFICIE	FONDO
<u>V. cholerae</u>	K	A	A(raramente K)	A	K	K o N
<u>V. parahaemolyticus</u>	K	A	K	A	K	K o N
<u>V. alginolyticus</u>	K	A	A	A	K	K o N
<u>V. vulnificus</u>	A o K	A	A	A	K	K o N
<u>A. hydrophila</u>	A o K	A	K o A	A	K	K o N
<u>P. shigelloides</u>	A o K	A	K o A	A	K	K o N

^aK, alcalino; a, ácido; N, neutral. Todos los microorganismos no producen ácido sulfhídrico con gas o gas de glucosa es detectable en cantidades en KLIGLER o Agar TSI. Algunas especies de aeromonas pueden producir gas de glucosa en este medio. No todos producen ácido sulfhídrico/gas en cantidades detectables en el medio de LIA.

TABLA No 7. Comparación de reacciones bioquímicas de V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus y V. vulnificus.

Prueba o sustrato	<u>V. cholerae</u> signo	<u>V. parahaemolyticus</u> signo	<u>V. alginol</u> signo	<u>V. vulnificus</u> signo
Motilidad	+	+	+	
Indol	+	+	+	+
Lisina descarbox. ^c	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa ^c	-	-	-	-
Ornitina descarbox. ^c	+	+	+/-	+
Rojo de metilo	+w	+	-	NA
Voges-Proskauer	+/-	-	+	-
Citrato (Simmons)	+/-	+	D	D
Fenilalanina deaminasa	-	-	-	NA
Gelatina (22½C)	+	+	+	+
Gas de glucosa	-	-	-	-
Lactosa ^c	-	-	-	+
Sacarosa	+	-	+	-
Arabinosa	-	+	-	-
Manosa	+	+	+	-
Manitol	+	+	+	+
Salicina	-	-	D	+
Esculina	-	+	-	NA
Melobiosa	-	-	-	D

^a Basado en la incubación de 1 - 2 días a 35 %c. todos los cultivos son oxidasa-positivos beta-galactosidas-positivos y reducción de nitratos a nitritos. Todos los cultivos no producen ácido sulfhídrico en TSI, son ureasa negativos, y no fermentadores de dulcitol inositol, adonitol, xilosa, rhamnosa.

^b Signo +, 80% o más positivos alrededor de 1 a 2 días -, 80% o más no demostrando reacción alrededor de 1-2 días +/-, alta variabilidad entre las cepas probadas; +^w, reacción positiva; NA, dato no evaluado; D, reacciones diferentes.

ANEXO 4. Normas de bioseguridad.

El laboratorio deberá estar localizado en un área bien ventilada e iluminada, libre de corrientes de aire y fluctuaciones bruscas de temperatura. Los pisos deben ser lisos, antiderrapantes y resistentes a productos químicos. Las paredes deben ser lisas y no muy altas (3.5 m) con el fin de evitar acumulaciones de polvo y mantener la temperatura del local lo más estable posible. Idealmente las paredes deben estar revestidas con alguna resina para su mejor limpieza, durabilidad y buena apariencia. Si esto no es posible, pintarlas de colores claros.

Debe haber un mínimo de dos puertas de fácil acceso, debiendo abrir siempre hacia afuera para salir fácilmente del laboratorio en caso de emergencia.

Las mesas deberán contar con tarja de acero inoxidable y llaves mezcladoras para agua caliente y fría, instalaciones eléctricas adecuadas para las estufas, muflas, incubadoras, contadores de colonias, microscopios y balanzas. Así mismo, deberá contarse con la instalación adecuada para la utilización del gas butano. La iluminación será con luz fluorescente del tipo luz de día.

Todos los analistas, incluyendo al personal auxiliar, deberán tener los conocimientos básicos en materia de higiene y seguridad. Cada uno debe estar informado acerca de los riesgos que existen en el área de trabajo, así como de los procedimientos y comportamientos que debe adoptar para prevenir cualquier accidente, infección o la propagación eventual de una epidemia fuera del laboratorio. Para el buen desempeño y mayor seguridad en el trabajo, se sugieren las siguientes medidas:

- Siempre se debe trabajar con bata personal, de preferencia de algodón color blanco.
- Usar guantes de plástico (de cirujano) y cubrebocas estériles durante todo el trabajo.
- Limpiar la mesa de trabajo con una solución de fenol al 5 % antes y después del análisis.
- Para la realización de los pipeteos siempre se debe utilizar la pera de succión.
- Colocar cerca del lugar de trabajo un recipiente adecuado para recibir el material de vidrio que se va desocupando (pipetas, tubos, cajas de Petri, etc.). Este material debe ser esterilizado antes de lavarse.
- El material deberá lavarse con detergente extrán y agua caliente; enjuagarse varias veces con agua caliente para eliminar toda huella de detergente y por último enjuagarse con agua destilada desmineralizada.

- Las descargas deberán realizarse en una fosa anexa al laboratorio y ser tratadas antes de su vertido al alcantarillado de la ciudad.
- Para la esterilización del material se debe considerar: guardar las pipetas en pipeteros metálicos o bien envolverlas en papel aluminio o Kraft y envolver las cajas Petri en papel aluminio o Kraft. Someter el material a $170 \frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ durante dos horas en una estufa. Los tubos de ensayo se llenan con los medios indicados en la técnica se esterilizarlas en autoclave a la presión indicada para cada medio durante 15 minutos.
- Evitar el contacto de las manos con el rostro o cualesquier otra área del cuerpo sin previa desinfección.
- No ingerir alimentos ni fumar en el área de trabajo.
- Después de la jornada de trabajo o cuando se salga del área del mismo, desinfectarse las manos con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % o de alcohol etílico y posteriormente lavarse perfectamente con agua y con jabón.
- No se debe tocar la toalla ó el jabón. Sin desinfección previa Utilizar toallas de papel desechables.
- El botiquín de primeros auxilios deberá colocarse en un punto específico, en el mismo se incluirá una mascarilla de oxígeno del tipo portátil.

ANEXO 5. Soluciones y medios de cultivos.

- SOLUCIONES

Fenol al 5 %

Fenol..... 50 g
Agua destilada..... 1000 ml

Preparación: Pesar 50 g de cristales de fenol y colocarlos en un frasco ambar adicionando 1000 ml de agua destilada.

Hipoclorito de sodio 0.5 %

Hipoclorito de sodio..... 5 ml
Agua destilada..... 100 ml

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

Hidróxido de sodio 1 N

NaOH..... 40 g
Agua destilada..... 1000 ml

Preparación: Pesar 40 g de hidróxido de sodio y colocar en un matraz volumétrico y completar un volumen de 1000 ml con agua destilada.

Agua de dilución

Solución patrón A

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)... 34 g
Agua destilada..... 500 ml

Preparación: Disolver el fosfato monopotásico en 500 ml de agua destilada, ajustar pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N, completar el volumen a un litro de agua destilada.

Solución patrón B

Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).. 50 g
Agua destilada..... 1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato de magnesio en un litro de agua destilada.

Preparación de agua de dilución

Agregar 1.25 ml de la solución patrón A de fosfato monopotásico y 5 ml de la solución patrón B de sulfato de magnesio a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos cantidades que aseguren un volumen de 90 ± 2 ml luego de esterilizar durante 15 minutos a $121 \frac{1}{2}^\circ\text{C}$.

Reactivo de Kovacs

p-dimetil-amino-benzaldehído... 5 g
alcohol amílico o isoamílico... 75 ml
HCl concentrado..... 25 ml

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

Reactivo de Erlich

p-dimetil-amino-benzaldehído... 1 g
alcohol etílico absoluto..... 85 ml
HCl concentrado..... 20 ml

Preparación: Pesar 1 g de p-dimetil-amino-benzaldehído y disolver en 85 ml alcohol de etílico absoluto g.r., agregar 20 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Reactivo de oxidasa

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

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

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

Desoxicolato de sodio

Desoxicolato de sodio (sólido). 0.5 g
Agua destilada..... 100 ml

Preparación: Pesar 0.5 g de desoxicolato y disolver en 100 ml de agua destilada esteril, guardar en frasco claro. Si se cuenta con el reactivo al 10 % según algunas marcas comerciales, utilizarlo tal cual.

Cloruro de sodio 0.85 %

NaCl..... 8.5 g
Agua destilada..... 100 ml

Solución formalinizada al 0.6 %

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

- MEDIOS DE CULTIVO.

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

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

Preparación: las sales se disuelven en 1,000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 9.0 con solución 1 N de NaOH y esterilizar la solución a 121 $\frac{1}{2}$ durante 15 minutos.

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

- MEDIOS DE AISLAMIENTO SELECTIVO.

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

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

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

Preparación: Suspender 89 g de este agar en un litro de agua destilada y llevar el pH de la solución a 8.6 a 25 $\frac{1}{2}$ C (en caso de que la temperatura sea superior a la especificada meter al refrigerador un momento), con solución 1 N de NaOH, calentar a ebullición hasta disolución completa. Vaciar, sin esterilizar el medio, en placas de petri estériles y sin dejar enfriarlas mantenerlas en refrigeración a una temperatura 2 a 8 $\frac{1}{2}$ C.

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

azulado, de aproximadamente 2 a 5 mm de diámetro y las de Vibrio alginolyticus son grandes de color amarillo de 2 a 5 mm de diámetro.

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

- MEDIOS DE IDENTIFICACION

Se utilizan para diversos ensayos <<bioquímicos>>.

- Medio Kligler.

Preparación: Se disuelven 52 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y el pH final de la solución debe ser de 7.4, se debe mezclar bien y calentar a temperatura de ebullición durante un minuto; se distribuyen de 3 a 4 ml en tubos de ensayo de 13 x 100, esterilizando posteriormente a 121 $\frac{1}{2}$ C durante 15 minutos dejándolos enfriar en una posición inclinada.

Usos: Es un medio creado para favorecer la fermentación de hidratos de carbono y para la diferenciación entre varios grupos, géneros y especies de las enterobacterias, así como para otro grupo de bacterias de metabolismo oxidativo. Determina la capacidad de un organismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico H₂S.

- Agar TSI.

Preparación: Se disuelven 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final de 7.4, mezclar bien y calentar a ebullición durante un minuto. Inmediatamente después distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100 y esterilizar a 121 $\frac{1}{2}$ C durante 15 minutos. Se deja solidificar en posición inclinada, de forma que sobre una columna de unos 3 cm de altura, se forme una superficie oblicua, elíptica, de unos 5 cm de diámetro mayor.

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

- Agar lisina-hierro

Preparación: Disolver 34.5 g por litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final 6.7 a 25½ C. Calentar a ebullición hasta disolución completa y distribuir de 3 a 4 ml, en tubos de 13 x 100. Esterilizar en autoclave 121½ C, durante 15 minutos, enfriar y antes de que solidifique inclinar los tubos, conservar los tubos preparados en refrigeración de 2 a 8½ C.

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

- Medio MIO

Preparación: Disolver 31 g por litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final 6.5 a 25½ C, calentar a ebullición hasta disolución completa, distribuir de 3 a 4 ml, en tubos de 13 x 100. Esterilizar en autoclave a 121½ C, durante 15 minutos, enfriar y dejarlos en reposo en posición vertical, conservar los tubos preparados en refrigeración de 2 a 8½ C.

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

- Caldo arginina (Base de Moeller + arginina)

Preparación: Rehidratar Bacto descarboxilasa Base de Moeller disolviendo 10.5 g en un litro de agua destilada o agua desionizada. El pH final debe ser de 6.8 a 25½ C. Calentar hasta completa disolución. Adicionar 10 g de L-arginina o 20 de DL-arginina, y agitar hasta completa disolución. Distribuir de 3 a 4 ml, en tubos de 13 x 100 y esterilizar en autoclave a 121 ½C, durante 10 minutos. Conservar los tubos preparados en refrigeración de 2 a 8½ C.

Usos: Esta prueba es de gran utilidad para la identificación de algunas enterobacterias. Vibrio cholerae que no hidrolizan la arginina, dando por consiguiente una respuesta negativa. En este medio se observa la fermentación de la glucosa y la descarboxilación arginina.

- Prueba de la oxidasa

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

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

ANEXO 6. GLOSARIO

Aerobiosis: Modelo metabólico capacitado para utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones.

Anaerobiosis: Modelo metabólico capacitado para utilizar compuestos orgánicos o inorgánicos distintos al oxígeno molecular como aceptores terminales de electrones.

Biotipo: Conjunto de características fisiológicas o bioquímicas de un cultivo. El Código de nomenclatura Bacteriana recomienda la sustitución de este vocablo por el Biovar.

Biovar: Véase Biotipo.

Cepa: Población constituida por los descendientes de un aislamiento único procedente de un cultivo puro. Una cepa, normalmente procede de una sucesión de cultivos derivados de una sola colonia. El concepto de cepa no coincide necesariamente con el de clon porque se desconoce si procede de la división sucesiva de una sola célula.

Clon: Población de células bacterianas derivadas de una sola célula parental.

Colonia: Estructura macroscópica, de morfología característica, que se desarrolla en los medios de cultivo sólidos y que está constituida por una población bacteriana de varios millones de individuos, procedentes de sucesivas divisiones celulares a partir de una célula parental. una colonia bacteriana satisface el concepto biológico de clon.

Crecimiento: Aumento de la masa bacteriana.

Cultivo bacteriano: Población de células bacterianas existentes en un momento y lugar determinado: un tubo, en una placa o un vial de liofilizado.

Cultivo puro: Población uniforme obtenida por el aislamiento de una sola colonia. A efectos prácticos suele coincidir con el concepto de cepa.

Enterobacteria: Bacteria con un hábitad intestinal. En sentido amplio comprende los bacilos y vibriones gramnegativos, facultativamente fermentadores, agrupados en las familias Enterobacteriáceas y Vibrionáceas, junto con sus géneros afines. En sentido estricto afecta solamente a algunos géneros de la familia Enterobacteriácea.

Especie: En bacteriología es una categoría solamente definible en términos de su posición intragenérica en un sistema jerárquico.

Fermentación: Degradación anaeróbica de los hidratos de carbono por los microorganismos, en la que el oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones ha sido sustituido por un sustrato orgánico.

Gram, tinción de: Tinción diferencial de bacterias apta para criterios de clasificación e identificación de las bacterias. Se denominan grampositivas o gram (+) a aquellas bacterias que retienen el colorante primario (cristal violeta) tras el tratamiento con el agente decolorante (alcohol-acetona). Se denominan gramnegativas o gram (-) aquellas que bajo la acción del alcohol-acetona se decoloran y deben teñirse con el colorante de contraste (safranina).

Gramnegativo: Vease Gram, tinción de.

Grampositivo: Vease Gram, tinción de.

Medio de cultivo: Sistema capaz de soportar el crecimiento bacteriano o de otro tipo de microorganismos o de partes de un organismo superior.

Medio de enriquecimiento: Medio de cultivo empleado para el aislamiento de un microorganismo determinado a partir de una muestra constituida probablemente por un cultivo mixto de varios microorganismos.

Medio diferencial: Medio de cultivo que contiene indicadores y sustratos capaces de proporcionar reacciones significativas cuando se desarrollan ciertos microorganismos.

Medio selectivo: Medio de enriquecimiento complejo en el que existe un inhibidor adecuado para la supresión del crecimiento de aquellos microorganismos distintos a los que se selecciona.

Nutriente: Sustrato susceptible de ser utilizado por microorganismos.

Serología: Disciplina utilizada, en algunos de sus aspectos, para diagnosticar la presencia de ciertos microorganismos aislados por métodos bacteriológicos. Este diagnóstico se basa en las reacciones específicas entre antígenos bacterianos y los anticuerpos contenidos en los sueros de animales sensibilizados.

Serotipo: Identificación de un biovar basada en sus características antigénicas. El Código de nomenclatura Bacteriana recomienda la sustitución de este vocablo por el de Serovar.

Serovar: Véase Serotipo.

Sistemática: Arte de clasificar seres vivos, que se ayuda de la taxonomía, bioquímica, ecología, genética, morfología y otras disciplinas.

Taxón: Cualquier grupo taxonómico sin categoría jerárquica.

Taxonomía: Conjunto de técnicas y métodos destinados a la clasificación, nomenclatura e identificación de microorganismos.

•

Cualquier duda o comentario a este
manual favor de comunicarse a:
Q.F.B. Ana María Sandoval Villasana
Av. San Bernabe 549
Col. San Jeronimo Lidice
C.P. 10200, México D. F.
Tel. 683 17 10, Fax 595 29 88