

V. Exámenes de alimentos y de muestras ambientales

Tradicionalmente, el agua se considera como el vehículo más importante para la transmisión del cólera. Hacia 1860, después de los estudios de John Snow y otros investigadores, quedó claro que las fuentes de agua contaminadas con aguas residuales, como sistemas municipales de abastecimiento de agua, ríos, arroyos o pozos eran la principal vía de transmisión de la enfermedad. El contacto con alimentos contaminados puede también propagar el cólera, aunque los alimentos más asociados son los pescados y mariscos. En una epidemia, generalmente el agua y los alimentos se contaminan con cepas de *V. cholerae* O1 procedentes de heces humanas. Así, por muchos años se creyó que el único reservorio de *V. cholerae* O1 era el intestino humano y que la supervivencia del microorganismo en el ambiente era limitada. Sin embargo, durante los últimos 20 años, investigaciones efectuadas en Australia y en los Estados Unidos han demostrado que cepas de *V. cholerae* O1 no toxigénicas y productoras de toxina pueden formar parte del ecosistema acuático de manera natural. Estos datos apoyan la idea de que las cepas toxigénicas y no toxigénicas de *V. cholerae* O1 pueden tener un reservorio ambiental, lo cual tendría repercusiones importantes en relación con los esfuerzos para combatir y erradicar el cólera.

Al igual que otros miembros de la familia *Vibrionaceae*, *V. cholerae* O1 puede sobrevivir por períodos prolongados en ambientes acuáticos, y muchos lo consideran como una especie nativa de aguas salobres y de estuarios. Diversos factores biológicos y fisicoquímicos, como el contenido de nutrientes, la salinidad, la temperatura y el pH, pueden influir en la multiplicación, supervivencia y distribución de *V. cholerae* en los ambientes acuáticos. El tiempo de supervivencia de *V. cholerae* en el agua puede ir desde horas hasta meses. La capacidad de *V. cholerae* para producir quitinasa puede también ayudarle a sobrevivir en estuarios donde abundan el plancton y otras especies marinas constituidas en parte por quitina. *V. cholerae* O1 logró sobrevivir en diversas especies de plancton recogidas en Bangladesh, donde el cólera es endémico. Otras biotas acuáticas, como los jacintos de agua de Bangladesh, también se colonizan con *V. cholerae* y favorecen su multiplicación. Esta relación con el plancton puede constituir un aspecto ecológico importante de *V. cholerae* O1 en las regiones de cólera endémico de Bangladesh, y se ve respaldada por el hecho de que los períodos de auge estacional del plancton coinciden con epidemias de cólera en ese país. Sin embargo, aunque las masas de agua naturales probablemente sirvan como reservorios ambientales y como medio de transmisión a los seres humanos, no siempre han dado buenos resultados los intentos de aislar *V. cholerae* de lagos, ríos, arroyos y estanques en zonas donde la enfermedad es epidémica.

A. Transporte de las muestras

Debido a que *V. cholerae* sobrevive mejor en las muestras mantenidas a 4 °C que en las congeladas, es conveniente conservar las muestras refrigera-

das colocándolas en una caja aislada con bolsas de material refrigerante congeladas (que pueden adquirirse en el comercio o improvisarse). Si las muestras se refrigeran con hielo en lugar de bolsas de material refrigerante, el agua de deshielo no debe trasminarse a las muestras ni gotear del recipiente. Esto se evita colocando el recipiente que contiene la muestra en bolsas de plástico impermeables que se puedan cerrar perfectamente. También debe evitarse sumergir las muestras en hielo para evitar su congelamiento parcial.

B. Selección de los métodos de aislamiento para las muestras ambientales

La selección del método de aislamiento depende del tipo de muestra que se va a cultivar. Las muestras procedentes de aguas marinas y de estuarios pueden contener muchas otras especies de *Vibrio* que crecen igual que *V. cholerae* en el agua peptonada alcalina y en el agar TCBS. Estas muestras se diluyen en incrementos décuplos hasta 10^{-3} para reducir el número de microorganismos competidores. La incubación en agua peptonada alcalina a una temperatura elevada (42 °C) inhibe el crecimiento de algunos microorganismos competidores, particularmente otros vibriones que no se multiplican bien a esa temperatura. Por lo tanto, puede facilitarse el aislamiento de *V. cholerae* O1 a partir de muestras de agua de estuario o de mar debido a que los competidores principales se inhiben a esa temperatura. Si los recursos de laboratorio lo permiten, es aconsejable preparar duplicados de las diluciones e incubarlos a 42 °C. Al contrario, las muestras provenientes de agua dulce o de aguas residuales, que contienen menos vibriones y microorganismos semejantes a estos, generalmente no requieren dilución antes de cultivarse ni incubación a 42 °C.

C. Aislamiento de *V. cholerae* a partir de aguas residuales

La vigilancia mediante el hisopo de Moore constituye una técnica práctica y eficaz para detectar *V. cholerae* en aguas residuales (Figura V-1). Los hisopos se montan con facilidad y, cuando se colocan en las cañerías de entrada de un sistema municipal de aguas residuales, pueden detectar infecciones por *V. cholerae* en zonas donde la vigilancia epidemiológica de las enfermedades diarreicas no ha logrado detectar cólera. La sensibilidad de la técnica no depende de la distancia que existe entre la fuente de infección y el sitio donde se toman las muestras. El empleo de este método para obtener muestras de las principales cañerías de entrada de un sistema comunitario de aguas residuales constituye una manera sencilla de determinar si existen en la zona infecciones por *V. cholerae* O1. En los párrafos siguientes se describen el montaje, la colocación y la manipulación subsecuente de los hisopos de Moore para la vigilancia de *V. cholerae* en aguas residuales.

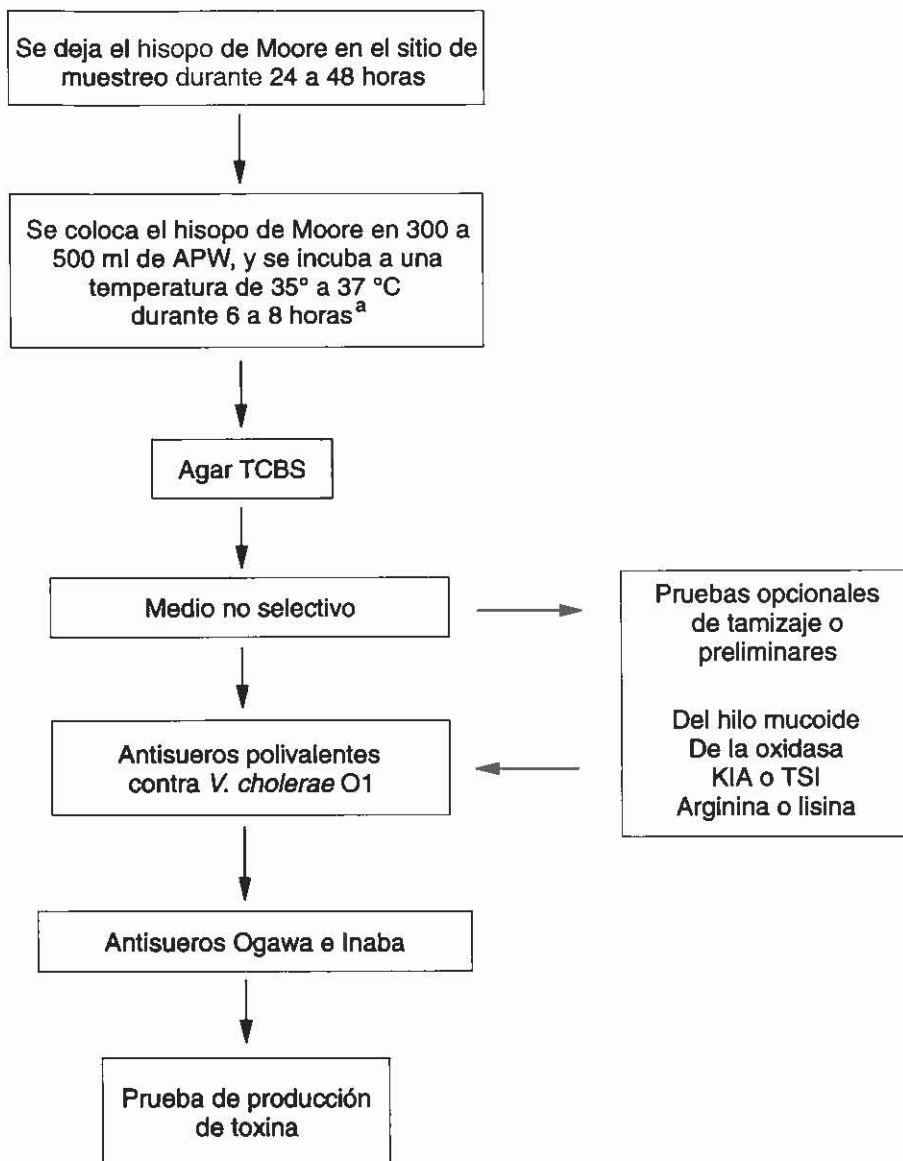


Figura V-1. Técnica del hisopo de Moore para obtener muestras de aguas residuales o agua, a fin de aislar *V. cholerae*.

^aSi al cabo de 6 a 8 horas de incubación el agua peptonada alcalina (APW) no se puede sembrar mediante estriación, se resiembr a las 18 horas en otro tubo de APW, se incuba durante 6 a 8 horas y se siembra por estriación en agar TCBS.

Material (para 10 muestras)

- 10 hisopos de Moore
- 100 m de hilo de pescar de nylon (resistencia tensil de 11,35 kg o mayor)
- 1 nevera portátil con aislamiento ("cooler") y bolsas de material refrigerante congeladas para el transporte
- 10 recipientes adecuados de cierre hermético (de 500 a 1.000 ml)
- 10 pares de guantes de látex
- 3 a 5 litros de agua peptonada alcalina (véase la fórmula de esta en el Capítulo XI).

Montaje de los hisopos de Moore

Los hisopos de Moore se elaboran cortando tiras de gasa de algodón de 120 cm de largo por 15 cm de ancho; la gasa se dobla o se enrolla varias veces a lo largo y se ata firmemente el centro con hilo de pescar. Es optativo envolver los hisopos en papel grueso y esterilizarlos en el autoclave antes de usarlos (Figura V-2).

Colocación de los hisopos de Moore

Para que la vigilancia sea eficaz, se colocan los hisopos de Moore en las principales cañerías de entrada de la planta de aguas residuales o de otros

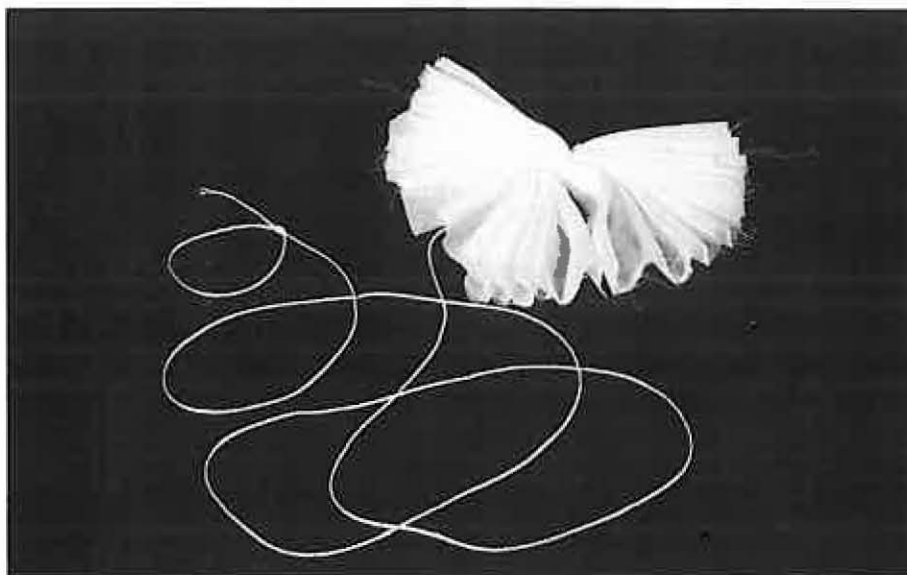


Figura V-2. El hisopo de Moore es un dispositivo sencillo para muestrear aguas residuales y agua contaminada con *V. cholerae*.

puntos centrales del sistema. Se valora cuidadosamente el sitio de colocación del hisopo para evitar las condiciones que puedan impedir la recuperación de microorganismos de *V. cholerae*. La colocación debe ser corriente arriba de cualquier vertedero de desechos sépticos o de aguas residuales recicladas parcialmente tratadas, para evitar la posible contaminación con desechos tóxicos. Se suspende el hisopo en las aguas residuales que van a someterse a prueba. En el caso de las cañerías de entrada accesibles solo por un pozo de inspección, se ata al extremo del hilo un trozo de alambre para evitar que el hilo se corte al colocar la tapa del pozo. El hisopo debe dejarse colocado durante 24 a 48 horas.

Recogida de las muestras

Se recomienda usar guantes de látex y cambiarlos entre las tomas de las muestras para evitar la contaminación cruzada. Cuando los hisopos de Moore, incluido el hilo que los sostiene, se retiran del sitio de muestreo, deben colocarse en recipientes de cierre hermético y tamaño adecuado. Se rotulan los recipientes anotando el nombre del sitio de la toma y la fecha. Las muestras se transportan lo antes posible al laboratorio en una caja de hielo (cooler) con bolsas de material refrigerante congeladas para evitar el probable sobrecalentamiento (véase la sección A del presente capítulo, donde se dan las instrucciones para el transporte de muestras). Si se prevé que vayan a transcurrir más de 3 horas entre la recogida de los hisopos y la llegada al laboratorio, los hisopos se colocan en agua peptonada alcalina antes de transportarlos, para asegurar así la recuperación óptima de *V. cholerae*. Al llegar al laboratorio se agregará inmediatamente agua peptonada alcalina (300 a 500 ml) a las muestras, si es que esto no se hizo en el sitio de recogida. El hisopo de Moore y la muestra de agua que lleva impregnada deben constituir cerca de 10% a 20% del volumen total de la muestra a la que se agrega agua peptonada alcalina, con el objetivo de obtener la relación óptima de la muestra con el caldo de enriquecimiento para lograr la recuperación. Se incuban las muestras a una temperatura de 35 ° a 37 °C durante 6 a 8 horas antes de sembrarse en placas, como se describe en la sección F del presente capítulo.

D. Aislamiento de *V. cholerae* a partir de muestras de agua

Todas las muestras de agua se recogerán en recipientes estériles y se transportarán refrigeradas al laboratorio (véase la sección A de este capítulo) para evitar el calentamiento. Por lo general, cuanto más grande es la muestra de agua, mayores son las probabilidades de aislar *V. cholerae*. Otra forma de mejorar las probabilidades de aislamiento consiste en recoger y procesar muchas muestras. La selección del método de aislamiento dependerá del tipo de muestra de agua que se va a cultivar, y de la salinidad de la fuente de agua, que será el factor decisivo. Por ejemplo, el agua de lastre de un barco, una fuente demostrada de *V. cholerae*, debe cultivarse por el mismo método que el agua de mar.

1. Técnica de cultivo directo

Se agregan 450 ml de agua a 50 ml de agua peptonada alcalina concentrada 10×. Un método alternativo consiste en hacer una dilución de 10^{-1} de la muestra en agua peptonada alcalina 1× (por ejemplo, 10 ml de agua en 90 ml de agua peptonada alcalina). El último método es particularmente útil para las muestras muy contaminadas. Si se cultivan muestras de agua de estuario o de mar, se deben hacer dos diluciones (decimal) adicionales en agua peptonada alcalina para obtener diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} . Se pueden hacer diluciones adicionales hasta 10^{-6} si se desea enumerarlas (véase más adelante la técnica del número más probable). Se incuban todas las diluciones a una temperatura de 35° a 37 °C y se siembran al cabo de 6 a 8 horas como se describe en la sección F de este capítulo. Si los recursos del laboratorio lo permiten, se prepara un duplicado de las diluciones para incubarlos a 42 °C. Cuando se cultivan muestras de agua dulce, quizá no sean necesarias las diluciones ulteriores ni la incubación a 42 °C para favorecer el aislamiento, ya que el número de microorganismos competidores (en particular *Vibrio* spp.) tal vez sea considerablemente menor que en las aguas marinas o de estuario.

2. Técnica del filtro de membrana

La técnica del filtro de membrana es más apropiada para el agua clara que no contiene detritus ni cieno. Si se utiliza para agua turbia, puede necesitarse un agente clarificante, filtro o prefiltro para eliminar partículas suspendidas. Se filtran 100 a 300 ml de la muestra de agua (o una cantidad mayor si es posible) a través de un filtro de membrana de 0,22 a 0,45 μm (Millipore). Se coloca el filtro en 100 ml de agua peptonada alcalina en un matraz. Se incuba a una temperatura de 35° a 37 °C por 6 a 8 horas y se siembra en agar TCBS. Si lo permiten los recursos del laboratorio, se prepara una muestra duplicada para incubarla a 42 °C. De manera alternativa, el filtro puede colocarse directamente en la superficie de una placa de agar no selectivo (por ejemplo, T₁N₁, HIA), incubarse por 3 horas a una temperatura de 35° a 37 °C, transferirse a una placa de agar de TCBS y, por último, incubarse durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35° a 37 °C. Si se cultivan muestras de aguas marinas o de estuario, hay que filtrar muestras de agua más pequeñas o diluirlas adecuadamente colocando los filtros en volúmenes mayores de agua peptonada alcalina.

3. Hisopo de Moore

Se puede utilizar el hisopo de Moore para el muestreo de agua y de aguas residuales, pero solo es ventajoso para usarse en ríos y fuentes de agua corriente; no ofrece ventaja alguna sobre otros métodos de muestreo de fuentes de agua estacionaria. Como se hace con las aguas residuales, el hisopo de Moore debe dejarse en el sitio de muestreo durante 24 a 48 horas. (Véase la sección C de este capítulo, donde se dan instrucciones para el montaje, la recogida de la muestra y el examen del hisopo de Moore.)

4. Trampa de Spira

En el método de muestreo con la trampa de Spira el agua se filtra a través de una gasa de algodón. La gasa se coloca en un frasco grande de plástico (por ejemplo, un frasco de medio de cultivo microbiológico de 500 g u otro recipiente equivalente) con un orificio de 2 cm de diámetro en el fondo (Figura V-3). El tamaño del orificio en el fondo del frasco es importante; si es demasiado grande, el flujo del agua expulsará la gasa, y si es muy pequeño el agua pasará muy lentamente. La gasa de 30 cm de ancho se empaca en el frasco doblándola en capas, de tal manera que cuando se vierta agua por la boca del frasco atraviese la gasa y salga por el orificio de 2 cm en el fondo. Para evitar que el agua se desvíe alrededor de la gasa en lugar de filtrarse, esta debe plegarse adecuadamente en capas. Se usará suficiente gasa (aproximadamente de 120 a 180 cm) para formar una paca firme pero todavía compresible que ocupe cerca de las dos terceras partes del volumen del frasco. La esterilización de las trampas de Spira es optativa; si se esterilizan, se envuelve cada frasco en papel de estaño o de estraza y se esteriliza en el autoclave. Por la boca del frasco se vierte el agua que se va a muestrear y se deja escurrir por el fondo. El trozo de gasa se retira observando las normas de la asepsia, y se coloca en un matraz o frasco que contenga 100 ml de agua peptonada alcalina 10×. Se agrega suficiente agua de la fuente para obtener un volumen final de 1 litro. Se incuba a una temperatura de 35° a 37 °C durante 6 a 8 horas, y se siembra en agar TCBS.



Figura V-3. La trampa de Spira se utiliza para filtrar grandes volúmenes de agua a través de una gasa de algodón, a fin de aislar *V. cholerae*.

5. Técnica del número más probable

El método del número más probable utiliza una serie de diluciones múltiples hasta que no haya crecimiento para calcular la cantidad de microbios. Es útil en situaciones donde la densidad de microorganismos es sumamente baja y en donde los posibles competidores complican otros métodos de enumeración. Este método, al establecer un gradiente de concentraciones de *V. cholerae*, se puede utilizar para localizar la fuente de contaminación. La estimación de la cantidad de microorganismos *V. cholerae* en el agua se puede hacer por el procedimiento del número más probable, que consiste en una serie de replicación de 3 a 5 tubos y tres diluciones que utiliza el enriquecimiento en agua peptonada alcalina seguido de inoculación en agar TCBS. Sin embargo, si el agua que se muestrea está muy contaminada con aguas residuales, para alcanzar un punto final puede ser necesario diluir hasta 10^{-6} . Si lo permiten los recursos del laboratorio, se prepara un lote de diluciones por duplicado para incubarlos a 42 °C. En la obra *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, publicada por la Asociación Estadounidense de Salud Pública, se describen los procedimientos para el método del número más probable.

E. Aislamiento de *V. cholerae* a partir de muestras de alimentos, sedimentos y otras muestras ambientales

Además del agua, los alimentos contaminados pueden servir como vehículo para la transmisión del cólera. Los alimentos que por lo general se asocian con transmisión del cólera son los pescados y mariscos (particularmente moluscos y crustáceos obtenidos de aguas contaminadas), leche, arroz cocido, lentejas, papas, frijoles, huevos, pollo y hortalizas. Frecuentemente, ostras y peces recién capturados se cultivan como muestras centinela para fines de vigilancia epidemiológica. Es probable que los intestinos y, en menor grado, la piel de los peces recién pescados, contengan más bacilos del cólera que el tejido muscular, pero la carne del pescado que se descama y limpia en el mercado puede dar un cultivo positivo debido a la contaminación cruzada durante el proceso de limpieza y el almacenamiento en hielo.

Para vigilar la incidencia y las características ecológicas de *V. cholerae* O1 en diversos ecosistemas y la importancia de estos como reservorios en la transmisión del cólera, se pueden estudiar sedimentos, plantas acuáticas y plancton, así como otras muestras ambientales.

1. Preparación de las muestras de alimentos, sedimentos y otras muestras ambientales

Las muestras deben mantenerse en refrigeración (4 °C) hasta que se cultiven (véase la sección A en este capítulo). Observando las normas de la asepsia, se pesa una muestra de alimento de 25 g en un vaso de licuadora o en una bolsa separadora de bacterias ("stomacher bag") (véase la Figura V-4). Se cortan las muestras grandes en pedazos pequeños antes de tritu-

Exámenes de alimentos y de muestras ambientales

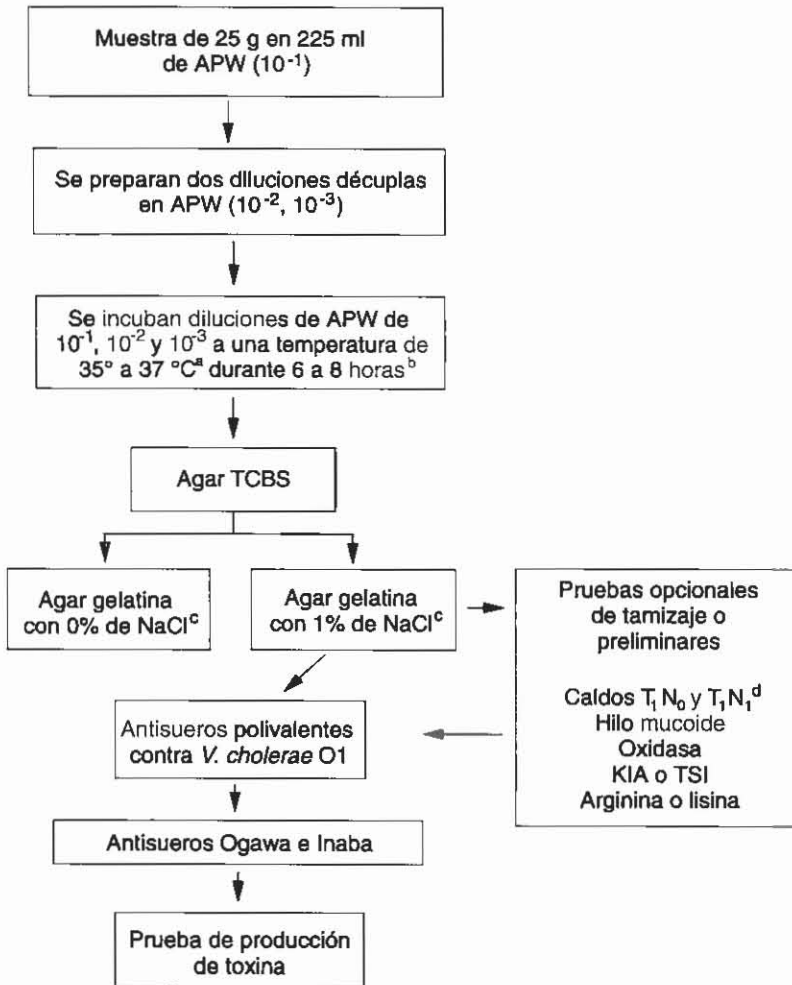


Figura V-4. Procedimiento para aislar *V. cholerae* a partir de alimentos o muestras ambientales.

^aSe pueden preparar diluciones por duplicado en agua peptonada alcalina e incubarse a 42 °C.

^bSi al cabo de 6 a 8 horas de incubación el APW no se puede sembrar por estríación, se subcultiva a las 18 horas en otro tubo de agua de APW, se incuba durante 6 a 8 horas y entonces se siembra por estrías en agar TCBS.

^cSe pueden utilizar los medios de agar T₁N₀ y T₁N₁ como alternativa del agar gelatina con NaCl al 0% y 1%.

^dColonias aisladas en agar TCBS pueden subcultivarse en un medio no selectivo para llevar a cabo pruebas de crecimiento en NaCl al 0% y 1% (por ejemplo, agar gelatina con 1% de NaCl, agar T₁N₀, o agar de infusión de corazón) y después en caldos T₁N₀ y T₁N₁.

rarse. Se agrega una pequeña cantidad de agua peptonada alcalina al recipiente y se trituran por completo. Acto seguido, se agrega más agua peptonada alcalina para obtener una cantidad total de 225 ml (dilución 10^{-1}). En el caso de sedimentos y otras muestras ambientales que no requieren triturarse, se pesa una muestra de 25 g y se coloca en 225 ml de agua peptonada alcalina (dilución 10^{-1}). Si los recursos lo permiten, se preparan muestras por duplicado (para incubación a una temperatura de 35° a 37 °C y también a 42 °C). Se preparan dos diluciones décuplas (10^{-2} y 10^{-3}) en agua peptonada alcalina de las muestras de alimento molido, de plancton o sedimento. Si se preparan muestras por duplicado, ambas deben diluirse. Se pueden hacer las diluciones de 10^{-6} si se desea hacer el recuento de *V. cholerae*. Para mayor información, consúltese el *Bacteriological Analytical Manual* (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos).

2. Preparación de muestras de ostras

Para hacer cultivos a partir de ostras, se retira y combina la carne de 10 a 12 de estos moluscos, incluyendo el líquido de la concha. Se licua todo para mezclarlo muy bien. Se agregan 25 g de esta mezcla a 225 ml de agua peptonada alcalina (dilución de 10^{-1}). Se preparan dos diluciones décuplas (10^{-2} y 10^{-3}) de las ostras en agua peptonada alcalina. Al prepararse muestras por duplicado, ambas deben diluirse. Debido a que ciertos componentes de la carne de la ostra son tóxicos para *V. cholerae* O1, se procesan solo pocas ostras en cada ocasión y se diluyen las muestras tan pronto como sea posible. Ello permite diluir los microorganismos competidores así como los efectos bactericidas de la carne de ostra sobre *V. cholerae*. Un conjunto de diluciones por duplicado incubadas a 42 °C mejora mucho las probabilidades de aislar *V. cholerae*; por ello se recomienda enfáticamente cuando se cultivan ostras, incluso más que con otros tipos de muestras de alimento.

F. Incubación en agua peptonada alcalina

Se incuba el agua peptonada alcalina (con las tapas de todos los frascos y tubos de dilución poco apretadas) a una temperatura de 35° a 37 °C durante 6 a 8 horas. Si se preparan diluciones por duplicado, el segundo juego de frascos y diluciones se incuba a 42 °C durante 6 a 8 horas. Después de la incubación, se siembra en agar TCBS mediante estriación utilizando una asa grande o dos más pequeñas de la porción superior del caldo, incluida la superficie, puesto que los vibriones migran preferentemente a esta zona. No se agite ni se mezcle el tubo antes de resembrar. Si después de 6 a 8 horas de incubación el agua peptonada alcalina no se puede subcultivar, a las 18 horas se resiembra en otro tubo de agua peptonada alcalina. Este segundo tubo se subcultivará en agar TCBS después de 6 a 8 horas de incubación. Las placas de TCBS se incuban durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35° a 37 °C.

En algunas circunstancias puede ser conveniente incubar agua peptonada alcalina durante 18 horas. En caso de alimentos y ostras congelados, se incuba el homogeneizado en agua peptonada alcalina durante 6 a 8 horas, y se resiembró en agar TCBS. El homogeneizado original se reincuba por un total de 18 horas, y se resiembran las muestras en agar TCBS.

G. Aislamiento e identificación presuntiva

Con frecuencia, cuando se cultivan muestras de un ambiente marino o estuarino, deben utilizarse métodos especiales para seleccionar las numerosas especies diferentes de *Vibrio* que crecen bien en agua peptonada alcalina y en agar TCBS. No existe un procedimiento de selección de *V. cholerae* O1 que sea ideal para cada laboratorio y cada muestra. El laboratorista debe seleccionar el método óptimo con base en los recursos disponibles (por ejemplo, la disponibilidad de antisueros), los microorganismos competidores presentes en el ambiente que se está muestreando y la capacidad del medio selectivo en placa para inhibir su crecimiento. A continuación se describe un procedimiento eficaz que utiliza un medio sin sal además de pruebas bioquímicas de selección y pruebas serológicas.

1. Medios sin sal

La mayor parte de las especies de *Vibrio* diferentes de *V. cholerae* que se encuentran frecuentemente en muestras de aguas marinas o de estuario son halófilas o por lo menos requieren una cantidad mínima de sal en los medios de cultivo. Por esta razón, la capacidad de *V. cholerae* para crecer en medios de cultivo sin sal puede ser una característica selectiva útil.

Se pueden seleccionar tres o más colonias de *V. cholerae* sospechosas cultivadas previamente en TCBS y proceder a subcultivarlas en dos placas de agar gelatina (una con 0% de NaCl y otra con 1% de NaCl) (Figura V-4). Véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones especiales para la preparación del agar gelatina. Si la reacción de gelatinasa no ofrece ninguna ventaja en el proceso de selección, se utilizan el agar T₁N₀ (1% de triptona y 0% de NaCl) y el agar T₁N₁ (1% de triptona y 1% de NaCl). Las placas se inoculan por lo menos con 8 colonias, dividiéndolas en 8 secciones. El inóculo se siembra en línea recta en la mitad de cada sector; se inocula primero la placa de gelatina sin sal, puesto que *V. cholerae* no crece bien sin sal y quizá haga falta un inóculo más grande para ese medio.

Debido a que *Vibrio*. spp halófilo crece solamente en el medio con 1% de NaCl, se seleccionan los aislamientos que crecen tanto en el medio con 0% de NaCl como en el medio con 1% de NaCl. La reacción de gelatinasa (para *V. cholerae* es positiva) puede observarse si se sostiene la placa por encima de una superficie negra o contra la luz, para apreciar el efecto de halo alrededor de las colonias que son gelatinasa positivas. La refrigeración de la placa de agar gelatina por 15 a 30 minutos realza el efecto de halo y

facilita su observación (véase en el Capítulo IV, "Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de muestras fecales", la descripción del agar gelatina). Las colonias obtenidas del medio de agar con 1% de NaCl se pueden probar directamente con antisuero polivalente contra *V. cholerae* O1, o seleccionarse mediante la prueba de la oxidasa y del hilo mucoide, antes de las pruebas bioquímicas posteriores.

Un procedimiento alternativo consistiría en tomar colonias sospechosas de *V. cholerae* cultivadas previamente en agar TCBS y sembrarlas en un medio no selectivo (por ejemplo, agar gelatina con 1% de NaCl, agar T₁N₁, agar de infusión de corazón). Se pueden utilizar medios en placa o en tubo. Las colonias obtenidas en este medio pueden inocularse entonces en caldo T₁N₀ y T₁N₁ para probar si se produce crecimiento en ausencia de sal, antes de proceder a efectuar otras pruebas.

2. Pruebas bioquímicas de selección

Las pruebas de serología en lámina son suficientes para la identificación preliminar de *V. cholerae* O1. No obstante, puede resultar conveniente practicar pruebas bioquímicas antes de utilizar los antisueros contra *V. cholerae* O1 si el agar TCBS utilizado para el aislamiento no es suficientemente selectivo para inhibir competidores como *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*; si dichos competidores son especialmente abundantes en el ambiente muestreado; o si las existencias de antisueros son limitadas. Las pruebas comprobadas como útiles para excluir microorganismos diferentes de *V. cholerae* son las de la arginina (o agar inclinado de glucosa y arginina), lisina (o agar hierro lisina), hilo mucoide, oxidasa y agar hierro de Kligler (KIA) o agar hierro de tres azúcares (TSI) (véase el Cuadro IV-2 en el Capítulo IV, "Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de muestras fecales"). Las pruebas bioquímicas se deben elegir de acuerdo con su capacidad para descartar el máximo número de competidores, y variarán según los diferentes tipos de muestras. No es necesario utilizar dos reacciones bioquímicas que descarten al mismo microorganismo. Por ejemplo, si se utiliza la prueba de la arginina, no representa ventaja alguna practicar también la de la lisina debido a que por lo general descartan los mismos microorganismos.

Las pruebas del hilo mucoide y de la oxidasa se pueden llevar a cabo en un cultivo recién obtenido de una placa de agar gelatina con 1% de NaCl (medio de T₁N₁ u otro no selectivo) y se obtiene información de inmediato. La prueba del hilo mucoide es útil para descartar las especies diferentes de *Vibrio*, particularmente *Aeromonas*. La arginina y la lisina se pueden utilizar para descartar *Aeromonas* y ciertas especies de *Vibrio*. La arginina suele ser más útil que la lisina, pero la lisina puede utilizarse si no se dispone de arginina. Los medios KIA o TSI excluirán *Pseudomonas* y ciertas especies de *Enterobacteriaceae*. La oxidasa se puede utilizar para descartar microorganismos diferentes de *Vibrio*, particularmente los de la familia *En-*

terobacteriaceae. (Véase en el Capítulo VI, "Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio", la descripción de estas pruebas).

Las tapas de todos los tubos de las reacciones bioquímicas deben mantenerse flojas antes de la incubación. Esto es particularmente importante para los tubos de KIA o TSI con plano inclinado, puesto que si las tapas están demasiado apretadas y existen condiciones anaerobias, pueden no presentarse las reacciones características de *V. cholerae*.

3. Aglutinación en lámina

Los aislamientos de *V. cholerae* sospechosos deben someterse a prueba mediante aglutinación en lámina con antisuero polivalente contra *V. cholerae* O1. Los aislamientos que aglutinen con el antisuero polivalente se notificarán como *V. cholerae* O1 presuntivo, pero habrán de confirmarse mediante aglutinación con antisueros monovalentes Ogawa e Inaba. Debido a que *V. cholerae* O1 no toxigénico se encuentra con frecuencia en muestras ambientales (particularmente marinas y de estuario), una vez confirmada su identificación, todos los aislamientos de *V. cholerae* O1 procedentes de muestras ambientales o de alimentos deben estudiarse para determinar si producen toxina del cólera. Los aislamientos que se confirmen serológicamente como *V. cholerae* O1 pueden caracterizarse aún más mediante pruebas de hemólisis, identificación bioquímica, sensibilidad a los antimicrobianos, biotipo o subtipo molecular. (Veáse el Capítulo VI, "Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio", en el que se describen los métodos para realizar las pruebas serológicas, bioquímicas, de biotipificación, de hemólisis y de sensibilidad. En el Capítulo VII se explican los métodos para detectar la producción de la toxina del cólera.)

Bibliografía

American Public Health Association, American Water Works Association, and the Water Pollution Control Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1989.

Barrett TJ, Blake PA, Morris GK, Puhr ND, Bradford HB, Wells JG. Use of Moore swabs for isolating *V. cholerae* from sewage. *J Clin Microbiol* 1980;11: 385-388.

Spira WM, Ahmed QS. Gauze filtration and enrichment procedures for recovery of *Vibrio cholerae* from contaminated waters. *Appl Environ Microbiol* 1981;42: 730-733.

U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 7th ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1992.