

3

# Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*

**CDC/NCID**  
CENTROS PARA EL CONTROL  
Y LA PREVENCIÓN DE  
ENFERMEDADES      CENTRO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES INFECCIOSAS

**OPS**    
ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD  
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la  
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

Este manual fue preparado por el Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, Estados Unidos de América, en cooperación con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Washington, D.C., Estados Unidos de América, en 1994.

Dr. David Satcher, Director, CDC

Dr. James M. Hughes, Director, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (NCID)

Dr. Mitchell L. Cohen, Director, División de Enfermedades Bacterianas y Micóticas, NCID

Dr. Carlyle Guerra de Macedo, Director, OPS, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud para las Américas

Dr. David Brandling-Bennett, Director, División de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles, OPS

Dr. José María Paganini, Director, División de Sistemas y Servicios de Salud, OPS

Dr. Virgilio Escutia, Asesor Regional en Servicios de Laboratorio, OPS

### ***Producción***

Sección de Publicaciones, Oficina de Recursos de Programas, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas, CDC

Polyxeni M. Potter, Lynne McIntyre, Beverly Holland

### ***Edición en español***

Programa Especial de Publicaciones, OPS

María Esmeralda Gramuglio de Gómez, Rita M. Shelton, Flor de María Rojas

### **Fotos**

James D. Gathany

# Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*

**CDC/NCID**

CENTROS PARA EL CONTROL  
Y LA PREVENCIÓN DE  
ENFERMEDADES

CENTRO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES INFECCIOSAS

**OPS**



ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD  
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la  
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

## Contenido

|  |           |
|--|-----------|
| Introducción   | vii       |
| Nota de agradecimiento   | ix        |
| Nota de los autores— <i>Vibrio cholerae</i> O139 toxigénico, un agente causal recientemente reconocido de cólera | xi        |
| Prefacio   | xv        |
| <b>I. Etiología y epidemiología del cólera</b>   | <b>1</b>  |
| A. Antecedentes históricos: cólera pandémico   | 2         |
| B. Focos ambientales   | 4         |
| C. Manifestaciones clínicas  | 4         |
| D. Tratamiento   | 4         |
| E. Epidemiología   | 6         |
| F. Vigilancia epidemiológica   | 7         |
| G. Vacuna contra el cólera   | 8         |
| H. Estrategias de prevención   | 8         |
| <b>II. La función del laboratorio de salud pública</b>   | <b>11</b> |
| A. Consideraciones generales   | 11        |
| B. Cuándo se reconoce la amenaza de epidemia de cólera   | 11        |
| C. Qué hacer durante un brote epidémico de cólera  | 13        |
| D. Definición de la duración de la epidemia  | 14        |
| E. Problemas especiales  | 15        |
| F. Resumen   | 15        |
| <b>III. Obtención y transporte de las muestras de pacientes</b>  | <b>17</b> |
| A. Obtención de las muestras   | 17        |
| B. Medios microbiológicos de transporte  | 19        |
| C. Muestras directas sin conservador   | 20        |
| D. Transporte de las muestras  | 21        |
| <b>IV. Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> a partir de muestras fecales</b>                                    | <b>23</b> |
| A. Enriquecimiento en agua peptonada alcalina  | 23        |
| B. Medios selectivos en placa  | 23        |
| C. Medios no selectivos en placa   | 26        |
| D. Aislamiento e identificación presuntiva   | 28        |
| E. Métodos de diagnóstico rápido   | 32        |

## Contenido

|   |            |
|---|------------|
| <b>V. Exámenes de alimentos y de muestras ambientales</b>   | <b>37</b>  |
| A. Transporte de las muestras   | 37         |
| B. Selección de los métodos de aislamiento para las muestras ambientales  | 38         |
| C. Aislamiento de <i>V. cholerae</i> a partir de aguas residuales   | 38         |
| D. Aislamiento de <i>V. cholerae</i> a partir de muestras de agua   | 41         |
| E. Aislamiento de <i>V. cholerae</i> a partir de muestras de alimentos, sedimentos y otras muestras ambientales       | 44         |
| F. Incubación en agua peptonada alcalina  | 46         |
| G. Aislamiento e identificación presuntiva  | 47         |
| <b>VI. Identificación de <i>Vibrio cholerae</i> en el laboratorio</b>   | <b>51</b>  |
| A. Identificación serológica de <i>V. cholerae</i> O1   | 51         |
| B. Identificación bioquímica de <i>V. cholerae</i>  | 55         |
| C. Pruebas de hemólisis   | 62         |
| D. Pruebas para determinar los biotipos de <i>V. cholerae</i> O1  | 65         |
| E. Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (método de difusión de disco en agar)                                 | 69         |
| <b>VII. Detección de la toxina del cólera</b>   | <b>73</b>  |
| A. Modo de acción de la toxina del cólera   | 73         |
| B. Indicaciones para la prueba de producción de la toxina del cólera  | 73         |
| C. Resumen histórico de los métodos de valoración de la toxina del cólera   | 74         |
| D. Producción de la toxina del cólera para las pruebas de laboratorio   | 79         |
| E. Ensayo Y-1 para la toxina del cólera   | 80         |
| F. Ensayo G <sub>M1</sub> -ELISA para la toxina del cólera  | 83         |
| G. Prueba de aglutinación de látex para la toxina del cólera  | 90         |
| H. Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera   | 92         |
| I. Sondas de DNA para los genes de la toxina del cólera   | 97         |
| <b>VIII. Detección de anticuerpos contra <i>Vibrio cholerae</i> O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes</b> | <b>105</b> |
| A. La prueba vibriocida   | 105        |
| B. La prueba ELISA para la antitoxina del cólera  | 112        |
| C. Interpretación de los resultados de las pruebas serológicas  | 115        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>IX. Subtipificación molecular de <i>Vibrio cholerae</i> O1</b>                | <b>119</b> |
| A. Perfiles de plásmidos   | 119        |
| B. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción                  | 120        |
| C. Análisis de enzimas de loci múltiples   | 120        |
| D. Determinación de la secuencia del DNA   | 121        |
| <b>X. Antiseros para la tipificación serológica de <i>Vibrio cholerae</i> O1</b> | <b>123</b> |
| A. Consideraciones generales   | 123        |
| B. Preparación de antiseros  | 124        |
| C. Control de calidad de los antiseros   | 125        |
| <b>XI. Preparación de medios de cultivo y reactivos</b>                          | <b>127</b> |
| A. Almacenamiento de los medios de cultivo                                       | 127        |
| B. Control de calidad  | 127        |
| C. Fórmulas de los medios de cultivo   | 130        |
| D. Preparación de reactivos  | 137        |
| <b>XII. Almacenamiento y envío de los aislamientos</b>                           | <b>141</b> |
| A. Almacenamiento de los aislamientos  | 141        |
| B. Transporte y envío de cultivos y muestras                                     | 143        |
| <b>XIII. Aspectos de seguridad en el laboratorio</b>                             | <b>147</b> |

## Introducción

El cólera constituye una nueva y emergente preocupación para la salud pública en muchas partes del mundo. La aparición de la epidemia de cólera en América Latina y el surgimiento en Asia de una enfermedad causada por *Vibrio cholerae* O139, la nueva cepa que se ha identificado, indica que el cólera seguirá siendo un problema en los próximos años. Para hacer frente a ese desafío con medidas efectivas de prevención y control del cólera será preciso aplicar técnicas microbiológicas confiables.

El presente manual resume una serie de técnicas de laboratorio empleadas en el diagnóstico del cólera; constituirá una obra de consulta para el personal de laboratorio que establece técnicas de diagnóstico o de vigilancia epidemiológica en relación con *Vibrio cholerae*. Los procedimientos descritos no son nuevos; en su mayor parte se han venido usando por varios años. Aunque para realizarlos hay que contar con una amplia gama de medios de laboratorio, estos procedimientos se seleccionaron sobre la base de la utilidad, la facilidad de ejecución y la capacidad de dar resultados reproducibles. También se tuvo en cuenta la diversidad de los medios de que dispone el laboratorio y su acceso a los materiales y suministros necesarios. Se han dejado fuera, a propósito, los métodos de carácter experimental u orientados hacia la investigación.

## **Nota de agradecimiento**

El financiamiento para la preparación de este manual fue proporcionado por la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, mediante la subvención PASA LAC-0657-X-HC-1030-00.

Se reconocen cumplidamente las valiosas aportaciones para la confección de esta obra hechas por las siguientes personas:

### ***Coordinadores***

Cheryl A. Bopp, Bradford A. Kay, Joy G. Wells, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas, CDC.

### ***Colaboradores***

Carolyn N. Baker, Timothy J. Barrett, Paul A. Blake, Frances W. Brenner, Lois E. Britt, Daniel N. Cameron, J. J. Farmer, III, John C. Feeley, Patricia I. Fields, James H. Green, Katherine D. Greene, Fay B. Hendricks, Tanja Popovic, Nancy D. Puhr, Nancy A. Strockbine, Robert V. Tauxe, Fred C. Tenover, Jessica Tuttle, I. Kaye Wachsmuth, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas; Theo M. Hawkins, Oficina del Programa de Ejercicio Profesional de la Salud Pública, CDC.

Edwin F. Archbold Sanjur, Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C., Estados Unidos; Elizabeth Castañeda del Gordo, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia; José Ramiro Cruz, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Ciudad de Guatemala, Guatemala; Alfredo Dávila Araujo, Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical, Guayaquil, Ecuador; Angelo DePaola, Jr., Administración de Alimentos y Medicamentos, Dauphin Island, Alabama, Estados Unidos; Elisa L. Elliot, Administración de Alimentos y Medicamentos, Washington, D.C., Estados Unidos; Virgilio Escutia, Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C., Estados Unidos; Silvia Giono Cerezo, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), México, D.F., México; Walter E. Hill, Administración de Alimentos y Medicamentos, Bothell, Washington, Estados Unidos; Anwarul Huq, Universidad de Maryland, College Park, Maryland, Estados Unidos; Charles A. Kaysner, Administración de Alimentos y Medicamentos, Bothell, Washington, Estados Unidos; Miguel Kourany, Ministerio de Salud, Ciudad de Panamá, Panamá; Nathaniel F. Pierce, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza; R. Bradley Sack, Centro Internacional de Investigaciones sobre las Enfermedades Diarreicas, Dacca, Bangladesh; Elsa Sofía Toro Araujo, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela.

## *Agradecimiento*

### ***Grupo Consultivo Internacional***

Gladys Estacio Addimandi, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela; Norma Binsztein, Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina; Erika Hannover Habetswallner, Instituto Nacional de Salud, La Paz, Bolivia; Kinue Irino, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil; María Amelia Flores González, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Ciudad de Guatemala, Guatemala; Miguel Francisco Torres Rubén, Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, Ciudad de Guatemala, Guatemala; Anna Patricia Vélez Moller, Universidad de San Carlos, Ciudad de Guatemala, Guatemala; Luis Rodrigo Mora Fonseca, Laboratorio de la Caja Costarricense de Seguridad Social, San José, Costa Rica; Zandra E. Fuentes Jiménez, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, San Salvador, El Salvador; Luis Eduardo Julio Villaverde, Laboratorio Central de Salud, Ciudad de Panamá, Panamá; Raúl Joaquín Monte Boada, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba; Wally Silva San Cristóbal, Instituto de Salud Pública, Santiago, Chile; Guadalupe Pérez Rueda, Instituto Nacional de Higiene, Quito, Ecuador; Carlos Carrillo Parodi, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú; Milagros Peralta, Instituto Dominicano de Tecnología Industrial, Santo Domingo, República Dominicana; Isabel González González, Laboratorio Central de Salud Pública, Montevideo, Uruguay; Zaida Josefina Carvajal Tesorero, Instituto Biomédico, Caracas, Venezuela; Coromoto Sandoval de Díaz, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Caracas, Venezuela; Yecenia López de Beauperthuy, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela.

## Nota de los autores

### ***Vibrio cholerae* O139 toxigénico, un agente causal recientemente reconocido de cólera**

Del total de más de 130 serogrupos de *Vibrio cholerae* que se habían notificado con anterioridad a 1992, solo el serogrupo O1 guardaba relación con el cólera epidémico y pandémico. Los miembros de los serogrupos denominados "distintos del O1" o no O1 se habían relacionado solo con infecciones extraintestinales y con casos esporádicos y brotes epidémicos limitados y ocasionales de enfermedad diarreica, de tal manera que no se les concedía mayor importancia en el campo de la salud pública.

Esta es la situación que se describe en el presente manual. A finales de 1992 y principios de 1993, cuando ya se había finalizado la redacción de la presente obra, se notificaron por primera vez brotes epidémicos grandes de cólera causados por *V. cholerae* distinto del serogrupo O1 tanto en la India como en Bangladesh. El agente causal de estos brotes se identificó como una cepa de *V. cholerae* perteneciente a un serogrupo recién descrito, el O139. Esta cepa producía toxina del cólera, pero no la enterotoxina termoestable a veces relacionada con cepas de *V. cholerae* distinto del O1. Según se informó, la mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* O139 eran resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol, estreptomycin, furazolidona y al agente vibriostático O/129.

Al momento de redactar esta nota, las características epidemiológicas del serogrupo O139 parecen ser semejantes a las del serogrupo O1. Aún resta por determinar la importancia del serogrupo O139 y su relación con el serogrupo O1, cosa que sin duda se hará en los próximos años. Las características de cultivo y bioquímicas del serogrupo O139 son idénticas a las de *V. cholerae* O1, así como a las de todos los otros serogrupos de *V. cholerae*. En consecuencia, mientras no surjan datos concretos que indiquen lo contrario, los procedimientos de aislamiento e identificación bioquímica que se describen en este manual para el serogrupo O1 deben aplicarse por igual al serogrupo O139, con la salvedad de que para la identificación de este último se necesita el antisuero específico correspondiente. Las pruebas de determinación del biotipo aplicables a *V. cholerae* O1 no son válidas para *V. cholerae* O139 ni para ningún aislamiento de serogrupo distinto del O1. Se está produciendo antisuero específico contra el O139, y es probable que se expanda en el comercio. A lo largo de la presente obra, por "distinto del O1" debe entenderse todos los serogrupos diferentes del O1, con excepción del serogrupo O139 recientemente descrito.

La aparición de este nuevo serogrupo de *V. cholerae* no modifica las circunstancias bajo las cuales el diagnóstico de laboratorio del cólera rinde su

máxima utilidad, ni las recomendaciones sobre cuándo deben practicarse los coprocultivos. Lo que sucede es que, desde el punto de vista de la salud pública, se torna más compleja la evaluación de los aislamientos de *V. cholerae* distinto del O1. Como las cepas distintas de la O1 (con excepción de la O139) son comunes en muchas partes del mundo, la manera de enfocar dicha evaluación depende de la frecuencia con que se prevea encontrar cepas O139. Esto significa que el mejor modo de proceder varía según el entorno, y habrá de modificarse si esta cepa persiste y se generaliza más. Así pues, recomendamos proceder de la manera que se explica a continuación.

**En las zonas donde no se ha sabido que ocurran infecciones por *V. cholerae* O139**

Desde el punto de vista de la salud pública, no es necesario que los aislamientos esporádicos de *V. cholerae* distinto del O1 se sometan a una caracterización mayor, a menos que exista un vínculo de carácter epidemiológico con una región del mundo comprobadamente afectada por el serogrupo O139 (al momento de redactar esta nota, la India y Bangladesh) o que el cuadro clínico sea típico del cólera grave, con deshidratación potencialmente mortal. Cuando esté indicado practicar la caracterización más a fondo, se debe incluir la aglutinación con el antisuero O139 y pruebas para determinar si hay producción de toxina del cólera.

Los aislamientos de *V. cholerae* distinto del O1 procedentes de brotes epidémicos (es decir, varios casos vinculados) de enfermedad semejante al cólera deben someterse a la prueba de aglutinación con el antisuero O139 y a la de producción de toxina del cólera. Las cepas que producen esta toxina pero no son del serogrupo O1 u O139 deberán enviarse a un laboratorio de referencia para la determinación del serogrupo.

**En las zonas donde comprobadamente ha habido infecciones por *V. cholerae* O139**

Los aislamientos esporádicos de *V. cholerae* distinto del O1 deben someterse a la prueba de aglutinación con el antisuero O139.

Los aislamientos de *V. cholerae* distinto del O1 provenientes de brotes de enfermedad semejante al cólera deben someterse a la aglutinación con el antisuero O139. Si los aislamientos no son del serogrupo O139, se procederá a efectuar las pruebas para detectar la producción de toxina del cólera. Las cepas que producen la toxina pero no son del serogrupo O1 u O139 se remitirán a un laboratorio de referencia para la determinación del serogrupo.

También recomendamos que la infección con *V. cholerae* O139 toxigénico se considere y notifique de la misma manera que la causada por *V. cholerae* O1 toxigénico. La enfermedad diarreica vinculada a la infección se denominará cólera, y se notificará como un caso de cólera a las autoridades de salud pública correspondientes.

---

## **Bibliografía**

Albert MJ, Siddique AK, Islam MS, *et al.* Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* 1993;341:704.

Bhattacharya MK, Bhattacharya SK, Garg S, *et al.* Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet* 1993;341:1346–1347.

Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, *et al.* Emergence of a novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* 1993;341:703–704.

Shimada T, Nair GB, Deb BC, Albert MJ, Sack RB, Takeda Y. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet* 1993;341:1347.

## Prefacio

Las enfermedades diarreicas han sido una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad en las Américas. En las regiones con menor desarrollo, el patrón epidemiológico endémico se ha caracterizado por las altas tasas de incidencia y de letalidad en niños menores de cinco años. Este grupo etáreo es afectado por una gran variedad de microorganismos, tales como los rotavirus, adenovirus tipos 40 y 41, astrovirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica, enteropatógena y enteroadherente, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* y *Cryptosporidium* sp. Asimismo, han existido epidemias de disentería asociada a *Shigella dysenteriae* tipo 1, que afectan a adultos y niños de igual manera. Por otro lado, los viajeros provenientes de zonas más desarrolladas y con mejor nivel de higiene, sufren de ataques de gastroenteritis y, en algunos casos, se han presentado brotes en turistas que viajan agrupados en el tiempo o en el espacio.

El escenario de las enfermedades diarreicas en la Región cambió dramáticamente en enero de 1991, cuando *Vibrio cholerae* fue identificado como el agente causal de la epidemia de gastroenteritis deshidratante que se presentó en la población del Perú. Hasta ese momento el cólera autóctono de las Américas se había diagnosticado únicamente en un número reducido de casos en el sur de los Estados Unidos de América; ahora está presente en toda la Región, con excepción de Uruguay y las islas del Caribe.

En general, los países de la Región no estaban preparados para el diagnóstico y el manejo de los casos de cólera. Hubo necesidad, entonces, de capacitar a personal médico, paramédico y de laboratorio para poder hacer frente a la epidemia, que al momento ha resultado en alrededor de un millón de casos con casi 1.000 defunciones.

Como parte del esfuerzo de preparación de personal, con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, se desarrollaron cursos nacionales y subregionales para capacitar a microbiólogos y técnicos en la metodología específica para el aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae*, así como para el examen serológico de pacientes. En cada una de estas actividades, con la valiosa colaboración de profesionales nacionales, se prepararon manuales específicos utilizados a nivel local. Posteriormente, se desarrolló un manual estandarizado de técnicas cuya versión en inglés estuvo disponible recientemente. Se hizo evidente que dicho manual debía ser traducido al español, para que su uso común por el personal de los laboratorios de la Región permita que su labor sea eficiente, eficaz y efectiva.

## *Prefacio*

El manual, resultado de un trabajo conjunto entre los CDC y la OPS, está diseñado para ser una obra de consulta para el personal responsable del diagnóstico y la vigilancia epidemiológica del cólera. Contiene la metodología básica y recomendada para la optimización de los recursos, preocupación de todos los Gobiernos Miembros.

Carlyle Guerra de Macedo  
Director

## I. Etiología y epidemiología del cólera

El cólera epidémico es causado por el serogrupo O1 de *Vibrio cholerae*, uno de los más de 130 serogrupos de este bacilo que se han identificado pero el único que guarda relación con el cólera epidémico o pandémico. En vista de que varía considerablemente el potencial patogénico de los aislamientos de *V. cholerae*, cobra capital importancia la distinción de laboratorio y epidemiológica entre los aislamientos de *V. cholerae* pertenecientes al serogrupo O1 y los diferentes del O1. Los aislamientos de *V. cholerae* distinto del O1 tienen la capacidad de causar enfermedad porque pueden poseer una variedad de factores de virulencia, incluida la producción de toxina del cólera. Sin embargo, no constituyen una amenaza para la salud pública como los del serogrupo O1. Los aislamientos de *V. cholerae* distinto del O1 deben notificarse de tal manera que se evite la confusión con bacilos del serogrupo O1. (En nota de los autores puede consultarse una descripción de *V. cholerae* O139.)

Dentro del serogrupo O1, la capacidad de producir toxina del cólera es un factor determinante principal de la virulencia. En general, los aislamientos de *V. cholerae* del serogrupo O1 que producen dicha toxina se consideran plenamente virulentos y capaces de causar cólera epidémico (Figura I-1). La mayoría de *V. cholerae* aislados durante los brotes de cólera pertenecen al serogrupo O1 toxigénico. Aun así, ciertos aislamientos de *V. cholerae* O1 no producen toxina del cólera y, por tanto, no pueden causar cólera epidémico. Cuando se encuentran estos aislamientos, su importancia debe juzgarse a la luz de las circunstancias clínicas y epidemiológicas. Es-

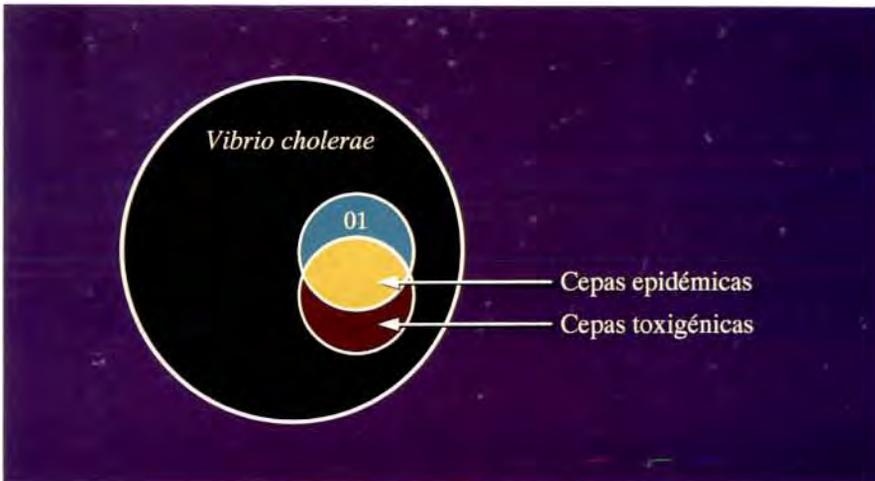


Figura I-1. De las cepas de *V. cholerae*, tradicionalmente solo los miembros toxigénicos del serogrupo O1 han tenido potencial epidémico e importancia como agentes causantes del cólera.

tos aislamientos, de manera análoga a los distintos del O1, pueden guardar relación con enfermedad diarreica esporádica.

Los aislamientos de *V. cholerae* O1 pueden dividirse en dos biotipos, El Tor y clásico, sobre la base de varias características fenotípicas (en el Capítulo VI, "Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio", se puede consultar la descripción de los métodos para determinar el biotipo). Las primeras seis pandemias de cólera que se produjeron fueron causadas por *V. cholerae* O1 perteneciente al biotipo clásico. La séptima pandemia fue la primera relacionada con el biotipo El Tor. Actualmente, el biotipo El Tor es el causante de prácticamente todos los casos de cólera en el mundo, y los aislamientos del biotipo clásico no se encuentran fuera de Bangladesh.

La determinación de biotipo no es necesaria para el control o tratamiento de los pacientes.

### **A. Antecedentes históricos: cólera pandémico**

Se cree que el cólera se originó en el delta del río Ganges, en la India. En el siglo XIX, verdaderas oleadas pandémicas se propagaron desde el sur de Asia a muchas partes del mundo siguiendo las rutas de comercio, peregrinación y migración. Durante esas pandemias, en toda Europa y el continente americano se produjeron grandes epidemias urbanas con elevadas tasas de mortalidad. En 1860, investigaciones efectuadas por John Snow y otros autores revelaron que los sistemas de abastecimiento de agua contaminados con aguas residuales eran la principal vía de transmisión. Gracias a este descubrimiento, mucho antes de que se identificara el agente causal, el temor al cólera epidémico recurrente dio lugar al movimiento de "reforma del saneamiento", que en el mundo industrializado desembocó en un extenso mejoramiento de los sistemas de agua potable y de los métodos de eliminación de aguas residuales.

En vista de que los barcos a menudo traían el cólera desde zonas afectadas, la vigilancia epidemiológica y la notificación de enfermedades cobraron importancia. La amenaza del cólera epidémico obligó a implantar la notificación sistemática de enfermedades y a crear departamentos de salud pública para investigar los casos presuntivos. En los años ochenta del siglo XIX, merced al empeño de los organismos de salud pública, ya era posible evitar la propagación epidémica cuando desembarcaban en puertos de América del Norte enfermos de cólera procedentes de países afectados por la quinta pandemia (1881-1896). Desde entonces, se atribuye al agua potable salubre y al tratamiento higiénico de las aguas residuales el haber protegido a muchas poblaciones del cólera epidémico y de otras enfermedades infecciosas. A mediados del siglo XX, el cólera había quedado limitado a unos cuantos países de Asia.

La distribución geográfica relativamente limitada del cólera en el decenio de 1950 se amplió mucho en los comienzos del decenio siguiente. En 1961, una epidemia de enormes proporciones tuvo como punto de partida el

Sudeste Asiático; ahora se sabe que ese fue el principio de la séptima pandemia. Esta pandemia, causada por el biotipo El Tor de *V. cholerae* O1 toxigénico, se propagó rápidamente por Asia meridional, Oriente Medio y sudeste de Europa, hasta llegar al África en 1970. En Europa ocurrieron varios brotes epidémicos a consecuencia de la contaminación de moluscos y crustáceos marinos comestibles o por el uso de agua sin tratar. Hasta 1991, las Américas estuvieron relativamente a salvo de la séptima pandemia (Figura I-2), aunque en muchos países industrializados ocurrían cada año unos cuantos casos importados.

En enero de 1991, el cólera epidémico apareció en varias ciudades costeras del Perú y pasó rápidamente a los países colindantes de América del Sur. A fines de 1991, el cólera se había propagado a 18 países de América Latina, y se registraron más de 391.000 casos y casi 3.900 defunciones. A principios de 1993, un solo país latinoamericano no había sido afectado. No hay pruebas de que el cólera vaya a desaparecer pronto de América Latina.



Figura I-2. La que actualmente se conoce como "la séptima pandemia de cólera" (verde) comenzó a propagarse rápidamente a partir de Indonesia en 1961, y a principios de los años setenta ya había alcanzado África y Europa. En enero de 1991 llegó al continente americano y se diseminó con rapidez por toda América Latina (rojo). En el nordeste de Australia y en la costa del Golfo de México correspondiente a los Estados Unidos se encuentran reservorios ambientales, no relacionados, de bacilos toxigénicos (círculos azules). (Mapa basado en los casos notificados a la Organización Mundial de la Salud, sin contar los casos importados.)

## **B. Focos ambientales**

En vista de que la historia del cólera se ha caracterizado por oleadas epidémicas, se creía que no existía ningún reservorio natural permanente en la mayor parte del mundo. Sin embargo, en años recientes se han identificado en el ambiente focos endémicos de *V. cholerae* O1 toxigénico. Por ejemplo, reiteradamente se han producido casos de cólera a consecuencia de haber bebido agua de ciertos ríos australianos remotos o por comer camarones semicocidos pescados en las aguas de la costa del Golfo de México correspondientes a los Estados Unidos. En ambos lugares, se aisló *V. cholerae* O1 toxigénico de las aguas superficiales, donde era poco probable la contaminación con aguas residuales humanas. Ello indica que al menos algunas cepas de *V. cholerae* O1 toxigénico pueden persistir en el ambiente natural durante muchos años.

## **C. Manifestaciones clínicas**

El cólera es una enfermedad que causa diarrea de tipo secretorio. La enterotoxina producida por *V. cholerae* O1 provoca el escape de enormes cantidades de líquido y electrólitos hacia la luz del intestino, lo cual produce rápidamente diarrea acuosa profusa, disminución del volumen sanguíneo circulante, acidosis metabólica, depleción de potasio y, en último término, colapso vascular y muerte. En los casos graves, la copiosísima diarrea puede causar rápidamente la pérdida de 10% o más del peso corporal, y acompañarse de choque hipovolémico y muerte; aun así, 75% o más de las infecciones iniciales por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor pueden ser asintomáticas, lo cual depende de la dosis infectante. Del 25% de personas con infecciones sintomáticas, la mayoría padecen una afección leve. Aproximadamente 5% de los pacientes presentan un cuadro clínico moderado que requiere atención médica pero no hospitalización. En tan solo un 2% de los pacientes la afección progresa a "cólera gravis" potencialmente mortal (Figura I-3). Las personas cuya sangre es de tipo O presentan mayores probabilidades de contraer cólera grave, en comparación con las que tienen otros tipos sanguíneos. Como la sangre de tipo O es más común en América Latina que en otras partes del mundo, una mayor proporción de las infecciones por el bacilo del cólera en esta región tienen probabilidades de ser graves.

## **D. Tratamiento**

El tratamiento con éxito de los enfermos de cólera depende de la rápida restitución del líquido y los electrólitos perdidos. Antes del advenimiento de la terapia de rehidratación, morían entre 30% y 50% de los pacientes aquejados de "cólera gravis." En la actualidad, cuando se proporciona tratamiento adecuado, la mortalidad es de menos de 1% de los casos notificados. Los líquidos y electrólitos pueden reemplazarse rápidamente por vía oral o intravenosa. La posibilidad de recurrir a la vía oral se explica porque las células epiteliales del intestino son capaces de absorber líquido

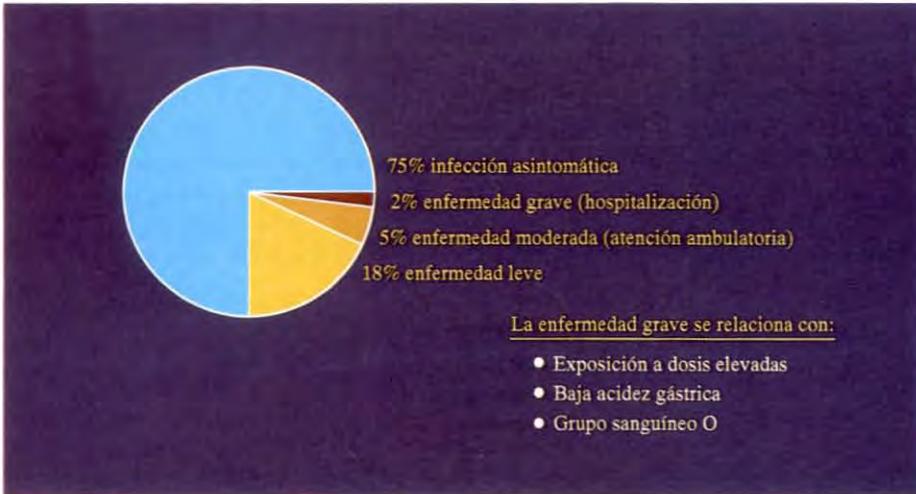


Figura I-3. La mayor parte de las infecciones con cepas epidémicas de *V. cholerae* que se producen de manera natural son asintomáticas. Solo una proporción reducida de los casos necesitan tratamiento o son potencialmente mortales. En la aparición de la enfermedad intervienen de manera importante la dosis de inoculación y los factores del huésped.

y electrolitos cuando estos se acompañan de glucosa u otros carbohidratos, incluso si al mismo tiempo se está produciendo secreción activa. La combinación óptima de electrolitos y glucosa para el tratamiento oral del cólera y otras diarreas de tipo secretorio es la contenida en la solución de sales de rehidratación oral (SRO) aprobada por la Organización Mundial de la Salud. Casi todos los pacientes de cólera pueden ser tratados con solución de SRO sola; aun los que al principio necesitan terapia intravenosa pueden cambiar en poco tiempo a la solución de SRO sola. La terapia intravenosa es necesaria para los pacientes que se encuentran en estado de choque profundo o no pueden beber. En tales casos, la solución de lactato de Ringer se recomienda para la rehidratación intravenosa inicial. El reemplazo del volumen en poco tiempo se consigue también con solución salina normal o seminormal, si se combina con terapia de SRO. La solución glucosada (dextrosa) al 5% es ineficaz y no debe emplearse porque no contiene electrolitos.

La terapia antimicrobiana resulta útil, aunque no es esencial, para tratar a los enfermos de cólera. Los agentes antimicrobianos acortan la duración de la enfermedad, disminuyen el volumen de las heces y abrevian la excreción de vibriones con las heces.

A veces se recomienda dar antimicrobianos a los contactos cercanos de los pacientes de cólera. Sin embargo, no se recomienda el uso profiláctico de estos medicamentos para comunidades enteras porque ha resultado ine-

## *Etiología y epidemiología del cólera*

ficaz, consume parte de los recursos de por sí escasos y acelera la aparición de resistencia antimicrobiana en *V. cholerae* O1. Los agentes antimicrobianos recomendados por la Organización Mundial de la Salud para tratar a los enfermos de cólera son tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, trimetoprima-sulfametoxazol, eritromicina y cloranfenicol. Datos recientes indican que las fluoroquinolonas (por ej., ciprofloxacina y norfloxacina) son también eficaces. En vista de que la resistencia a los antimicrobianos ha sido un problema en ascenso en ciertas partes del mundo, debe vigilarse periódicamente la sensibilidad de las cepas de *V. cholerae* O1 a los agentes antimicrobianos.

### **E. Epidemiología**

Cuando el cólera en la forma epidémica se presenta por vez primera en una población anteriormente no expuesta, puede afectar a todos los grupos de edad. Al contrario, en las zonas con tasas elevadas de la forma endémica de la enfermedad, como Bangladesh, la mayoría de los adultos han adquirido cierto grado de inmunidad natural como resultado de las infecciones repetidas, sean o no sintomáticas. En estas circunstancias, la enfermedad se presenta principalmente entre los niños pequeños, que se exponen al bacilo por primera vez, y en los ancianos, cuya producción de ácido gástrico es menor y cuya inmunidad está menguando. Las epidemias se producen de manera característica a finales del verano y en el otoño. Las personas pobres corren el riesgo más elevado porque suelen carecer de agua potable, las condiciones higiénicas de sus casas son deficientes y pueden depender de los vendedores ambulantes u otras fuentes mal reglamentadas para obtener sus alimentos y bebidas.

Innumerables investigaciones han vinculado la transmisión del cólera con el agua potable extraída de pozos, ríos o arroyos poco profundos, y hubo un caso producido por agua de manantial embotellada comercialmente. También se ha inculcado al hielo hecho con agua contaminada. En algunas ciudades del mundo en desarrollo, los grandes sistemas municipales distribuyen agua sin filtrar ni clorar, por medio de tuberías con fugas y a baja presión. En algunos lugares, las personas cavan hasta encontrar la tubería maestra, la cual perforan para obtener el agua para beber. Es posible que el orificio en la tubería haya sido taponado con un trapo o con cualquier otro medio igualmente ineficaz. Si la presión desciende dentro de la tubería, puede producirse retrosifonamiento con la contaminación consiguiente. En forma análoga, muchos recipientes domésticos para almacenar el agua favorecen la contaminación. En vista de todo ello, la introducción de recipientes más seguros para almacenar el agua en las casas y el mejoramiento de la integridad de los sistemas municipales de agua se han convertido en prioridades en muchas zonas actualmente afectadas por el cólera epidémico.

Los alimentos constituyen otro importante medio de transmisión del cólera. Una y otra vez, los pescados y mariscos han sido fuente del cólera,

particularmente moluscos y crustáceos crudos o semicocidos pescados en lechos marinos contaminados por aguas residuales o en ambientes donde *V. cholerae* O1 vive naturalmente. El cangrejo, el camarón, las ostras, las almejas y el pescado seco han sido inculpados de causar brotes epidémicos de origen alimentario. Aunque *V. cholerae* O1 se destruye fácilmente por efecto de la desecación, la luz solar y la acidez, se multiplica bien en una variedad de alimentos húmedos de los cuales la cocción previa ha eliminado otros microorganismos competidores. El arroz cocido es un excelente medio de cultivo, como lo son también las lentejas, el mijo y otros alimentos húmedos con pH neutro. En una investigación efectuada en África, el arroz sobrante servido con una salsa de maní alcalina transmitió el cólera. El mismo arroz servido con salsa de tomate ácida no constituyó un vehículo para la propagación de la infección. Las frutas y hortalizas regadas con aguas residuales durante su cultivo y consumidas sin cocinar o sin someterlas a otros procedimientos de descontaminación son probablemente vehículos de la transmisión del cólera. La congelación de los alimentos o las bebidas no impide la transmisión del cólera; ciertos brotes ocurridos en 1991 se pudieron adjudicar al hielo hecho con agua contaminada, a una ensalada preparada con cangrejo congelado y a leche de coco congelada usada como aliño de un postre.

No se ha demostrado que el cólera se propague de una persona a otra mediante el contacto directo, como el que entraña darse la mano o asistir a un paciente. Es probable que los brotes que se producen en pabellones de hospital con gran hacinamiento de pacientes sean causados por alimentos o agua contaminados. De modo análogo, ciertos brotes que sobrevienen poco después del entierro de una persona que falleció a causa del cólera parecen haber sido causados por el consumo de alimentos contaminados servidos durante el velorio, a menudo elaborados por las mismas personas que prepararon el cadáver para sepultarlo.

## **F. Vigilancia epidemiológica**

La vigilancia epidemiológica del cólera comienza con los clínicos y microbiólogos que están alerta ante la posibilidad de que aparezca el cólera y, en consecuencia, obtienen cultivos apropiados para la confirmación cuando se presenta una enfermedad sospechosa. Los casos presuntivos iniciales deben notificarse de inmediato a las autoridades de salud locales, estatales o regionales. Las colonias aisladas con aspecto de corresponder a *V. cholerae* se enviarán de inmediato a un laboratorio de referencia para la identificación y confirmación. Todos los aislamientos de *V. cholerae* deben someterse a pruebas para determinar si son del serogrupo O1. Los aislamientos de *V. cholerae* O1 relacionados con infecciones esporádicas y una muestra de los identificados en el transcurso de una epidemia deben estudiarse para saber si producen la toxina del cólera. Cuando se aísla *V. cholerae* O1 de personas con diarrea acuosa grave, hay que notificar inmediatamente a las autoridades de salud pública correspondientes, aun antes de practicar las prue-

## *Etiología y epidemiología del cólera*

bas para confirmar la elaboración de la toxina; esto se hace con la finalidad de investigar la fuente de la infección y poder aplicar las medidas de control adecuadas.

### **G. Vacuna contra el cólera**

Desde hace varios años se cuenta con una vacuna parenteral contra el cólera; se trata de una preparación inyectable a base de bacilos muertos que es relativamente ineficaz. Su aplicación disminuye tan solo en 50% el riesgo de cólera clínico, y la protección se limita de 3 a 6 meses. Además, la vacuna no parece aminorar la gravedad de la enfermedad en las personas que contraen el cólera después de vacunarse. Esta vacuna no impide la infección asintomática ni tampoco evita la infección en las personas que tienen estrecho contacto con enfermos de cólera. La aplicación de esta vacuna a grandes grupos no ha resultado útil para combatir el cólera epidémico. No se recomienda su empleo con fines de salud pública para las personas que viajan a zonas de cólera endémico. En la actualidad, ningún país exige oficialmente el certificado de vacunación contra el cólera. La aplicación de una vacuna ineficaz crea una falsa sensación de seguridad que impide tener en cuenta medidas preventivas más eficaces.

Aunque la vacuna anticolérica existente carece de valor práctico, se hallan en experimentación varias vacunas que son prometedoras. Entre ellas se cuentan dos preparaciones orales: una vacuna de células enteras muertas que contiene la subunidad B de la toxina del cólera, y una vacuna de células vivas atenuadas. Desde el punto de vista de la salud pública, podría ser importante contar con una vacuna contra el cólera capaz de inducir protección continua contra la enfermedad grave y, de manera ideal, contra la infección asintomática.

### **H. Estrategias de prevención**

Las medidas para combatir las epidemias suelen aplicarse en varias etapas. Las medidas de control urgentes y a corto plazo son las siguientes: 1) mejorar la capacidad para diagnosticar, tratar y vigilar la propagación del cólera epidémico; 2) enseñar a la gente medidas de prevención sencillas, como hervir o tratar de otro modo el agua de beber y evitar los alimentos que entrañan alto riesgo; y 3) llevar a cabo investigaciones epidemiológicas para identificar medidas de control concretas. Entre las medidas de control a mediano plazo, que se aplican en el término de varios meses o años, figuran una variedad de intervenciones sostenibles y relativamente baratas, como introducir métodos más seguros de almacenar el agua en casa, aplicar técnicas económicas y prácticas para la desinfección local del agua, y procurar un abasto de alimentos con menores riesgos, en especial mediante el mejoramiento de la inocuidad de los alimentos y bebidas que expenden los vendedores callejeros. Es probable que el cólera epidémico persista mientras en las zonas afectadas no se apliquen medidas encaminadas a lograr la reforma a largo plazo de las condiciones de saneamiento. Entre ellas pue-

den mencionarse el mantener y actualizar sistemas de abastecimiento y distribución de agua que sean seguros, construir plantas para el tratamiento eficaz de aguas residuales y crear la infraestructura de salud pública que apoye la transición hacia un ambiente exento del riesgo del cólera.

---

### **Bibliografía**

- CDC. Update: cholera—Western Hemisphere, 1992. *MMWR* 1993;42:89–91.
- Global Task Force on Cholera Control. Guidelines for cholera control. Geneva: World Health Organization, 1992; publication no. WHO/CDD/SER/80.4 Rev 4.
- Pollitzer R. Cholera. Geneva: World Health Organization, 1959.

## **II. La función del laboratorio de salud pública**

### **A. Consideraciones generales**

Para guiar la selección de cualquier prueba de laboratorio resulta esencial entender el uso que ha de darse a los resultados de las mismas. Esto cobra particular importancia en el caso del cólera porque en las zonas donde esta enfermedad es endémica es posible diagnosticarla con aceptable exactitud basándose únicamente en las manifestaciones clínicas. Asimismo, el cólera se puede tratar eficazmente sin que medie la confirmación del agente causal por el laboratorio. No obstante, en los comienzos de un brote epidémico se precisa la confirmación del agente causal por el laboratorio debido a que otras enfermedades que se acompañan de diarrea de tipo secretorio, como las causadas por *Escherichia coli* toxigénico o rotavirus, pueden parecerse al cólera. Asimismo, como la mayor parte de las infecciones (aproximadamente 75%) causadas por *V. cholerae* O1 son asintomáticas, y como el cólera gravis (deshidratación potencialmente mortal) se presenta en tan solo un 2% de los pacientes, el diagnóstico de cólera puede pasarse por alto si se basa únicamente en las manifestaciones clínicas, especialmente en las primeras etapas del brote o cuando se producen pocos casos.

Durante un brote epidémico de cólera, los esfuerzos del laboratorio deben encauzarse a resolver problemas cruciales de salud pública y no a examinar un gran número de muestras clínicas que arrojen escasa información. Las prioridades de un laboratorio se modifican en el transcurso de una epidemia de cólera. Al comienzo del brote es necesario confirmar el agente causal de los casos presuntivos. Una vez que la epidemia de cólera se ha establecido, disminuye la importancia de confirmar cada caso diagnosticado por medios clínicos, de suerte que los esfuerzos del laboratorio deben dirigirse entonces a investigar el alcance de la epidemia, la fuente de la infección y la aparición de resistencia a los antimicrobianos. Después que la epidemia cede, la confirmación de los casos presuntivos por el laboratorio es importante para definir el final de la epidemia y para orientar las decisiones en materia de salud pública.

### **B. Cuándo se reconoce la amenaza de epidemia de cólera**

En una región amenazada por el cólera epidémico, el laboratorio de salud pública desempeña una función central en lo referente a detectar la introducción de la enfermedad. La detección temprana de los casos de cólera facilita la selección de las actividades de control adecuadas. La vigilancia basada en el laboratorio se lleva a cabo empleando varios tipos de muestras, según se indica a continuación.

#### **1. Muestras clínicas de casos de “enfermedad semejante al cólera” en los consultorios u hospitales centinela cuando no hay un brote de cólera**

El muestreo regular de especímenes provenientes de casos sospechosos puede hacerse de manera periódica, lo cual depende de los recursos con

que cuente el laboratorio y del acceso a centros clínicos. Hay que ponerse de acuerdo de antemano acerca de la definición de “casos presuntivos”, que son los que habrán de someterse a examen para detectar *V. cholerae*.

Cuando acude a consulta un paciente con diarrea acuosa intensa y deshidratación que exige tratamiento intravenoso, se debe considerar como candidato para la práctica de un cultivo con fines de vigilancia epidemiológica. Al efectuar dichos cultivos es preciso tener en cuenta los recursos disponibles y la frecuencia de casos presuntivos. Se pueden tomar provisiones para obtener hisopados (escobillones) rectales de todos los pacientes con enfermedad semejante al cólera en varios establecimientos clínicos, o bien muestrear a un subgrupo de pacientes, como pueden ser todos los que acuden a consulta por diarrea en un día determinado o un número determinado de pacientes al mes. Es importante trazar planes para transportar adecuadamente las muestras clínicas al laboratorio. Es más eficaz examinar un número reducido de muestras cuidadosamente escogidas que examinar un gran número de muestras mal escogidas que quizá se hayan manipulado incorrectamente.

## **2. Confirmación de los casos en las primeras etapas de un brote de “enfermedad semejante al cólera”**

Pueden practicarse cultivos y pruebas serológicas en muestras provenientes de contactos familiares de los casos iniciales, y se debe considerar la posibilidad de acrecentar la vigilancia epidemiológica por un tiempo limitado en la zona donde se haya confirmado un caso inicial. Estas medidas permiten determinar rápidamente si el primer caso fue un acontecimiento aislado o si representa el inicio de un brote epidémico.

## **3. Vigilancia de los puntos de captación de aguas residuales**

El hisopo de Moore (véase el Capítulo V, “Exámenes de alimentos y de muestras ambientales”) es un método sencillo, fiable y sensible para identificar a los individuos infectados en la población usuaria de un sistema de captación de aguas residuales. El muestreo repetido en los puntos centrales a intervalos de una a dos semanas puede identificar eficazmente las infecciones, ya sean sintomáticas o asintomáticas, en la zona. No obstante, en el transcurso de una epidemia, cuando los hisopos resultan sistemáticamente positivos, el muestreo continuo ofrece escasa información suplementaria, así que puede ser suspendido.

## **4. Confirmación de los aislamientos de *V. cholerae* en el laboratorio**

Si de una muestra de la fase preepidémica se aísla *V. cholerae* O1, el aislamiento se debe enviar a un laboratorio de referencia para confirmación y caracterización. La confirmación del antígeno O1, el serotipo y la producción de toxina del cólera es decisiva para confirmar la presencia de cólera en la zona. Un número reducido de aislamientos se someterán a pruebas bioquímicas de identificación, a la determinación del biotipo y a pruebas

para identificar resistencia a los antimicrobianos. La caracterización más a fondo de los aislamientos, por ejemplo, mediante la subtipificación molecular, puede ayudar a determinar el origen de los mismos.

### **C. Qué hacer durante un brote epidémico de cólera**

Una vez que se ha confirmado la presencia de casos de cólera en una zona y que se comprueba la transmisión continua de la infección, bien sea mediante la vigilancia clínica o ambiental, habrá que disminuir considerablemente las actividades del laboratorio encaminadas a detectar infecciones por *V. cholerae* O1. No es necesaria la confirmación de todos los casos presuntivos, ni tampoco hace falta la caracterización extensa de los casos confirmados. Como la cepa epidémica es mucho más común que las cepas O1 no toxigénicas, tiene poca utilidad someter a prueba todos los aislamientos para determinar la producción de toxina del cólera o hacer otros estudios fuera de la aglutinación con el antisuero O1. En vez de ello, los recursos del laboratorio de salud pública deben usarse para las tareas que se describen a continuación.

#### **1. Vigilancia de la aparición de resistencia a los antimicrobianos**

El examen periódico de un número pequeño de aislamientos puede detectar el surgimiento de resistencia a los antimicrobianos. La resistencia puede aparecer en la localidad, de manera que se debe considerar la posibilidad de efectuar pequeñas encuestas periódicas en toda la zona afectada.

#### **2. Investigaciones epidemiológicas especiales**

Durante las epidemias de cólera, las investigaciones focalizadas sobre el terreno ayudan a determinar las fuentes de infección y vías de transmisión y la tasa de propagación a los contactos familiares.

Las investigaciones de casos y testigos son de máxima precisión si tanto los pacientes como los testigos pueden ser examinados en busca de infección actual o reciente. La infección actual puede comprobarse mediante el cultivo de muestras obtenidas cuando los enfermos acuden en busca de tratamiento. Además, en las zonas recientemente afectadas por una epidemia, las muestras de suero de los testigos sanos pueden analizarse para determinar los títulos de anticuerpos vibriocidas, ya que así pueden excluirse del estudio los posibles testigos con títulos elevados de dichos anticuerpos, que indican infección reciente.

Las encuestas en los hogares de los pacientes pueden determinar si se está produciendo transmisión intrafamiliar y si, por tanto, se justifica adoptar medidas tales como educación o quimioprofilaxis del grupo familiar.

#### **3. Definición de la magnitud de la epidemia y mejoramiento de la interpretación de los datos de vigilancia**

Las encuestas serológicas que se efectúan periódicamente en el transcurso de una epidemia pueden ayudar a determinar el número de infecciones

que se han producido entre la población y la proporción de ellas que son asintomáticas. Los resultados de los cultivos obtenidos de una serie secuencial de 50 a 100 pacientes que encajan en la definición de caso aplicada durante una epidemia pueden determinar el valor predictivo de dicha definición. Esto confirmará la exactitud de la definición de caso usada para los fines de la vigilancia epidemiológica. Por ejemplo, si el 80% de los pacientes que encajan en la definición de caso presentan infección confirmada por el cultivo, el valor predictivo de la definición será elevado y, en consecuencia, cuando no se cuente con la confirmación del cultivo se podrá presumir que padecen cólera los enfermos que satisfacen los criterios de la definición.

#### **4. Determinación de la repercusión de las medidas de control**

Los datos de la vigilancia de laboratorio pueden determinar la eficacia de las medidas para combatir la epidemia. Si las medidas preventivas están dirigidas contra determinados vehículos de transmisión, las pruebas de laboratorio que comprueben el éxito o el fracaso de las medidas en curso para descontaminar dichos vehículos pueden utilizarse como indicadores de la eficacia de las medidas de control concretas, lo cual es mejor que limitarse a practicar cultivos de muestras de los vehículos para intentar aislar *V. cholerae* O1. Las pruebas de la cloración adecuada del suministro de agua y la ausencia demostrada de coliformes fecales en el agua, los alimentos y las bebidas resultan más tranquilizadoras que el hecho de no poder detectar *V. cholerae* O1 en muestras tomadas de estos productos.

#### **D. Definición de la duración de la epidemia**

Una disminución considerable en el número de casos de cólera definidos por medios clínicos en una población determinada puede representar una disminución estacional pasajera, la transición al estado de endemidad o la completa desaparición del cólera de esa población. La transmisión puede cesar por completo en ciertas regiones, mientras que en otras puede persistir en un grado menor. Como es común que el cólera epidémico disminuya bruscamente en las estaciones más frías y regrese el verano siguiente, pueden ser prematuras las declaraciones de que una región determinada está exenta del cólera. En estas circunstancias, la vigilancia de laboratorio focalizada puede ayudar a definir la situación. Al igual que en el período preepidémico, el muestreo periódico de personas con "enfermedad semejante al cólera" de carácter grave y de puntos centrales de captación de aguas residuales puede usarse de nuevo para determinar con gran sensibilidad la presencia o ausencia de la cepa epidémica. Para poder declarar con confianza que una zona está exenta de cólera es preciso que transcurran 12 meses sin que se hayan detectado indicios de *V. cholerae* O1. Un informe puede mencionar que no se han detectado casos de cólera desde una determinada fecha, sin tener que declarar que la zona está libre del cólera.

## **E. Problemas especiales**

### **1. Diagnóstico retrospectivo de un presunto brote**

Si se llega a una población después de que ha cedido un presunto brote de cólera, pueden recogerse muestras de suero para determinar los títulos de anticuerpos vibriocidas. Los sueros pueden obtenerse de un número reducido de pacientes “típicos” y de testigos sanos. La obtención de sueros testigos en el mismo poblado permite comparar los títulos de anticuerpos vibriocidas del grupo “enfermo” con los del grupo “sano”. La elección de la prueba serológica depende del momento en que se recoja el espécimen (véase el Capítulo VIII, “Detección de anticuerpos contra *Vibrio cholerae* O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes”). Los títulos de anticuerpos vibriocidas comienzan a elevarse varios días después de la exposición, generalmente alcanzan su punto máximo al cabo de 10 a 21 días, comienzan a declinar en el término de un mes y regresan a sus niveles basales más o menos en un año. Los anticuerpos contra la toxina del cólera alcanzan su punto máximo entre 21 y 28 días después de la exposición y persisten elevados durante más de un año después de la infección.

### **2. Muestreo ambiental**

Los métodos para muestrear los alimentos y el agua y para obtener otras muestras ambientales con la finalidad de aislar *V. cholerae* O1 exigen un uso intensivo de mano de obra, son relativamente poco sensibles y pueden agotar en poco tiempo los recursos del laboratorio sin producir resultados claramente interpretables. Cuando el cultivo resulta negativo, ello puede indicar que las muestras ambientales se recogieron demasiado tarde o que se manipularon incorrectamente. Si en diferentes tipos de muestras se aísla *V. cholerae* O1, quizá no quede claro si el alimento o el agua causaron la enfermedad o si fueron contaminados por las personas infectadas.

En general, no se recomiendan las encuestas ambientales amplias. No obstante, si desde el punto de vista epidemiológico se ha identificado un vehículo de transmisión concreto, el muestreo focalizado de este puede arrojar información útil. De modo parecido, una vez que se han adoptado medidas de control para reducir la contaminación del vehículo, la evaluación microbiológica puede indicar el grado de éxito de la intervención.

## **F. Resumen**

El laboratorio de salud pública puede facilitar información de carácter crucial para definir el principio de una epidemia de cólera, vigilar la resistencia y otros cambios en la cepa epidémica, y definir el curso de la epidemia. Mediante la colaboración con epidemiólogos, el microbiólogo de salud pública puede apoyar los esfuerzos encaminados a determinar las fuentes de la infección y a medir la eficacia de las medidas de control. El uso adecuado de los recursos del laboratorio puede despejar muchos interrogantes

## *La función del laboratorio de salud pública*

cruciales. La clara formulación de las preguntas precisas que habrán de responderse, aunada a una meticulosa atención a los aspectos de la selección y el transporte de las muestras, y del uso eficiente de las pruebas diagnósticas, puede impedir que los recursos del laboratorio se agoten practicando pruebas de dudoso valor epidemiológico.

---

### **Bibliografía**

Global Task Force on Cholera Control. Guidelines for cholera control. Geneva: World Health Organization, 1992; publication no. WHO/CDD/SER/80.4 Rev. 4.

### **III. Obtención y transporte de las muestras de pacientes**

Los esfuerzos del laboratorio por aislar *V. cholerae* O1 pueden verse obstaculizados si las muestras se obtienen en cantidad insuficiente o si se recogen o transportan de manera inadecuada. Por lo tanto, en cualquier estudio de laboratorio es crucial recoger muestras adecuadas, usar un medio microbiológico de transporte apropiado para muestras fecales, y transportar oportunamente las muestras al laboratorio (véase el Cuadro III-1).

#### **A. Obtención de las muestras**

##### **1. Muestras fecales**

Las muestras fecales deben recogerse en las etapas iniciales de cualquier enfermedad entérica, cuando los agentes patógenos suelen estar presentes en mayor número en las heces, y antes de que se inicie la antibioticoterapia.

##### ***Recogida de las heces***

Recoja las heces en recipientes limpios (sin residuos de desinfectantes ni detergentes) con tapas de cierre hermético a prueba de fugas. No deben recogerse muestras del cómodo, pues este puede contener residuos de desinfectante. Para obtener heces líquidas de pacientes con diagnóstico presuntivo de cólera puede usarse una sonda rectal. La sonda estéril se lubrica con líquido estéril, se introduce más allá del esfínter rectal y se mueve suavemente dentro del intestino hasta que por el extremo exterior de la sonda comienzan a salir heces líquidas.

Las heces sin conservador se refrigerarán si es posible y serán procesadas dentro de un plazo máximo de 2 horas después de haber sido recogidas. Cualquier grado de desecación de la muestra o un cambio del pH hacia la acidez disminuirá considerablemente el número de bacilos viables. Si se prevé procesar la muestra más de 2 horas después, utilice una torunda de algodón o un hisopo con punta de poliéster estéril, la cual se sumerge en las heces y se deposita luego en medio de transporte de Cary-Blair (las instrucciones para la inoculación de este medio pueden consultarse en la sección B del presente capítulo). Si en las heces hay moco y fragmentos de epitelio intestinal, se deben tomar muestras de ellos con el hisopo. Las muestras conservadas en medios de transporte microbiológicos no necesitan refrigeración, a menos que haya probabilidades de exposición a temperaturas elevadas (>40 °C).

##### ***Recogida de hisopados rectales***

Humedezca un hisopo estéril con punta de algodón en medio de transporte de Cary-Blair (no deben usarse lubricantes para este propósito), introduzca el hisopo en el esfínter rectal hasta alcanzar el conducto anal y, una vez allí, hágalo girar varias veces. Extraiga el hisopo y examínelo para

**Cuadro III-1. Obtención de muestras para el diagnóstico del cólera por el laboratorio**

| Instrucciones para la toma                        | Muestras fecales  | Muestras de suero   |
|---|---|---|
| Cuándo recoger                                    | Durante el período de diarrea activa (lo antes posible una vez que ha comenzado la enfermedad)                                    | Suero de la fase aguda, si es posible, en los 3 primeros días; suero de convalecencia, entre 10 y 21 días después del inicio <sup>a</sup>           |
| Qué cantidad recoger                              | Hisopado rectal o hisopado de heces recién emitidas   | De 10 a 15 ml de sangre total en adultos, o de 3 a 5 ml en niños  |
| Método de recogida                                | Hisopado de heces o hisopado rectal colocado en medio de transporte de Cary-Blair   | Recoger la sangre en tubo sin anticoagulante, dejar coagular, centrifugar y colocar el suero en un tubo estéril                                     |
| Almacenamiento de la muestra después de recogerla | Almacenar a temperatura ambiente o refrigerar a 4 °C  | Refrigerar o congelar inmediatamente el suero (no congelar la sangre entera)  |
| Transporte  | Cerrar muy bien el envase de la muestra para evitar fugas; enviar en recipiente resistente por un servicio de entrega en 24 horas | Colocar las muestras en recipientes bien cerrados sobre bolsas de hielo o hielo seco, enviar en caja aislada por un servicio de entrega en 24 horas |

<sup>a</sup>Los títulos de anticuerpos vibriocidas comienzan a elevarse varios días después del inicio de la enfermedad y alcanzan su punto máximo en el término de 10 a 21 días.

comprobar que contenga materia fecal. Coloque el hisopo en el tubo del medio de Cary-Blair y transpórtelo al laboratorio a temperatura ambiente o refrigerado (4 °C).

## **2. Suero para estudios de anticuerpos**

Obtenga dos muestras de suero (una de la fase aguda y otra de la fase de convalecencia). La de la fase aguda debe recogerse tan pronto como sea posible una vez que ha comenzado la enfermedad (en condiciones ideales, antes de transcurridos tres días), la de la fase de convalecencia, entre 10 y 21 días después del inicio. Además del nombre y la edad del paciente, indique la fecha en que se extrajo la muestra de sangre y la fecha de inicio de la enfermedad.

Recoja las muestras de sangre (10 a 15 ml de adultos y 3 a 5 ml de niños) en tubos sin anticoagulante y déjelas coagular. Centrifugue las muestras y envíe únicamente el suero a analizar. Si no se cuenta con centrífuga, guarde las muestras de sangre en el refrigerador hasta que se forme el coágulo; a continuación, extraiga el suero con todo cuidado mediante una pipeta Pasteur, evitando aspirar los eritrocitos. Coloque el suero sin células en un tubo estéril con tapón de rosca. Si el suero se va a conservar por varios días, es mejor congelarlo que refrigerarlo para evitar la multiplicación de bacterias. Si es posible, envíe las muestras congeladas empacadas en hielo seco o con un paquete frío. Sin embargo, si el suero contiene eritrocitos, no se debe congelar, pues ello ocasionará hemólisis y dificultará el análisis. Si el suero no se centrifugó y se sometió a la técnica de coagulación descrita anteriormente, envíe las muestras refrigeradas (no congeladas), de tal manera que puedan centrifugarse para retirar los eritrocitos remanentes antes de la congelación.

## **B. Medios microbiológicos de transporte**

### **1. Medio de Cary-Blair**

Este es el medio que se prefiere para la conservación y el transporte de *V. cholerae*, debido a que su pH elevado (8,4) es óptimo para esta especie y a que su consistencia semisólida facilita el transporte. El medio de Cary-Blair es estable y después de preparado puede almacenarse hasta por un año en recipientes herméticamente cerrados. Puede usarse para transportar muchos agentes enteropatógenos además de *V. cholerae*. (Las instrucciones para preparar el medio de Cary-Blair aparecen en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos".)

### ***Inoculación del medio de transporte de Cary-Blair***

Después de recoger la muestra, adoptando las precauciones de asepsia necesarias, introduzca uno o dos hisopos en el medio contenido en el tubo (Figura III-1). Mantenga el algodón del hisopo sumergido en el medio.



Figura III-1. Medio de transporte semisólido de Cary-Blair.

Aplicando las normas de la asepsia, rompa la parte sobrante del palito del hisopo que ha sido tocada por sus dedos. Coloque el tapón en el tubo y apriételo fuertemente. Transporte o almacene el medio inoculado a temperatura ambiente (25 °C) o refrigerado (4 °C).

## 2. Otros medios microbiológicos de transporte

El agua peptonada alcalina (APW) puede emplearse para transportar *V. cholerae* por períodos breves, si no se tiene medio de Cary-Blair. El APW no debe usarse si el subcultivo va a efectuarse más de 6 horas después de la recogida, pues transcurrido ese lapso la multiplicación de otros microorganismos sobrepasará a la de los vibriones.

Si no se cuenta con medio de Cary-Blair, los medios de transporte de Amies (pH 7,4) y de Stuart (pH 7,3) pueden utilizarse para transportar las muestras, pero solo por períodos breves (1 ó 2 días) porque el pH de estos medios no es óptimo para *V. cholerae*. La solución salina amortiguada con glicerol no es apropiada para el transporte de *V. cholerae* y por tanto no debe emplearse.

## C. Muestras directas sin conservador

Si no se pueden usar medios microbiológicos de transporte, una opción consiste en impregnar de heces líquidas un trozo de papel de filtro, gasa o algodón y colocarlo en una bolsa de plástico. La bolsa habrá de cerrarse muy bien para que la muestra conserve la humedad y no se seque. La adición de varias gotas de solución salina a la bolsa puede ayudar a evitar la

deseccación. La refrigeración durante el transporte es aconsejable pero no necesaria.

#### **D. Transporte de las muestras**

El transporte o envío de muestras para estudios diagnósticos por sistemas de reparto públicos o comerciales puede estar sujeto a reglamentos locales o nacionales. El transporte de muestras no debe representar un peligro para los seres humanos o el ambiente y debe proteger la viabilidad de los presuntos agentes patógenos. En el capítulo XII, "Almacenamiento y envío de los aislamientos", se dan instrucciones acerca del envío internacional de muestras para estudios diagnósticos y de agentes causales.

En caso de no existir reglamentos específicos, se sugiere regirse por las siguientes normas para el transporte de muestras para estudios diagnósticos:

- Colocar cada muestra en un envase primario apropiado (tubo de ensayo, recipiente para heces, medio de transporte, vial de suero).
- Colocar los recipientes primarios en un recipiente secundario no desechable, impermeable y con suficiente material absorbente (por ej., algodón en rama, toallas de papel) para absorber cualquier posible derrame del recipiente primario.
- Las muestras pueden refrigerarse si se colocan en una caja junto con bolsas de material refrigerante congelado (las cuales pueden adquirirse en el comercio o improvisarse). Si se opta por usar hielo en vez de bolsas de material refrigerante, el agua de deshielo no debe introducirse en los tubos que contienen las muestras ni gotear del recipiente secundario. Cuando se use hielo, los recipientes con las muestras se colocarán dentro de bolsas impermeables de plástico que puedan cerrarse herméticamente.
- Las muestras congeladas solo pueden mantenerse en ese estado si se empacan en hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido). Se debe emplear suficiente hielo seco para mantener la muestra congelada hasta que la reciba el laboratorio que la procesará (generalmente, entre un tercio y la mitad de la capacidad del envase de embarque). Los tubos de vidrio no deben entrar en contacto directo con el hielo seco; protéjense las muestras colocando entre este y los tubos una capa de papel de embalar u otro material amortiguador.
- Empacar las muestras en hielo seco o hielo ordinario fijándolas de manera tal que no puedan rodar dentro del recipiente una vez que se haya acabado el hielo.
- Las muestras que no se refrigeran ni se congelan también deben protegerse contra la posibilidad de calor o frío extremos.

### *Obtención y transporte de las muestras de pacientes*

- Seleccionar los medios de transporte más rápidos y confiables para evitar retrasos en el envío. Si se mandan por avión muestras congeladas, obtener previamente la aprobación de la compañía aérea para usar hielo seco, ya que a medida que este se derrite libera CO<sub>2</sub> en forma de gas. De ser posible, programar la entrega en un día hábil y en horas de oficina.
- Si las muestras se despachan por correo, empacarlas según los requisitos postales nacionales o internacionales (véase el Capítulo XII). Cerciorarse de adjuntar toda la información y documentación necesaria para cada muestra.

---

### **Bibliografía**

Cary SG, Blair EB. New transport medium for shipment of clinical specimens. I. Fecal specimens. *J Bacteriol* 1964; 88:96-8.

CDC. Recommendations for the collection of laboratory specimens associated with outbreaks of gastroenteritis. *MMWR* 1990;39 (No. RR-14).

Global Task Force on Cholera Control. Guidelines for cholera control. Geneva: World Health Organization, 1992; publication no. WHO/CDD/SER/80.4 rev 4.

World Health Organization. Manual for the Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.

## **IV. Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de muestras fecales**

Aunque *V. cholerae* O1 crece en diversos medios de agar que se utilizan comúnmente, el aislamiento a partir de muestras fecales se realiza con mayor facilidad empleando medios selectivos. Se recomienda el agua peptonada alcalina (APW) como caldo de enriquecimiento, y el agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) como el medio de agar selectivo preferible para el aislamiento de *V. cholerae* O1. En algunos casos (por ejemplo, cuando el paciente se encuentra en fases muy tempranas de la enfermedad y tiene evacuaciones líquidas), puede ser innecesario el uso de muestras enriquecidas o medios selectivos en placa. Sin embargo, siempre se debe usar el caldo de enriquecimiento y un medio selectivo en placa cuando se trata de personas convalecientes, infecciones presuntivas asintomáticas, muestras ambientales, y cuando es probable que la muestra contenga gran cantidad de microorganismos competidores.

### **A. Enriquecimiento en agua peptonada alcalina**

*Vibrio* spp. crece muy rápidamente en agua peptonada alcalina, y al cabo de 6 a 8 horas está presente en mayor cantidad que otros microorganismos. El enriquecimiento en dicho medio favorece el aislamiento de *V. cholerae* O1 cuando hay pocos microorganismos, como en muestras de personas convalecientes y de portadores asintomáticos.

Se han descrito otros caldos de enriquecimiento para el cultivo de *V. cholerae*. Entre ellos se puede mencionar el medio de enriquecimiento de Monsur, que contiene tripticasa, telurito de potasio y taurocolato de sodio (sales biliares). A veces se utiliza una modificación del agua peptonada alcalina, en la cual se agrega telurito de potasio en concentraciones de 1:100.000 a 1:200.000. Los medios de enriquecimiento que contienen un agente selectivo quizá no ofrezcan ventaja alguna sobre el agua peptonada alcalina si esta se utiliza con un período de incubación breve (6 a 8 horas).

### **B. Medios selectivos en placa**

#### **1. Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa**

El agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) es el medio que se prefiere para el aislamiento de *V. cholerae* y se utiliza ampliamente en todo el mundo. El agar TCBS se expende en el comercio y es fácil de preparar; no requiere esterilización en el autoclave y es diferencial y selectivo (Cuadro IV-1). Sin embargo, tiene una vida de almacenamiento relativamente corta una vez preparado (de 3 a 5 días), a menos que las placas se protejan cuidadosamente de la desecación. La selectividad del agar TCBS está sujeta a variaciones de un lote a otro y de una marca a otra, y el cultivo en este medio no es conveniente para las pruebas de aglutinación con antiseros contra *V. cholerae* O1.

**Cuadro IV-1. Medios selectivos en placa para el cultivo de *V. cholerae***

| Medio                          | Características morfológicas de las colonias | Tamaño de las colonias (mm) | Se consigue en el comercio | Hay que esterilizar en autoclave | Prueba directa con material tomado de la placa <sup>a</sup> |
|--------------------------------|--|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---|
| Agar TCBS                      | Amarillas, redondas, lisas                   | 2 a 3                       | Sí                         | No                               | No  |
| Agar TTG                       | Grisés, aplanadas, zona opaca alrededor      | 1 a 2                       | No                         | Sí                               | Sí  |
| Agar de MacConkey <sup>b</sup> | De incoloras a rosa claro                    | 1 a 3                       | Sí                         | Sí                               | No  |

Nota: TCBS = tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa; TTG = gelatina con taurocolato y telurito.

<sup>a</sup>Prueba directa de aglutinación con antisueros o reacción de la oxidasa.

<sup>b</sup>No todas las cepas de *V. cholerae* O1 crecen en el agar de MacConkey.

El agar TCBS es verde cuando se prepara. El crecimiento de un día para otro (18 a 24 horas) de *V. cholerae* producirá colonias grandes (2 a 4 mm de diámetro), ligeramente aplanadas, amarillas, con el centro opaco y la periferia translúcida (Figura IV-1). El color amarillo se debe a la fermentación de la sacarosa en el medio. Los microorganismos que no fermentan la sacarosa, como es el caso de *V. parahaemolyticus*, producen colonias de color verde a azul verde. Las colonias sospechosas que se someterán a pruebas ulteriores deben sembrarse en un medio no inhibitorio, como agar gelatina, agar infusión de corazón (HIA) agar hierro de Kligler (KIA) o agar hierro con tres azúcares (TSI).

## **2. Agar taurocolato-telurito-gelatina (agar TTG o medio de Monsur)**

El agar taurocolato-telurito-gelatina (TTG) es un agar diferencial y selectivo ideado específicamente para el aislamiento de *V. cholerae*. El agar TTG tiene una vida de almacenamiento relativamente larga después de preparado, y se pueden utilizar las colonias tomadas directamente del medio para efectuar las pruebas de la oxidasa y de aglutinación (véase el Cuadro IV-1). Este medio tiene como inconvenientes que no se expende en el comercio y que las colonias de *V. cholerae* incubadas de un día para otro en él tienden a ser más pequeñas (1 a 2 mm) que las cultivadas en agar TCBS. También varía la calidad del telurito de potasio, que se agrega al



Figura IV-1. Las colonias de *V. cholerae* cultivadas en agar TCBS durante 18 a 24 horas son grandes (2 a 4 mm) y amarillas debido a la fermentación de la sacarosa; se caracterizan por ser redondas, lisas, brillantes y ligeramente aplanadas.

medio para aumentar la selectividad; por lo tanto, debe titularse cada lote para determinar la concentración óptima que ha de usarse en el agar TTG (véase el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos").

El crecimiento de un día para otro (18 a 24 horas) de *V. cholerae* en agar TTG se caracteriza por colonias pequeñas y opacas con el centro ligeramente oscuro (Figura IV-2). Al cabo de 24 horas, el centro de la colonia se hace más oscuro y, al final, toda ella toma un color de "acero pavonado". Además del color oscuro, que se debe a la reducción del telurito, hay una zona opaca semejante a un halo alrededor de las colonias. El efecto de halo, debido a la producción de la enzima gelatinasa, se puede intensificar mediante refrigeración breve (15 a 30 minutos) de la placa. Como muchos miembros del género *Vibrio* tienen características similares en el agar TTG, se requieren pruebas adicionales (antisueros, pruebas bioquímicas o ambos) para identificar los microorganismos aislados en este medio.

### **3. Agar de MacConkey**

Para aislar especies de la familia *Enterobacteriaceae* se utiliza mucho el agar de MacConkey, que también permite el crecimiento de algunas cepas de *V. cholerae*. Las colonias de este bacilo incubadas de un día para otro en agar de MacConkey tienden a ser pequeñas o medianas (1 a 3 mm) y por lo general se ven como lactosa negativas o ligeramente rosadas; con frecuen-



Figura IV-2. Las colonias de *V. cholerae* en agar TTG son grises y aplanadas, y están rodeadas de un halo turbio formado por la producción de gelatinasa.

cia recuerdan a las colonias de microorganismos que producen fermentación “tardía” o “lenta” de la lactosa (Cuadro IV-1; Figura IV-3). Las colonias que presuntivamente correspondan a *V. cholerae* se resemebrarán en medios no inhibitorios para efectuar pruebas adicionales.

### **C. Medios no selectivos en placa**

#### **1. Agar gelatina**

El agar gelatina es un buen medio no selectivo para el cultivo de *V. cholerae*. La producción de gelatinasa, que es una característica de los vibriones en general, se puede determinar en el agar gelatina y se reconoce por la aparición de una zona opaca parecida a un halo alrededor de las colonias. El efecto de halo se puede identificar mediante la refrigeración breve (15 a 30 minutos) de la placa. Las colonias de *V. cholerae* en el agar gelatina son lisas, opacas, blancas y de 2 a 4 mm de diámetro tras la incubación de 18-24 horas a una temperatura de 35° a 37 °C. Cuando las colonias se observan con luz transmitida oblicuamente con aumentos de 10× a 20×, pueden aparecer finamente granulosa e iridiscentes, con un brillo verdoso como de bronce. Las colonias provenientes de este medio pueden



Figura IV-3. Las colonias de *V. cholerae* aisladas en agar de MacConkey e incubadas de 18–24 horas son pequeñas (1 a 3 mm), translúcidas, con una gama cromática que va desde incoloras hasta rosado claras (lactosa negativas).

someterse directamente a las pruebas de aglutinación con antisueros, de la oxidasa y del hilo o hebra mucoide. Se puede utilizar agar gelatina sin sales como un medio selectivo para descartar los vibriones marinos halófilos (que requieren sal) semejantes a *V. cholerae*, que frecuentemente se aíslan de pescados y mariscos y de muestras ambientales. Véanse en el Capítulo XI, “Preparación de medios de cultivo y reactivos”, las instrucciones especiales para la preparación del agar gelatina.

## **2. Agar de extracto de carne (agar nutritivo alcalino)**

El agar de extracto de carne es similar al agar gelatina en su capacidad para permitir el crecimiento de *V. cholerae*; sin embargo, a diferencia de este, las colonias que aparecen en él no tienen características distintivas. Al cabo de la incubación de 18 a 24 horas, las colonias de *V. cholerae* en agar de extracto de carne son de 2 a 4 mm de diámetro, lisas, opacas y de color crema. Cuando se observan con luz oblicua con aumentos de 10× y 20×, las colonias se ven finamente granulares e iridiscentes, con un brillo verdoso como de bronce. Las pruebas de oxidasa y del hilo mucoide y la aglutinación con antisueros se pueden realizar directamente con colonias presuntivas aisladas en placas de agar de extracto de carne.

## **D. Aislamiento e identificación presuntiva**

### **1. Inoculación directa de muestras fecales en medios selectivos en placa**

En los medios muy selectivos (agares TCBS y TTG) la siembra se hace con un inóculo abundante de heces líquidas, suspensión fecal o hisopado rectal (Figura IV-4). Con medios de baja selectividad (agar gelatina, agar de extracto de carne y agar sangre), se utiliza un inóculo ligero, el cual se siembra mediante estriación con asa de alambre para aislar colonias. No es necesario flamear el asa entre la estriación de los diferentes cuadrantes de la placa. Los medios de alta selectividad requieren una estriación más cerrada en los cuadrantes que se siembran primero, no así los medios de baja selectividad. Después de la inoculación, se incuban las placas durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35° a 37 °C.

### **2. Inoculación de agua peptonada alcalina a partir de muestras fecales**

El agua peptonada alcalina se puede inocular con heces líquidas, suspensión fecal o hisopado rectal (Figura IV-4). El inóculo de heces no debe exceder del 10% del volumen del caldo. Se incuba el tubo con la tapa sin apretar a una temperatura de 35° a 37 °C durante 6 a 8 horas. Después de este período de incubación, se resiembra en agar TCBS empleando una o dos asadas de agua peptonada alcalina obtenidas de la porción más alta del caldo, incluida la superficie, puesto que los vibriones crecen preferentemente en esta zona. El tubo no se agita ni se mezcla antes de resembrar. Si el caldo no se puede subcultivar después de 6 a 8 horas de incubación, se resiembra a las 18 horas en un tubo nuevo de agua peptonada alcalina. Este segundo tubo debe resembrarse en un medio sólido después de 6 a 8 horas de incubación.

### **3. Aislamiento de colonias presuntivas a partir de medios en placa**

Se seleccionan varias colonias presuntivas de la placa de agar TCBS y se inoculan en agar de infusión de corazón con plano inclinado u otro medio no selectivo. No debe utilizarse agar nutritivo porque no contiene sal ni permite el crecimiento óptimo de *V. cholerae*. Se incuba a una temperatura de 35° a 37 °C.

### **4. Aglutinación en lámina o portaobjeto**

Las colonias sospechosas de *V. cholerae* recién aisladas en un medio de agar no selectivo se pueden someter a la prueba de aglutinación con antisuero polivalente contra *V. cholerae* O1. Por lo general, después de 5 a 6 horas de incubación, las colonias que crecen en el plano inclinado son suficientes para llevar a cabo pruebas serológicas en lámina con antisueros polivalentes contra *V. cholerae* O1; si no es así, el cultivo se incuba de nuevo de un día para otro. Los aislamientos que aglutinan con el antisuero poliva-

*Aislamiento de Vibrio cholerae a partir de muestras fecales*

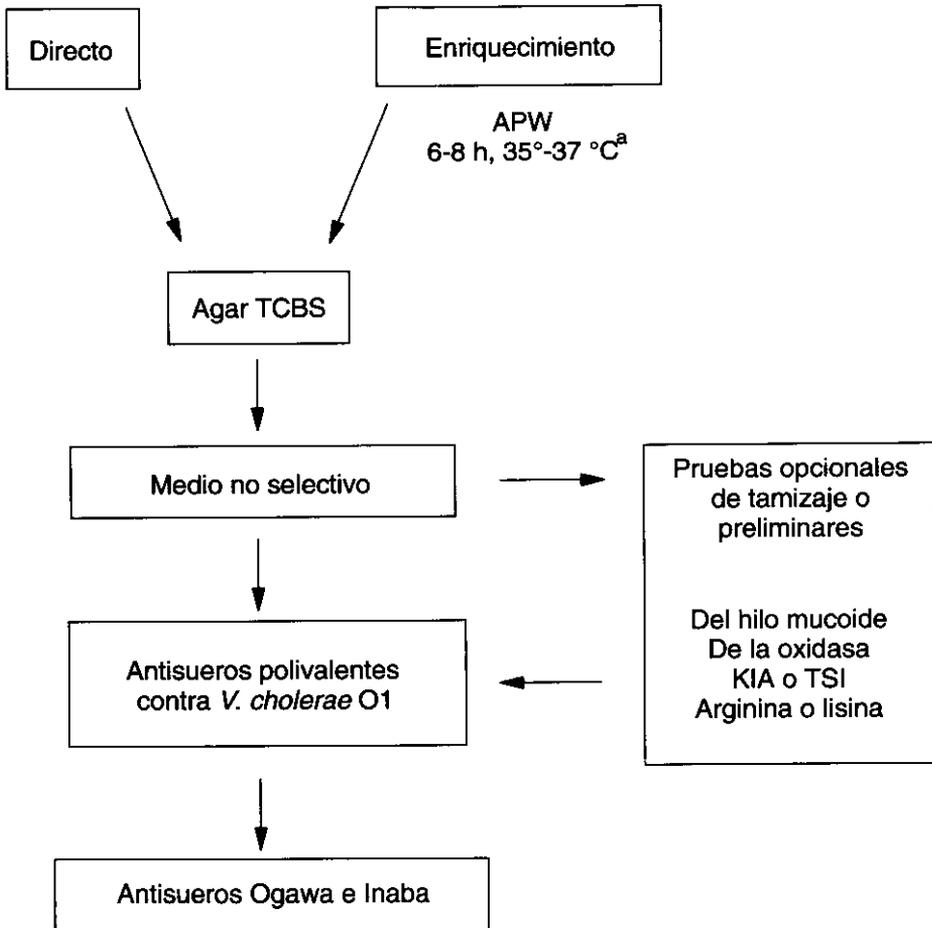


Figura IV-4. Procedimiento para aislar *V. cholerae* a partir de muestras fecales.

\* Si el cultivo en agua peptonada alcalina no se puede sembrar mediante estriación después de 6 a 8 horas de incubación, se resiembra a las 18 horas en un tubo nuevo de agua peptonada alcalina; se incuba durante 6 a 8 horas y entonces se siembra en agar TCBS mediante estriación.

## *Aislamiento de Vibrio cholerae a partir de muestras fecales*

lente contra el serogrupo O1 se identifican como presuntivo *V. cholerae* O1 (véase en el Capítulo VI, "Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio", la descripción del método de aglutinación en lámina). El presuntivo *V. cholerae* O1 se puede someter a confirmación mediante aglutinación con antisueros monovalentes o con antisueros Ogawa o Inaba; pero quizá no se necesite la confirmación de todos los aislamientos, en especial cuando el abasto de antisueros es limitado. La identificación mínima de *V. cholerae* O1 requiere solamente la confirmación serológica de la presencia de antígenos del serotipo O1 en los aislamientos presuntivos. Sin embargo, a veces es necesaria la caracterización más completa del microorganismo, lo cual puede incluir pruebas de producción de la toxina, de hemolisinas, así como la de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos e identificación bioquímica, del biotipo o del subtipo molecular. Estas pruebas solo se deben efectuar en ciertos aislamientos, como los que se han recuperado al principio de un brote o en el curso de la vigilancia epidemiológica en zonas amenazadas por el cólera epidémico. Solamente los aislamientos que se confirman como *V. cholerae* O1 por pruebas serológicas deben caracterizarse aún más. (Véase en el Capítulo II la explicación de cuándo es necesaria la caracterización adicional de los aislamientos, y en los Capítulos VI, VII y IX, la descripción de estas pruebas.)

### **5. Pruebas bioquímicas de selección**

Por lo general no son necesarias las pruebas bioquímicas de selección para los aislamientos de *V. cholerae* sospechosos a partir de muestras fecales, puesto que las pruebas en laminilla con antisueros polivalentes contra O1 bastan para la identificación presuntiva. Sin embargo, si el suministro de antisueros es limitado, pueden ser de utilidad las pruebas del hilo mucóide y de la oxidasa u otras pruebas bioquímicas para lograr la selección más completa de los aislamientos antes de practicar las pruebas con antisueros. No hay un solo procedimiento de selección de *V. cholerae* O1 que resulte ideal para todos los laboratorios y todas las muestras. El laboratorista debe elegir un procedimiento de selección con base en los recursos a su alcance (por ejemplo, las existencias de antisueros), en los tipos y el número de microorganismos competidores que probablemente haya en las muestras que se cultivan, y en la capacidad del medio selectivo de placa para inhibir el crecimiento de esos microorganismos competidores.

La prueba del hilo mucóide, en la que se utiliza un cultivo fresco en agar no selectivo, es útil para descartar los microorganismos distintos de *Vibrio* spp., particularmente *Aeromonas* spp. (Cuadro IV-2). También se puede utilizar la prueba de la oxidasa para seleccionar los microorganismos distintos de *Vibrio* spp., como los de la familia *Enterobacteriaceae*. El agar hierro de Kligler (KIA) o el agar hierro de tres azúcares (TSI) descartan *Pseudomonas* y algunas especies de *Enterobacteriaceae*. Por lo general, la prueba de la arginina es más útil que la de la lisina para seleccionar *Aeromonas* y ciertas especies de *Vibrio*, pero se puede recurrir a cualquiera de

Cuadro IV-2. Características diferenciales de determinados miembros de las familias *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae*

| Prueba                                 | Bacteria               |                       |                     |                             |                          |                                 |                           |
|--|------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|
|  | <i>Vibrio cholerae</i> | <i>Vibrio mimicus</i> | Vibriones halófilos | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Aeromonas veronii</i> | <i>Plesiomonas shigelloides</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| KIA                                    | K/A                    | K/A                   | V                   | V                           | K/AG                     | K/A                             | V                         |
| TSI                                    | A/A                    | K/A                   | V                   | V                           | A/AG                     | K/A                             | V                         |
| Hilo mucóide                           | +                      | +                     | + <sup>a</sup>      | -                           | -                        | -                               | -                         |
| Oxidasa                                | +                      | +                     | +                   | +                           | +                        | +                               | -                         |
| Gas                                    | -                      | -                     | - <sup>b</sup>      | +                           | +                        | -                               | V                         |
| (de glucosa)                           |                        |                       |                     |                             |                          |                                 |                           |
| Sacarosa                               | +                      | -                     | V                   | V                           | +                        | -                               | V                         |
| Lisina                                 | +                      | +                     | V                   | V                           | +                        | +                               | V                         |
| Arginina                               | -                      | -                     | V                   | +                           | -                        | +                               | V                         |
| Ornitina                               | +                      | +                     | V                   | -                           | +                        | +                               | V                         |
| VP                                     | V                      | -                     | V                   | V                           | +                        | -                               | V                         |
| Crecimiento en 0% de NaCl <sup>c</sup> | +                      | +                     | -                   | +                           | +                        | +                               | +                         |
| Crecimiento en 1% de NaCl <sup>c</sup> | +                      | +                     | +                   | +                           | +                        | +                               | +                         |

Nota: KIA = agar hierro de Kligler; K/A = alcalinidad/acidez; V = reacción variable; K/AG = alcalinidad/acidez y gas; TSI = agar hierro de tres azúcares; A/A = acidez/acidez; VP = Voges-Proskauer.

<sup>a</sup> *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis* y *V. damsela* dan reacciones variables.

<sup>b</sup> *V. furnissii* y *V. damsela* dan reacciones variables.

<sup>c</sup> Base de caldo nutritivo (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos).

## *Aislamiento de Vibrio cholerae a partir de muestras fecales*

estos medios. No hay necesidad de utilizar dos pruebas bioquímicas que excluyan al mismo microorganismo. Por ejemplo, si se utiliza la prueba de la arginina, por lo general no hay ventaja alguna en seleccionar también con la prueba de la lisina, en virtud de que ambos aminoácidos descartan las mismas especies. Las tapas de todos los tubos de las pruebas bioquímicas habrán de mantenerse poco apretadas antes de la incubación. Esto tiene importancia particular para los tubos con medios de KIA o TSI en plano inclinado, puesto que si las tapas están demasiado apretadas y existen condiciones anaerobias, quizá no se produzcan las reacciones características de *V. cholerae*. (En el Capítulo VI, "Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio", se puede consultar la descripción de estas pruebas bioquímicas.)

### **E. Métodos de diagnóstico rápido**

El diagnóstico rápido del cólera en el laboratorio suele resultar ventajoso para vigilar la propagación de la enfermedad y para establecer con celeridad las medidas de control. Se han obtenido y utilizado métodos diversos de detección rápida para la identificación de *V. cholerae* O1 directamente en las heces de enfermos en muy mal estado o a partir de caldos de enriquecimiento. En ciertas situaciones, estos métodos rápidos pueden ser prácticos; sin embargo, solo brindan un diagnóstico preliminar. A pesar de sus ventajas en lo que se refiere a rapidez y (en ocasiones) a las necesidades de reactivos más sencillos y de equipo, en general los métodos de diagnóstico rápido no pueden sustituir por completo a los métodos tradicionales de cultivo. Es preciso recurrir a las técnicas rutinarias cuando se necesita un aislamiento para otras pruebas, como son el análisis de la producción de toxina del cólera, la sensibilidad a los antimicrobianos, hemólisis, determinación del biotipo y subtipificación molecular. Los métodos rápidos suelen ser más útiles sobre el terreno, cuando se requiere llevar a cabo el diagnóstico inmediato para vigilar el curso de un brote de cólera.

#### **1. Métodos de microscopia de campo oscuro y de contraste de fases**

La microscopia de campo oscuro y de contraste de fases se han utilizado para diagnosticar en muestras fecales en relación con *V. cholerae*. Utilizando estas técnicas, las heces líquidas se examinan con el microscopio para identificar los microorganismos con su típica movilidad de saeta ("estrella fugaz"). La observación de la movilidad característica solo se puede considerar como una prueba de selección preliminar, y la exactitud diagnóstica no es alta si se compara con las técnicas de cultivo ordinarias.

El método de inhibición de la movilidad es aun mejor cuando se usan antisueros específicos contra *V. cholerae* O1; con este método se examinan las heces o los caldos enriquecidos a los que se les han agregado o no antisueros. Si la adición de antisueros polivalentes contra *V. cholerae* O1 suprime la movilidad, a juzgar por lo que se observa en la microscopia de campo oscuro o de contraste de fases, la prueba se considera positiva.

## *Aislamiento de Vibrio cholerae a partir de muestras fecales*

Los diluyentes para los antisueros y las heces se seleccionarán cuidadosamente para evitar la inhibición no específica de la movilidad (por ejemplo, ciertos preservativos utilizados en los antisueros, como la azida de sodio o el mertiolato). El agua destilada, al inhibir la movilidad de *V. cholerae*, no es un diluyente adecuado para las muestras de heces. Otros inconvenientes de estos métodos son los requisitos de contar con microscopía de campo oscuro o de contraste de fases y la necesaria participación de un técnico experto. Esta técnica se ha utilizado ampliamente a pesar de esos inconvenientes.

### **Procedimiento de campo oscuro**

La muestra que se prefiere es la constituida por heces líquidas (“agua de arroz”) recién obtenidas. Si la muestra es líquida pero no tiene aspecto de agua de arroz, debe diluirse en una proporción de 1:1 con solución salina antes de la prueba directa. Si la muestra de heces recién obtenida es negativa, se lleva a cabo un enriquecimiento de 6 a 8 horas en agua peptonada alcalina y se repite la prueba con el caldo enriquecido. Puede ahorrarse antisuero si primero se determina que la muestra de heces o de caldo enriquecido presenta movilidad, y solo entonces se prepara la muestra con antisuero para el examen. Debe usarse como testigo positivo una cepa móvil conocida de *V. cholerae* O1.

Para el procedimiento de campo oscuro se requieren los siguientes materiales:

- Microscopio con condensador de campo oscuro (si se utiliza lente de inmersión en aceite [100×], el objetivo debe tener un diafragma de iris)
- Antisuero polivalente contra *V. cholerae* O1
- Portaobjetos (de tamaño normal) y cubreobjetos limpios
- Solución salina fisiológica estéril o solución salina con amortiguador de fosfato, pH de 7,0 a 8,0

Para realizar la prueba, se coloca una gota del antisuero polivalente contra *V. cholerae* O1 cerca del extremo de un portaobjetos limpio. A continuación, se agrega una gota de heces con aspecto de agua de arroz recién obtenidas o una gota de caldo de enriquecimiento con agua peptonada alcalina incubado durante 6 a 8 horas y se mezcla con la gota de antisuero; se deposita también otra gota de heces o agua peptonada alcalina en el extremo opuesto de la lámina. Se colocan sendos cubreobjetos sobre las gotas en cada extremo. Utilizando el microscopio de campo oscuro, con el objetivo de 40× se examina la gota que contiene las heces o el caldo de enriquecimiento para observar la movilidad de “estrella fugaz”. Si se detecta este tipo de movilidad se examina la mezcla que contiene el antisuero. Si el microorganismo móvil es *V. cholerae* O1, la movilidad cesará por completo. Si los microorganismos que se encuentran bajo ambos cubreobjetos no son

## *Aislamiento de Vibrio cholerae a partir de muestras fecales*

móviles o si no hay diferencia entre la movilidad de una mezcla a otra, el microorganismo no es *V. cholerae* O1.

### **2. Inmunofluorescencia**

Se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia que emplean antisueños conjugados con isotiocianato de fluoresceína para observar células de *V. cholerae* O1 en diversos tipos de muestras. A pesar de su utilidad, los métodos de inmunofluorescencia no son de uso general como instrumentos de diagnóstico primario debido a las exigencias de equipo caro, reactivos inmunológicos de alta calidad y la necesaria intervención de técnicos capacitados.

### **3. Aglutinación en látex**

Para la detección del microorganismo directamente en muestras fecales, se ha empleado un estuche comercial de aglutinación en lámina (Denka Seiken, Tokio, Japón), preparado para la serotipificación de los aislamientos de *V. cholerae* O1. El estuche utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos A, B y C de *V. cholerae* O1. Durante la investigación de una epidemia de cólera, se valoró la capacidad de dicho equipo para confirmar el diagnóstico de cólera al lado del paciente utilizando hisopados rectales. La prueba de aglutinación en látex detectó 63% de los pacientes con cultivo positivo a partir de hisopados rectales, pero dio resultados positivos falsos en 12% de los pacientes con cultivo negativo. No se han determinado la sensibilidad ni la especificidad de esta prueba con muestras de heces líquidas.

### **4. Coaglutinación**

En el método de coaglutinación, los anticuerpos contra *V. cholerae* O1 se ligan a la superficie de células de *Staphylococcus aureus* (Cowan 1) sin perder su capacidad de unión al antígeno ni su especificidad. Cuando la reacción es positiva, las células estafilocócicas se unen entre sí formando una trama reticular debido a la formación de enlaces entre los anticuerpos que se encuentran en su superficie y las células de *V. cholerae*.

Los problemas con el uso de esta técnica se atribuyen a sustancias que se encuentran en las heces y que inhiben, de manera no específica, la aglutinación y la formación de trama o retícula de células estafilocócicas. Recientemente apareció en el comercio una prueba de coaglutinación basada en anticuerpos monoclonales (CholeraScreen, New Horizons Diagnostics, Columbia, Maryland) que al parecer supera los obstáculos mencionados. Son alentadores los informes de las evaluaciones del producto con muestras obtenidas de cultivos en los Estados Unidos y con muestras clínicas en Guatemala y en Bangladesh.

## **5. Otras técnicas de identificación y aislamiento rápidos**

Se han descrito otras técnicas para el diagnóstico rápido de *V. cholerae* O1 que incluyen métodos basados en la multiplicación de bacteriófagos, la adición de antisueros a los medios de crecimiento para precipitar las células de *V. cholerae* en caldo, y el uso de esferas o cuentas magnéticas o papel de nylon o nitrocelulosa cubiertos de anticuerpos para reunir físicamente, a manera de agregado, las células de *V. cholerae*.

---

## **Bibliografía**

Benenson AS, Islam MR, Greenough WB. Rapid identification of *Vibrio cholerae* by darkfield microscopy. *Bull WHO* 1964; 30:827-831.

Colwell RR, Hansan JAK, Huq A, *et al.* Development and evaluation of a rapid, simple, sensitive, monoclonal antibody-based co-agglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 97:215-220.

Gustafsson B, Holme T. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O:1 by motility inhibition and immunofluorescence with monoclonal antibodies. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4:291-294.

Morris GK, Merson MH, Huq I, Kibrya AKMG, Black R. Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 1979; 9:79-83.

Shaffer N, Silva do Santos E, Andreason P, Farmer JJ. Rapid laboratory diagnosis of cholera in the field. *Trans Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:119-120.

World Health Organization. Manual for the Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.

## 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 vibrios 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 vibrios 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.

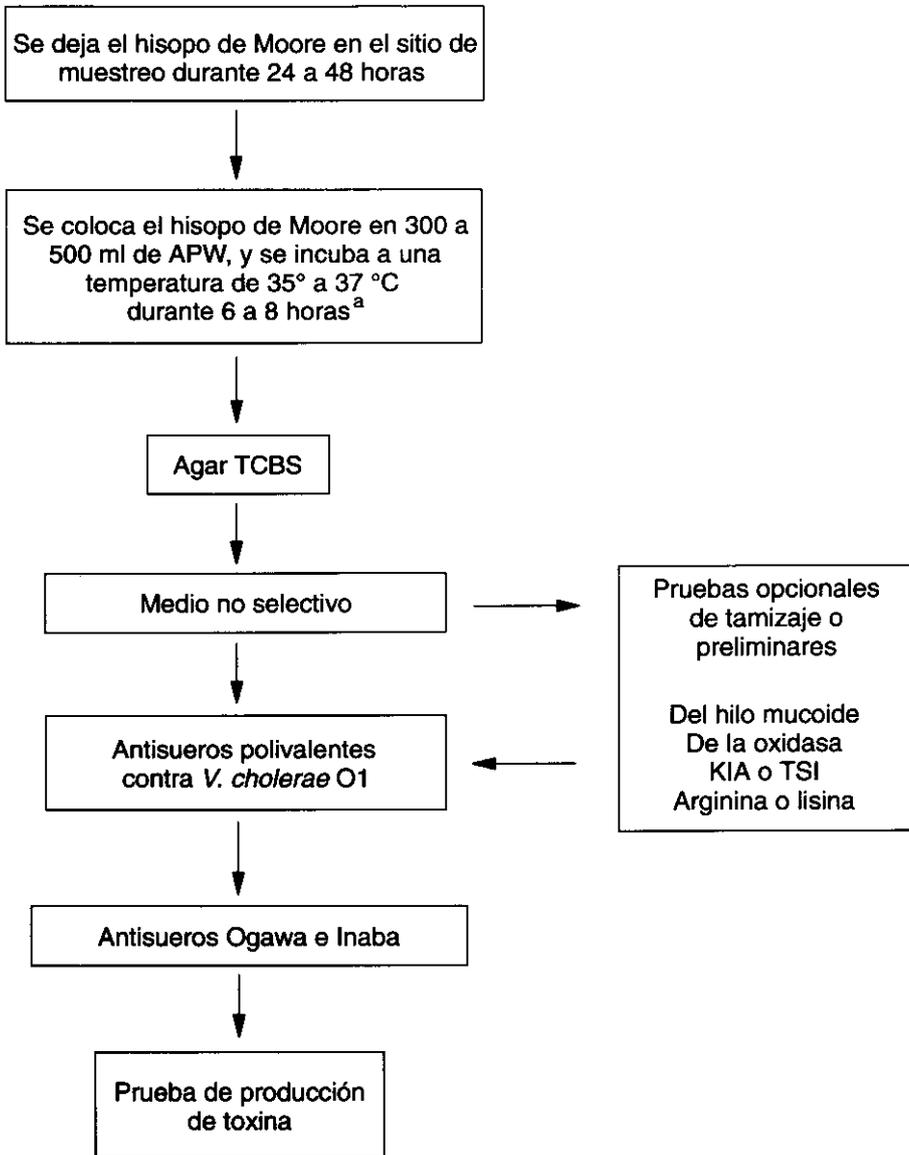


Figura V-1. Técnica del hisopo de Moore para obtener muestras de aguas residuales o agua, a fin de aislar *V. cholerae*.

<sup>a</sup>Si 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  $\mu\text{m}$  (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, T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, 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. (Veáse 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.

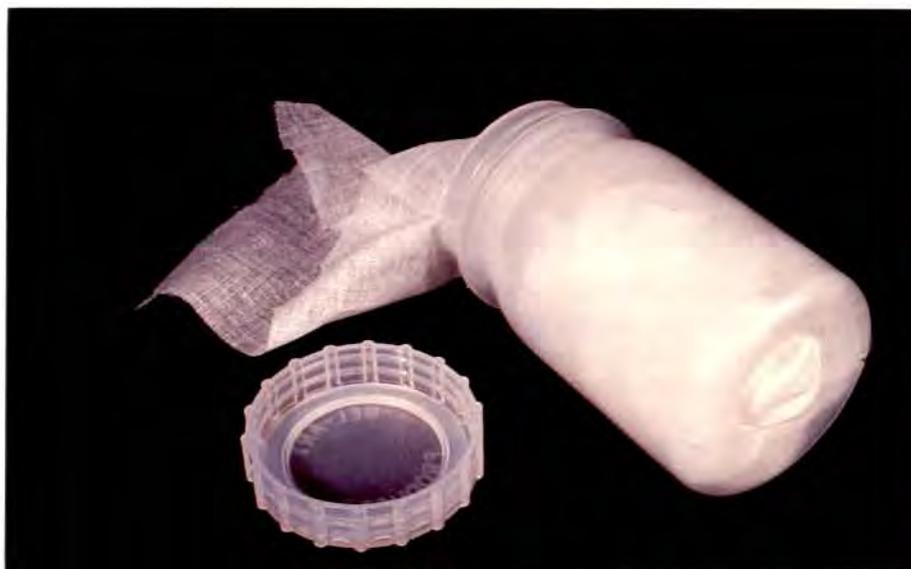


Figura V-3. La trampa de Spira se utiliza para filtrar grandes volúmenes de agua a través de una gasa de algodón, a fin de aislar *V. cholerae*.

## **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

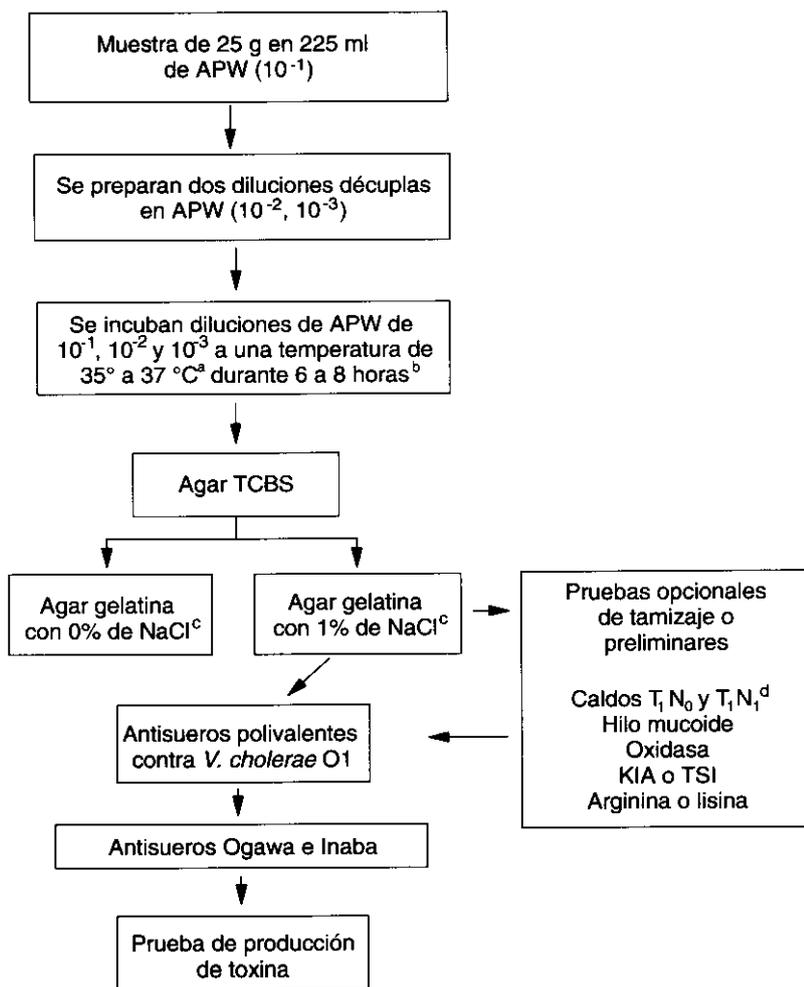


Figura V-4. Procedimiento para aislar *V. cholerae* a partir de alimentos o muestras ambientales.

<sup>a</sup>Se pueden preparar diluciones por duplicado en agua peptonada alcalina e incubarse a 42 °C.

<sup>b</sup>Si al cabo de 6 a 8 horas de incubación el APW no se puede sembrar por estrías, 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.

<sup>c</sup>Se pueden utilizar los medios de agar T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> como alternativa del agar gelatina con NaCl al 0% y 1%.

<sup>d</sup>Colonias 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 T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>, o agar de infusión de corazón) y después en caldos T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>.

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 sembrar. 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 T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> (1% de triptona y 0% de NaCl) y el agar T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (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 ulteriores.

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 T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, 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 T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 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 T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 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. (Véase 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.

## VI. Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

Los miembros del género *Vibrio* son bacilos gramnegativos curvos o rectos, anaerobios facultativos, asporógenos y móviles. Los vibriones pueden requerir NaCl o que su crecimiento se estimule por la adición de este. Todos los miembros del género *Vibrio*, con excepción de *V. metschnikovii* y *V. gazogenes*, son oxidasa positivos y reducen los nitratos a nitritos. La familia *Vibrionaceae* incluye muchas especies, que en su mayor parte son habitantes normales del ambiente acuático. De más de 30 especies del complejo *Vibrio-Photobacterium*, solo 12 se han reconocido como patógenos para el ser humano (Cuadro VI-1). Aunque la mayor parte de estas 12 especies se aíslan en caso de infecciones intestinales y extraintestinales, solo *V. cholerae* se asocia con el cólera epidémico.

Los vibriones no identificados se han denominado “especies marinas” o, simplemente, “vibriones marinos”. Estas especies marinas se definen como cepas de *Vibrio* o *Photobacterium* oxidasa positivas; fermentan la *D*-glucosa, no crecen en caldo nutritivo sin NaCl, pero crecen si este se agrega. La mayor parte de los microorganismos aislados de aguas de los océanos o los estuarios pertenecen al grupo de “vibriones marinos” y son difíciles de identificar excepto en unos cuantos laboratorios especializados. Debido a que no se asocian con enfermedades humanas, los vibriones marinos de ordinario no tienen que ser identificados. Los laboratorios clínicos y de salud pública por lo general notifican los vibriones patógenos para el ser humano indicando el género y la especie, y todos los demás como “vibriones marinos”.

La identificación mínima de *V. cholerae* O1 solo requiere la confirmación serológica de la presencia de antígenos del serotipo O1 en los aislamientos sospechosos. Sin embargo, puede ser necesaria una caracterización más completa del microorganismo que incluya diversas pruebas bioquímicas así como la determinación de otras características. El laboratorio debe decidir cuándo es apropiado realizar estas pruebas adicionales en los aislamientos clínicos, ya que no deben formar parte de la identificación común de *V. cholerae* O1. En términos generales, si el aislamiento proviene de una región amenazada por el cólera epidémico o que se encuentra en las primeras fases de un brote de cólera, es apropiado confirmar la producción de toxina del cólera y la identificación bioquímica. Otras pruebas que podrían brindar importante información de salud pública son las de hemólisis, biotipificación, subtipificación molecular y sensibilidad a los antimicrobianos. Estas pruebas solo se deben realizar en un número limitado de aislamientos. (Véase el Capítulo II, “La función del laboratorio de salud pública”.)

### A. Identificación serológica de *V. cholerae* O1

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación de *V. cholerae* O1. Aunque para el tratamiento del cólera no es necesario identificar el serogrupo y el serotipo de los aisla-

Cuadro VI-1. Ocho pruebas diferenciales clave para dividir en seis grupos las 12 especies del género *Vibrio* que tienen importancia clínica (1)

| Reacción de la especie en: | Prueba                                      |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
|----------------------------|---|------------|---------|-------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                            | Crecimiento en caldo nutritivo <sup>a</sup> |            | Oxidasa | Nitrito a nitrato | Fermentación de mio-inositol | Dihidrolasa de arginina | Descarboxilasa de lisina | Descarboxilasa de ornitina |
|                            | 0% de NaCl                                  | 1% de NaCl |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <b>Grupo 1</b>             |   |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <i>V. cholerae</i>         | +   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | +                        | +                          |
| <i>V. mimicus</i>          | +   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | +                        | +                          |
| <b>Grupo 2</b>             |   |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <i>V. metschnikovii</i>    | -   | +          | -       | -                 | V                            | V                       | V                        | -                          |
| <b>Grupo 3</b>             |   |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <i>V. cincinnatiensis</i>  | -   | +          | +       | +                 | +                            | -                       | V                        | -                          |
| <b>Grupo 4</b>             |   |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <i>V. hollisae</i>         | -   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | -                        | -                          |
| <b>Grupo 5</b>             |   |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <i>V. damsela</i>          | -   | +          | +       | +                 | -                            | +                       | V                        | -                          |
| <i>V. fluvialis</i>        | -   | +          | +       | +                 | -                            | +                       | -                        | -                          |
| <i>V. furnissii</i>        | -   | +          | +       | +                 | -                            | +                       | -                        | -                          |
| <b>Grupo 6</b>             |   |            |         |                   |                              |                         |                          |                            |
| <i>V. alginolyticus</i>    | -   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | +                        | V                          |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | -   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | +                        | +                          |
| <i>V. vulnificus</i>       | -   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | +                        | V                          |
| <i>V. carchariae</i>       | -   | +          | +       | +                 | -                            | -                       | +                        | -                          |

Nota: + = ≥90% positivo; - = <10% positivo; V (variable) = 10 a 89% positivo.

<sup>a</sup>Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos.

## Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

mientos de *V. cholerae*, esta información puede ser de importancia en epidemiología y en salud pública (Cuadro VI-2).

### 1. Serogrupos de *V. cholerae* O1

Con base en la presencia de antígenos somáticos O, se ha determinado que existen más de 130 serogrupos de *V. cholerae*. Sin embargo, solo el serogrupo O1 se relaciona con el cólera epidémico y pandémico. Otros serogrupos se pueden vincular con diarrea grave, pero no poseen el potencial epidémico de los aislamientos O1 y no aglutinan con antiseros O1. Es común el aislamiento de *V. cholerae* distinto de O1 en muestras tomadas de fuentes ambientales, a pesar de la ausencia de casos de diarrea. Debido a la posibilidad de confusión, los laboratorios pueden optar por no informar el aislamiento de *V. cholerae* distinto de O1 o informan como *V. cholerae* no O1, pero cuando se investigan las epidemias de cólera algunos prestadores de atención de salud o los funcionarios de sanidad quizá no conozcan las importantes diferencias epidemiológicas entre los aislamientos O1 y los distintos del O1. El nombre "*Vibrio cholerae*" escrito en un informe de laboratorio puede llevar a concluir, erróneamente, que un aislamiento distinto de O1 tiene importancia epidemiológica. La confusión se puede evitar con solo informar si se aisló o no *V. cholerae* serogrupo O1.

### 2. Serotipos de *V. cholerae* O1

Los aislamientos del serogrupo O1 de *V. cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (muy raro). La identificación del serotipo se basa en la aglutinación con antiseros dirigidos contra antígenos tipospecíficos O (véase el Cuadro VI-3). La identificación de estos antígenos es válida solamente con aislamientos de serogrupos O1. Por esta razón, los antiseros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas

Cuadro VI-2. Características de *Vibrio cholerae*

| Sistemas de tipificación | Relacionados con epidemias             | No relacionados con epidemias  |
|--------------------------|--|--|
| Serogrupos               | O1                                     | Distintos del O1 (existen > 130)   |
| Biotipos                 | Clásico y El Tor                       | Los biotipos no se aplican a las cepas que no son O1                       |
| Serotipos                | Inaba, Ogawa e Hikojima                | Estos 3 serotipos no se aplican a las cepas que no son O1                  |
| Producción de toxina     | Produce toxina del cólera <sup>a</sup> | Generalmente no producen toxina del cólera, a veces producen otras toxinas |

<sup>a</sup>Existen cepas O1 que no son toxigénicas, pero no están relacionadas con epidemias.

Cuadro VI-3. Serotipos de *V. cholerae* serogrupo O1

| Serotipo | Principales factores<br>O presentes | Aglutinación en suero absorbido |       |
|----------|-------------------------------------|---------------------------------|-------|
|          |                                     | Ogawa                           | Inaba |
| Ogawa    | A, B                                | +                               | -     |
| Inaba    | A, C                                | -                               | +     |
| Hikojima | A, B, C                             | +                               | +     |

que son negativas frente a los antisueros polivalentes O1. Los aislamientos que aglutinan débil o lentamente con los antisueros del serogrupo O1 pero no aglutinan con los antisueros Inaba ni Ogawa no se consideran del serogrupo O1.

Las cepas de un serotipo frecuentemente reaccionan en forma cruzada, lenta y débilmente con el antisuero de otro serotipo, lo cual depende de cuán bien sean absorbidos los antisueros específicos para el serotipo. Las reacciones de aglutinación con antisueros Inaba y Ogawa se examinarán de manera simultánea, y la reacción más intensa y más rápida dará la pauta para identificar el serotipo. Si los antisueros están absorbidos adecuadamente, son raras las cepas que aglutinan con una reacción vigorosa e igual con los antisueros Ogawa e Inaba. Si se sospecha de tales reacciones, las cepas se enviarán a un laboratorio de referencia para examen más a fondo, designándolas como "posible serotipo Hikojima".

### 3. Aglutinación en lámina

Las pruebas de aglutinación para los antígenos somáticos O de *V. cholerae* se pueden llevar a cabo en una caja de Petri o en una lámina de vidrio limpia. Para retirar una porción del cultivo de la superficie del agar de infusión de corazón (HIA), agar hierro de Kligler (KIA), agar de tres azúcares (TSI) u otro medio de agar no selectivo, se puede utilizar un asa de inoculación, una aguja, un aplicador estéril o un palillo de dientes. Dicha porción se emulsifica en una gota pequeña de suero fisiológico y se mezcla muy bien mediante movimientos de balance de la lámina hacia atrás y adelante durante cerca de 30 segundos. Se examina la suspensión cuidadosamente para comprobar que sea uniforme y no tenga grumos producidos por la autoaglutinación. Si se observa aglutinación, el cultivo se considerará "rugoso" y por lo tanto no se puede serotipificar. Si la suspensión es lisa (turbia y fluida), se le agrega una pequeña gota de antisuero. Por lo general, se mezclan volúmenes casi iguales del antisuero y la suspensión de colonias, pero el volumen de suspensión puede ser hasta el doble del volumen de antisuero. Para ahorrar antisuero se pueden utilizar volúmenes muy pequeños, incluso de 10 µl. Se mezclan bien la suspensión y el antisuero, y se

balancea la lámina hacia atrás y adelante para observar la aglutinación. Si la reacción es positiva, en un lapso de 30 segundos a 1 minuto aparece una aglutinación muy intensa (Figura VI-1).

### **B. Identificación bioquímica de *V. cholerae***

Debido a que la confirmación de *V. cholerae* O1 requiere tan solo la identificación de los antígenos del serotipo O1 por aglutinación en lámina, la confirmación bioquímica rara vez es necesaria (véase el Capítulo II, "La función del laboratorio de salud pública"). En el Cuadro VI-4 se presenta una breve lista de pruebas bioquímicas que se pueden utilizar para confirmar aislamientos de *V. cholerae*. Si los resultados de las pruebas con un aislamiento son los mismos que se muestran en el Cuadro VI-4, la identificación del aislamiento se confirma como *V. cholerae*. Sin embargo, si el aislamiento no da los resultados que se muestran en el cuadro, será necesario aplicar pruebas adicionales para la identificación. Véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones para preparar los medios de cultivo y los reactivos para las pruebas bioquímicas que se muestran en el Cuadro VI-4. El uso de los medios de cultivo KIA o TSI, las pruebas de la oxidasa y del "hilo mucoso", y las reacciones de arginina y lisina pueden ser útiles para seleccionar aislamientos que parezcan

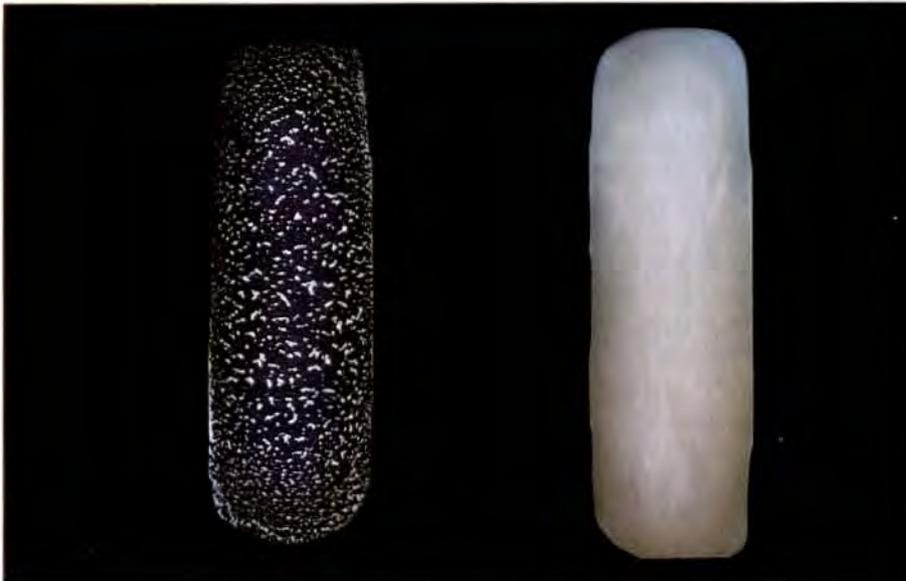


Figura VI-1. Los antisueros contra el serogrupo O1 de *V. cholerae* aglutinan los microorganismos homólogos (izquierda). Un testigo de suero normal o de solución salina (derecha) no presenta aglutinación.

Cuadro VI-4. Características bioquímicas de aislamientos típicos de *V. cholerae* O1

| Prueba                                     | % Positivo                         |
|--|------------------------------------|
| Oxidasa                                    | 100                                |
| Hilo mucoide                               | 100                                |
| Agar hierro de Kligler                     | K/A, sin gas, sin H <sub>2</sub> S |
| Agar hierro de tres azúcares               | A/A, sin gas, sin H <sub>2</sub> S |
| Glucosa <sup>a</sup> (producción de ácido) | 100                                |
| Glucosa (producción de gas)                | 0                                  |
| Sacarosa (producción de ácido)             | 100                                |
| Lisina <sup>a</sup>                        | 99                                 |
| Arginina <sup>a</sup>                      | 0                                  |
| Ornitina <sup>a</sup>                      | 99                                 |
| Crecimiento en 0% de NaCl <sup>b</sup>     | 100                                |
| Crecimiento en 1% de NaCl <sup>b</sup>     | 100                                |
| Voges-Proskauer <sup>a</sup>               | 75 <sup>c</sup>                    |

Nota: K/A = alcalinidad/acidez; A/A = acidez/acidez.

<sup>a</sup>Modificada mediante la adición de 1% de NaCl.

<sup>b</sup>Base de caldo nutritivo (Difco Laboratories).

<sup>c</sup>La mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* serotipo O1, biotipo El Tor, dan positiva la prueba de Voges-Proskauer, mientras que las cepas del biotipo clásico la dan negativa.

*V. cholerae*. Los procedimientos de selección para muestras fecales y ambientales se exponen en los Capítulos IV y V.

### 1. Prueba de la oxidasa

La prueba de la oxidasa se lleva a cabo con colonias aisladas recientemente en agar de infusión de corazón (HIA) con plano inclinado o en cualquier otro medio que no contenga carbohidratos. No se utilizarán colonias aisladas en agar TCBS. Se colocan dos o tres gotas del reactivo de oxidasa (tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%) sobre un pedazo de papel filtro en una caja de Petri. Se extiende el cultivo sobre el papel húmedo con un asa de platino (no de nicromio), un aplicador de madera o un palillo de dientes estéril. En una reacción positiva, el cultivo bacteriano se torna morado oscuro en 10 segundos (Figura VI-2). No se toma en cuenta el color que aparezca después de 10 segundos. Deben probarse al mismo tiempo testigos positivo y negativo. Los microorganismos de los géneros *Vibrio*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes* son oxidasa positivos; los de la familia *Enterobacteriaceae* son oxidasa negativos.

### 2. Prueba del hilo mucoide

La prueba de la hebra o hilo mucoide se puede realizar en un portaobjetos o en una caja de Petri de plástico, donde se suspenden colonias (ob-



Figura VI-2. Una prueba positiva de la oxidasa (como se muestra aquí) da por resultado la aparición de un color morado oscuro en 10 segundos. *V. cholerae* es oxidasa positivo, lo cual lo diferencia de los microorganismos oxidasa negativos tales como los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

tenidas por cultivo durante 18 a 24 horas en agar de infusión de corazón u otro medio no inhibitorio) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato, con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado de las células lisadas ocasionará que la mezcla se haga viscosa. Al retirar lentamente de la suspensión el asa, se forma un "hilo" mucoso (Figura VI-3). La mayor parte de los vibriones son positivos, en tanto que las cepas de *Aeromonas* suelen ser negativas.

### 3. Agar hierro de Kligler o agar hierro de tres azúcares

El agar hierro de Kligler (KIA) y el agar hierro de tres azúcares (TSI) son medios selectivos que contienen carbohidratos y son de uso general en la microbiología de diagnóstico. Aunque se usan de modo parecido, contienen distintos carbohidratos. Las reacciones de *V. cholerae* en KIA, que contiene glucosa y lactosa, son similares a las de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que no fermentan la lactosa (K/A, y no producen gas ni  $H_2S$ ) (Figura VI-4). El medio TSI, que contiene sacarosa además de glucosa y lactosa, presenta reacciones de A/A y no produce gas ni  $H_2S$ . Los tubos de KIA o TSI con plano inclinado se inoculan mediante picadura y estriación. Los tubos se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C y se

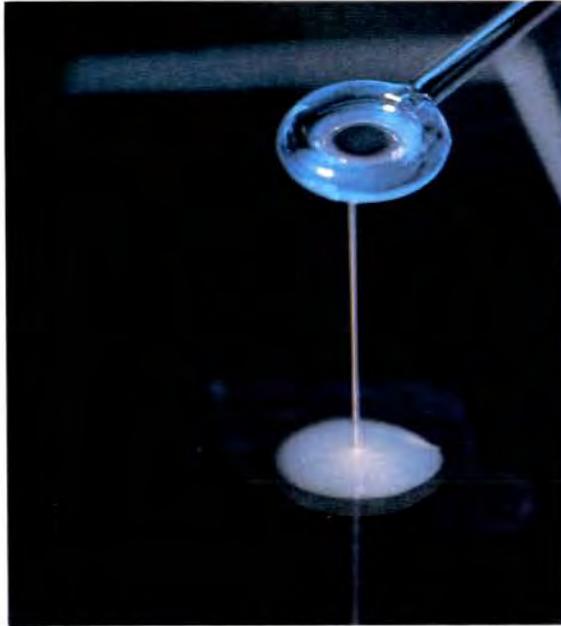


Figura VI-3. Se muestra aquí una prueba del hilo mucoide positiva con *V. cholerae*; es un método rápido y sencillo para distinguir entre el género *Vibrio* (fundamentalmente positivo) y *Aeromonas* (casi siempre negativo).

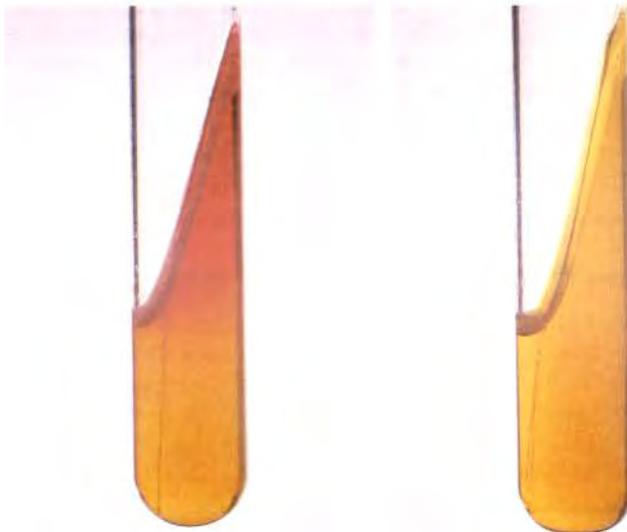


Figura VI-4. Reacciones de *V. cholerae* en agar hierro de Kligler (izquierda) y agar hierro de tres azúcares (derecha).

examinan después de 18 a 24 horas. Las tapas de todos los tubos de las reacciones bioquímicas deben mantenerse poco apretadas antes de la incubación, pero esta condición es particularmente importante para los tubos de KIA y agar TSI. Si las tapas están demasiado apretadas y existen condiciones anaerobias en dichos tubos, las reacciones características de *V. cholerae* quizá no se presenten y puede ocurrir una reacción inapropiada.

#### **4. Carbohidratos**

Los caldos de glucosa y sacarosa deben inocularse ligeramente con cultivos recién obtenidos. Los caldos se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C y se observan a las 24 horas. Si las pruebas de fermentación son negativas a las 24 horas, hay que incubarlos hasta 7 días. Cuando se utiliza indicador de Andrade en el medio de cultivo, la producción de ácido se pone de manifiesto por la aparición de color rosado (Figura VI-5). *V. cholerae* fermenta la glucosa y la sacarosa, pero no produce gas a partir de ellas.

#### **5. Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa**

Los caldos para las pruebas de arginina, lisina, ornitina y testigo (sin aminoácidos), modificados por la adición de 1% de NaCl, se inoculan ligera-

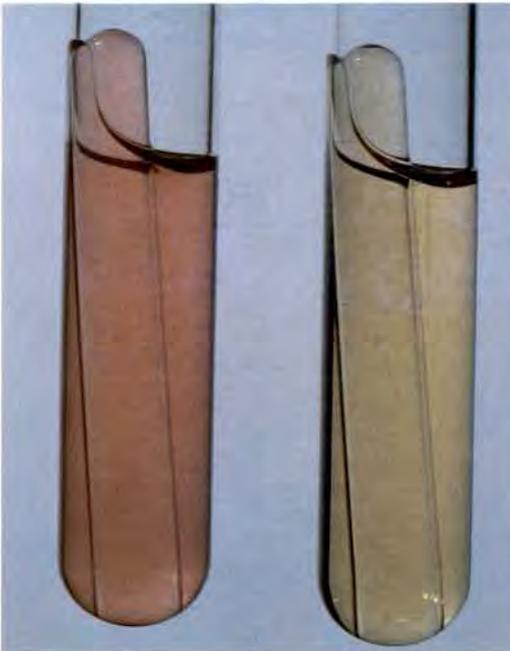


Figura VI-5. Con el indicador de Andrade en el medio de carbohidratos, si hay fermentación aparece un color rosado; en las reacciones negativas el color es amarillo.

### Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

mente a partir de un cultivo recién obtenido. Al caldo en cada tubo se agrega una capa superficial de aceite mineral estéril de 4 a 5 mm de espesor. Se incuba a una temperatura de 35° a 37 °C y se lee a las 24 y 48 horas, pero si la prueba es negativa se incuba hasta 7 días. Cuando se utilizan como indicadores el púrpura de bromocresol y el rojo de cresol, una reacción alcalina (positiva) da color morado, en tanto que una reacción negativa o ácida se indica por un color amarillo (Figura VI-6). La prueba es válida solamente si el tubo testigo permanece negativo (amarillo). *V. cholerae* es típicamente positivo para la descarboxilasa de lisina, en tanto que otras especies de *Vibrio* son negativas y las de *Aeromonas* dan reacciones variables. *V. cholerae* es típicamente negativo para la dihidrolasa de arginina, en tanto que *Aeromonas*, *Plesiomonas* y ciertas especies de *Vibrio* son positivos. *V. cholerae* es positivo para la descarboxilasa de ornitina.

#### **Tubos de agar con hierro y lisina y de glucosa con arginina de plano inclinado**

En lugar del caldo de lisina (véase el párrafo precedente), para investigar la producción de descarboxilasa de lisina se puede usar un tubo de agar con hierro y lisina (LIA) de plano inclinado. De modo análogo, en lugar del caldo de arginina, para investigar la producción de dihidrolasa de arginina se puede utilizar un tubo semejante de glucosa con arginina (AGS; Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. *Bacteriological Analytical Manual*, 6ª edición. Arlington, Virginia:



Figura VI-6. Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa para *V. cholerae*; de izquierda a derecha: lisina (+), arginina (-), ornitina (+) y testigo (-).

Association of Official Analytical Chemists, 1992). Estos tubos de plano inclinado se utilizan con mayor frecuencia como parte del proceso de selección (véanse los Capítulos IV y V). Los tubos de LIA y AGS se inoculan mediante picadura y estriación. Los microorganismos que producen descarboxilasa de lisina en LIA (o dihidrolasa de arginina en AGS) causan una reacción alcalina (color morado) en todo el medio. Los microorganismos que no poseen estas enzimas producen típicamente una superficie alcalina (morado) y un fondo ácido (amarillo). *V. cholerae* da una reacción K/K en LIA (lisina positiva), pero produce una reacción K/A (arginina negativa) en AGS.

## 6. Caldos con sal

Los caldos con sal al 0% y al 1% (base de caldo nutritivo [Difco Laboratories, Detroit, Michigan]; véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones especiales para la preparación de los caldos con sal) se inoculan muy ligeramente con un cultivo recién obtenido. El inóculo debe ser tan ligero que no cause turbiedad antes de incubar los caldos. Los caldos se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C y se leen a las 18 a 24 horas. Si no hay crecimiento de un día para otro, se incuban hasta 7 días (Figura VI-7).

## 7. Prueba de Voges-Proskauer

El laboratorio de referencia de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) utiliza una modificación de la prueba de Voges-Proskauer que aumenta la sensibilidad con los vibriones. Según esta



Figura VI-7. *V. cholerae* crece en ausencia de NaCl (tubo B), pero el crecimiento se ve estimulado al agregarse NaCl al 1% (tubo A). El tubo C, NaCl al 0%, inoculado con *V. parahaemolyticus*, no muestra crecimiento.

## Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

modificación, en el medio (caldo de Voges-Proskauer con rojo de metilo [MR-VP] ) se incorpora 1% de NaCl; además, el reactivo A consiste en 5% de alfa naftol en etanol absoluto, y el reactivo B es una solución de 0,3% de creatina en 40% de hidróxido de potasio (KOH). El microorganismo de prueba se incuba en el caldo de MR-VP durante 48 horas antes de que se agreguen los reactivos A y B. Un color rojo cereza indica una reacción positiva (Figura VI-8).

### 8. Sensibilidad al compuesto vibriostático O/129

La sensibilidad de los microorganismos al fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina (denominado compuesto O/129 o vibriostático) se ha recomendado y usado como un método primario para diferenciar entre *Vibrio* (sensible al O/129) y *Aeromonas* (resistente al O/129). Si bien la mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* han sido sensibles al O/129, varios informes recientes han descrito aislamientos clínicos y ambientales que fueron resistentes a este compuesto. En dichos informes, aislamientos de *V. cholerae* O1 y distintos de O1 fueron resistentes a 10 y 150  $\mu\text{g}$  de O/129, a semejanza de *Aeromonas*. Debe tenerse precaución cuando se recurre a esta prueba.

### C. Pruebas de hemólisis

Históricamente, los biotipos clásico y El Tor se diferenciaban por la capacidad del grupo El Tor para lisar los eritrocitos. Sin embargo, hacia 1972 casi todos los aislamientos de El Tor en el mundo eran no hemolíticos. Las

Figura VI-8. *V. cholerae* produce acetoina, la cual se detecta en la prueba de Voges-Proskauer por la aparición (reacción positiva) de un color rojo (izquierda). A la derecha se observa una reacción negativa.



dos excepciones de esta tendencia han sido las clonas de *V. cholerae* O1 encontradas en las aguas del Golfo de México correspondientes a los Estados Unidos y en Australia, que son intensamente hemolíticas cuando se analizan en placa o en tubo (Cuadro VI-5). Por esta razón, la hemólisis sigue siendo un rasgo fenotípico útil para diferenciar las clonas de *V. cholerae* O1 de las dos regiones mencionadas de las cepas El Tor del resto del mundo, incluida América Latina.

### 1. Hemólisis en placa

Para obtener colonias aisladas, deben inocularse por estriación placas de agar sangre que contengan de 5% a 10% de sangre de carnero. Las placas se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C durante 18 a 24 horas. Las colonias hemolíticas presentan zonas claras alrededor cuando se han lisado por completo los eritrocitos, y una cepa hemolítica presuntamente se debe comparar con una cepa testigo intensamente hemolítica (Figura VI-9). Las cepas que producen hemólisis incompleta (los eritrocitos no desaparecen por completo) no se deben notificar como hemolíticas.

En placas de agar sangre de carnero y en condiciones aerobias, *V. cholerae* no hemolítico frecuentemente produce una franja verdosa alrededor de las colonias confluentes, pero no en torno de las colonias bien aisladas. Este fenómeno, descrito con frecuencia como "hemodigestión", se produce por la inhibición de los subproductos metabólicos que se producen durante la incubación anaerobia de la placa de agar sangre. Por esta razón, cuando el crecimiento sucede en condiciones aerobias, la hemólisis se determinará alrededor de las colonias aisladas, no en las zonas de confluencia de colonias. Asimismo, las placas de agar sangre en condiciones aerobias no deben incubarse por más de 18 a 24 horas, ya que el efecto de hemodigestión se ve acentuado por períodos de incubación más largos.

La incubación aerobia de la placa durante 24 horas como máximo, aunque no es óptima para la detección de hemólisis, permitirá la diferencia-

Cuadro VI-5. Actividad hemolítica de *V. cholerae* O1, biotipos clásico y El Tor

| Biotipo/ubicación                                      | Actividad hemolítica |
|--|----------------------|
| Clásico  | Negativa             |
| El Tor/Australia                                       | Fuertemente positiva |
| El Tor/Costa del Golfo de México en los Estados Unidos | Fuertemente positiva |
| El Tor/América Latina                                  | Negativa             |
| El Tor/Asia, África, Europa, Pacífico*                 | Negativa             |

\*Cepas aisladas entre 1963 y 1992.



Figura VI-9. Cepa hemolítica de *V. cholerae* en una placa de agar con sangre de carnero.

ción de cepas intensamente hemolíticas, tales como las clonas de las aguas del Golfo de México correspondientes a los Estados Unidos y las de Australia, de las cepas no hemolíticas latinoamericanas. Si los resultados de la hemólisis en placa no son concluyentes, se recurre al método de hemólisis en tubo, el cual tiene menos riesgo de una falsa interpretación.

## 2. Hemólisis en tubo

Testigos: se utilizan dos cepas bien caracterizadas de *V. cholerae*; una debe ser acentuadamente hemolítica, y la otra, no hemolítica.

- 1) Se lavan 20 ml de eritrocitos de carnero en 25 ml de solución salina con amortiguador de fosfato (PBS), 0,01 M, pH de 6,8 a 7,2. El lavado se repite dos veces en cada ciclo, y se practican en total tres ciclos. Se prepara una suspensión al 1% (volumen/volumen) de concentrado ("paquete") de eritrocitos de carnero en PBS.
- 2) A partir del cultivo recién obtenido, las cepas de prueba y las testigo se inoculan en caldo de infusión de corazón (o caldo de tripticasa de soya) con 1% de glicerol (pH 7,4) y se incuban a una temperatura de 35° a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se centrifuga cada caldo para sedimentar las células bacterianas; se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- 3) Se divide el sobrenadante en dos porciones iguales. Una alícuota se calienta a 56 °C durante 30 minutos. Se hacen diluciones dobles seriadas

en PBS (se diluye hasta 1:1.024) de los sobrenadantes calentados y no calentados.

- 4) Se agregan 0,5 ml de la suspensión al 1% de eritrocitos de carnero en PBS a 0,5 ml de cada dilución del sobrenadante.
- 5) Se incuban en baño de María a 37 °C durante dos horas. Se retiran las suspensiones del baño y se mantienen a 4 °C de un día para otro.
- 6) Se examinan en busca de signos de hemólisis. Los eritrocitos no lisados se depositarán en el fondo del tubo de prueba y formarán un “botón” (Figura VI-10). Si los eritrocitos se lisan por efecto de la hemolisina, no habrá botón. Los títulos de hemolisina se expresarán como la dilución más alta en la que se presentó hemólisis completa.
- 7) Se comparan los resultados de los sobrenadantes calentados y no calentados. Los tubos calentados no deben presentar hemólisis, ya que la hemolisina de *V. cholerae* es termolábil y, si se encuentra, se inactiva por la incubación a 56 °C (paso 3, arriba). Los títulos de 2 a 8 se consideran intermedios, y los de 16 o mayores, intensamente positivos.

#### **D. Pruebas para determinar los biotipos de *V. cholerae* O1**

La diferenciación de *V. cholerae* O1 en los biotipos clásico y El Tor no es necesaria para el control o tratamiento de los pacientes, pero puede

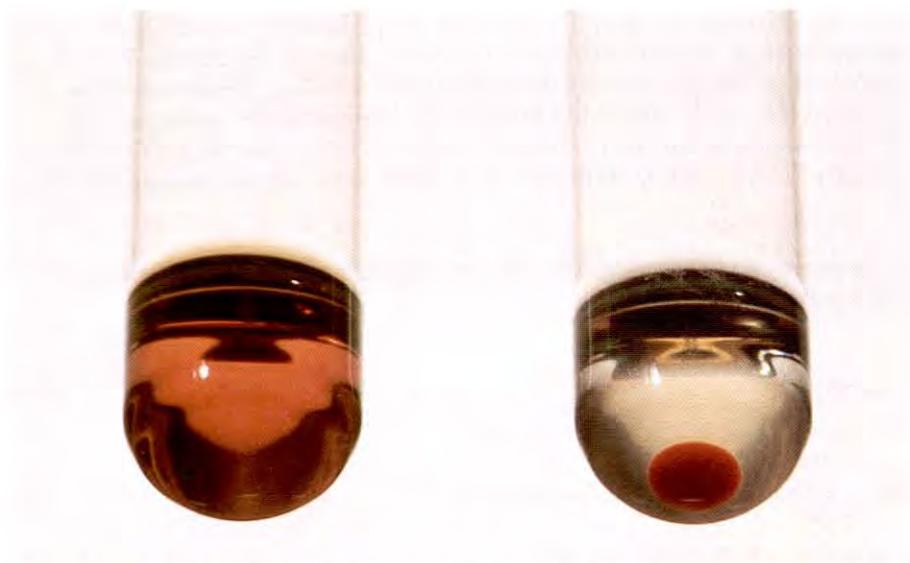


Figura VI-10. En el tubo de la izquierda se muestra la prueba de hemólisis en tubo, caracterizada por la ausencia de un “botón” de eritrocitos sedimentados y la presencia de hemoglobina libre en el sobrenadante.

## Identificación de *Vibrio cholerae* en el laboratorio

ser de importancia en salud pública o en epidemiología para ayudar a identificar la fuente de la infección; particularmente cuando el cólera se diagnostica por primera vez en un país o zona geográfica. Solamente se debe biotipificar un número limitado de aislamientos cuidadosamente seleccionados. La biotipificación no es apropiada para *V. cholerae* distinto de O1, y las pruebas pueden dar resultados atípicos para *V. cholerae* O1 no toxigénico. Las pruebas enumeradas en el Cuadro VI-6 se utilizan corrientemente para determinar el biotipo de *V. cholerae* O1. Se deben utilizar por lo menos dos de estas pruebas para determinar el biotipo, debido a que los resultados varían entre los distintos aislamientos.

El biotipo El Tor es el que predomina actualmente en todo el mundo y es el único que se ha aislado en el continente americano. Es raro observar el biotipo clásico, excepto en Bangladesh.

### 1. Prueba de Voges-Proskauer

Para diferenciar entre los biotipos El Tor y clásico de *V. cholerae* O1, se utiliza la prueba de Voges-Proskauer. Por lo común, los biotipos clásicos dan resultados negativos, mientras que los aislamientos de El Tor generalmente son positivos.

### 2. Sensibilidad a la polimixina B

Para diferenciar los biotipos de *V. cholerae* O1 se ha utilizado la sensibilidad al antimicrobiano polimixina B (véase en la sección E de este capítulo la descripción de los procedimientos de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos). En esta prueba se utiliza un disco de polimixina B de 50 unidades (Mast Diagnostics, Merseyside, Reino Unido) y cepas conocidas de biotipo clásico y El Tor como testigos. El biotipo El Tor suele ser resistente a esta concentración de polimixina B y no da una zona de inhibición (Figura VI-11). Si hay cualquier duda sobre el resultado de esta prueba, se

Cuadro VI-6. Diferenciación de los biotipos clásico y El Tor de *V. cholerae* serogrupo O1

| Propiedad   | Biotipo |        |
|---|---------|--------|
|   | Clásico | El Tor |
| Prueba de Voges-Proskauer (modificada con 1% de NaCl) | -       | +      |
| Zona alrededor del disco de polimixina B (50 U)       | +       | -      |
| Aglutinación de eritrocitos de pollo                  | -       | +      |
| Lisis por bacteriófago:                               |         |        |
| clásico IV  | +       | -      |
| El Tor 5  | -       | +      |

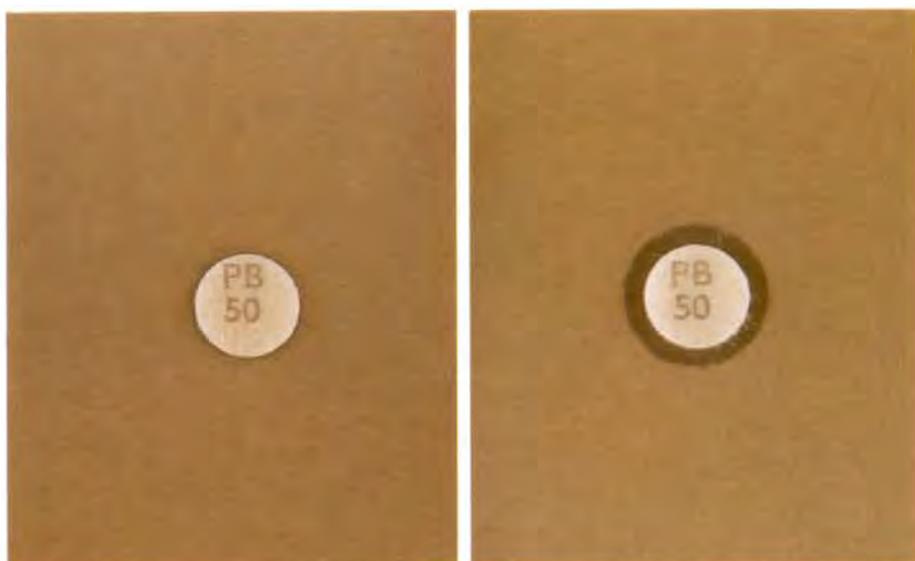


Figura VI-11. La cepa El Tor de *V. cholerae* O1, a la izquierda, es resistente a la acción del antimicrobiano polimixina B (disco de 50 unidades). La cepa clásica de *V. cholerae* O1, a la derecha, muestra una zona característica de inhibición.

realizan otras pruebas de biotipificación o el aislamiento se envía para confirmación a un laboratorio de referencia. Las cepas clásicas, por lo general, son sensibles a la polimixina B y darán una zona de inhibición. Debido a que el tamaño de la zona no es importante, cualquier zona se interpreta como un resultado positivo.

### 3. Hemaglutinación (prueba directa)

Se pueden utilizar eritrocitos frescos de pollo o de carnero para este análisis. A partir de eritrocitos lavados (tres veces) y concentrados (por centrifugación) se prepara una suspensión al 2,5% (volumen/volumen) en solución salina normal, después del lavado final. Se coloca una gran asada de suspensión de eritrocitos en una lámina de vidrio. Con una aguja o asa se toma una porción pequeña de colonias cultivadas en agar no selectivo y se mezcla bien con los eritrocitos. Cuando la prueba es positiva, la aglutinación de los eritrocitos ocurre en 30 a 60 segundos (Figura VI-12). Con cada nueva suspensión de eritrocitos se deben utilizar cepas testigo hemaglutinante (El Tor) y no hemaglutinante (clásica). Las cepas de *V. cholerae* O1 clásico que llevan mucho tiempo en el laboratorio o que son producto de pases repetidos en caldo pueden causar hemaglutinación y no deben utilizarse como testigos.



Figura VI-12. *V. cholerae* O1 biotipo El Tor aglutina los eritrocitos de carnero como se muestra a la izquierda. El biotipo clásico de *V. cholerae* O1, a la derecha, no aglutina los eritrocitos.

#### 4. Sensibilidad a los bacteriófagos

Se puede determinar el biotipo por la sensibilidad de un aislamiento del serogrupo O1 de *V. cholerae* a un bacteriófago específico. Las cepas clásicas de *V. cholerae* O1 son sensibles al bacteriófago del cólera "clásico IV"; los aislamientos de El Tor son sensibles al bacteriófago "El Tor 5". Aunque estas pruebas son muy confiables, la propagación, el almacenamiento y el uso de bacteriófagos es técnicamente muy exigente y por lo común se realiza en muy pocos laboratorios de referencia. Si se requiere la determinación del biotipo mediante sensibilidad a bacteriófagos, debe realizarla un laboratorio que utilice comúnmente este método.

A continuación se describe en forma resumida el uso de bacteriófagos en la biotipificación de *V. cholerae* O1. El aislamiento que se va a someter a prueba proviene de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no inhibitorio. La muestra se inocula en caldo de infusión de cerebro y corazón (o caldo con tripticasa de soja) y se incuba durante 6 horas a una temperatura de 35° a 37 °C. A continuación, se siembra una muestra del aislamiento en la fase exponencial (logarítmica) del crecimiento (densidad óptica = 0,1) en una placa de agar de infusión de cerebro y corazón; para ese efecto, se humedece un hisopo de algodón en el caldo de 6 horas y se frota ligeramente toda la superficie. Las cepas testigo positiva y negativa también se deben inocular. Se aplica al cultivo bacteriano confluyente una gota

del bacteriófago a la dilución de prueba establecida (una medida de la concentración de partículas del bacteriófago activo). La placa se incuba de 18 a 24 horas y se lee entonces. Si las bacterias son sensibles al bacteriófago, se lisarán y habrá una zona de lisis en la capa de crecimiento confluyente.

### **E. Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (método de difusión de disco en agar)**

Debido a que la resistencia antimicrobiana ha sido un problema que va en aumento en algunas partes del mundo, la sensibilidad de las cepas de *V. cholerae* O1 a los antimicrobianos debe vigilarse periódicamente. Aunque la técnica de difusión de disco es el método más corriente para efectuar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, no se han establecido criterios interpretativos para *V. cholerae* O1 y se desconoce la confiabilidad del método para este microorganismo. Se deben utilizar los métodos de dilución en agar o en caldo para obtener resultados exactos de sensibilidad de *V. cholerae* O1. En el *Manual of Clinical Microbiology* se encuentra la descripción de estos procedimientos. Si un laboratorio no puede efectuar de rutina una de las técnicas de dilución, se utilizará el método de difusión de disco para investigar la resistencia antimicrobiana. En el Cuadro VI-7 se presentan los criterios de interpretación para los agentes antimicrobianos actualmente recomendados por la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento del cólera (tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, trimetoprima-sulfametoxazol, eritromicina y cloranfenicol) así como para otros antimicrobianos de uso común. Estos criterios, que se han estandarizado para la familia *Enterobacteriaceae*, pueden servir provisionalmente como pautas sobre el tamaño de la zona de inhibición para detectar la resistencia a los antimicrobianos de *V. cholerae* O1 hasta que se validen los criterios de interpretación. Al hacer la selección con el método de difusión de disco, cualquier aislamiento que encaje en la categoría de resistencia o sensibilidad intermedia se debe someter a prueba con un método de dilución para determinar la concentración inhibitoria mínima del fármaco en cuestión.

#### ***Procedimiento para la difusión de disco en agar***

Para conocer una descripción más completa de este método, se sugiere al lector consultar el *Manual of Clinical Microbiology*.

El agar de Mueller-Hinton debe prepararse y esterilizarse en el autoclave de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez que se ha enfriado aproximadamente a 50 °C en baño de María, el medio se vacía en cajas de Petri de 15 × 150 mm de diámetro y con una profundidad de 4 mm (cerca de 60 a 70 ml por placa). Se secan las placas en una incubadora durante 10 a 30 minutos antes de su uso.

Se prepara un patrón de turbiedad de McFarland 0,5, para lo cual se agregan 0,5 ml de 1.175% de solución (peso/volumen) de cloruro bórico dihidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99,5 ml de ácido sulfúrico al 1%. El patrón de turbiedad debe estar en un tubo de ensayo idéntico al que se utiliza para

Cuadro VI-7. Patrones correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* para la interpretación del tamaño de la zona de inhibición producida por determinados discos de antimicrobianos (no validadas para *V. cholerae* O1)

| Agente antimicrobiano       | Potencia del disco ( $\mu\text{g}$ ) | Diámetro de la zona (mm) <sup>a</sup> |            |           | Límites del diámetro de la zona (mm) para <i>E. coli</i> ATCC 25922 |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------|-----------|---|
|                             |                                      | Resistente                            | Intermedio | Sensible  |   |
| Cloranfenicol               | 30                                   | $\leq 12$                             | 13 a 17    | $\geq 18$ | 21 a 27   |
| Doxiciclina                 | 30                                   | $\leq 12$                             | 13 a 15    | $\geq 16$ | 18 a 24   |
| Eritromicina                | 15                                   | $\leq 13$                             | 14 a 22    | $\geq 23$ | 8 a 14 <sup>b</sup>   |
| Furazolidona                | 100                                  | $\leq 13$                             | 14 a 17    | $\geq 18$ | 22 a 26 <sup>c</sup>  |
| Trimetoprima-sulfametoxazol | 1,25/<br>23,75                       | $\leq 10$                             | 11 a 15    | $\geq 16$ | 24 a 32   |
| Tetraciclina                | 30                                   | $\leq 14$                             | 15 a 18    | $\geq 19$ | 18 a 25   |
| Ciprofloxacina              | 5                                    | $\leq 15$                             | 16 a 20    | $\geq 21$ | 30 a 40   |
| Ácido nalidíxico            | 30                                   | $\leq 13$                             | 14 a 18    | $\geq 19$ | 22 a 28   |

<sup>a</sup>Fuente: National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1992. El NCCLS no ha establecido los tamaños de las zonas para *V. cholerae*.

<sup>b</sup>Fuente: Organización Mundial de la Salud.

<sup>c</sup>Fuente: Fabricante.

### *Identificación de Vibrio cholerae en el laboratorio*

cultivar en el caldo el microorganismo en estudio. El patrón de McFarland se cierra con cera, cinta Parafilm u otro medio que permita evitar la evaporación, y se puede almacenar hasta por 6 meses a temperatura ambiente (22° a 25 °C) en la oscuridad.

Cada cultivo sujeto a prueba se sembrará por estriación sobre un medio de agar no inhibitorio (agar sangre, agar de infusión de cerebro y corazón o agar con tripticasa de soja) para obtener colonias aisladas. Tras la incubación a una temperatura de 35° a 37 °C por 18 a 24 horas, con una aguja o asa de inoculación se seleccionan colonias bien aisladas y se transfieren a un tubo de caldo estéril (caldo de Mueller-Hinton, caldo de infusión de corazón o caldo con tripticasa de soja). Se emulsifica una cantidad suficiente de cultivo bacteriano en el caldo, de tal forma que la turbiedad se aproxime a la del patrón de McFarland 0,5. Esta comparación se facilita si los tubos se observan contra el trasfondo de una hoja de papel blanco en la cual se han dibujado líneas negras netas. Si fuera necesario, la turbiedad se ajusta agregando caldo estéril. A los 15 minutos de haber ajustado el grado de turbiedad, se sumerge en la suspensión un hisopo estéril no tóxico. El hisopo se oprime con firmeza contra las paredes interiores del tubo, exactamente por encima del nivel del líquido, y se rota para eliminar el exceso de líquido. Se pasa tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, trazando estrías y rotando la placa aproximadamente 60 grados después de cada aplicación para lograr la distribución uniforme del inóculo. Por último, se frota el hisopo siguiendo el borde de la superficie de agar.

Los discos de antimicrobianos deben guardarse en el refrigerador. Después de retirar los recipientes del refrigerador, se dejan cerrados a temperatura ambiente por una hora, aproximadamente, para permitir que la temperatura se equilibre. Esto reduce el grado de condensación que se presenta cuando el aire tibio alcanza el envase frío. Si se utiliza un aparato distribuidor de discos, este debe tener una cubierta que ajuste bien, guardarse en el refrigerador y dejarse entibiar a temperatura ambiente antes de su uso. Los discos de antimicrobiano se colocan en las placas tan pronto como sea posible, pero no más de 15 minutos después de la inoculación. Una vez que los discos se colocan en la placa, esta se pone en una incubadora a 35 °C durante 16 a 18 horas.

Después de la incubación por 18 a 24 horas, se mide el diámetro de la zona de inhibición completa (incluido el diámetro del disco) y se registra en milímetros. Las mediciones se pueden hacer con una regla en la superficie inferior de la caja de Petri, sin necesidad de destaparla. Con las sulfonamidas y la trimetoprima-sulfametoxazol, puede observarse un crecimiento escaso en la zona de inhibición. Cuando esto sucede, se prescinde de dicho crecimiento escaso (80% de inhibición) y el diámetro de la zona se mide hasta el borde del crecimiento abundante. Las zonas de inhibición del crecimiento se comparan con el cuadro de interpretación del tamaño de la zona (véase el Cuadro VI-7), y para cada fármaco sometido a prueba el resultado se anota como sensible, sensibilidad intermedia o resistente.

## *Identificación de Vibrio cholerae en el laboratorio*

Las variaciones en los medios de cultivo, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores influyen en las pruebas de sensibilidad. Para obtener resultados confiables es importante incluir microorganismos testigo con cada prueba y seguir el procedimiento con precisión (véase el Cuadro VI-7, donde aparecen los diámetros de las zonas de inhibición para la cepa de control de calidad). Una disminución en la potencia de los discos atribuible al almacenamiento puede ponerse de manifiesto por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición alrededor de la cepa testigo.

---

### **Bibliografía**

Barrett TJ, Blake PA. Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic. *J Clin Microbiol* 1981;13:126-129.

Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 1117-1125.

Feeley JC. Classification of *Vibrio cholerae* (*Vibrio comma*), including El Tor vibrios, by infrasubspecific characteristics. *J Bacteriol* 1965;89: 665-670.

Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ III. *Vibrio*. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 384-395.

Sahm DF, Washington JA II. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991: 1105-1116.

World Health Organization. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.

## VII. Detección de la toxina del cólera

### A. Modo de acción de la toxina del cólera

La producción de la toxina del cólera es una propiedad esencial de virulencia de las cepas epidémicas de *Vibrio cholerae* O1. Cada molécula de toxina del cólera está compuesta de cinco subunidades B (de enlace) y una subunidad A (activa). Las subunidades B se unen a los receptores del gangliósido G<sub>M1</sub> en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Después de la unión, se separan la subunidad A y el componente A2, lo cual facilita la entrada del componente A1 en la célula. El componente A1 estimula la producción de la enzima adenilciclasa, la cual rige la producción del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Las altas concentraciones intracelulares de AMPc dan como resultado una alteración del transporte activo de los electrólitos a través de la membrana celular, lo cual impide la absorción de líquido y conduce a su secreción en el intestino delgado. Cuando el volumen de líquido que entra en el colon proveniente del intestino delgado es mayor que la capacidad de reabsorción de aquel, se presenta la diarrea. Desde el punto de vista antigénico y en su mecanismo de acción, la toxina del cólera es muy similar a la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*; por lo tanto, la mayor parte de las pruebas para la detección de la toxina del cólera también se aplican a la enterotoxina termolábil y viceversa.

### B. Indicaciones para la prueba de producción de la toxina del cólera

En un laboratorio de diagnóstico, el valor de la prueba de la toxina del cólera varía según las características epidemiológicas del cólera en un país o comunidad determinados. En el curso de un brote de cólera, el aislamiento de *V. cholerae* que posea el antígeno O1 obtenido de pacientes sintomáticos se correlaciona bien con la producción de toxina y la virulencia, y no hay necesidad de someter a prueba, de manera sistemática, los aislamientos en busca de toxina del cólera. Esto también es válido para la mayor parte de los sitios que presentan cólera endémico y una frecuencia considerablemente alta de la enfermedad. Sin embargo, en circunstancias de endemidad con incidencia baja del cólera, o al principio de un brote, la mayor parte de las cepas de *V. cholerae* O1 aisladas de heces diarreicas deben someterse a prueba para la detección de la toxina. (Véase en el Capítulo II, "La función del laboratorio de salud pública", la explicación de cuándo es necesario someter a prueba los aislamientos para la producción de la toxina del cólera.) Debido a que las cepas de *V. cholerae* O1 no toxigénico se encuentran ocasionalmente en muestras ambientales (en particular en las aguas de los mares y de los estuarios), todos los aislamientos de *V. cholerae* O1 obtenidos de alimentos o del ambiente se someterán a prueba para determinar la producción de toxina del cólera después de confirmar la identificación.

Antes de realizar la prueba de la toxina, se ratifica la identidad de los aislamientos de *V. cholerae* O1. Ciertas cepas de *V. cholerae* distinto de O1

## *Detección de la toxina del cólera*

pueden producir toxina de cólera u otras toxinas, como la enterotoxina termoestable o toxina similar a la de *Shigella* (toxina Shiga), pero dichas cepas son muy raras y no se asocian con enfermedad epidémica. Así pues, desde el punto de vista de la salud pública no es provechoso someter a prueba los aislamientos esporádicos de *V. cholerae* distinto de O1 para detectar la toxina del cólera u otras toxinas.

Aunque las necesidades clínicas y de salud pública exigen como mínimo algunas valoraciones de la toxina del cólera, por lo general esas necesidades se satisfacen eficiente y económicamente a nivel del laboratorio de referencia. Los laboratorios seleccionarán el método más adecuado para sus necesidades y competencia.

### **C. Resumen histórico de los métodos de valoración de la toxina del cólera**

Hay varios métodos para valorar la toxina del cólera, incluidas pruebas de su actividad, de sus antígenos y de los genes que la codifican. La selección de una prueba específica dependerá de la capacitación, la experiencia y los recursos del laboratorio. El Cuadro VII-1 resume las características importantes de algunas de las pruebas más comunes que se utilizan para la detección de la toxina del cólera.

#### **1. Biovaloraciones**

##### ***Métodos que utilizan animales***

En los años cincuenta, los investigadores descubrieron que la inyección de preparaciones de enterotoxina en segmentos ligados de intestino (asas ileales) de conejos (y más tarde, de otros animales, incluidos cerdos, perros y terneras) causaba acumulación de líquido. Este descubrimiento dio por resultado la primera valoración de la enterotoxina del cólera, en el asa ileal de conejo adulto, que fue la más utilizada para estos fines hasta los años sesenta. Este modelo se ha utilizado mucho para estudiar los mecanismos de acción de la toxina del cólera, la enterotoxina termolábil de *E. coli* y otras enterotoxinas. Después de la exteriorización y ligadura del intestino delgado del conejo, se inyecta un sobrenadante acelular en cada asa ileal y se mantiene cerrado el abdomen durante 18 horas. Entonces, se realiza la eutanasia, se extirpa el intestino y las asas se miden y se pesan para determinar la cantidad de líquido acumulado en virtud de la estimulación de la toxina. Los resultados se expresan como el volumen de líquido por la longitud del asa intestinal. Esta prueba no solo causa excesivo dolor a los animales sino que consume mucho tiempo, es incómoda y difícil de estandarizar. La prueba es relativamente cara por el número de animales que se requieren, ya que solo se pueden probar cerca de 8 a 14 sobrenadantes por cada animal, sin incluir los testigos positivos y negativos; asimismo, la aplicación de sobrenadantes a los animales se debe hacer por duplicado, y la orientación de los sobrenadantes se debe invertir de un animal al siguiente.

Cuadro VII-1. Métodos comunes para la detección de la toxina del cólera

| Prueba                               | Sensibilidad por ml       | Tipo de prueba | Objetivo específico de la prueba    | Muestra estudiada                           |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------------------|---|
| Asa ileal de conejo                  | 30 ng                     | Biovaloración  | Estimular la acumulación de líquido | Sobrenadante del cultivo                    |
| Valoración en conejo lactante        | 250 a 500 ng              | Biovaloración  | Estimular la acumulación de líquido | Cultivo en caldo o sobrenadante del cultivo |
| Prueba en la piel del conejo         | 0,1 a 3,5 ng              | Biovaloración  | Factor de permeabilidad             | Sobrenadante del cultivo                    |
| Células suprarrenales Y1 de ratón    | 10 pg                     | Biovaloración  | Acumulación de AMPc                 | Sobrenadante del cultivo                    |
| Células de ovario de hámster chino   | 10 pg                     | Biovaloración  | Acumulación de AMPc                 | Sobrenadante del cultivo                    |
| ELISA G <sub>M1</sub>                | 10 pg                     | Inmunitaria    | Subunidad B <sup>b</sup>            | Sobrenadante del cultivo                    |
| Coagulación                          | 50 ng <sup>a</sup>        | Inmunitaria    | Subunidad B <sup>b</sup>            | Lisados del cultivo                         |
| Aglutinación inversa pasiva en látex | 1 a 2 ng                  | Inmunitaria    | Subunidad B <sup>b</sup>            | Sobrenadante del cultivo                    |
| Sondas de DNA                        | Detecta el gen <i>ctx</i> | Genética       | Gen <i>ctx</i>                      | DNA (improntas de colonias)                 |
| PCR                                  | Detecta el gen <i>ctx</i> | Genética       | Gen <i>ctx</i>                      | DNA (lisado de la célula en bruto)          |

<sup>a</sup> Sensibilidad para la detección de la toxina del cólera utilizando antisuero contra la enterotoxina termolábil de *E. coli*.

<sup>b</sup> Subunidad B de la molécula de la toxina del cólera.

## *Detección de la toxina del cólera*

El modelo de infección en conejo lactante se obtuvo en 1955 y se puede utilizar para la detección de enterotoxinas de *V. cholerae* y *E. coli*. Conejos lactantes de 7 días de edad se infectan con el microorganismo mediante intubación o por inyección directa intragástrica o intraluminal (en el intestino delgado). Se mantiene a los animales bajo observación para detectar diarrea acuosa y muerte por deshidratación. Otra opción consiste en matarlos después de un período de incubación de 7 horas; se extirpan los intestinos y se cuantifica el volumen de líquido por centímetro de intestino. El método del conejo lactante tiene como inconvenientes la variabilidad de los resultados y el costo de utilizar un animal por cada aislamiento sujeto a prueba.

La prueba en la piel del conejo, o valoración del factor de permeabilidad vascular, se ha utilizado para detectar la actividad de la toxina del cólera o de la toxina termolábil de *E. coli*. La especificidad de dicha prueba está determinada por la neutralización de la actividad mediante una cantidad estandarizada de antisueros contra la toxina del cólera. En la espalda afeitada de un conejo adulto joven se inyectan por vía intradérmica un sobrenadante acelular de un cultivo de *V. cholerae* o *E. coli* y diluciones de antisueros. Se pueden someter a prueba cerca de 30 a 40 sobrenadantes por conejo. Dieciocho horas más tarde se aplica una inyección intravenosa del colorante azul de Evans. El aumento de la permeabilidad capilar mediado por la actividad de la toxina del cólera conduce a la difusión del colorante en la piel (reacción de azulete), con induración localizada en los sitios de inyección. La zona de "azulete" se mide con relación a un testigo negativo. Este procedimiento permite el análisis de 30 a 40 cultivos por conejo; por lo tanto, es más económico en términos de número de animales requeridos que otros modelos animales como el del conejo lactante y las pruebas de asa ileal.

### **Métodos de cultivo de tejidos**

Los métodos de cultivo de tejido son muy sensibles y de fácil reproducción; se han utilizado mucho para el estudio de la producción de toxina. La acción de la toxina sobre un cultivo celular ha permitido la investigación con éxito de las bases moleculares de la patogenicidad. Además, estos métodos se pueden utilizar para detectar anticuerpos neutralizantes contra la toxina del cólera. Sin embargo, los métodos del cultivo de tejidos requieren técnicos capacitados, y reactivos y equipo especiales. Estas técnicas son las más adecuadas para utilizarse en los laboratorios que cuentan con recursos para el cultivo de tejidos.

Los cultivos de células suprarrenales Y-1 de ratón (Y-1) y de ovario de hámster chino han sido las pruebas modelo para la detección de la toxina del cólera y de la toxina termolábil, aunque también son sensibles otras líneas celulares como las células Vero de riñón de mono. Si la toxina del cólera o la termolábil (*E. coli*) están presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos agregados a las células, estimularán la producción de

adenilciclasa, la cual eleva la concentración intracelular de AMPc. Las cantidades aumentadas de este compuesto dan por resultado una respuesta estructural que se puede observar al microscopio (las células de ovario de hámster chino se alargan y las células Y-1 se redondean). Las reacciones positivas pueden confirmarse mediante neutralización de los efectos tóxicos en el cultivo celular con antisuero contra toxina del cólera (o toxina termolábil de *E. coli*) o con gangliósido  $G_{M1}$ , el cual es el receptor para ambas toxinas en la membrana de la célula huésped, y se une a cualquiera de estas toxinas. Para la prueba de la toxina, se coloca una suspensión de células Y-1 en placas de microtitulación (microplacas) de 96 pozos. Por lo general, una botella de 75 cm<sup>2</sup> de células Y-1 es suficiente para sembrar hasta 25 microplacas. Cada microplaca puede utilizarse para someter a prueba hasta 60 sobrenadantes (30 sobrenadantes si se realiza por duplicado), cuando no se utilizan los pozos periféricos de la placa.

## **2. Inmunováloraclón**

### **ELISA**

La toxina del cólera es inmunogénica para los seres humanos y los animales de laboratorio. Por ello, se han elaborado muchas técnicas inmunológicas para detectar esta toxina. El descubrimiento de que el gangliósido  $G_{M1}$  es el receptor natural para la toxina del cólera y la toxina termolábil, y su subsecuente purificación, condujo a la obtención de una prueba de inun-absorción enzimática con captura de gangliósido ( $G_{M1}$ -ELISA) para la detección de estas toxinas. Para realizar la prueba  $G_{M1}$ -ELISA, se agregan los sobrenadantes del cultivo a los pozos de la microplaca revestidos con gangliósido  $G_{M1}$ . La toxina unida a los receptores  $G_{M1}$  se detecta a continuación agregando antisuero contra la toxina del cólera, seguida por anticuerpo antiglobulina conjugado con enzima. En lugar de utilizar  $G_{M1}$  para revestir la placa, se puede recurrir a otro anticuerpo que se una a la toxina. Si se utiliza una microplaca de 96 pozos para el estudio de la toxina, es factible probar 30 sobrenadantes por duplicado en cada microplaca (por lo general, no se utilizan los pozos del margen externo).

### **Coaglutinación**

Debido a que muchas cepas de *Staphylococcus aureus* tienen una cubierta de proteína A que puede combinarse directamente con la IgG, se han preparado reactivos serológicos para reacciones de aglutinación en las cuales un anticuerpo IgG específico se adsorbe en la superficie de las células estafilocócicas. Es factible preparar el reactivo a un costo relativamente bajo, pero se requiere un anticuerpo específico contra la toxina del cólera (o contra la toxina termolábil de *E. coli*). La coaglutinación de la enterotoxina termolábil de *E. coli* se realiza de manera rápida y sencilla, y requiere poco equipo especializado y capacitación del personal de laboratorio; sin embargo, esta prueba nunca se ha usado para detectar toxina del cólera a partir de sobrenadantes de cultivo de *V. cholerae* O1.

### ***Aglutinación de látex***

En la prueba de aglutinación de látex se utilizan anticuerpos específicos contra la toxina del cólera o la termolábil de *E. coli* unidos a partículas de látex. La técnica de aglutinación de látex requiere antisuero de alta calidad o anticuerpos purificados, una preparación adecuada de látex y material de laboratorio de fácil adquisición. Se expende en el comercio un estuche de esta prueba que se describe más adelante en este capítulo.

## **3. Análisis basados en el DNA**

### ***Sondas de DNA***

Las pruebas moleculares que identifican a los microorganismos patógenos con base en las secuencias específicas de DNA tienen muchas aplicaciones en la microbiología diagnóstica y de salud pública. Las secuencias específicas de DNA en el gen o los genes que codifican la toxina del cólera se han usado como sondas para detectar secuencias de DNA homólogas en aislamientos de *V. cholerae* toxigénico. En la práctica, se pueden utilizar una variedad de moléculas de DNA como sondas, incluidos el DNA clonado, fragmentos de restricción del DNA clonado, ampliaciones de DNA generadas en una reacción en cadena de la polimerasa y oligonucleótidos. Primero se marca la sonda con una molécula de fácil detección, como es un radioisótopo, una enzima o un ligando, y entonces se hibrida al DNA del microorganismo de prueba. La sonda solo hibrida aquellos fragmentos de DNA de microorganismos que contengan secuencias homólogas. La sonda no hibridada se desecha, y la sonda hibridada remanente se detecta por medio de una prueba específica que la pone en evidencia.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés) es otro método para efectuar pruebas diagnósticas moleculares que se basan en las secuencias específicas de DNA. En la PCR se utiliza la enzima DNA polimerasa para sintetizar o amplificar copias múltiples de una secuencia específica de DNA (ampliación), la cual puede entonces detectarse en un gel de agarosa o con sondas de DNA. La ampliación de DNA se define por la localización de dos oligonucleótidos cortos y específicos de DNA que señalan la secuencia de interés y son utilizados como iniciadores por la DNA polimerasa. Al igual que las sondas de DNA, el blanco de la PCR es un gen de virulencia, o una secuencia de DNA exclusivo de un microorganismo patógeno. La toxigenicidad de un aislamiento de *V. cholerae* se puede someter a prueba mediante la PCR y los iniciadores que, de manera específica, amplifican solamente los genes de la toxina del cólera. La PCR tiene la ventaja de ser una técnica muy rápida que no requiere cultivos puros ni microorganismos viables. Algunas pruebas de PCR pueden amplificar los segmentos de DNA directamente de las muestras fecales, alimentarias o ambientales; así, se puede determinar la presencia de un microorganismo en una muestra

sin cultivarlo. Asimismo, la PCR tiene aplicaciones en otras técnicas moleculares; se puede utilizar para producir rápidamente sondas de DNA marcadas para un análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP en inglés) e improntas de colonias ("colony blots").

La sensibilidad y especificidad de las valoraciones basadas en el DNA ofrecen una ventaja sobre los métodos ordinarios. El uso de sondas de DNA o PCR evita las dificultades que se presentan con las cepas de *V. cholerae* que no expresan la toxina del cólera a concentraciones detectables pero poseen genes *ctx*. El uso de marcadores de DNA no radioactivos, como biotina y digoxigenina, ha eliminado los problemas técnicos asociados con los radioisótopos. Mientras que el uso de las pruebas diagnósticas basadas en el DNA requieren un adiestramiento específico en los métodos moleculares y los reactivos son costosos, las ventajas de sencillez, sensibilidad, seguridad y estabilidad han convertido a las técnicas basadas en el DNA en elementos invaluable para los laboratorios de investigación.

#### **D. Producción de la toxina del cólera para las pruebas de laboratorio**

Las condiciones óptimas de crecimiento para *V. cholerae* no siempre se corresponden con la mejor producción de la toxina *in vitro*. Por esta razón se han elaborado medios especializados para la producción de toxina del cólera. Las condiciones ideales para su producción varían de acuerdo con el medio que se utilice. En general, se ha encontrado que es mejor una temperatura de incubación de 30 °C que una de 37 °C para la producción de toxina con *V. cholerae* de cualquier biotipo. Con las cepas El Tor, utilizando el medio de Craig, la mejor combinación de tiempo y temperatura es 30 °C durante 48 horas sin aeración. Para las cepas del biotipo clásico, una temperatura de 30 °C con agitación vigorosa durante 48 horas permite la mejor producción de la toxina. Si se utilizan temperaturas de incubación de 37 °C se recomienda el medio AKI. Aunque este medio permite la producción de toxina del cólera a 37 °C, tiene el inconveniente de una vida corta de almacenamiento, lo que exige su preparación semanal. *V. cholerae* El Tor cultivado en medio AKI debe incubarse a 37 °C durante 20 horas sin agitación. El medio AKI no se ha evaluado con respecto a la producción de toxina por las cepas del biotipo clásico.

*V. cholerae* libera activamente su toxina hacia el medio de cultivo, a diferencia de la toxina termolábil de *E. coli*, la cual, por lo general, se encuentra en el espacio periplásmico. Los agentes antimicrobianos, como la polimixina B o la lincomicina, que favorecen la acumulación de toxina termolábil de *E. coli* en los medios de cultivo, no tienen efecto en la liberación de la toxina del cólera. Por lo tanto, no es necesario utilizar antimicrobianos en los medios donde se va a determinar la producción de dicha toxina.

La mayor parte de las pruebas de la toxina del cólera, inmunológicas y de biovaloración, buscan la toxina en los sobrenadantes de los cultivos. La

### *Detección de la toxina del cólera*

valoración de la actividad de la toxina requiere toxina del cólera íntegra, en tanto que algunas pruebas antigénicas solamente detectan la subunidad B y no requieren la molécula completa. Las condiciones del cultivo para la producción de toxina se enuncian en una lista más adelante, y se recomiendan para la expresión óptima de la toxina completa (activa), tal como se requiere para las pruebas de asa ileal de conejo, piel de conejo y cultivo de tejidos.

#### ***Producción de la toxina del cólera***

- 1) Los cultivos que se van a someter a prueba se siembran mediante estríación en un medio de plano inclinado no selectivo (como agar de infusión de corazón) y se incuban de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Se incluyen cuatro cepas testigo (dos positivas y dos negativas).
- 2) Se inoculan las cepas en 5 ml de medio de Craig en tubos de tapa de rosca de 16 × 125 mm. Se mantienen los tapones poco apretados y se incuban los tubos a 30 °C durante 48 horas sin agitar. [Nota: los cultivos se pueden someter a prueba al cabo de solo 24 horas de incubación, pero 48 horas es el tiempo óptimo para la producción de toxina.]
- 3) Se centrifugan los tubos para sedimentar las células bacterianas, y se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur. El sobrenadante se almacena a 4 °C hasta que se vaya a utilizar. Si el sobrenadante ha de almacenarse por más de 7 días, se congela a -70 °C.

#### **E. Ensayo Y-1 para la toxina del cólera**

La clona Y-1 de células de tumor suprarrenal de ratón es sensible a bajas concentraciones, incluso de 10 picogramos por mililitro, de toxina del cólera. Sin embargo, *Vibrio* y otros géneros bacterianos pueden sintetizar productos extracelulares termolábiles que causan redondeamiento no específico de dichas células, el cual se puede malinterpretar como si fuera causado por la toxina del cólera. Es preferible neutralizar las reacciones positivas o dudosas con antisueros específicos para la toxina o con otras sustancias específicas de enlace como el gangliósido G<sub>M1</sub>, el receptor natural de la toxina en la membrana celular.

#### ***Material***

- Incubadora de CO<sub>2</sub> programada a una temperatura de 37 °C con 5,0% de CO<sub>2</sub>
- Campana de flujo laminar
- Microscopio invertido de contraste de fases
- Tubos de centrifuga cónicos estériles
- Centrifuga

- Botellas estériles de cultivo de tejido (75 cm<sup>2</sup> de área de crecimiento)
- Microplacas de 96 pozos de fondo plano, estériles, para cultivo de tejidos
- Mezcla nutritiva F-10 de Ham (GIBCO Laboratories, Grand Island, Nueva York) con 15% de suero de caballo, 2,5% de suero fetal de ternera y gentamicina (10 µg/ml)
- tripsina al 0,2%

***Procedimientos semanales para prueba y mantenimiento del cultivo de tejidos***

Las células suprarrenales Y-1 se mantienen en un cultivo de monocapa en mezcla nutritiva F-10 de Ham. Comúnmente las botellas de cultivo de tejido con un área de crecimiento de 75 cm<sup>2</sup> se llenan con 25 ml de medio y se incuban a 37 °C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las manipulaciones celulares se realizan bajo una campana de flujo laminar, y las células se examinan empleando un microscopio invertido de contraste de fase.

**Día 1**

- 1) Se desecha el medio F-10 de la monocapa confluyente (por lo general, se requiere una semana de crecimiento). Se lava la monocapa de células con 5 ml de solución salina con amortiguador de fosfato (PBS en inglés) estéril y se desecha el líquido.
- 2) Se agrega 1,5 ml de tripsina al 0,2% y se deja la monocapa cubierta de tripsina a temperatura ambiente hasta que las células comiencen a desprenderse de la superficie de plástico (de 5 a 10 minutos).
- 3) Se agregan 5 ml de medio F-10 para neutralizar la tripsina. (El medio F-10 de Ham se almacena a una temperatura de 4 °C y después se lleva a un baño de María a 37 °C antes de que todo el medio cambie y se presente proliferación celular.) Si permanece alguna monocapa, se desprende de la superficie de la botella con espátula de goma estéril.
- 4) Las células suspendidas se transfieren (aproximadamente 6,5 ml) a un tubo de centrifuga cónico estéril y se centrifuga de 500 a 1.000 × *g* durante 5 minutos.
- 5) El sobrenadante se aspira dejando un sedimento de células suprarrenales Y-1 en el tubo de centrifuga. Las células se resuspenden con una pipeta Pasteur en 5 ml de medio F-10 recién preparado.
- 6) Utilizando una pipeta Pasteur, se depositan 6 gotas de la suspensión celular en cada botella, a la cual se han agregado 25 ml de medio F-10 recién preparado. Como regla general, se siembran botellas por duplicado.
- 7) Para la prueba de la toxina, la cual se practica en una microplaca de fondo plano, de 96 pozos, hágase una dilución de 1:50 a 1:100 de la sus-

### *Detección de la toxina del cólera*

pensión celular. Se deposita la suspensión, aproximadamente 0,15 ml por pozo, de modo tal que una botella sirve para sembrar de 12 a 25 placas. Se apilan las placas y se cubre la placa superior para evitar contaminación y evaporación.

- 8) Se colocan las botellas (con las tapas poco apretadas) y las microplacas en la incubadora de CO<sub>2</sub>.

#### **Día 2**

Se revisan las botellas y los pozos al microscopio para observar la proliferación celular.

#### **Día 3 (últimas horas de la tarde)**

Utilizando una pipeta Pasteur, a cada pozo de la microplaca que contenga una monocapa de células suprarrenales Y-1 se le agregan 2 gotas (50 µl) de los sobrenadantes de la toxina (incluidos los testigos positivos y negativos). (Véase la Sección D para conocer los métodos de cultivo de *V. cholerae* para la producción de su toxina.) Se sugiere asegurarse de que las microplacas y las hojas de registro estén codificadas antes de efectuar la transferencia. Las microplacas se vuelven a apilar y se incuban en una atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37 °C de un día para otro.

#### **Día 4 (en la mañana)**

Se leen los resultados de las pruebas. Los pozos se examinan con aumentos de 100x o 200x, utilizando un microscopio invertido de contraste de fases. Los pozos de prueba se comparan con los de testigo positivo. Las toxinas del cólera y termolábil provocan que las células suprarrenales Y-1 se redondeen (Figura VII-1). Para los análisis de toxina del cólera o toxina termolábil, un pozo positivo contiene más de 10% de células Y-1 redondeadas. Ocasionalmente, la actividad citotóxica en el sobrenadante dará por resultado muerte, lisis o desprendimiento de las células, lo cual puede enmascarar el efecto de redondeamiento que produce la toxina del cólera. Si esto ocurre, la dilución del sobrenadante (para intentar diluir la citotoxina) puede permitir que se visualicen las células redondeadas.

#### **Método para la neutralización de la enterotoxina del cólera**

Véase la Sección D de este capítulo para conocer los métodos de cultivo de *V. cholerae* para la producción de toxina del cólera. Los sobrenadantes de la prueba se diluyen 1:4 utilizando PBS (pH 7,2) con 0,1% de gelatina (PBS/G). Si se dispone de ella, se usará una preparación pura de toxina del cólera como testigo positivo. En esta prueba se utiliza un antisuero contra la toxina del cólera de título alto (en los CDC el antisuero contra la toxina del cólera utilizado para la G<sub>M1</sub>-ELISA también se utiliza para la neutralización de las células Y-1). El antisuero se diluye en PBS/G.

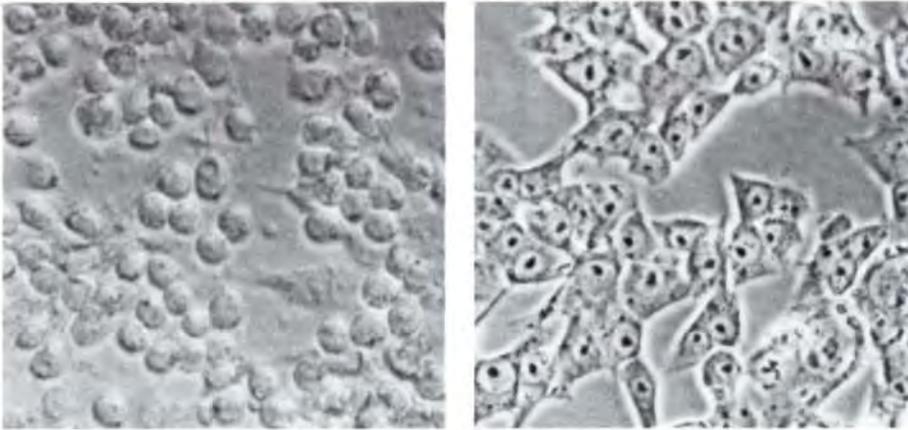


Figura VII-1. La fotografía de la izquierda muestra el redondeo típico de las células Y-1 suprarrenales de ratón causado por la presencia de la toxina del cólera. Se muestran células Y-1 normales en la fotografía de la derecha.

Se preparan diluciones al doble del antisuero contra la toxina del cólera en PBS/G, comenzando con una de 1:10 y terminando con una de 1:10.240. Se mezclan volúmenes iguales de diluciones del antisuero por duplicado y se mezclan con sobrenadante sin diluir y diluido al 1:4. Se repite el procedimiento para el resto de los sobrenadantes y la toxina del cólera purificada. El sobrenadante se incuba con mezclas de antisuero en baño de María a una temperatura de 37 °C. Después de una hora se transfieren 50  $\mu$ l de cada sobrenadante con la mezcla del antisuero a la monocapa de células Y-1 que se encuentra en la microplaca. Se agrega sobrenadante no neutralizado a un pozo por cada cultivo sujeto a prueba, con objeto de utilizarlo como testigo. Se incuban las células de 18 a 24 horas y se leen para determinar la dilución más alta de suero contra la toxina del cólera que neutraliza el efecto de redondeamiento de las células que provoca esta.

#### **F. Ensayo $G_{M1}$ -ELISA para la toxina del cólera**

El ensayo  $G_{M1}$ -ELISA constituye una inmunoválora muy sensible para la detección de la toxina del cólera. Esta prueba utiliza una inmunoglobulina marcada con una enzima, la cual se cuantifica midiendo su actividad en un sustrato específico. Los pozos de microtitulación se revisten con gangliósido  $G_{M1}$ , el receptor natural para la toxina del cólera (Figura VII-2). De manera alternativa, los pozos de microtitulación se pueden revestir con anticuerpos contra toxina del cólera; pero, si se hace esto, dichos anticuerpos se deben preparar en una especie animal diferente a la del otro anticuerpo contra la toxina del cólera utilizado en la prueba. Los sobrenadantes del cultivo se agregan entonces a los pozos revestidos. Las moléculas

## Detección de la toxina del cólera

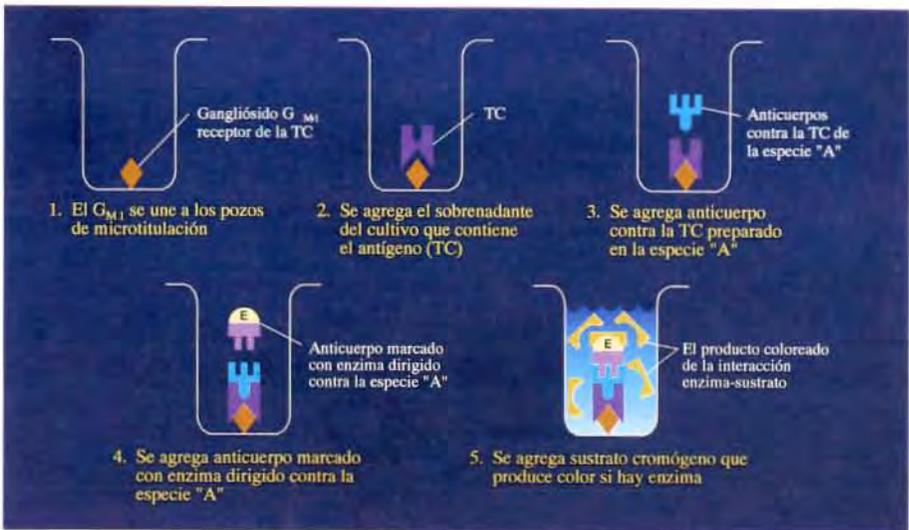


Figura VII-2. Diagrama del ensayo  $G_{M1}$ -ELISA para la detección de la toxina del cólera (TC).

de toxina del cólera en el sobrenadante se unen al  $G_{M1}$  en el pozo y reaccionan con el anticuerpo contra la toxina del cólera que se adiciona posteriormente. El anticuerpo contra la inmunoglobulina de la especie animal específica conjugado con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano) se agrega al pozo, donde reacciona con el anticuerpo contra la toxina del cólera. Por último, se agrega el sustrato de la enzima, y la enzima unida degrada el sustrato. Se forma así un producto de color que indica la presencia de toxina del cólera, toxina termolábil de *E. coli* u otras moléculas inmunológicamente afines. Estas reacciones se pueden leer con el espectrofotómetro o visualmente. En el Cuadro VII-2 se presenta un resumen del método ELISA. Todos los materiales y reactivos del ensayo  $G_{M1}$ -ELISA para la toxina del cólera, incluido el antisuero contra esta, se pueden adquirir en el comercio.

### Equipo

- Microplacas de polivinilo o poliestireno, de fondo plano o fondo redondeado (en u)
- Micropipetas y pipetas múltiples (automáticas)
- Lector de placa de ELISA (opcional)

### Reactivos

(Véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones para preparar los siguientes reactivos.)

Cuadro VII-2. ELISA para la detección de la toxina del cólera (TC)

| Paso                | Reactivo                                     | Diluyente                     | Concentración        | Volumen/pozo | Tiempo de incubación |
|---------------------|--|-------------------------------|----------------------|--------------|----------------------|
| Recubrimiento       | G <sub>M1</sub>                              | PBS                           | 2 µg/ml <sup>a</sup> | 100 µl       | De un día para otro  |
| Bloqueo             | Albúmina sérica de bovino (ASB)              | PBS                           | 1%                   | 150 µl       | 30 minutos           |
| Muestra             | Sobrenadante del cultivo                     | Ninguno                       | Sin diluir           | 100 µl       | 60 minutos           |
| Bloqueo             | Albúmina sérica de bovino (ASB)              | PBS                           | 1%                   | 150 µl       | 30 minutos           |
| Anticuerpo          | Anticuerpo contra TC preparado en cabra      | PBS con ASB al 0,1%           | 1:2.000 <sup>a</sup> | 100 µl       | 60 minutos           |
| Conjugado           | IgG anticabra marcada con fosfatasa alcalina | PBS con ASB al 0,1%           | 1:500 <sup>a</sup>   | 100 µl       | 60 minutos           |
| Sustrato            | p-nitrofenil fosfato disódico                | Amortiguador de dietanolamina | 1 mg/ml              | 100 µl       | 10 a 20 minutos      |
| Detener la reacción | NaOH   | H <sub>2</sub> O              | 3 M                  | 50 µl        | Ninguno              |

<sup>a</sup> La dilución óptima de cada reactivo se determinará mediante titulación.

## *Detección de la toxina del cólera*

- Gangliósido G<sub>M1</sub> (Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri)
- PBS con 0,05% de Tween 20 o sin él y albúmina sérica de bovino
- Anticuerpos de cabra contra toxina del cólera CT<sub>b</sub> (Calbiochem Corp., La Jolla, California) [Nota: como una alternativa a los anticuerpos contra la toxina del cólera preparados en cabra, se pueden utilizar anticuerpos producidos en otra especie animal o anticuerpos monoclonales.]
- Globulina anticabra (o contra cualquier especie utilizada para producir el anticuerpo contra la toxina del cólera) marcada con fosfatasa alcalina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland) o con peroxidasa del rábano.
- *p*-nitrofenil fosfato (Sigma Chemical Co.) disuelto en amortiguador de dietanolamina [Nota: hay varios sustratos para la peroxidasa del rábano, cada uno con sus requisitos específicos de preparación.]

La dilución óptima de la preparación de cada reactivo específico se determinará por titulación. En esta sección se describe un procedimiento de titulación de la muestra.

### **Testigos**

En cada microplaca se deben incluir por lo menos dos testigos positivos de *V. cholerae* conocidos y dos testigos de sobrenadante negativo conocidos.

### **Realización de la prueba**

- 1) Se agregan 100  $\mu$ l de G<sub>M1</sub> diluido adecuadamente en PBS a los 60 pozos internos de la microplaca. Los pozos vacíos que se encuentran en la periferia de la placa se llenan con PBS/Tween. Se cubre la placa con un sellador de placa o se coloca la placa en una cámara húmeda y se deja a temperatura ambiente de 18 a 24 horas o a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 4 horas.
- 2) Se lava la placa tres veces con PBS/Tween de la manera siguiente: se invierte la placa sobre una toalla absorbente y se vacía el contenido con cuidado. Con una piceta u otro instrumento adecuado, cada pozo se llena con PBS/Tween (aproximadamente 200  $\mu$ l). Se deja la placa durante 3 minutos. Se elimina el PBS/Tween y se repite la operación dos veces. Al guardar la placa para uso posterior, se deja el tercer lavado en las placas y se refrigera (4 °C). La placa se puede almacenar por un período de 4 a 6 semanas.
- 3) Se bloquean los sitios de unión restantes llenando cada pozo con 150  $\mu$ l de albúmina sérica de bovino (BSA en inglés) al 1% en PBS. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se retira el contenido y se lavan los pozos tres veces con PBS/Tween como se describió en el paso 2.
- 4) Con una micropipeta, se agregan por duplicado 100  $\mu$ l de cada sobrenadante a pozos de la placa. Se deja vacía una sola hilera de pozos en el

margen externo de la placa. Esto permitirá 30 pruebas por placa. Se llenan los pozos vacíos del perímetro de la placa con PBS/Tween. La placa se coloca en una cámara húmeda o se sella y se incuba por una hora a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Se lavan las placas tres veces como se describe en el paso 2.

- 5) Se agregan 150  $\mu$ l de BSA al 0,1% en PBS a cada pozo, y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lava tres veces (paso 2).
- 6) Se agregan 100  $\mu$ l del suero de cabra anti-CT<sub>b</sub> (diluido en PBS con BSA al 0,1%) en cada uno de los pozos de prueba. La placa se coloca en una cámara húmeda o se sella e incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. Se lava la placa tres veces.
- 7) A cada pozo de prueba se agregan 100  $\mu$ l de globulina anticabra preparada en conejo y marcada con fosfatasa alcalina, diluida adecuadamente en PBS que contenga 0,1% de BSA. Se coloca la placa en una cámara húmeda o se sella e incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. Se lava la placa tres veces.
- 8) Se agregan 100  $\mu$ l de la solución de sustrato de la enzima (*p*-nitrofenil fosfato en amortiguador de dietanolamina) a todos los pozos. Se incuba la placa a la temperatura ambiente hasta 30 minutos o hasta que la aparición de color en los pozos del testigo positivo alcance una intensidad adecuada, pero sin que transcurra tanto tiempo que aparezca color excesivo en los pozos del testigo negativo (aproximadamente 10 a 20 minutos, pero no más de 30 minutos).
- 9) La reacción se detiene agregando 50  $\mu$ l de NaOH 3 M a cada pozo. Se mezcla bien.

### ***Lectura de los resultados de la prueba***

- 1) Se comparan los pozos del testigo positivo con los del sobrenadante testigo negativo. Debe haber un poco de color o ausencia de este en los pozos del testigo negativo. Se observará un color amarillo distintivo (Figura VII-3) en los pozos del testigo positivo.
- 2) El grado de color en los pozos de prueba se compara con el color en los pozos del testigo negativo. Las muestras que claramente desarrollen un color más intenso que los testigos negativos se considerarán positivas.
- 3) Si se utiliza un lector de microplacas, la longitud de onda debe programarse de manera adecuada para el sustrato que se utilice. Para el *p*-nitrofenil fosfato la longitud de onda debe ser de 405 nm. Se calcula la relación de positivo a negativo (P/N) dividiendo la densidad óptica (DO) de la muestra desconocida entre la media de la densidad óptica de los pozos que contienen los testigos negativos. Las muestras que tengan una relación P/N de 2,0 o mayor se considerarán positivas.

## Detección de la toxina del cólera

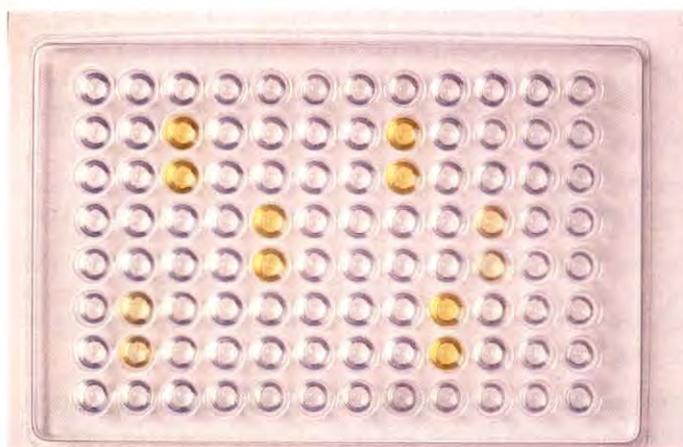


Figura VII-3. En el ensayo  $G_{M1}$ -ELISA para la toxina del cólera, la aparición de un color amarillo distintivo en los pozos de la microplaca indica una reacción positiva.

### **Titulación de los reactivos de la prueba $G_{M1}$ -ELISA para la toxina del cólera**

1) Se diluye  $G_{M1}$  en PBS a las concentraciones que siguen:

- 0,5  $\mu\text{g/ml}$
- 1,0  $\mu\text{g/ml}$
- 2,0  $\mu\text{g/ml}$
- 5,0  $\mu\text{g/ml}$

2) Se agregan 100  $\mu\text{l}$  del gangliósido  $G_{M1}$  (Sigma Chemical Co.) a cada uno de los 60 pozos internos de las microplacas de polivinilo de fondo redondo o placas de poliestireno de fondo plano que contengan las siguientes diluciones de  $G_{M1}$ :

|         |                      |
|---------|----------------------|
| Placa 1 | 0,5 $\mu\text{g/ml}$ |
| Placa 2 | 1,0 $\mu\text{g/ml}$ |
| Placa 3 | 2,0 $\mu\text{g/ml}$ |
| Placa 4 | 5,0 $\mu\text{g/ml}$ |

Se cubre con un sellador de placa o se colocan las placas en una cámara húmeda y se dejan a temperatura ambiente de 18 a 24 horas. Se lavan las placas tres veces con 200  $\mu\text{l}$  de PBS/Tween.

- 3) Para bloquear los sitios de unión remanentes de los pozos, se llena cada pozo con 150  $\mu\text{l}$  de BSA al 1% en PBS y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, se retira el contenido y se lavan los pozos tres veces con 200  $\mu\text{l}$  de PBS/Tween.
- 4) Se rehidrata la toxina del cólera pura (Calbiochem Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluye en PBS con BSA al 0,1%

*Detección de la toxina del cólera*

(se requieren por lo menos 4 ml de cada dilución para la titulación en 4 placas) como sigue:

| <b>Dilución</b>  | <b>Concentración de la toxina del cólera</b> |
|------------------|--|
| 10 <sup>-3</sup> | 1,0 µg/ml                                    |
| 10 <sup>-4</sup> | 100,0 ng/ml                                  |
| 10 <sup>-5</sup> | 10,0 ng/ml                                   |
| 10 <sup>-6</sup> | 1,0 ng/ml                                    |
| 10 <sup>-7</sup> | 100,0 pg/ml                                  |
| 10 <sup>-8</sup> | 10,0 pg/ml                                   |

A cada placa se agregan 100 µl de cada dilución diferente de la toxina del cólera, de tal forma que cada dilución ocupe una hilera en la placa (hileras B, C, D, E, F, G). Los pozos vacíos se llenan con PBS/Tween. Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. Las placas se lavan tres veces con 200 µl de PBS/Tween.

- 5) Se bloquea con 150 µl de BSA al 1%. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lava tres veces.
- 6) Se preparan 5 diluciones de anticuerpo contra la toxina del cólera en PBS con 0,1% BSA al 0,1%:

1:500  
1:1.000  
1:2.000  
1:5.000  
1:10.000

[Nota: El anticuerpo monoclonal se probará a diluciones de 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000.]

A cada placa se agregan 100 µl de anticuerpo contra la toxina del cólera diluido de tal forma que cada dilución ocupe una columna de la placa (columnas 2 a 6). Se repite para las columnas 7 a 11. Los pozos vacíos se llenan con PBS/Tween. Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. La placa se lava tres veces.

- 7) El conjugado marcado con fosfatasa alcalina se diluye en PBS con BSA al 0,1% como sigue:

1:500  
1:1.000

A cada placa se agregan 100 µl de cada dilución del conjugado, de tal forma que cada dilución ocupe la mitad de la placa (desde la columna 2 hasta la 6 para una dilución y desde de la columna 7 hasta la 11 para la otra dilución). Los pozos vacíos se llenan con PBS/Tween. La placa se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora. La placa se lava tres veces.

- 8) Se agregan 100 µl del sustrato de *p*-nitrofenil fosfato. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

## *Detección de la toxina del cólera*

- 9) Se agregan 50  $\mu$ l de NaOH 3 M para detener la reacción y se leen los resultados con el espectrofotómetro o visualmente. Se anota la dilución más alta de cada reactivo que presente una intensidad de color adecuada. El reactivo más difícil de obtener, o el más caro, se utilizará en la dilución más alta posible.

### **G. Prueba de aglutinación de látex para la toxina del cólera**

El estuche VET-RPLA (Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra) se ideó para la detección de la toxina del cólera o la toxina termolábil en el líquido sobrenadante de un cultivo. Este procedimiento se conoce como aglutinación pasiva inversa de látex (RPLA en inglés). Las partículas de látex de poliestireno se sensibilizan con antisuero purificado producido en conejos inmunizados con enterotoxina purificada de *V. cholerae*. Estas partículas de látex se aglutinarán en presencia de la toxina del cólera o de la toxina termolábil. Se provee un reactivo testigo, que consiste en partículas de látex cubiertas o “sensibilizadas” con globulinas de conejo no inmunes.

La prueba se realiza en las microplacas de fondo en forma de V o de U (se prefieren las placas de fondo V; las placas de fondo plano no son adecuadas para este procedimiento). Las diluciones del sobrenadante del cultivo sujeto a prueba se hacen en dos columnas de pozos. [Nota: Los sobrenadantes de prueba se prepararán de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la sección D de este capítulo; no se prepararán sobrenadantes por el método descrito en las instrucciones incluidas con el estuche, debido a que, por lo general, *V. cholerae* no produce toxina del cólera en cantidades suficientes cuando crece en agua peptonada alcalina (APW en inglés).] Una suspensión de partículas de látex cubiertas con anticuerpos se agrega a la primera columna, y el látex testigo, no sensibilizado, se agrega a la segunda columna. Si en el sobrenadante hay cantidades suficientes de toxina del cólera o toxina termolábil, se presentará aglutinación. La aglutinación resulta de la formación de enlaces cruzados entre las partículas de látex unidas a las moléculas de toxina del cólera. Esta estructura, similar a una red, aparecerá y formará una capa difusa en el fondo del pozo. Si no hay enterotoxina o está en una concentración inferior al nivel de detección, no se formará la estructura reticular; en su lugar, las partículas de látex no aglutinadas formarán un “botón”, al sedimentarse.

#### **Material requerido**

- Placas de 96 pozos (con fondo en V o U) con tapa
- Micropipetas fijas o ajustables y puntas (25  $\mu$ l)
- Látex sensibilizado: suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) contra la toxina del cólera (que viene con el estuche)
- Látex testigo: suspensión de látex cubierto con globulinas de conejo no inmunes (viene con el estuche)

- Toxina del cólera testigo (deshidratada, viene con el estuche)
- Diluyente: BSA en PBS (viene con el estuche)

**Realización de la prueba**

- 1) Cada muestra requiere dos columnas (ocho pozos por columna) en la placa. Con una pipeta o cuentagotas, se depositan 25  $\mu$ l del diluyente en cada pozo, excepto en el primer pozo de cada columna.
- 2) Agréguese 25  $\mu$ l de la muestra que se va a probar al primero y segundo pozos de cada grupo de dos columnas.
- 3) Utilizando una pipeta o diluidor, y comenzando con el segundo pozo de cada columna, se retiran 25  $\mu$ l y se realizan diluciones al doble. Detenerse en el séptimo pozo de la columna, de tal forma que el octavo pozo contenga solamente diluyente. Los 25  $\mu$ l extra del séptimo pozo se desechan.
- 4) Se agregan 25  $\mu$ l de látex sensibilizado a cada pozo de la primera columna para cada sobrenadante de prueba y testigo. Se agregan 25  $\mu$ l de látex testigo no sensibilizado a cada pozo de la segunda columna para cada sobrenadante de prueba y testigo.
- 5) El contenido de cada pozo se mezcla agitando la microplaca suavemente con la mano.
- 6) Para evitar la evaporación, la placa se cubre con una tapa y se coloca en un recipiente de plástico para almacenamiento junto con una toalla de papel húmeda. La placa se coloca sobre una superficie que no vibre y se deja allí sin mover, a temperatura ambiente, durante 20 a 24 horas.

**Lectura de los resultados de la prueba**

- 1) Cada pozo de cada columna se examina contra un fondo negro para observar aglutinación. La presencia de la toxina del cólera o de la termolábil causará aglutinación, manifiesta por la formación de una estructura reticular; al sedimentarse esta, formará una capa difusa en el fondo del pozo (Figura VII-4). Si no hay enterotoxinas o se encuentran en concentraciones inferiores al nivel de detección de la prueba, no se formará dicha estructura reticular; por lo tanto, al sedimentarse se observará un botón compacto.
- 2) Los resultados de la columna de pozos que contiene el látex testigo deben ser negativos. El último pozo de todas las columnas debe ser negativo. Si se observan resultados positivos en alguno de estos pozos, la reacción se considerará como no válida.
- 3) Cuando hay exceso de toxina del cólera, se puede observar un efecto de prozona; esto es, se obtiene un resultado negativo en los primeros pozos que contienen la muestra en estudio y el látex sensibilizado. Sin embargo, como resultado de las diluciones al doble, la concentración de la

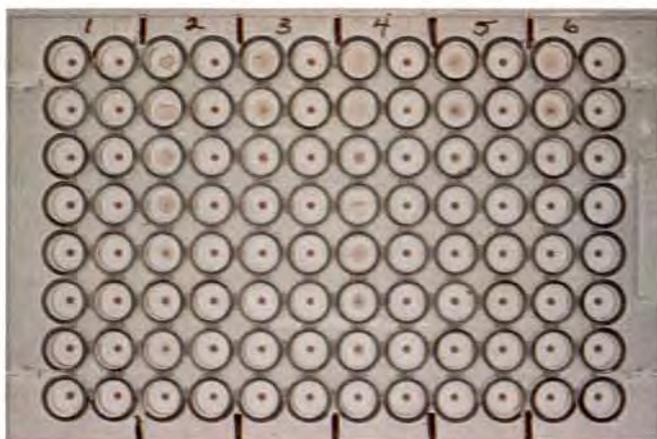


Figura VII-4. Microplaca con resultados de la prueba VET-RPLA (Oxoid Limited). La muestra 1 es negativa; las muestras 2, 3, 4, 5 y 6 son positivas.

toxina del cólera en cada pozo a lo largo de la columna se reduce progresivamente, anulando el efecto prozona debido a las cantidades excesivas de toxina del cólera. Se observará un resultado positivo de aglutinación después de los resultados negativos en los primeros pozos de la columna. Con tales resultados, la muestra de prueba se clasificará como positiva.

- 4) La sensibilidad de este estuche de prueba en la detección de la toxina del cólera es de 1 a 2 ng/ml. La enterotoxina, que se encuentra a concentraciones más bajas que esta, dará por tanto resultados negativos. El método es ligeramente menos sensible que el de  $G_{M1}$ -ELISA y rara vez una cepa toxigénica dará resultados negativos.

#### H. Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que emplea dos oligonucleótidos de DNA cortos y específicos (iniciadores) y la enzima DNA polimerasa para sintetizar copias múltiples de DNA en la porción del genoma bacteriano que tiene la secuencia complementaria al iniciador en cada extremo. En la PCR para la toxina del cólera descrita aquí, los iniciadores específicos detectan solamente el gen que codifica para la subunidad A de la toxina del cólera (*ctxA*; Figura VII-5). El DNA amplificado de *ctxA* se detecta como una banda de 564 pares de bases (pb) en un gel de agarosa. La ampliación de la PCR se puede caracterizar aún más mediante digestión con enzimas de restricción o hibridación con una sonda interna específica para asegurarse de que la banda de ampliación en el gel

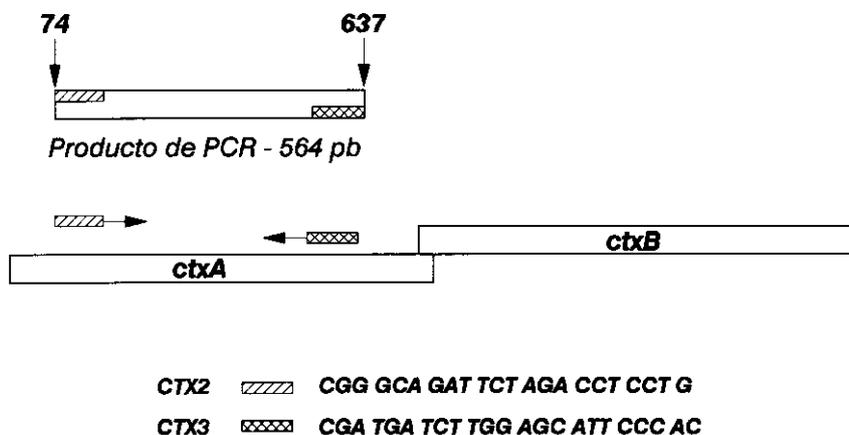


Figura VII-5. Localización de los iniciadores y tamaño del fragmento de DNA amplificado en la prueba de la PCR para la detección de *ctxA*.

es del gen *ctxA*. Esta prueba de PCR sirve para la confirmación de la colonia de *V. cholerae* O1 toxigénico; fue ideada para distinguir las cepas de *V. cholerae* O1 toxigénicas de las no toxigénicas, obtenidas de cultivos puros. Otros autores han descrito pruebas de PCR capaces de detectar *V. cholerae* toxigénico directamente en las heces o en los alimentos después del enriquecimiento con agua peptonada alcalina. La detección directa de *V. cholerae* por la PCR en las heces o en los alimentos se puede ver obstaculizada por sustancias presentes en estos tipos de muestras que inhiben la DNA polimerasa.

#### Equipo y suministros

- Baño de María en ebullición
- Termociclador (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, o M.J. Research Inc., Watertown, Massachusetts)
- Vórtex
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Cámara y transiluminador UV
- Micropipetas: de 0,5 a 20  $\mu$ l, de 20 a 50  $\mu$ l, y de 100 a 1.000  $\mu$ l
- Puntas de micropipetas desechables y estériles
- Tubos de microcentrífuga: 1,5 y 0,5 ml
- Guantes
- Máscara para detener polvo y partículas

## Detección de la toxina del cólera

### Reactivos

- Agua estéril (preparense alícuotas de 10 a 20 ml y utilícense alícuotas nuevas para cada prueba)
- Amortiguador de PCR 10x (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl 15 mM, gelatina al 0,1% [p/v])
- dNTP 12,5x (2,5 mM cada uno, dATP, dCTP, dGTP, dTTP en agua destilada estéril)
- Iniciador CTX2: 5' CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G 3'; 100  $\mu$ M en agua destilada
- Iniciador CTX3: 5' CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC 3'; 100  $\mu$ M en agua destilada
- DNA polimerasa AmpliTaq (5 unidades/ $\mu$ l, Perkin-Elmer)
- Aceite mineral (estéril)
- Agarosa (FMC BioProducts, Rockland, Maine)
- Amortiguador Tris borato EDTA (TBE) 10x (108 g de base Tris, 55 g de ácido bórico, 40 ml de 0,5 M EDTA y agua destilada hasta completar 1.000 ml; ajustar pH a 8,0)
- Amortiguador de carga del gel 10x (0,5% sulfato dodecil sódico, 10 mM EDTA, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 0,1% de cianol de xileno)
- Bromuro de etidio (la solución primaria es de 10 mg/ml de agua)
- Columnas de separación en tubo de microcentrífuga (G-50, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana)
- Endonucleasas de restricción *AluI* y *RsaI* (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland)
- Amortiguador 1 de restricción 10x (Gibco BRL)
- Marcador del tamaño de DNA molecular: escalera 1 kb (Gibco BRL)
- TEMED (Sigma Chemical Co.)
- Persulfato de amonio al 10% en agua, se prepara todos los días (Gibco BRL)
- Acrilamida al 30% (29 partes de acrilamida: 1 parte de bisacrilamida en agua), se guarda en la oscuridad a 4 °C

Nota: La acrilamida es neurotóxica; debe utilizarse máscara protectora cuando se prepara la solución primaria.

### Cepas testigo

- *V. cholerae* ATCC 14035 (clásica, Ogawa, toxina positiva)
- *V. cholerae* ATCC 14033 (El Tor, Inaba, toxina negativa)

### **Realización de la prueba**

**NOTA ESPECIAL:** Solo se requiere una cantidad muy pequeña del molde de DNA (DNA a partir del cual se genera la ampliación de la PCR) para la PCR. La presencia de cantidades pequeñas de DNA contaminante, en especial las que son producto de pruebas anteriores de la PCR, pueden dar resultados falsos positivos. Es importante usar testigos negativos así como positivos en cada experimento. El uso de agua en lugar del molde de DNA y una cepa negativa conocida son testigos negativos apropiados. El testigo positivo debe ser una cepa de referencia positiva conocida que se prepara junto con las cepas de prueba.

Para reducir la posibilidad de contaminar la PCR con productos obtenidos de dicha prueba en reacciones anteriores, las reacciones se prepararán en una habitación y la amplificación y la electroforesis se realizarán en otra. El producto de la PCR nunca debe llevarse a la habitación donde se prepara dicha reacción. Se reservará un juego separado de micropipetas, de preferencia pipetas de desplazamiento positivo, para preparar las pruebas de PCR.

- 1) Para preparar un molde de DNA, se suspende una asada de 1  $\mu\text{l}$  del testigo o de las cepas de prueba en 0,5 ml de agua para obtener una concentración de  $10^5$  a  $10^6$  microorganismos/ml. Se hierva la muestra durante 20 minutos para liberar el DNA. Son suficientes 1 a 10 ng de DNA; demasiado DNA puede inhibir la reacción de amplificación. Es importante usar agua en lugar de PBS u otro amortiguador que contenga fosfato pues este inhibe la PCR. Los grupos heme de las placas de agar sangre también pueden inhibirla.
- 2) Para cada prueba de PCR, se utiliza una mezcla de reacción de 50  $\mu\text{l}$  que consta de 38,75  $\mu\text{l}$  de agua estéril, 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador de PCR 10x, 4  $\mu\text{l}$  de dNTPs 12,5x, 0,5  $\mu\text{l}$  de cada iniciador (volumen total, 1  $\mu\text{l}$ ), 0,25  $\mu\text{l}$  de la DNA polimerasa AmpliTaq y 1  $\mu\text{l}$  del molde de muestra. Se prepara una "mezcla maestra" de todos los reactivos excepto del DNA de muestra. Esto reduce los errores de pipeteo y produce concentraciones más uniformes de los reactivos. Se mezcla suficiente amortiguador de PCR, dNTPs, polimerasa *Taq*, iniciadores y agua para todas las pruebas que se van a realizar en un solo tubo que debe contener el volumen necesario y posteriormente se colocan alícuotas individuales de 49  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción maestra en cada tubo de microcentrífuga de 0,5 ml. A continuación, se agrega 1  $\mu\text{l}$  del molde de DNA de muestra.
- 3) Se cubre la mezcla reactiva con una gota de aceite mineral estéril, y se cierran los tubos. Se programa el termociclador para un paso de preincubación a 95 °C durante 5 minutos, después a 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 72 °C y una incubación final a 72 °C durante 10 minutos. Se puede agregar un paso final que consiste en mantener los tubos a 4 °C para refrigerar las muestras hasta que estén

## *Detección de la toxina del cólera*

cargadas en el gel. Los tubos se colocan en el termociclador y se inicia el proceso.

- 4) Se prepara un gel de agarosa al 0,8% con amortiguador TBE. Se mezclan 10  $\mu$ l de la solución de PCR con 1 a 2  $\mu$ l del amortiguador de carga del gel de 10x y se cargan los pozos. Cuando se retiran los 10  $\mu$ l de la PCR, hay que cerciorarse de que la punta de la pipeta descienda más allá de la capa de aceite. Se utilizan testigos positivos y negativos adecuados con cada grupo de las reacciones, incluido un patrón de tamaño molecular en cada gel.
- 5) Se corre el gel hasta que el azul de bromofenol (color morado) ha migrado cerca de dos terceras partes del largo de la distancia en el gel. El voltaje y el tiempo efectivos variarán dependiendo del aparato de electroforesis que se utilice (por lo general, son suficientes un lapso de 2 a 3 horas y unos 60 a 80 voltios). La amplificación del gen *ctxA* de 564 pb debe migrar cerca del azul de bromofenol. Se tiñe el gel con bromuro de etidio (1 gota de la solución primaria en 500 ml de agua) durante 20 minutos, entonces se destiñe en agua durante 10 a 20 minutos. [Nota: el bromuro de etidio es mutagénico; siempre hay que usar guantes.] Se coloca el gel en el transiluminador UV y se toman fotografías para documentación.

### ***Interpretación de los resultados***

La prueba de PCR genera un producto amplificado de 564 pb. Esta ampliación migrará exactamente por arriba de la banda de 0,5 kb y del patrón de tamaño del DNA de 1 kb. Los iniciadores pueden verse como un frotis tenue que migra exactamente por abajo del patrón de tamaño de 200 pb (Figura VII-6). Los iniciadores, pero no la banda de ampliación de 564 pb, serán visibles para las muestras negativas. Las bandas que no sean del tamaño adecuado se considerarán negativas. Las bandas tenues que parezcan tener el tamaño correcto se deben interpretar con precaución. Cuando los resultados son dudosos, se puede verificar que el DNA amplificado proviene del gen *ctxA* recurriendo a la digestión con enzimas de restricción o a la hibridación con una sonda interna después de la prueba de transferencia de Southern. Para las aplicaciones comunes, la prueba con enzimas de restricción es más sencilla y más rápida que el sondeo con hibridación.

### ***Verificación de la ampliación de la PCR***

- 1) Se retira el aceite mineral de la muestra colocando el volumen total de la PCR sobre una cinta selladora Parafilm inclinada. El aceite mineral se adhiere al Parafilm a medida que la gota acuosa resbala hacia abajo. Se purifica el fragmento de DNA en una columna de separación en tubo de microcentrífuga G-50. Para preparar la columna, se centrifuga a  $600 \times g$  durante 5 minutos. Se agrega la muestra (10 a 50  $\mu$ l) y se repite la centrifugación. El mismo volumen de DNA purificado que se agregó a la columna pasará a través de la misma.

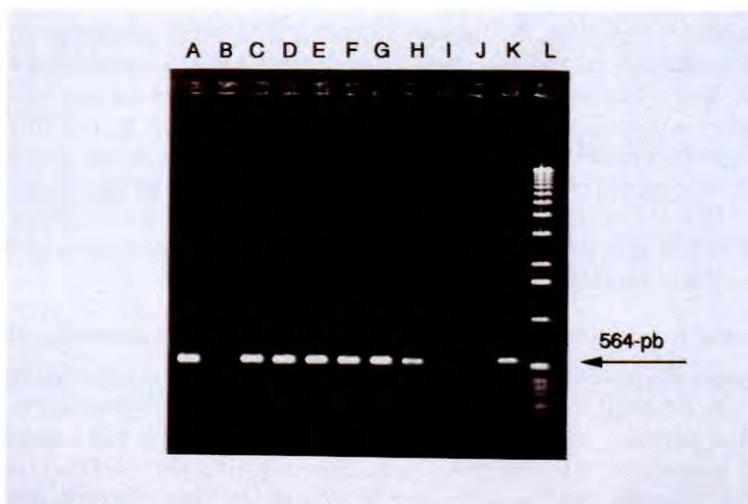


Figura VII-6. Gel de agarosa con resultados de una prueba PCR típica de la toxina del cólera. Las bandas A, C, D, E, F, cepas de prueba positivas; las bandas B, J, cepas de prueba negativas; bandas G, K, testigos positivos; bandas H, I, testigos negativos; banda L, escalera de ADN de 1 kb.

- 2) Se transfieren 15  $\mu$ l de la solución de la PCR a un tubo de microcentrífuga; se agregan 2  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l del amortiguador 1 de restricción (BRL) y 1  $\mu$ l de *RsaI* o *AluI* (o ambos). Se incuba durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de acrilamida. Los gels de acrilamida producen mejor resolución de los fragmentos pequeños de DNA. Para un miniaparato de electroforesis, se prepara un gel al 8% con 6,6 ml de acrilamida al 30% (29:1 acrilamida: bisacrilamida en agua), 15,6 ml de agua, 2,5 ml de TBE 10x, 0,2 ml de persulfato de amonio al 10% y 20 l de TEMED. Se vierte el gel y se deja polimerizar durante 1 hora antes de inocular las muestras (10  $\mu$ l de la PCR y 1  $\mu$ l del amortiguador de carga 10x). Se deja que el azul de bromofenol migre la mitad de la distancia antes de teñir el DNA, como se hace con el de agarosa. La restricción de la ampliación del gen *ctxA* de 564 pb con la endonucleasa *RsaI* genera tres fragmentos de 480, 70 y 14 pb; es factible que no se pueda ver el fragmento de 14 pb. La endonucleasa de restricción *AluI* produce dos fragmentos de 499 y 65 pb. La combinación de las dos enzimas genera cuatro fragmentos: 415, 70, 65 y 10 pb.

### I. Sondas de DNA para los genes de la toxina del cólera

En las improntas o “manchas” de colonias, las colonias aisladas que se van a someter a prueba para la detección de genes de la toxina del cólera

## *Detección de la toxina del cólera*

se inoculan en una placa de agar no selectivo utilizando una cuadrícula y se incuban hasta que los inóculos o parches de crecimiento alcancen el tamaño deseado. Las colonias, entonces, se transfieren a un filtro de nailon donde se someten a una serie de pasos para lisar a las células y fijar al filtro el DNA desnaturalizado o monocatenario. El filtro se hibrida con una sonda de DNA específica que corresponde al gen *ctx*. Aunque se han sometido a prueba DNA y los oligonucleótidos clonados, una amplificación generada mediante PCR que contiene bases marcadas con digoxigenina ha resultado ser una opción sensible, estable y segura.

### **1. Generación de ampliaciones de PCR marcadas con digoxigenina**

El procedimiento para generar sondas para PCR marcadas con digoxigenina es similar al que detecta genes *ctxA* con la misma reacción (sección H de este capítulo), excepto que ahora se utiliza una cepa bien caracterizada de *V. cholerae* O1 toxigénica para producir el molde de DNA, así como una segunda amplificación para incorporar la base marcada con digoxigenina.

#### ***Equipo y suministros***

Véase la Sección VII-H (“Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera”)

#### ***Reactivos***

- Véase la Sección VII-H (“Reacción en cadena de la polimerasa para los genes de la toxina del cólera”)
- Mezcla 10x de dNTP “-digoxigenina” (dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM)
- Digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim; la concentración es de 1 mM)

#### ***Procedimiento***

- 1) Se genera el producto amplificado por PCR que se utilizará como molde de DNA para la detección, siguiendo el procedimiento descrito en la sección VII-H usando una cepa productora de toxina del cólera (ATCC 14035 u otra cepa productora de toxina del cólera bien caracterizada) como fuente para el molde de DNA. La incorporación de dUTP marcado con digoxigenina en una molécula de DNA es menos eficiente que la incorporación de los dNTP estándar; por lo tanto, en la PCR de marcación se utiliza la ampliación de PCR como molde de DNA en lugar del DNA genómico total; esto se hace con la finalidad de aumentar la cantidad de DNA marcado (sonda) que se produce.
- 2) Se corren de 5 a 10  $\mu$ l de la mezcla de la PCR en un gel de agarosa al 0,8% para confirmar la producción de la ampliación de DNA de tamaño y concentración adecuados. Se tiñe y se fotografía para documentación.

- 3) Se hace una dilución de la mezcla de PCR de tal forma que cerca de 50 ng de los fragmentos de PCR se utilicen como moldes en la PCR de marcación (por lo general, de 1 a 3  $\mu$ l de una dilución 1:10).
- 4) Se prepara la PCR de marcación en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml: de 1 a 3  $\mu$ l del molde de DNA generado por PCR diluido, 1  $\mu$ l de cada iniciador (2  $\mu$ l del volumen total), 10  $\mu$ l del amortiguador de PCR 10x, 10  $\mu$ l de la mezcla de “-digoxigenina” dNTP 10x, 7  $\mu$ l de digoxigenina-11-dUTP (1 mM), 0,5  $\mu$ l de polimerasa *Taq* y de 67,5 a 69,5  $\mu$ l de agua destilada estéril. Se cubre la mezcla con 2 gotas de aceite mineral.
- 5) Se programa el termociclador para 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 90 segundos a 60 °C, 3 minutos a 72 °C, luego se incuba 10 minutos a 72 °C, y se mantiene a 4 °C. Se colocan los tubos en el termociclador y se inicia el proceso.
- 6) Los dNTP no incorporados y los iniciadores se retiran por purificación del DNA en una columna de separación en tubo de microcentrífuga G-50.
- 7) Se corren de 2 a 3  $\mu$ l de la mezcla de PCR en un gel de agarosa al 0,8%. Se tiñe y se fotografía. La ampliación marcada con digoxigenina migrará más lentamente (esto es, a un peso molecular más alto) que la ampliación no marcada, debido a la presencia de digoxigenina en la molécula.

## **2. Hibridación de colonias para los genes de la toxina del cólera**

### ***Equipo y suministros***

- Filtros de nailon circulares de 8 cm de diámetro (Micron Separations, Inc., Westboro, Massachusetts)
- Papel de cromatografía Whatman 3MM
- Horno de secado
- Agitador de plataforma
- Bolsas de plástico sellables con calor
- Aparato de sellado mediante calor
- Cajas de Petri
- Placas de caldo de Luria (LB en inglés) u otro medio de enriquecimiento (no utilizar placas de MacConkey debido a que causan más tinción de fondo en las manchas)

### ***Reactivos***

- Sonda marcada con digoxigenina (ampliación preparada en la Sección I.1.)
- NaOH 10 N

### *Detección de la toxina del cólera*

- Tris 1M, pH 8,0
- NaCl 5 M
- SDS al 20%
- SSC 20x: 175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrato de sodio en 1 litro de agua, pH 7,0
- Solución de prehibridación: SSC 5x, reactivo de bloqueo al 1% (Boehringer Mannheim), N-laurilsarcosina al 0,1%, SDS al 0,02% (se puede preparar previamente en grandes cantidades, hacerse alícuotas y almacenarse a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [Nota: La solución de prehibridación se utiliza para prehibridaciones y para hibridaciones.]
- Amortiguador A: Tris 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM
- Amortiguador C: Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM
- Leche descremada en polvo
- Conjugado de fragmento Fab de antidigoxigenina/fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim)
- Azul de tetrazolio (NBT en inglés): 75 mg/ml en agua
- 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato toluidino (BCIP): 175  $\mu\text{g/ml}$  en agua

### ***Preparación de las improntas o manchas de colonias***

- 1) Las colonias aisladas de cada cepa de prueba se transfieren a una placa de caldo de Luria (LB en inglés) utilizando una cuadrícula para organizar las colonias. La placa se incuba durante varias horas o de un día para otro a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que todas las colonias se observen claramente en la placa.
- 2) Se marca un filtro de nailon circular de 8 cm (área total de  $50\text{ cm}^2$ ) con una flecha para orientar la posición de las colonias y un número o la fecha para identificar el filtro. Se coloca el filtro con la flecha en la porción superior (con el lado rotulado hacia abajo), sobre la placa de caldo de Luria inoculada. Se retiran todas las burbujas de aire atrapado. Se incuba la placa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos a 2 horas. [Nota: Se pueden utilizar filtros de nitrocelulosa, pero se rompen con mayor facilidad que los de nailon. Los filtros de vidrio, como los Whatman 541, no se pueden usar en esta prueba debido a que la digoxigenina se adhiere de manera no específica a ellos.]
- 3) Se saturan dos hojas de papel de cromatografía de 3MM con NaOH 0,5 M en un recipiente de vidrio. Se levanta el filtro de nailon, se retira de la placa y se coloca en el papel de 3MM, con el lado de las colonias hacia arriba. Los parches o inóculos visibles de cada colonia deben adherirse al filtro. Se deja que las células se lisen durante 15 minutos.
- 4) Se saturan dos hojas de papel de cromatografía de 3MM con Tris 1,0 M, pH 8,0, en un recipiente de vidrio. Se transfiere el filtro del papel satu-

rado con NaOH al papel saturado con Tris, otra vez con las colonias hacia arriba. Se permite que se efectúe la neutralización durante 10 minutos.

- 5) Se saturan dos hojas de papel de cromatografía de 3MM con Tris 0,7 M, NaCl 1,5 M, pH 8,0, en un recipiente de vidrio. Se transfiere el filtro del papel saturado con Tris 1,0 M al papel saturado con Tris/NaCl, con las colonias hacia arriba. Se permite que se efectúe la neutralización durante 10 minutos.
- 6) Se enjuaga el filtro brevemente en SSC 2x. Se aplica el filtro sobre papel de cromatografía 3MM seco y se seca con aire a la temperatura ambiente o a 37 °C. Se coloca el filtro en un horno a 80 °C durante 30 minutos a 2 horas. El filtro quedará listo para la hibridación pero se puede almacenar en un recipiente hermético a temperatura ambiente hasta que se requiera.

### ***Hibridación de las improntas de colonias***

- 1) Se coloca el filtro en una bolsa de plástico sellable con calor. Se agregan 10 ml (0,2 ml/cm<sup>2</sup>) de la solución de prehibridación. Se expulsan las burbujas de aire oprimiendo la bolsa con una pipeta de arriba abajo. Téngase cuidado de expulsar el líquido. Se sella la bolsa con un aparato de sellado mediante calor. Se incuba el filtro en la bolsa a 65 °C durante 1 hora en baño de María con agitación.
- 2) Se prepara la sonda de 15 a 20 minutos antes del final del tiempo de prehibridación (véanse en la sección I-1 las instrucciones para la preparación de la sonda). Se diluye la sonda en un volumen total de 100 µl en un tubo de microcentrífuga; se utilizan de 1 a 5 µl de la sonda, dependiendo de la concentración. [Nota: La concentración óptima de la sonda necesita determinarse de manera empírica probando varias concentraciones en filtros replicados.] Se desnaturaliza la sonda incubándola en baño de María hirviendo por 10 minutos. Se enfría rápidamente la sonda colocándola en hielo durante algunos minutos. Se centrifuga la sonda en una microcentrífuga algunos segundos y se mantiene en hielo hasta que se necesite.
- 3) Se retira el filtro del baño de María. Se corta una esquina de la bolsa y se elimina de ella toda la solución de prehibridación. Se agregan 2,5 ml (0,05 ml/cm<sup>2</sup>) de la solución de prehibridación y la sonda a la bolsa. Se eliminan las burbujas de aire y se sella la bolsa de tal manera que se adapte a la forma del filtro hasta donde sea posible, para así lograr el contacto máximo entre el filtro y la sonda.
- 4) Se hibrida el filtro a 65 °C de 18 a 24 horas en baño de María con agitación.
- 5) Se preparan cerca de 500 ml de solución de lavado (SSC 1x, SDS al 0,1%), y se precalientan a 65 °C. Se retira el filtro de la bolsa de plástico

### *Detección de la toxina del cólera*

y se coloca en un recipiente de vidrio. Se agregan 100 ml de solución de lavado al recipiente de vidrio y se enjuaga brevemente el filtro. Se decanta la solución de lavado ya utilizada.

- 6) Se agregan 200 ml de solución de lavado al recipiente de vidrio y se coloca el filtro en el baño de María con agitación a 65 °C durante 15 minutos. Se retira la solución de lavado. Se agrega la solución de lavado restante y se incuba otra vez a 65 °C durante 15 minutos. El filtro se seca al aire y se conserva para el revelado posterior o se procede directamente a revelarlo.

### ***Detección de sondas marcadas con digoxigenina***

- 1) Se enjuaga el filtro con 40 ml de amortiguador A en una caja de Petri sobre un agitador de plataforma durante 1 minuto.
- 2) Se retira el filtro del amortiguador A, dejando que el exceso de solución escurra durante algunos segundos. Se coloca el filtro en otra caja de Petri que contenga 40 ml del amortiguador A con 5% de leche descremada en polvo (solución de bloqueo). Se incuba con agitación suave durante una hora.
- 3) Se decanta la solución de bloqueo y en su lugar se agrega conjugado de antidigoxigenina/fosfatasa alcalina en dilución de 1:5.000 en 10 ml de amortiguador A que contenga 5% de leche descremada en polvo. Se incuba durante 30 minutos con agitación suave.
- 4) Se transfiere el filtro a una caja de Petri que contenga 40 ml de amortiguador A. Se incuba durante 15 minutos con agitación suave. Se repite una vez el paso de lavado.
- 5) Se enjuaga el filtro en una caja de Petri que contenga 40 ml de amortiguador C en una bandeja de agitación durante 2 minutos.
- 6) Se retira el filtro del amortiguador C, dejando que el exceso de solución escurra durante algunos segundos. Se coloca el filtro en una caja de Petri que contenga 10 ml de amortiguador C con 45 µl de NBT (75 mg/ml) y 35 µl de BCIP (175 µg/ml). Se cierra la caja con cinta selladora Parafilm, se coloca en un lugar oscuro y se revisa periódicamente. Los resultados se pueden observar en algunas horas, pero puede requerirse la exposición de un día para otro para el revelado completo.

### ***Interpretación de los resultados***

Los aislamientos positivos para *ctxA* aparecerán como manchas o parches de un color entre morado oscuro y café sobre los filtros de nailon (Figura VII-7). Los aislamientos y los testigos negativos pueden aparecer como parches débilmente teñidos.

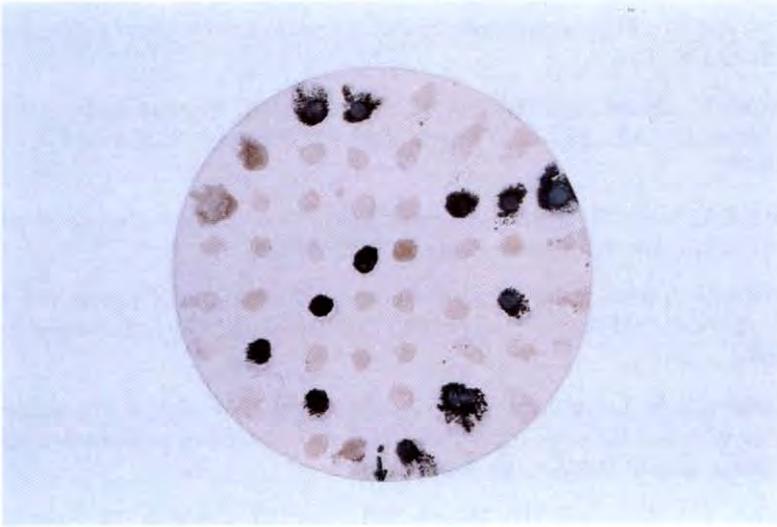


Figura VII-7. Resultados de la hibridación con una sonda marcada con digoxigenina para *ctxA*; el color morado oscuro indica una reacción positiva.

---

## Bibliografía

- Almeida RJ, Hickman-Brenner FW, Sowers EG, Puhr ND, Farmer JJ III, Wachsmuth IK. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. *J Clin Microbiol* 1990;28:128-130.
- Craig JP. A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature* 1965;207:614-616.
- De SN, Chatterje DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol* 1953;66:559-562.
- Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-1651.
- Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol* 1992;30:2118-2121.
- McIntyre OR, Feeley JC. Passive serum protection of the infant rabbit against experimental cholera. *J Infect Dis* 1964;114:468-475.

*Detección de la toxina del cólera*

Pershing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29:1281-1285.

Rapley R, Theophilus BDM, Bevan IS, Walker MR. Fundamentals of the polymerase chain reaction: a future in clinical diagnostics? *Med Lab Sci* 1992;49: 119-128.

Sack DA, Sack RB. Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect Immun* 1975;11:334-336.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Wachsmuth K. Laboratory detection of enterotoxins. En: Ellner PD, editor. *Infectious diarrheal diseases; current concepts and laboratory procedures*. New York & Basel: Marcel Dekker, Inc. 1984:93-115.

Yolken RH, Greenberg HB, Merson MH, Sack RB, Kapikian AZ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol* 1977;6:439-444.

## VIII. Detección de anticuerpos contra *Vibrio cholerae* O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes

El aislamiento de *V. cholerae* O1 a partir de heces de un paciente con infección es la prueba definitiva de infección con el microorganismo. Sin embargo, en algunas circunstancias no es posible el aislamiento del agente causal, como sucede cuando no se obtiene una muestra de heces mientras el paciente está sintomático o la muestra se recoge después de que la persona ha dejado de excretar el microorganismo, ya sea por tratamiento antibiótico o porque ha transcurrido el tiempo. Del mismo modo, el aislamiento puede no ser posible si la muestra se maneja inadecuadamente y los vibrios mueren, o si no hay apoyo de laboratorio para efectuar estudios bacteriológicos. En estas situaciones, la presencia de anticuerpos séricos o el cambio en ellos puede, a menudo, determinar si una persona ha sido infectada con *V. cholerae* O1.

Debido a que la mayor parte de las infecciones por *V. cholerae* O1 son asintomáticas o sintomáticas leves a moderadas, una encuesta de enfermedad clínica no es una buena forma para determinar qué proporción de una población se ha infectado recientemente con dicho bacilo. Los anticuerpos séricos pueden brindar la respuesta. Las pruebas de anticuerpos pueden ser particularmente valiosas para 1) identificar personas que no han tenido infección reciente por *V. cholerae* O1, a fin de usarlas como testigos en los estudios de casos y testigos; 2) determinar, en las zonas sin cólera confirmado, si los casos presuntivos de cólera, sin cultivos, fueron de hecho infecciones con *V. cholerae* O1; 3) determinar la proporción de personas que han tenido infecciones por *V. cholerae* O1 en las zonas recién afectadas, y 4) utilizar las muestras de suero almacenadas para determinar si el cólera ha pasado inadvertido en una zona, en años anteriores.

Las dos pruebas realizadas con mayor frecuencia para la detección de anticuerpos en infecciones por *V. cholerae* O1 son las de anticuerpos vibriocidas (dirigidos contra los antígenos somáticos O de *V. cholerae*) y las de anticuerpos antitoxina (dirigidos contra la toxina del cólera). En el Cuadro VIII-1 se presenta un resumen de estos métodos.

### A. La prueba vibriocida

La prueba vibriocida es un método confiable y bien documentado para determinar la presencia de anticuerpos bactericidas dirigidos contra los antígenos O de *V. cholerae* O1. En la prueba, las diluciones del suero del paciente se mezclan con un inóculo estandarizado de *V. cholerae* O1 (se deben utilizar cepas de *Vibrio cholerae* Ogawa e Inaba) y complemento de cobayo en exceso. Durante el período de incubación inicial, las bacterias mueren si hay anticuerpos vibriocidas. Se agrega medio de cultivo y después de un segundo período de incubación para detectar la supervivencia de bacterias se hace la lectura. Si aparece turbidez en el medio de cultivo, ello indica la ausencia de anticuerpos vibriocidas o por lo menos una cantidad de anticuerpos por debajo del umbral de detección con este método.

**Cuadro VIII-1. Prueba vibriocida y ELISA anti-TC**

| Característica de la prueba                               | Prueba vibriocida   | ELISA anti-TC   |
|---|---|---|
| Reactivos específicos necesarios                          | Complemento de cobayo y cultivos de <i>V. cholerae</i> serotipos Inaba y Ogawa  | Toxina o toxoide del cólera, anticuerpo conjugado con enzima dirigido contra IgG humana, sustrato enzimático  |
| Testigos necesarios                                       | Antisueros humanos positivo y negativo  | Antisueros humanos positivo y negativo  |
| Tipo de prueba  | Muerte <i>in vitro</i> de <i>V. cholerae</i> en presencia de complemento  | Unión de anticuerpo y antígeno sobre un soporte de fase sólida, detectada mediante anticuerpo antiglobulínico conjugado con enzima  |
| Anticuerpo determinado                                    | Anticuerpos antibacterianos   | Anticuerpos contra TC   |
| Respuesta máxima de anticuerpos                           | Diez días después del comienzo de la enfermedad   | Entre 21 y 28 días después del comienzo   |
| Duración de los anticuerpos, medidos por la propia prueba | Comienzan a disminuir al cabo de 1 mes, desaparecen en 12 meses   | Pueden persistir hasta por 2 años   |
| Ventajas  | Sensible, solo se necesita un reactivo comercial, no hace falta equipo costoso  | La producción de anticuerpos contra la TC no es estimulada por la vacuna anticolérica parenteral a base de células muertas  |
| Inconvenientes  | Los anticuerpos vibriocidas se ven afectados por las vacunas anticoléricas corrientes; la estandarización del inóculo es crucial para la exactitud de la prueba | No es tan sensible como la prueba vibriocida; requiere varios reactivos comerciales; los anticuerpos contra la toxina termolábil de <i>E. coli</i> pueden afectar la exactitud o especificidad de la prueba |

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

La prueba vibriocida puede fallar por varios elementos cruciales de la técnica. El control de calidad cuidadoso y el apego estricto al protocolo son esenciales para obtener resultados reproducibles. Con frecuencia se presentan problemas con la prueba vibriocida en relación con los siguientes aspectos:

- 1) procedencia, almacenamiento o dilución del complemento
- 2) carencia de cepas estándar de *V. cholerae* O1
- 3) preparación de la suspensión del antígeno
- 4) alteración de los pasos de la incubación durante la realización de la prueba.

**1. Preparación y control de calidad de los reactivos para la prueba vibriocida**

***Complemento***

El complemento liofilizado de cobayo se expende en el comercio. Si los laboratorios consideran que ello no es práctico o no es posible, pueden preparar su propio complemento liofilizado o congelado a partir de fuentes animales locales.

***Preparación del complemento mezclado fresco***

Se obtienen por punción cardíaca 10 ml de sangre de cada cobayo sano. Se deja que la sangre coagule (1 hora a temperatura ambiente), se centrifuga y rápidamente se separa el suero de cada animal en un tubo rotulado para cada muestra. En este momento, los sueros se pueden congelar por separado para usarlos en pruebas posteriores antes de mezclarlos, o se mantienen continuamente en baño de hielo en tanto se termina la prueba en 24 horas. (Véase a continuación la sección "Prueba de los sueros individuales de cobayo para detectar actividad vibriocida intrínseca".)

***Prueba de los sueros individuales de cobayo para detectar actividad vibriocida intrínseca***

El suero fresco mezclado de varios cobayos se puede usar como fuente de complemento en la prueba de anticuerpos vibriocidas; este no debe poseer actividad vibriocida intrínseca que altere la prueba por matar a los bacilos del cólera. Algunos cobayos (tal vez uno de cada 20) de ciertas colonias de animales tienen concentraciones bajas de anticuerpos que reaccionan contra *V. cholerae*, quizá debido a que han sido colonizados o infectados con una especie bacteriana cuyos antígenos dan reacción cruzada con los de dicho bacilo. El complemento comercial de cobayo generalmente representa la mezcla del suero de muchos cobayos, de tal manera que los anticuerpos presentes posiblemente se diluirán en el fondo común en grado suficiente para no alterar la prueba, a menos que la prevalencia de anticuerpos contra *V. cholerae* que aparecen de manera natural sea alta en la colonia original de cobayos utilizados.

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

Se examina el suero para detectar actividad vibriocida intrínseca dependiente del complemento; para tal efecto, se compara la fuerza letal del suero sin calentar con la del mismo suero calentado a 56 °C durante 30 minutos para destruir la actividad del complemento. Los anticuerpos contra *V. cholerae* que aparecen de manera natural no matarán al microorganismo si se ha inactivado el complemento.

El siguiente procedimiento, previo a la prueba, puede ser útil para eliminar el suero inadecuado cuando se prepara complemento de cobayo mezclado:

- 1) Se toma 0,1 ml de cada suero de cobayo y se diluye 1:5 agregándolo a 0,4 ml de solución salina en un pequeño tubo de ensayo rotulado. Se mezcla bien y se pipetea 0,25 ml en otro tubo rotulado (que diga "calentado"). Se mantiene el tubo original en baño de hielo mientras que el segundo tubo se calienta en baño de María a 56 °C durante 30 minutos.
- 2) Por cada muestra de suero que se va a someter a la prueba, se vierten 15 µl de suero diluido sin calentar en un pozo de microplaca y 15 µl de la muestra calentada del mismo suero en un pozo adyacente.
- 3) Se agregan 15 µl de una suspensión de *V. cholerae* (estandarizada y diluida 1:10), como se especifica más adelante en la sección "Preparación y estandarización de la suspensión de antígeno."
- 4) Se agregan 30 µl de solución salina estéril a cada pozo y se incuba a 37 °C durante 1 hora.
- 5) Se agregan 150 µl de caldo tibio de infusión de corazón a cada pozo y se incuba durante 1 hora y 45 minutos.
- 6) Por cada suero sometido a la prueba, se compara la turbidez en los pozos adyacentes que contienen muestras calentadas y no calentadas.
- 7) Se identifica y se descarta cualquier suero de cobayo que muestre significativamente mayor turbidez en el pozo de suero "calentado" que en el de suero "no calentado". Dichos sueros no se utilizarán en la prueba vibriocida, pero se pueden utilizar para otras reacciones dependientes del complemento.
- 8) Después de eliminar los sueros individuales que muestren actividad vibriocida intrínseca, se mezclan bien los sueros restantes y se congelan.

Nota: Si se desea, la prueba se puede realizar también en tubos de ensayo de 13 × 100 mm o 12 × 75 mm, ajustando las cantidades del inóculo, de solución salina y de caldo. Esto podría ahorrar una microplaca si se examina tan solo un número pequeño de sueros de cobayo.

### ***Titulación del complemento***

A diferencia de la prueba de fijación del complemento, no es necesario titular el complemento para la prueba vibriocida debido a que se utiliza un exceso de complemento.

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

**Almacenamiento del complemento**

El complemento se debe distribuir y congelar en alícuotas adecuadas en viales tapados herméticamente. Un mililitro de complemento de cobayo proveerá complemento suficiente para cuatro microplacas. El complemento comercial, después de rehidratarlo, también se debe dividir en alícuotas y congelarse de inmediato. [Precaución: No se utilice el diluyente comercial provisto con el complemento para rehidratarlo, puesto que puede contener algún agente conservador.] El complemento se puede almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por lo menos 1 año y a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos 3 meses. Cuando se descongela, el complemento debe usarse o desecharse y no se volverá a congelar.

**Cepas patrón**

Las cepas patrón usadas como testigo en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades son la VC 12 (*V. cholerae* O1 Ogawa) y la VC 13 (*V. cholerae* O1 Inaba). Es posible utilizar otras cepas Inaba y Ogawa bien caracterizadas, pero el uso de VC 12 y VC 13 permitirá estandarizar los resultados de muchos laboratorios.

Las cepas estándar se almacenarán congeladas, de preferencia a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y se sembrarán mediante estriación en agar de infusión de corazón (HIA) u otro medio no selectivo para preparar tantos tubos con medio inclinado como se necesiten. Dichos tubos se almacenarán por no más de 2 semanas para tener la seguridad de que las cepas permanecen lisas y viables para la prueba.

**Preparación y estandarización de la suspensión de antígeno**

Es necesario preparar dos suspensiones de antígeno: una de VC 12 y otra de VC 13. Se suspenden colonias recién aisladas de cada cepa en 2 a 3 ml de solución salina al 0,85% y se ajusta cuidadosamente la turbidez a una densidad de aproximadamente  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro). Este es el paso decisivo de la prueba vibriocida; una suspensión de antígeno que esté demasiado turbia o demasiado diluida puede alterar los títulos obtenidos.

**Método de McFarland**

Antes de utilizar este método, deben prepararse un patrón 4 de McFarland (en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", puede consultarse la fórmula correspondiente) y suspensiones del antígeno de prueba (para VC 12 y VC 13), las cuales se ajustarán a la misma turbidez del patrón 4 de McFarland. Se deben hacer recuentos de placa para asegurarse de que la turbidez del McFarland 4 sea la correcta y tenga una densidad de  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml.

Se agita el patrón de turbidez McFarland 4 en un vórtex inmediatamente antes de su uso. Se compara visualmente el patrón con la suspensión de antígeno preparada como se describió antes y se diluye esta, si es nece-

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

sario, con solución salina estéril. (Para un ajuste adecuado de la turbidez se utiliza un fondo blanco y una línea negra contrastante, además de iluminación suficiente.)

***Método del espectrofotómetro***

Antes de utilizar este método, se debe establecer la densidad óptica (DO) correspondiente a  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml. Para ello, se realizan recuentos de placa y se grafican contra la DO (longitud de onda de 550 nm) a fin de obtener una curva patrón. Con una cubeta de 1 cm y un haz de luz de 1 cm, la densidad óptica a esta concentración será de 0,9 a 0,95. Una vez que se conoce la densidad óptica, la curva patrón no necesita trazarse de nuevo mientras se utilice el mismo espectrofotómetro, los mismos recipientes y el mismo diluyente. Después de preparar las suspensiones a partir de los tubos con medio inclinado (descritas arriba), se mide la densidad óptica a 550 nm de cada suspensión y se ajusta con solución salina estéril hasta lograr la densidad óptica adecuada.

**2. Procedimiento de la prueba vibriocida**

Si se desea, la prueba vibriocida también puede realizarse en tubos ajustando las cantidades de inóculo, solución salina y caldo.

***Inoculación de las cepas de prueba***

- 1) La tarde anterior a la prueba, cepas VC 12 y VC 13 (u otras cepas testigo Ogawa e Inaba bien caracterizadas) procedentes de cultivos de reserva se siembran mediante estriación en placas de HIA (u otro medio no selectivo) y se incuban a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 16 a 18 horas. Cuatro tubos de agar con medio inclinado no inoculados se colocan en una incubadora a una temperatura de 35 °C a 37 °C para precalentarlos. Los tubos precalentados se inoculan con cultivos de VC 12 y VC 13 (2 tubos por cepa) de un día para otro. El inóculo se dispersa de manera abundante y uniforme sobre la superficie de los tubos. Se incuban a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 4 horas.

***Preparación de las diluciones de suero***

- 2) Siempre se procesa un suero positivo de título conocido y un suero negativo con la tanda diaria de estas pruebas. Se utiliza solución salina estéril como diluyente. Se prepara una dilución inicial de 1:5 para cada prueba y suero testigo colocando 25 µl de suero en el primer pozo en la hilera de una microplaca de fondo en U con 96 pozos y se agregan 100 µl de solución salina.
- 3) Se colocan 25 µl de solución salina en cada pozo de las hileras restantes.
- 4) Se transfieren 25 µl del primer pozo (suero 1:5) al segundo pozo (primer pozo de prueba). Se hacen diluciones dobles seriadas de 25 µl

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

hasta el pozo número 12 utilizando pipetas múltiples con salida única. La primera dilución de prueba (pozo número 2) será de 1:10 (1:20 después de agregar el antígeno).

***Estandarización de la suspensión de antígeno***

- 5) Después de que los tubos con medio inclinado se han incubado durante 4 horas, se suspenden las colonias de los tubos inoculados con 2 a 3 ml de solución salina estéril (0,85%). Se ajusta la turbidez de estas suspensiones a una densidad de aproximadamente  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml por uno de los métodos descritos anteriormente. Las suspensiones ajustadas se diluyen a 1:10 en solución salina estéril (dando una densidad de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) para proveer los antígenos que se van a utilizar.

***Preparación de la mezcla de complemento y bacterias***

- 6) Se diluye al 1:5 en agua destilada estéril el complemento recién descongelado. [Precaución: Si se utiliza complemento comercial, no se utilice el diluyente que trae, puesto que puede contener algún agente conservador.]
- 7) Se mezclan cantidades iguales del complemento diluido 1:5 y de la suspensión de antígeno bacteriano estandarizada diluida 1:10 (véase la sección precedente, "Estandarización de la suspensión de antígeno"). La mezcla se mantendrá en hielo y se utilizará en un plazo de 30 minutos. Se requieren cerca de 2,5 ml de mezcla de bacterias y complemento para cada placa. La concentración bacteriana final en la mezcla será aproximadamente de  $7,5 \times 10^7$  bacterias/ml.

***Adición de la mezcla de complemento y bacterias***

- 8) Se agregan 25  $\mu$ l de la mezcla de complemento y bacterias a las diluciones de suero preparadas antes en la microplaca. La mezcla se agregará a todas las diluciones de suero, excepto a las de la primera columna, las cuales se utilizan para detectar contaminación bacteriana del suero.
- 9) Se mezcla por agitación y se sellan las microplacas con selladores especiales.
- 10) Se coloca las placas en baño de María a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 1 hora. (Si no se dispone de baño de María, se puede utilizar una incubadora de 35 °C a 37 °C; sin embargo, puede ser necesario prolongar el tiempo de incubación.) Se precalienta el caldo de infusión de corazón para el siguiente paso.

***Adición del caldo de infusión de corazón***

- 11) Se retiran las placas del baño de María o de la incubadora y se agregan 150  $\mu$ l de caldo tibio de infusión de corazón (pH 7,4) a cada pozo,

### *Detección de anticuerpos contra*

### *Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

incluidos los pozos de la columna 1, los cuales se usarán como testigos para detectar la contaminación del suero. (Si el suero está contaminado, la prueba no tiene validez.) Se regresa la placa al baño de María a una temperatura de 35 °C a 37 °C y se incuba por 1 hora y 45 minutos.

- 12) Se retiran las placas del baño de María y se lee la prueba. Si el crecimiento en los pozos de suero testigo negativo es ligero, se reincuba durante 15 a 20 minutos antes de leer la prueba.

Nota: Se recomienda ceñirse estrictamente a los tiempos de incubación, en especial para el paso en el cual la mezcla del complemento y el antígeno se agrega a las diluciones de los antisueros.

### ***Lectura de la prueba vibriocida en la placa de microtitulación***

- 13) Se lee la prueba observando el crecimiento visible o la turbidez en los pozos después de agregar el caldo e incubar. La inhibición del crecimiento, puesta en evidencia por la falta de turbidez, es una reacción positiva (Figura VIII-1). El título se obtiene determinando la dilución del suero que inhibe aproximadamente el 50% del crecimiento de *V. cholerae*.

Nota: El título del suero testigo positivo no debe diferir más de una dilución con respecto al título esperado. Si el pozo de la primera columna, el cual contiene solamente suero y caldo, presenta crecimiento, el suero está contaminado. Si toda la microplaca presenta crecimiento, el caldo está contaminado.

## **B. La prueba ELISA para la antitoxina del cólera**

La toxina del cólera (TC) es antigénica y se han caracterizado bien sus propiedades inmunobiológicas. Las personas que han sido infectadas por *V. cholerae* productor de toxina suelen desarrollar una respuesta de anticuerpos intensa contra la toxina. Esta respuesta inmunitaria constituye la base del examen serológico para determinar la situación de cada individuo con respecto a los anticuerpos contra la toxina del cólera; por tanto, representa un indicador confiable de infección reciente con *V. cholerae* toxigénico. Es posible determinar la presencia de anticuerpos contra la toxina del cólera mediante estudios en animales y en cultivos de tejidos, con lo cual se establece si la actividad de la toxina ha sido neutralizada por el suero del paciente; sin embargo, en los laboratorios que no pueden efectuar pruebas *in vivo* o en cultivos de tejidos se realiza con frecuencia la prueba denominada ELISA anti-TC. La interpretación de las pruebas de anticuerpos contra la toxina del cólera se complica por el hecho de que dicha toxina es similar desde el punto de vista antigénico a la enterotoxina termolábil producida por *Escherichia coli* y ocurren reacciones cruzadas en personas que recientemente han padecido infecciones con *E. coli* enterotoxigénico productor de esta toxina.

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

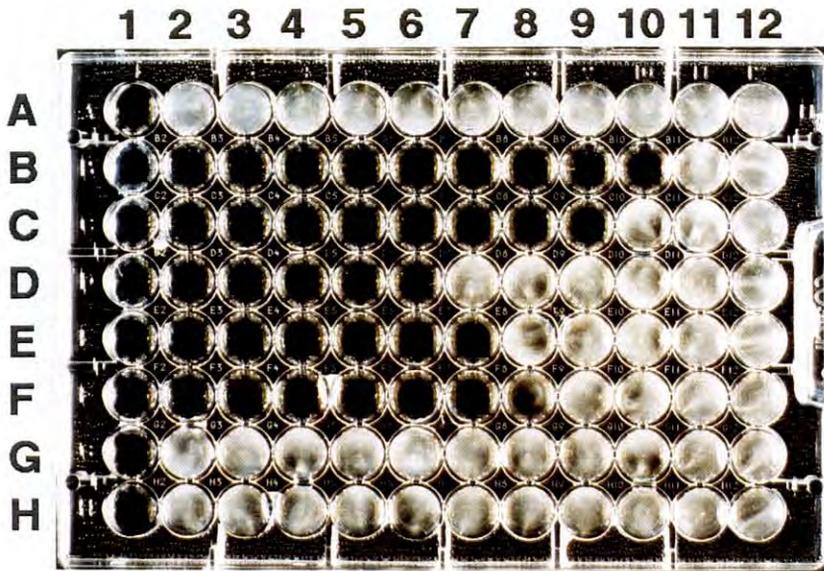


Figura VIII-1. La ausencia o inhibición del crecimiento indica que la cepa de *V. cholerae* O1 ha muerto por efecto de los anticuerpos específicos en el suero del paciente. La hilera A contiene el suero testigo negativo, y la hilera B, el suero testigo positivo. Los sueros de las hileras A, G y H son negativos para los anticuerpos vibriocidas ya que ha ocurrido crecimiento en todos los pozos, excepto en la columna A, que es el testigo para la contaminación del suero. Los títulos de las otras hileras son como sigue: B, 5.120; C, 2.560; D, 320; E, 640; F, 1.280 (en el pozo número 8, la turbidez es  $\leq 50\%$  por comparación con el pozo testigo negativo; por lo tanto, se lee como positiva).

La prueba ELISA para la detección de anticuerpos contra la toxina del cólera se basa en la unión de estos, presentes en el suero del paciente, a la toxina inmovilizada. Mediante el examen selectivo de pares de muestras séricas obtenidas en las fases tempranas de la enfermedad (muestra de la fase aguda) y durante el período de convalecencia (muestra de la fase de convalecencia), se pueden cuantificar y comparar las concentraciones de anticuerpos contra la toxina del cólera antes de la enfermedad y después de ella. En la prueba de microtitulación, los pozos de la microplaca se revisten con toxina del cólera y se lavan cuidadosamente, después de lo cual se agrega el suero del paciente a los pozos. Si hay anticuerpos contra la toxina del cólera, se unirán a ella y quedarán inmovilizados en el pozo de la microplaca. Tras un lavado ulterior, se agrega al pozo IgG antihumana preparada en cabra que ha sido marcada con una enzima (como fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano) que actúa sobre un sustrato cromógeno. La IgG mencionada se une a la inmunoglobulina humana. Cuando los pozos se

### *Detección de anticuerpos contra*

### *Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

lavan otra vez para eliminar todo el material que no se unió, solo permanece el "sandwich" de toxina del cólera + anticuerpos del paciente contra la toxina + IgG antihumana preparada en cabra y marcada con enzima. Entonces se agrega el sustrato cromógeno y se cuantifica la enzima unida midiendo la intensidad de la reacción cromática. Dicha intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra la toxina del cólera en el suero del paciente.

### **Procedimiento de la prueba ELISA anti-TC**

- 1) Se diluye la toxina del cólera (Calbiochem Corp., La Jolla, California) a razón de 1  $\mu\text{g/ml}$  en amortiguador de carbonato (0,05 M, pH 9,6). Se colocan 100  $\mu\text{l}$  de la solución en cada uno de los 60 pozos internos de una microplaca de 96 pozos con fondo plano o redondo.
- 2) Se colocan las placas cubiertas en una cámara húmeda y se refrigeran de un día para otro (de 15 a 20 horas).
- 3) Se lava cada placa cuatro veces con solución salina amortiguada con fosfato 0,01 M, pH 7,2 más Tween al 1% (PBS-T). Se deja el último lavado en las placas y se guardan estas en una cámara húmeda a 4 °C para su uso posterior. Las placas no deben almacenarse por muchos días (menos de dos semanas a 4 °C).
- 4) Se desecha de la placa la solución del último lavado y se bloquean todos los pozos con 150  $\mu\text{l}$  de PBS-T que contenga 5% de leche descremada en polvo y 10% de suero fetal de bovino (PBS-T-M-FBS en inglés). Se incuba a temperatura ambiente por lo menos de 30 minutos a 1 hora. Se desecha el líquido, pero no se lava. En este momento la placa se ha "bloqueado" para su uso posterior.
- 5) En tubos estériles pequeños se hacen diluciones de 1:200 en PBS-T-M-FBS (5  $\mu\text{l}$  de suero en 1 ml de amortiguador) de cada suero que va a someterse a prueba. Se incluyen en cada tanda sueros testigo, uno positivo y tres negativos.

Si se desea saber solamente si un suero determinado es positivo para anticuerpos contra la toxina, no es necesario hacer más diluciones. Se colocan 100  $\mu\text{l}$  de cada suero diluido 1:200 en los pozos correspondientes de la microplaca sensibilizada (preparada en los pasos 1 al 4).

Si se desea determinar un título de anticuerpos, se diluyen los sueros en una microplaca separada sin sensibilizar, de la siguiente manera: se colocan 200  $\mu\text{l}$  de suero diluido 1:200 en la primera columna de los pozos internos; se depositan 100  $\mu\text{l}$  de PBS-T-M-FBS en cada pozo restante; se hacen seis diluciones dobles seriadas de 100  $\mu\text{l}$  utilizando una pipeta múltiple de salida única. Se vierten 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución del suero en los pozos apropiados de la placa sensibilizada (preparada en los pasos 1 al 4). Nota: Los sueros testigo negativos no se diluyen.

- 6) Se incuba a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante una hora.

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

- 7) Se desecha el líquido de las placas y se lava cuatro veces con PBS-T que contenga 1% de suero fetal de bovino (PBS-T-FBS).
- 8) Se diluye el conjugado de inmunoglobulina antihumana marcada con fosfatasa alcalina (1:2.000; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland) en PBS-T-FBS, y se colocan 100  $\mu$ l en cada pozo. [Nota: Puesto que el conjugado puede variar de un lote a otro, la concentración que debe utilizarse se determinará mediante titulación previa.] Se incuba durante 1 hora a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Se desecha el líquido y se lava cuatro veces con PBS-T-FBS.
- 9) Se prepara la solución del sustrato de la fosfatasa alcalina (*p*-nitrofenil-fosfato [Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri] en amortiguador de dietanolamina; véanse en el Capítulo XI, "Preparación de medios de cultivo y reactivos", las instrucciones para su preparación). Se colocan 100  $\mu$ l de la solución del sustrato de la enzima en cada pozo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 10) Se detiene la reacción agregando 50  $\mu$ l de NaOH 3M a cada pozo. Se mezcla bien y se lee la densidad óptica a 405 nm en un aparato lector de ELISA. Se registran los resultados.

Si no se determinan los títulos (se utiliza una sola dilución de 1:200), una lectura de densidad óptica de 0,30 o mayor se considerará como lectura significativa o "positiva" (véase a continuación la sección C, "Interpretación de los resultados de las pruebas serológicas").

Una densidad óptica mayor de 0,1 (o dos veces mayor que la media de los tres sueros testigo negativos) se considerará positiva para la presencia de anticuerpos contra la toxina del cólera a esa dilución. El título del suero corresponde al valor recíproco de la última dilución que haya dado una lectura positiva de densidad óptica. Un título de anticuerpo contra la toxina de 400 se considerará positivo, en tanto que 200 se considerará un valor límite umbral (véase la sección C, a continuación).

### **C. Interpretación de los resultados de las pruebas serológicas**

Se deben obtener de cada persona, cuando sea posible, sueros por pares para determinar anticuerpos vibriocidas; el suero de la fase aguda se obtendrá lo antes posible (de manera ideal, en un plazo de 0 a 3 días después del inicio de la enfermedad), y el suero de la fase de convalecencia, entre 10 y 21 días después del inicio. Un aumento en cuatro diluciones o mayor en el título de anticuerpos vibriocidas, a por los menos 320, establece el diagnóstico de infección por *V. cholerae* O1 si el paciente no ha recibido recientemente vacuna contra el cólera. Los títulos menores quizá no sean reproducibles. Los anticuerpos vibriocidas aparecen en por lo menos 90 a 95% de las personas con infección por *V. cholerae* O1 confirmada mediante cultivo. Los títulos vibriocidas aumentan rápidamente tras el inicio de la enfermedad o de la infección. El aumento de los títulos es similar en todas

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

las personas infectadas, independientemente de la presencia de los síntomas o su gravedad. Los títulos en voluntarios humanos, por lo general, alcanzan su máximo 10 días después de la ingestión de los microorganismos, comienzan a declinar en un mes, disminuyen marcadamente en 6 a 12 meses y regresan casi al nivel basal al cabo de un año.

No hay un solo título vibriocida que establezca el diagnóstico de cólera en todas las situaciones. En los Estados Unidos, donde los casos de cólera son extremadamente raros, un estudio demostró que los títulos anti-Ogawa >640 se presentan en solo 0,9% de las personas sanas. En un estudio con voluntarios, un mes después de la infección se observaron los siguientes resultados: 79% de las personas tuvieron títulos  $\geq 1.280$ ; 89%,  $\geq 640$ ; 92%,  $\geq 320$ ; 97%,  $\geq 160$ , y 99%,  $\geq 20$ . Una persona con un título <20 es poco probable que haya tenido infección por *V. cholerae* O1 durante los 10 a 30 días precedentes, mientras que una persona con un título  $\geq 1.280$  es probable que haya sido infectada con el microorganismo y para fines prácticos se le considera "positiva". Las personas con títulos intermedios pueden haber estado infectadas o no, y el título que podría considerarse "positivo" depende del grado de certeza que se desee tener. Por ejemplo, mientras que los títulos vibriocidas de 160 y de 320 se consideran por lo general "negativos", las personas con estos títulos no se aceptan como testigos "negativos" en los estudios de casos y testigos sobre el cólera. Un título vibriocida de 640 se considera positivo dudoso por estar en el límite umbral; puede representar una infección pasada con *V. cholerae* O1 o la presencia de anticuerpos contra microorganismos capaces de provocar reacción cruzada (*Yersinia enterocolitica* serotipo O9, *Brucella* spp., *Citrobacter* spp. y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*). Los resultados en el límite umbral deben repetirse y confirmarse porque entre una tanda y otra de pruebas de la misma muestra es posible encontrar una variación en el título por un tubo o una dilución. Una disminución en el título del suero entre la fase aguda y la de convalecencia también puede indicar infección.

La interpretación de las pruebas de anticuerpos contra la toxina se complica por el hecho de que la toxina del cólera es similar a la enterotoxina termolábil producida por *E. coli*. Esta situación rara vez representa un problema en países como los Estados Unidos, donde son raras las infecciones por *E. coli* enterotoxigénico. Sin embargo, como estas son comunes en la mayor parte de los países afectados por el cólera, dichas pruebas resultan menos útiles de lo que podrían ser. Es posible distinguir los anticuerpos si se someten a prueba contra la toxina del cólera y la enterotoxina termolábil; pero los procedimientos correspondientes escapan a los propósitos de este manual y deben consultarse en otras fuentes.

Los anticuerpos contra la toxina se han detectado mediante ELISA anti-TC en 88% de los voluntarios que excretan *V. cholerae* O1. Los anticuerpos pueden permanecer elevados durante más de dos años. Los anticuerpos de IgG contra la toxina alcanzan su valor máximo en un plazo de 21 a 28 días después del inicio de la enfermedad. La muestra de suero

*Detección de anticuerpos contra  
Vibrio cholerae O1 y contra la toxina del cólera en los pacientes*

de la fase aguda para la prueba de dichos anticuerpos debe obtenerse tan pronto como sea posible (de manera ideal, dentro de un margen de 0 a 3 días después del inicio de la enfermedad), y el de la fase de convalecencia, lo más cerca posible del período de 21 a 28 días después del inicio. Un incremento neto de la densidad óptica de 0,2 o mayor entre los sueros de la fase aguda y la de convalecencia (a una dilución de 1:200) o un aumento total en cuatro diluciones representa una respuesta significativa de anticuerpos contra la toxina. Una muestra única es menos útil, pero una densidad óptica neta  $\geq 0,30$  (a una dilución única de 1:200) se ha utilizado para indicar una muestra positiva. También se puede considerar positivo un título sérico de 400. Un título sérico de 200 es positivo dudoso por estar en el límite umbral.

Para determinar si una persona ha tenido una infección reciente por *V. cholerae* O1, el estudio de una sola muestra de suero mediante las pruebas vibriocida y de anticuerpos contra la toxina puede ofrecer un diagnóstico más seguro que el que se logra con una sola de ellas. En una persona no infectada, es remota la posibilidad de que por azar ocurra un aumento en el título de anticuerpos contra dos antígenos independientes de *V. cholerae*.

---

## Bibliografía

Clements ML, Levine MM, Young CR, Black RE, Lim YL, Robins-Browne RM, Craig JP. Magnitude, kinetics and duration of vibriocidal antibody responses in North Americans after ingestion of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1982;145:465-473.

Levine MM, Young CR, Black RE, Takeda Y, Finkelstein RA. Enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibodies to purified heat-labile enterotoxins from human and porcine strains of *Escherichia coli* and to cholera toxin: application in serodiagnosis and seroepidemiology. *J Clin Microbiol* 1985;21:174-179.

Levine MM, Young CR, Hughes TP, O'Donnell S, Black RE, Clements ML, Robins-Browne R, Lim Y-L. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am J Epidemiol* 1981;114:348-354.

Snyder JD, Allegra DT, Levine MM, Craig JP, Feeley JC, DeWitt WE, Blake PA. Serologic studies of naturally acquired infection with *Vibrio cholerae* serogroup O1 in the United States. *J Infect Dis* 1981;143:182-187.

Young CR, Wachsmuth IK, Olsvik O, Feeley JC. Immune response to *Vibrio cholerae*. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editors. *Manual of clinical laboratory immunology*. 3rd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1986:363-370.

## IX. Subtipificación molecular de *Vibrio cholerae* O1

Las técnicas de biología molecular se han aplicado en la microbiología diagnóstica y en la salud pública. Estas técnicas por lo general son más rápidas y específicas que las técnicas tradicionales, y con frecuencia facilitan la diferenciación entre las cepas. Asimismo, han sido decisivas en la subtipificación de los aislamientos de *V. cholerae* y resultan de máxima utilidad en los laboratorios de referencia en donde se cuenta con equipo y reactivos especializados. Estas técnicas tienen la clara ventaja de ser genéricas, es decir, son aplicables a una amplia gama de bacterias patógenas. Aunque la mayor parte de los métodos requieren medidas cualitativas e interpretación de los datos, esto podría cambiar con el uso creciente del equipo de obtención de imágenes biológicas y análisis computadorizado de datos. En virtud de que las pruebas genotípicas han cobrado mayor importancia dentro de la microbiología clínica, actualmente se intenta estandarizar los métodos.

El aislamiento y la identificación comunes de *V. cholerae* O1 son relativamente sencillos. Sin embargo, las técnicas genotípicas son útiles para caracterizar cepas singulares, puesto que las características fenotípicas por sí solas no bastan para diferenciar las cepas de *V. cholerae* O1. Dado que las cepas procedentes de la epidemia de América Latina no se pudieron subtipificar mediante las características fenotípicas, se definieron por análisis enzimáticos de loci múltiples, electroforesis en gel de campo pulsado, ribotipificación y otros métodos de subtipificación molecular. Además, se han estudiado las relaciones de los aislamientos de América Latina en comparación con los provenientes de la costa del Golfo de México correspondiente a los Estados Unidos y de otras partes del mundo.

### A. Perfiles de plásmidos

Los plásmidos son elementos de DNA extracromosómicos que median diversos rasgos fenotípicos y pueden mediar la conjugación entre células bacterianas. Algunos plásmidos son autotransmisibles y pueden estimular la transferencia de otros plásmidos. Estas propiedades genéticas a menudo dan por resultado cepas que poseen un conjunto complejo de plásmidos; es factible determinar el número y tamaño de estos mediante el aislamiento del DNA del plásmido y la electroforesis en geles de agarosa. Este perfil del plásmido puede ser exclusivo de determinadas cepas bacterianas y ha sido útil en la identificación de las cepas epidémicas en los brotes de enfermedad diarreica.

Los perfiles de plásmidos son particularmente útiles en la caracterización de los aislamientos de *V. cholerae* del biotipo clásico, que por lo general tiene plásmidos de 21 y 3 megadaltones de peso molecular. Sin embargo, las cepas de *V. cholerae* O1 del biotipo El Tor rara vez presentan plásmidos que no se asocian con resistencia adquirida a los antibióticos.

## **B. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción**

El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP en inglés) representan diferencias en el tamaño del fragmento o de los fragmentos de restricción del DNA específico entre las diferentes cepas. Una enzima de restricción que reconoce las secuencias blanco específicas (por lo general de 4 a 8 pares de bases) en la molécula de DNA corta o digiere el DNA genómico total en fragmentos más pequeños. Dichos fragmentos se separan entonces por electroforesis en gel de agarosa. Debido al tamaño y la complejidad del genoma bacteriano, suelen generarse cientos de fragmentos de restricción diferentes, lo cual dificulta la identificación de los RFLP. Para generar fragmentos de restricción más manejables, los fragmentos de DNA separados se transfieren a una membrana y se estudian los genes específicos de interés. La sonda de DNA o RNA marcada hibrida solamente con los fragmentos de restricción que contienen las secuencias de DNA complementarias. [Nota: Actualmente se expenden en el comercio varios sistemas de marcación y detección.] El conjunto de bandas de la sonda que identifica la localización de los genes específicos es también mucho más sencillo, pues consta generalmente de 1 a 14 bandas.

Se ha utilizado una variedad de sondas para la tipificación molecular de *V. cholerae* O1. Los genes que codifican el RNA ribosómico (RNAr) se encuentran en copias múltiples en el genoma de *V. cholerae*; así, se obtienen conjuntos de bandas moderadamente complejos cuando se utiliza RNAr como sonda. A menudo se logra un alto grado de discriminación de las cepas con esta técnica, denominada en ocasiones “ribotipificación” (Figura IX-1). De manera similar, debido a que los genes de la toxina del cólera pueden estar presentes en una o en muchas copias, los RFLP basados en la localización de dichos genes suelen ser útiles para diferenciar las cepas. Los bacteriófagos VcA1 y VcA3 en ocasiones se encuentran en el cromosoma de los aislamientos de *V. cholerae*; se han utilizado sondas para estos profagos con el fin de identificar las cepas.

Se ha elaborado recientemente la llamada electroforesis en gel de campo pulsado, que separa fragmentos de DNA de peso molecular muy alto. Esta técnica, en combinación con las enzimas de restricción que cortan el DNA, de vez en cuando permite identificar un número relativamente pequeño de fragmentos de restricción del DNA. Estos RFLP se pueden visualizar y analizar sin necesidad de hibridación ni de sondas específicas.

## **C. Análisis de enzimas de loci múltiples**

Las enzimas que participan en los procesos metabólicos corrientes de una célula bacteriana frecuentemente aparecen en formas alélicas múltiples, denominadas isoenzimas. Las diferentes formas alélicas se pueden identificar como una diferencia en la movilidad de la enzima en una matriz de gel. Un extracto sin refinar que contenga las enzimas celulares se somete a electroforesis a través de un gel de almidón y se determina la localiza-

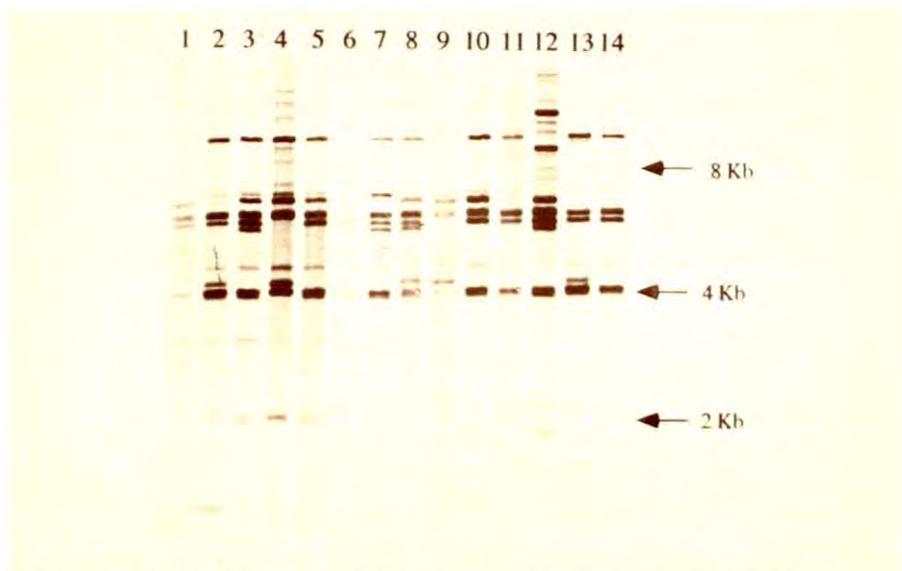


Figura IX-1. Bandas de restricción del gen de RNAr obtenidas en el DNA de *V. cholerae* O1 digerido por *BglI*.

ción de una enzima específica mediante la adición de un sustrato precipitante o una sustancia química que permita identificar la enzima; esto produce un cambio de color en la región del gel en donde se localiza la enzima. Cada resultado de movilidad electroforética se registra como una forma alélica diferente. Cuando se utiliza esta técnica, se caracteriza una cepa con respecto a la movilidad electroforética de un conjunto de enzimas, y las formas alélicas de todas ellas se utilizan para definir la cepa o el tipo de enzima.

La prueba de enzimas de loci múltiples se ha utilizado para demostrar que la cepa de *V. cholerae* O1 asociada con la epidemia de América Latina es singular y que la mayor parte de los aislamientos de *V. cholerae* O1 no toxigénico, que se han vinculado solamente con enfermedad esporádica y leve, no se relacionan con los aislamientos de cepas pandémicas productoras de toxina.

#### D. Determinación de la secuencia del DNA

En muchos laboratorios de biología molecular se ha vuelto común la capacidad para determinar la secuencia de nucleótidos en una molécula de DNA. Recientemente, esta técnica se automatizó y es posible aplicarla a la caracterización rutinaria de las cepas con propósitos diagnósticos y epidemiológicos. Una secuencia de DNA específica de un gen que existe en formas alélicas múltiples puede ser un buen marcador epidemiológico de dicho

alelo en un aislamiento. Por ejemplo, se sabe que algunas toxinas, como la del cólera, son heterogéneas; las diferentes cepas producen formas antigénicas distintas de la toxina. Esa heterogeneidad se refleja en la secuencia de DNA de los genes que codifica. Por lo tanto, se pueden identificar las diferentes formas de la toxina mediante la determinación de la secuencia de DNA del gen que la codifica. Las diferencias en la secuencia del gen *ctxA* indican que las cepas de América Latina son como las cepas de la séptima pandemia de otras partes del mundo y que las cepas de las costas del Golfo de México correspondientes a los Estados Unidos son como las cepas del biotipo clásico.

---

## Bibliografía

- Almeida RJ, Cameron DN, Cook WL, Wachsmuth IK. Vibriophage VcA-3 as an epidemic strain marker for the U.S. Gulf Coast *Vibrio cholerae* O1 clone. *J Clin Microbiol* 1992;30:300-304.
- Chen F, Evins GM, Cook WL, Almeida R, Hargrett-Bean N, Wachsmuth K. Genetic diversity among toxigenic and nontoxigenic *V. cholerae* O1 isolated from the Western Hemisphere. *Epidemiol Infect* 1991;107:225-233.
- Cook WL, Wachsmuth K, Johnson SR, Birkness KA, Samadi AR. Persistence of plasmids, cholera toxin genes, and prophage DNA in Classical *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* 1984;45:222-226.
- Koblavi S, Grimont F, Grimont PAD. Clonal diversity of *V. cholerae* O1 evidenced by rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol* 1990;141:645-657.
- Olsvik O, Wahlberg J, Peterson B, Uhlen M, Popovic T, Wachsmuth IK, Fields PI. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J Clin Microbiol* 1993;31:22-25.
- Popovic T, Bopp C, Olsvik O, Wachsmuth K. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *V. cholerae* O1. *J Clin Microbiol* 1993;31:2474-2482.
- Wachsmuth IK, Bopp CA, Fields PI, Carrillo C. Difference between toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from South America and US gulf coast. *Lancet* 1991;337:1097-1098.
- Wachsmuth IK, Evins GM, Fields PI, Olsvik O, Popovic T, Bopp CA, Wells JG, Carrillo C, Blake PA. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J Infect Dis* 1993; 167:621-626.
- Yam WC, Lung ML, Ng MH. Restriction fragment length polymorphism analysis of *V. cholerae* strains associated with a cholera outbreak in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 1991;29:1058-1059.

## X. Antisueros para la tipificación serológica de *Vibrio cholerae* O1

### A. Consideraciones generales

La tipificación serológica de los aislamientos de la especie *Vibrio cholerae* se basa en la detección de los antígenos somáticos O, termoestables y de naturaleza lipopolisacárida, mediante pruebas de aglutinación en lámina (o tubo). Basándose en los antígenos O se han identificado más de 130 serogrupos en esta especie, pero solamente los microorganismos que poseen los antígenos O del grupo 1 (cepas "O1") y producen toxina del cólera se han relacionado con cólera epidémico. Los antígenos flagelares (o "H") se comparten ampliamente entre los serogrupos O y no han resultado útiles para serotipificar *V. cholerae*.

Se sabe que las cepas de *V. cholerae* O1 contienen tres componentes antigénicos discernibles, los cuales se denominan por las letras A, B y C. El A es el antígeno específico O1 común. Los aislamientos que carecen del antígeno A pertenecen a serogrupos diferentes de O1. En el serogrupo O1 hay dos serotipos: Ogawa (que contiene antígenos AB) e Inaba (que contiene antígenos AC). Se ha descrito un tercer serotipo, denominado Hikojima, del cual se dice que posee antígenos ABC. Sin embargo, este tipo es muy raro y generalmente inestable; su identificación se atribuye, con frecuencia, a reacciones en que los antisueros de prueba se absorbieron de manera inadecuada.

Desde los puntos de vista inmunoquímico y genético, las diferencias entre los serotipos Ogawa e Inaba son muy pequeñas y dependen de cambios menores en los residuos de azúcares que constituyen los determinantes antigénicos propiamente dichos del complejo del antígeno lipopolisacárido. De hecho, se sabe que se presentan cambios antigénicos del serotipo Ogawa mediante los cuales se convierte en Inaba y viceversa. No es raro observar un brote que se inicia con un serotipo, pero a medida que se propaga se encuentran aislamientos del otro serotipo. Al principio del brote, en América Latina solamente se aisló el serotipo Inaba, pero las cepas del serotipo Ogawa aparecieron a medida que se propagaba la epidemia.

Los análisis genéticos de la secuencia del DNA han demostrado que el gen *rfbT* es el responsable del cambio de los serotipos de Ogawa a Inaba y viceversa. Las cepas Ogawa tienen un gen *rfbT* funcional, en tanto que las cepas Inaba han sufrido una mutación que da por resultado un gen *rfbT* afuncional. Las mutaciones de los serotipos Ogawa a Inaba (y viceversa) se han demostrado en condiciones de laboratorio *in vivo* e *in vitro* bajo presión inmunitaria selectiva, y estas mutaciones presumiblemente se presentan en los pacientes y, en gran escala, en poblaciones enteras. Esto se ha observado en el brote de América Latina y representa solo un cambio genético trivial, no la introducción de una nueva cepa epidémica.

Aunque la identificación del serotipo puede tener limitaciones como herramienta epidemiológica debido al cambio antigénico mencionado, no es pro-

bable que pronto se abandone la serotipificación de *V. cholerae* O1. La detección de otro serotipo o un cambio en el serotipo predominante puede ser un reflejo válido de un acontecimiento epidemiológico importante. Asimismo, la identificación del serotipo con antisueros monoespecíficos (absorbidos) sigue siendo la prueba serológica confirmatoria para los aislamientos de *V. cholerae* que aglutinan con el antisuero polivalente O1.

## **B. Preparación de antisueros**

La tipificación serológica de los aislamientos de *V. cholerae*, por lo general, se hace mediante pruebas de aglutinación en lámina. Para tal efecto, se prepara un antisuero polivalente O1 en conejos inmunizados con microorganismos muertos por calor, después de lo cual se lleva a cabo la aglutinación en lámina con sueros absorbidos específicos anti-Ogawa y anti-Inaba. Además de los antisueros de conejo, se consiguen en el comercio reactivos basados en anticuerpos monoclonales. El antisuero polivalente O1 de título satisfactorio es relativamente fácil de preparar mediante la inmunización de conejos; por el contrario, los sueros específicos anti-Ogawa (AB) y anti-Inaba (AC), son más difíciles de preparar debido a que requieren absorción extensa para lograr la especificidad de serotipo y, como resultado, tienen frecuentemente un título bajo. El suero específico anti-Ogawa (anti-B) se prepara por absorción repetida del suero anti-Ogawa (que contiene anticuerpos anti-A y anti-B) con células Inaba (AC) para eliminar los anticuerpos anti-A que presentan reacción cruzada. A la inversa, el suero específico anti-Inaba (anti-C) se prepara mediante absorción del suero anti-Inaba (que contine anti-A y anti-C) con células Ogawa (AB), también con la finalidad de eliminar los anticuerpos anti-A que dan reacción cruzada. Aunque es sencilla en teoría, la preparación de estos sueros es difícil y frecuentemente da por resultado títulos insuficientes. Puede haber gran variación de un conejo a otro referente a la cantidad de anticuerpos que sintetizan en contra de los antígenos B y C específicos de serotipo; en consecuencia, quizá haya que proceder tentativamente para seleccionar el mejor suero con miras a preparar estos reactivos absorbidos. Los sueros específicos anti-Inaba (anti-C), generalmente son más difíciles de preparar porque la mayor parte de los antígenos Ogawa que se utilizan para la absorción contienen un pequeño residuo de epítopes antigénicos anti-C activos, disminuyendo así significativamente el contenido deseado de anticuerpo anti-C del reactivo absorbido.

Solamente los laboratorios con gran experiencia en la preparación de antisueros absorbidos y con capacidad de efectuar pruebas amplias de control de calidad deben preparar sueros diagnósticos de cólera. Se proporcionará a quien lo solicite una descripción detallada de los procedimientos que se utilizan para preparar dichos sueros en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

Un método más satisfactorio para la preparación de estos reactivos incluye la tecnología de anticuerpos monoclonales. Varios investigadores han

informado de la producción con éxito de anticuerpos monoclonales contra los antígenos A, B y C. Los anticuerpos monoclonales no solo ofrecen especificidad notable sino que, una vez establecidas las líneas celulares productivas, estas se pueden mantener congeladas prácticamente por siempre en nitrógeno líquido para satisfacer necesidades de producción futuras. Se consiguen en el comercio reactivos de anticuerpos monoclonales para el estudio de los serogrupos y los serotipos de *V. cholerae*, pero son costosos. Con mayor frecuencia se utilizan como reactivos en látex o reactivos de coagulación estafilocócica.

### **C. Control de calidad de los antisueros**

El control de calidad de los antisueros (serogrupo polivalente [O1] y serotipo monovalente [Inaba, Ogawa]) incluye el examen de las características de aglutinación de los antisueros no diluidos y en diluciones de 1:3, 1:5 y 1:10. Las diluciones de los antisueros se someterán a prueba con células de cultivos vivos provenientes de varios (por lo menos 5 ó 6) aislamientos de *V. cholerae* O1 de ambos serotipos. Del mismo modo, se someterá a prueba un número igual de *V. cholerae* distinto de O1. No debe haber reacción de los antisueros con ningún microorganismo que no sea O1. Se registran los resultados de todas las reacciones. Los antisueros polivalentes pueden usarse a la dilución más alta que dé una reacción 2+ a 4+ contra las cepas Inaba y Ogawa, y reacciones negativas con *V. cholerae* distinto de O1.

1. Se preparan alícuotas del antisuero que se va a someter a prueba en solución salina normal (0,85%) estéril. Se harán las siguientes diluciones: 1:3, 1:5 y 1:10.
2. Se coloca una gota (aproximadamente 0,05 ml) de cada dilución del antisuero en una zona marcada sobre una laminilla o placa. Para cada antígeno que se utilice se tendrán dos testigos, uno con una gota de solución salina al 0,85% y el otro con una gota de suero normal (no inmune) estéril de conejo (SNC).
3. Se prepara una suspensión muy turbia (McFarland 2 ó 3) de *V. cholerae* O1 en solución salina normal, utilizando colonias tomadas mediante técnica de asepsia de un cultivo de 18 a 24 horas en agar de infusión de corazón u otro medio de agar no selectivo. Se usa este antígeno vivo sin diluir para el siguiente procedimiento de prueba.
4. Se agrega una gota de la suspensión del antígeno a cada dilución del antisuero y a los testigos de solución salina y de SNC. Se mezcla bien. Cada mezcla debe formar un área aproximada de  $5 \times 20$  mm. Se agita continuamente la lámina durante 1 minuto.
5. Se lee la reacción de aglutinación sobre una caja con luz o una fuente de luz indirecta con fondo oscuro. El grado de aglutinación se leerá de la siguiente manera:

*Antisueros para la tipificación serológica de Vibrio cholerae O1*

| Título | Porcentaje de aglutinación |
|--------|----------------------------|
| 4+     | 100                        |
| 3+     | 75                         |
| 2+     | 50                         |
| 1+     | 25                         |
| 0      | 0                          |

Para que la prueba sea válida, los testigos de SNC y de solución salina no deben aglutinar.

---

**Bibliografía**

Adams LB, Henk MC, Siebeling RJ. Detection of *Vibrio cholerae* with monoclonal antibodies specific for serovar O1 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1988;26:1801-1809.

Gustafsson B. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for identification and serotyping of *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol* 1984;20:1180-1185.

Gustafsson B, Holme T. Monoclonal antibodies against group- and type-specific lipopolysaccharide antigens of *Vibrio cholerae* O:1. *J Clin Microbiol* 1983;18:480-485.

Sugiyama J, Gondaira F, Matsuda J, Soga M, Tereda Y. New method for serological typing of *Vibrio cholerae* 1:0 using a monoclonal antibody-sensitized latex agglutination test. *Microbiol Immunol* 1987;31:387-391.

## **XI. Preparación de medios de cultivo y reactivos**

### **A. Almacenamiento de los medios de cultivo**

En los estudios del cólera se utilizan diferentes medios, algunos de los cuales se obtienen en el comercio como preparaciones deshidratadas. Los medios preparados comercialmente por lo general tienen fecha de caducidad; sin embargo, es difícil predecir el tiempo efectivo que pueden almacenarse los medios preparados y deshidratados. El ambiente del laboratorio tiene un efecto decisivo incluso sobre el medio más estable, especialmente si prevalecen situaciones extremas de calor, frío, humedad y sequedad durante períodos prolongados. Por lo general, los medios deshidratados se conservan en condiciones satisfactorias por períodos más largos que los medios preparados. Los medios secos se mantendrán herméticamente cerrados y almacenados en un lugar fresco y seco, de manera ideal con una temperatura entre 25 °C y 28 °C. Se puede utilizar todo medio deshidratado que no presente zonas duras, cambio de color ni otros signos de deterioro.

### **B. Control de calidad**

Se examinará cada nuevo lote de medio antes de su uso corriente para verificar la esterilidad y las características de crecimiento adecuadas de las cepas testigo. Los medios que han rebasado la fecha de caducidad y que todavía se utilizan también se examinarán periódicamente. La esterilidad del medio se determinará por incubación durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Las cepas de referencia con características conocidas se inocularán en los medios y se incubarán durante un lapso adecuado. Después de la incubación, el medio se examinará para observar crecimiento (o ausencia de él, según corresponda), características de las colonias y características diferenciales particulares del medio. Se conservarán registros escritos de los resultados.

#### ***Control de calidad de los medios de agar selectivos***

A continuación se presenta el ejemplo de un procedimiento que se puede utilizar para evaluar la calidad de un lote grande de medios selectivos en placa. Otros métodos pueden también dar buenos resultados. El personal de laboratorio establecerá un método y lo usará para valorar cada lote de medio. Cualquier método o modificación que se utilice debe dar resultados exactos y reproducibles y se usará regularmente con los diferentes lotes de medios. Se llevarán registros por escrito. Los procedimientos de control de calidad pueden variar de un laboratorio a otro, siempre y cuando se cumplan estos criterios.

En el Cuadro XI-1 se presenta un ejemplo del informe de la prueba de control de calidad para el agar TCBS. En cada lote de agar TCBS sometido a prueba se sembraron por duplicado diluciones de cultivos en caldo de cada microorganismo. También se sembraron en agar de infusión de corazón, un medio no inhibitorio, para valorar el número de unidades forma-

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Cuadro XI-1 Ejemplo de control de calidad del agar TCBS

| Microorganismo                             | Dil. tubo | Agar TCBS<br>Marca A |      | Agar TCBS<br>Marca B |      | AIC<br>Lote 790278 |      |
|--|-----------|----------------------|------|----------------------|------|--------------------|------|
|  |           | 1                    | 2    | 1                    | 2    | 1                  | 2    |
| <i>V. cholerae</i> 01<br>Inaba, cepa No. 1 | 10-5      | 53                   | 67   | 67                   | 47   | 211                | 198  |
|  | 10-6      | 3                    | 2    | 10                   | 8    | 31                 | 26   |
|  | 10-7      | 2                    | 1    | 0                    | 0    | 3                  | 4    |
| <i>V. cholerae</i> 01<br>Ogawa, cepa No. 2 | 10-5      | 424                  | 368  | MNPC                 | MNPC | MNPC               | MNPC |
|  | 10-6      | 59                   | 53   | 89                   | 115  | 85                 | 114  |
|  | 10-7      | 4                    | 4    | 7                    | 4    | 22                 | 22   |
| <i>V. cholerae</i> 01<br>Ogawa, cepa No. 3 | 10-5      | 47                   | 30   | 232                  | 256  | MNPC               | MNPC |
|  | 10-6      | 3                    | 7    | 32                   | 30   | 74                 | 65   |
|  | 10-7      | 1                    | 0    | 1                    | 0    | 6                  | 8    |
| <i>V. parahaemolyticus</i>                 | 10-5      | 79                   | 83   | 116                  | 104  | 244                | 284  |
|  | 10-6      | 14                   | 16   | 11                   | 10   | 38                 | 32   |
|  | 10-7      | 1                    | 1    | 1                    | 0    | 3                  | 4    |
| <i>V. alginolyticus</i>                    | S. DIL    | MNPC                 | MNPC | MNPC                 | MNPC |                    |      |
|  | 10-1      | MNPC                 | MNPC | MNPC                 | MNPC |                    |      |
|  | 10-2      | MNPC                 | MNPC | MNPC                 | MNPC |                    |      |
|  | 10-3      | 60                   | 70   | 138                  | 124  |                    |      |
|  | 10-4      | 10                   | 13   | 11                   | 17   | MNPC               | MNPC |
|  | 10-5      | 1                    | 0    | 1                    | 1    | 89                 | 63   |
|  | 10-6      | 1                    | 0    | 0                    | 0    | 3                  | 6    |
|  | 10-7      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 1                  | 0    |
| <i>P. mirabilis</i>                        | S. DIL    | MNPC                 | MNPC | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-1      | 40                   | 48   | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-2      | 1                    | 2    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-3      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-4      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-5      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | MNPC               | MNPC |
|  | 10-6      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 146                | 136  |
|  | 10-7      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 17                 | 14   |
| <i>A. hydrophila</i>                       | S. DIL    | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-1      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-2      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-3      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-4      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-5      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | MNPC               | MNPC |
|  | 10-6      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 79                 | 53   |
|  | 10-7      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 4                  | 4    |
| <i>E. coli</i>                             | S. DIL    | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-1      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-2      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-3      | 0                    | 0    | 0                    | 0    |                    |      |
|  | 10-4      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | MNPC               | MNPC |
|  | 10-5      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 184                | 156  |
|  | 10-6      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 36                 | 41   |
|  | 10-7      | 0                    | 0    | 0                    | 0    | 4                  | 0    |

Nota: Dil. tubo = dilución en el tubo; AIC = agar de infusión de corazón; MNPC = muy numerosos para contarlos; S. DIL. = sin diluir.

doras de colonias en cada dilución. Se llevan registros de control de calidad para referencia.

### **Medios y reactivos**

- Agar de infusión de corazón y caldo de infusión de corazón (HIB en inglés).

[Se pueden sustituir por otros medios no selectivos ni diferenciales, como el agar de tripticasa de soja o el de base de agar sangre. Si se somete a prueba un medio selectivo de *V. cholerae*, no se utilizarán agar ni caldo nutritivos ya que no contienen NaCl y este favorece el crecimiento del bacilo.]

- Solución salina estéril (0,85%)
- Un lote nuevo de medio selectivo que se va a someter a prueba
- Lote probado del mismo medio

### **Cepas**

- Dos o más aislamientos del agente o agentes causales apropiados.

[Por ejemplo, cuando se utiliza agar TCBS, se seleccionan *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, los cuales son sacarosa positivo y negativo, respectivamente.]

- Uno o varios aislamientos de microorganismos competidores previstos.

[Por ejemplo, cuando se utiliza agar TCBS, los competidores podrían ser *Escherichia coli*, *Proteus*, *Aeromonas* y *V. alginolyticus*.]

### **Método**

#### **Día 1**

Se obtienen tubos de agar con plano inclinado o placas estériles de HIA ya sometidas a control de calidad. Si se utilizan placas, es necesario cerciorarse de que la superficie del agar esté seca. Los microorganismos sujetos a prueba se sembrarán mediante estriación en tubos o placas de HIA. Se incuba de 18 a 24 horas.

#### **Día 2**

Se siembra en el HIB un inóculo ligero de cepas cultivadas en HIA del día 1. Se incuba de 18 a 24 horas.

#### **Día 3**

- 1) Se hacen diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  en solución salina de los cultivos de HIB incubados 18 a 24 horas.
- 2) Se inocula cada medio en placa que se va a probar con 0,1 ml de las diluciones en tubo. Se realiza esto en placas por duplicado. Se esparce el inóculo sobre las placas con una varilla de vidrio estéril hasta que se

## Preparación de medios de cultivo y reactivos

haya absorbido completamente en el medio. Se incuban las placas en condiciones apropiadas para cada medio.

### Día 4

- 1) Se registra el recuento de colonias en las placas. Se calculan las unidades formadoras de colonias.
- 2) Se mide el diámetro de 3 a 5 colonias por placa, y se calcula el diámetro promedio para cada medio de cultivo.
- 3) Se anotan los resultados y se determina la calidad del medio sometido a prueba en comparación con los resultados de los lotes del mismo medio examinados y aceptados previamente.

## C. Fórmulas de los medios de cultivo

### Medio AKI para la producción *in vitro* de la toxina del cólera

|                      |          |
|----------------------|----------|
| NaCl                 | 0,5 g    |
| NaHCO <sub>3</sub>   | 0,3 g    |
| Extracto de levadura | 0,4 g    |
| Bacto-peptona        | 1,5 g    |
| Agua destilada       | 100,0 ml |

**Preparación:** Se disuelven los ingredientes, excepto el NaHCO<sub>3</sub>, en la mitad del volumen de agua destilada y se mete al autoclave. El NaHCO<sub>3</sub> (0,6%) se esteriliza por filtración. En un tubo de ensayo se mezclan suavemente volúmenes iguales (5 ml cada uno) de ambos ingredientes esterilizados.

### Agua peptonada alcalina (APW)

[Nota: Se han publicado diferentes fórmulas para este medio.]

|                |            |
|----------------|------------|
| Peptona        | 10,0 g     |
| NaCl           | 10,0 g     |
| Agua destilada | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se agregan los ingredientes al agua y se ajusta a un pH de 8,5 con solución de NaOH 3 N. Se distribuye y se mete al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se almacena el agua peptonada alcalina en botellas o tubos de ensayo con las tapas cerradas herméticamente para evitar que disminuya el pH o se evapore la solución.

### Tubos de glucosa y arginina en agar con plano inclinado

[Nota: Fórmula del *Bacteriological Analytical Manual*, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.]

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Peptona              | 5,0 g  |
| Extracto de levadura | 3,0 g  |
| Triptona             | 10,0 g |
| NaCl                 | 20,0 g |

### Preparación de medios de cultivo y reactivos

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| Glucosa                  | 1,0 g      |
| L-arginina-(clorhidrato) | 5,0 g      |
| Citrato férrico amónico  | 0,5 g      |
| Tiosulfato de sodio      | 0,3 g      |
| Púrpura de bromocresol   | 0,03 g     |
| Agar                     | 13,5 g     |
| Agua destilada           | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Los ingredientes se suspenden en agua destilada, que se hierve para disolverlos, y se vacían cantidades de 5 ml en tubos de 13 × 100 mm. El pH final será de 6,8 a 7,0. Se mete al autoclave durante 10 a 12 minutos a 121 °C. Después de la esterilización, se inclinan los tubos para que al solidificarse se forme el plano inclinado.

**Procedimiento:** Las colonias individuales se inoculan por picadura del agar y por estriación sobre el plano inclinado del agar. Se incuba durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C con las tapas o los tapones poco apretados. Los microorganismos que producen dihidrolasa de la arginina producen una reacción alcalina (color morado) en todo el medio. Los microorganismos sin esta enzima producen, de manera característica, un plano alcalino (morado) y un fondo ácido (amarillo). Se lee el tubo como se hace con el agar de hierro de Kligler o el agar de hierro de tres azúcares, observando las reacciones en el fondo y en la superficie del plano inclinado, así como la formación de gas y de H<sub>2</sub>S. *V. cholerae* produce una reacción K/A (arginina negativa) en este medio, sin producción de gas ni H<sub>2</sub>S.

#### Agar sangre

El agar sangre se puede preparar utilizando un medio de base deshidratado, como es la base de agar sangre o agar de tripticasa de soja, a la cual se le agrega 5% de sangre de carnero desfibrinada y estéril, después que se ha sacado del autoclave y se ha enfriado a 50 °C. No se debe usar sangre humana porque esta puede contener agentes antimicrobianos, restos de otros agentes farmacéuticos, anticuerpos, otros factores inmunitarios o microorganismos patógenos del torrente sanguíneo. Se mezcla bien después de agregar la sangre y se vierten volúmenes de 15 a 20 ml en cajas de Petri. Se deja secar la superficie de las placas antes de la inoculación. Se debe efectuar una prueba de esterilidad.

#### Caldo de prueba de carbohidratos

|   |            |
|---|------------|
| Peptona                                   | 10,0 g     |
| NaCl                                      | 5,0 g      |
| Agua destilada                            | 1.000,0 ml |
| Indicador de Andrade (véase más adelante) | 10,0 ml    |
| Carbohidrato de prueba                    | 10,0 g     |

### *Preparación de medios de cultivo y reactivos*

**Preparación:** Se mezclan los ingredientes con calor suave. Se ajusta el pH a 7,4 ó 7,5. Se vierte la mezcla en cantidades de 3 a 5 ml en tubos. Se esteriliza por medio de autoclave. Se registrará una reacción positiva (fermentación del carbohidrato) cuando el indicador vire del ámbar al rosa.

#### **Indicador de Andrade:**

|                |          |
|----------------|----------|
| Fucsina ácida  | 0,5 g    |
| NaOH, 1 N      | 16,0 ml  |
| Agua destilada | 100,0 ml |

Se disuelve la fucsina ácida en el agua destilada y se agrega el hidróxido de sodio. La fucsina debe tomar un color ligeramente anaranjado al día siguiente. Si no es así, se agrega una pequeña cantidad adicional de NaOH (hasta 1 ml) para conseguir el cambio de color.

#### **Medio de transporte Cary Blair**

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Tioglicolato de sodio            | 1,5 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,1 g    |
| NaCl                             | 5,0 g    |
| Agar                             | 5,0 g    |
| Agua destilada                   | 991,0 ml |

**Preparación:** Se disuelven los ingredientes en el agua y se calientan en baño de María hirviendo hasta que la solución esté clara (no se permite que hierva). Se enfría a 50 °C, se agregan 9 ml de solución de cloruro de calcio al 1% recién preparada y se ajusta el pH a 8,4 con NaOH 10 N. Se colocan cantidades de 5 a 7 ml en tubos de tapón de rosca (aflojado) estériles de 13 x 100 mm. Se esteriliza con vapor (no en autoclave) a 100 °C en baño de María hirviendo durante 15 minutos. Se aprietan los tapones después de la esterilización. El medio de Cary Blair es bastante estable si se almacena en un lugar fresco y oscuro y no se permite que se seque. Este medio se puede utilizar mientras no presente pérdida de volumen, contaminación ni cambio de color.

[Nota: En el comercio se expende el medio deshidratado de Cary Blair.]

#### **Medio de Craig para la producción de la toxina del cólera**

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Casaminoácidos                  | 30,0 g     |
| Extracto de levadura            | 4,0 g      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,5 g      |
| Agua destilada                  | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se disuelven los casaminoácidos, el extracto de levadura y el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en agua destilada. El pH final debe ajustarse a 7,0 con NaOH 3 M. Después de la esterilización del medio en el autoclave, se agrega la glucosa esterilizada por filtración (10 ml/litro de una solución al 20%) para lograr una concentración de glucosa final de 0,2%. Se vierten cantidades de 5 ml en tubos de tapón de rosca estériles de 16 × 125 mm o de 10 ml en

## Preparación de medios de cultivo y reactivos

frascos estériles de tapón de rosca de 50 ml. Se refrigera hasta que se vaya a utilizar.

### Caldo de descarboxilasa/dihidrolasa (fórmula de Möeller)

|                        |         |    |
|------------------------|---------|----|
| NaCl                   | 10,0    | g  |
| Peptona                | 5,0     | g  |
| Extracto de carne      | 5,0     | g  |
| Púrpura de bromocresol | 0,10    | g  |
| Rojo de cresol         | 0,005   | g  |
| Glucosa                | 0,5     | g  |
| Piridoxal              | 0,005   | g  |
| Agua destilada         | 1.000,0 | ml |

**Preparación:** Se mezclan los ingredientes con calor suave hasta que se disuelvan. Se ajusta el pH a 6,0. Se ponen alícuotas en cuatro matraces. Se agrega a un matraz el monoclóhidrato de *L*-arginina al 1%; a otro diclorhidrato de *L*-lisina, y a un tercero, diclorhidrato de *L*-ornitina (si no se tienen al alcance los aminoácidos puros de la forma *L*, se pueden utilizar aminoácidos DL al 2%). Se reserva un matraz para usarlo como testigo sin agregar aminoácidos. Se reajusta el pH en el matraz con la ornitina a pH 6,0. Se vierten cantidades de 3 a 4 ml en tubos de tapón de rosca y se mete al autoclave durante 10 minutos a 121 °C.

**Procedimiento:** Se inoculan los tubos de prueba y testigo con un inóculo ligero proveniente de un cultivo de 18 a 24 horas. Se cubre el inóculo con 4 a 5 mm de aceite mineral estéril. Se incuban los tubos a una temperatura de 35 °C a 37 °C y se leen en un lapso de 24 a 48 horas, o hasta 7 días si el resultado es negativo. Las reacciones positivas se manifiestan por una reacción alcalina (morado) (pH de 6,2 o más) acompañada de una reacción ácida (amarillo) en el tubo testigo. Es normal que el medio primero se torne amarillo debido a la fermentación de la glucosa. Sin embargo, si dicho color persiste, la reacción es negativa.

### Agar gelatina (0% y 1% de NaCl)

|                      |          |    |
|----------------------|----------|----|
| Peptona              | 4,0      | g  |
| Extracto de levadura | 1,0      | g  |
| NaCl                 | 0 ó 10,0 | g  |
| Gelatina             | 15,0     | g  |
| Agar                 | 15,0     | g  |
| Agua destilada       | 1.000,0  | ml |

**Preparación:** Para la gelatina sin sal no se agrega NaCl; de lo contrario, se agregan 10 gramos de NaCl por litro. Los ingredientes se disuelven con calor y se lleva la mezcla hasta ebullición con agitación constante. Se ajusta el pH entre 7,2 y 7,4. Se mete al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se enfría a 50 °C. Se reparte en cajas de Petri y se deja solidificar.

## Preparación de medios de cultivo y reactivos

**Control de calidad:** El agar gelatina preparado con 0% y 1% de NaCl se recomienda como medio de selección para diferenciar *V. cholerae* de los microorganismos halófilos (véase el Capítulo V, “Exámenes de alimentos y muestras”). Cuando se recurre al agar gelatina para este propósito, debe elegirse cuidadosamente la peptona utilizada en el medio. Las diferentes peptonas contienen cantidades variables de NaCl que pueden afectar el crecimiento de los microorganismos sensibles a la concentración de esta sal. Cada fuente de peptona se someterá a control de calidad utilizando una cepa patrón de *V. cholerae* y un microorganismo halófilo.

### Agar con extracto de carne (MEA en inglés; también denominado agar nutritivo alcalino)

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Peptona                         | 10,0 g     |
| NaCl                            | 10,0 g     |
| Extracto de carne (concentrado) | 3,0 g      |
| Agar                            | 20,0 g     |
| Agua destilada                  | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se agregan los ingredientes al agua y se calienta hasta ebullición al tiempo que se agita para que se disuelva el agar. Se ajusta a un pH de 8,4. Se mete al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Aplicando las normas de asepsia, se reparte en cajas de Petri (20 ml por placa). Se deja enfriar lentamente y se almacena en posición invertida en refrigeración (4 °C).

### Medio de polivinilpirrolidona para liofilización

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Polivinilpirrolidona | 5,0 g    |
| Sacarosa             | 5,0 g    |
| Glutamato de sodio   | 1,0 g    |
| Agua destilada       | 100,0 ml |

**Preparación:** Se disuelven los ingredientes mencionados en 90 ml de agua y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH. Se afora a 100 ml con agua. Se esteriliza por filtración o se mete al autoclave durante 15 minutos.

### Caldo nutritivo para prueba de sal

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| Caldo nutritivo (Difco Laboratories) | 8,0 g      |
| Agua destilada                       | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se combinan los ingredientes mezclándolos y aplicando calor leve. Se ajusta el pH entre 7,4 y 7,5. Se divide en volúmenes iguales, cuyo número depende del número de concentraciones diferentes de NaCl que se van a preparar. No se agrega sal a una porción (0% NaCl); a las otras porciones se les agrega sal hasta igualar el porcentaje deseado. Se deposita el caldo en tubos de ensayo de tapón de rosca y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 10 minutos.

**Control de calidad:** *V. cholerae* crecerá en caldo nutritivo (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) sin sal, pero los microorganismos halófilos

## Preparación de medios de cultivo y reactivos

crecerán solamente en caldo nutritivo al cual se le ha agregado 1% de NaCl (véanse los Capítulos IV y VI). Estas reacciones se basan en el uso del caldo nutritivo Bacto (Difco Laboratories) y cualquier otro medio de base se valorará exhaustivamente antes de usarlo en esta prueba. Las diferentes peptonas contienen cantidades variables de NaCl que pueden afectar el crecimiento de los microorganismos sensibles a la concentración de NaCl. Cada fuente de peptona o medio de base se someterá a control de calidad utilizando una cepa patrón de *V. cholerae* y un microorganismo halófilo.

### Medio de congelamiento con leche descremada

Se agregan 20 g de leche descremada en polvo a 100 ml de agua destilada; se disuelve la mezcla, se mete al autoclave a una temperatura de 116 °C durante 20 minutos. Se debe evitar el sobrecalentamiento, pues la leche se puede caramelizar.

### Agar gelatina con taurocolato y telurito (agar TTG, o medio de Monsur)

|  |            |
|--|------------|
| Tripticasa   | 10,0 g     |
| NaCl   | 10,0 g     |
| Taurocolato de sodio   | 5,0 g      |
| NaHCO <sub>3</sub>   | 1,0 g      |
| Gelatina   | 30,0 g     |
| Agar   | 15,0 g     |
| Agua destilada   | 1.000,0 ml |
| Telurito de potasio (1%) (véase más adelante el procedimiento de titulación) |            |

**Preparación:** Se disuelven los ingredientes en el agua, con calor. Se ajusta el pH a 8,5. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Se enfría a 50 °C, se agregan cantidades predeterminadas de solución acuosa de telurito de potasio al 1% esterilizada por filtración (véase más adelante). Se mezcla bien y se vacía en placas. Si solo se requieren pocas placas en cada ocasión, los medios pueden repartirse en volúmenes cuantificados en botellas de tapón de rosca. Después de esterilizarse en el autoclave, los medios se pueden almacenar en refrigeración hasta que se necesiten. Antes de usar los medios, estos se derriten y se enfrían a una temperatura de 50 °C a 55 °C, se agrega la cantidad adecuada de telurito de potasio, se mezcla y se vacía en placas.

**Titulación del telurito de potasio:** La concentración óptima de telurito de potasio para el agar TTG variará de acuerdo con la calidad de cada lote de dicha sustancia. Antes de su uso regular, cada lote (o botella) de telurito de potasio se titulará para determinar la dilución de trabajo adecuada para usarse en el agar TTG. Véase el Cuadro XI-2 para conocer las cantidades de telurito de potasio al 1% que se utilizan en la preparación de los medios para evaluación.

Cuadro XI-2. Concentración del telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ ) por litro

| Cantidad de la solución de telurito de potasio al 1% por cada litro | Concentración final del telurito de potasio en el agar TTG |
|---|--|
| 0,25 ml   | 1:400.000  |
| 0,5 ml  | 1:200.000  |
| 1,0 ml  | 1:100.000  |
| 2,0 ml  | 1:50.000   |
| 4,0 ml  | 1:25.000   |

En cada lote de prueba de agar TTG que contenga las diferentes diluciones de telurito de potasio, se siembran mediante estriación una o varias cepas bien caracterizadas de *V. cholerae* para obtener colonias aisladas. Se incuban las placas a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 18 a 24 horas. Después de la incubación, se examina cada placa para observar el grado de crecimiento, el tamaño y el color de las colonias y la producción de gelatinasa. Se registran los resultados y se incuban nuevamente las placas durante 18 a 24 horas más, al cabo de las cuales se vuelven a examinar. Al cabo de 18 a 24 horas, las colonias típicas de *V. cholerae* son pequeñas (1 a 2 mm) y opacas, con un oscurecimiento ligero en el centro. En este momento, el cultivo puede presentar actividad de gelatinasa o no hacerlo. Al cabo de 36 a 48 horas de incubación, las colonias tendrán un diámetro de 2 a 4 mm y un "halo" turbio neto, causado por la producción de gelatinasa, y serán de un color gris pavonado. La mayor parte de los lotes de telurito de potasio son satisfactorios a una dilución final de 1:100.000 ó 1:200.000.

**Caldos o agares de sal y triptona ( $T_1N_0$  y  $T_1N_1$ )**

[Nota: Fórmula tomada del *Bacteriological Analytical Manual*, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.]

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Tripticasa o triptona | 10,0 g     |
| NaCl                  | 0 ó 10,0 g |
| Agar                  | 0 ó 20,0 g |
| Agua destilada        | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se agrega agar si se va a preparar medio sólido, pero se omite para el caldo. Para el  $T_1N_0$  sin sal, no se agrega NaCl. Para la fórmula de NaCl al 1% ( $T_1N_1$ ), se agregan 10 g de NaCl. Se disuelven los ingredientes en agua destilada. Se esteriliza el medio en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C, y se vacía en recipientes apropiados (tubos para el caldo, placas o tubos para el agar). Si se agrega agar, se enfría el medio a 50 °C antes de vaciarlo.

**Control de calidad:** Las diferentes peptonas contienen diversas cantidades de NaCl, las cuales pueden afectar el crecimiento de los microorganismos sensibles a las concentraciones de NaCl. Cada fuente de

### Preparación de medios de cultivo y reactivos

peptona se someterá a control de calidad utilizando una cepa patrón de *V. cholerae* y un microorganismo halófilo.

#### Caldo de Voges-Proskauer con 1% de NaCl para vibriones

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Peptona                         | 7,0 g      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5,0 g      |
| Glucosa                         | 5,0 g      |
| NaCl                            | 10,0 g     |
| Agua destilada                  | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se combinan los ingredientes; se ajusta el pH a 6,9. Se distribuye el caldo en tubos de tapón de rosca en volúmenes de 2 ml y se esterilizan en el autoclave a 121 °C durante 10 minutos.

#### Reactivos A y B de Voges-Proskauer:

##### Reactivo A de VP

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Etanol absoluto | 100,0 ml |
| Alfa-naftol     | 5,0 g    |

##### Reactivo B de VP

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| Hidróxido de potasio (KOH)  | 40,0 g   |
| Creatina                    | 0,3 g    |
| Aforar con agua destilada a | 100,0 ml |

Se preparan por separado los reactivos A y B de Voges-Proskauer, agitando bien los ingredientes para asegurar una mezcla completa.

**Procedimiento:** Después de 48 horas de incubación del cultivo de prueba en el caldo Voges-Proskauer modificado con rojo de metilo (MR-VP en inglés), se agregan aproximadamente 0,6 ml del reactivo A y 0,2 ml del reactivo B. Se tapa el tubo, se agita bien y se deja 5 minutos. La aparición de un color entre rosa oscuro y rojo cereza en 5 minutos significa una prueba positiva. Si en ese tiempo no aparece ningún color o el que aparece es amarillo a anaranjado, es una prueba negativa.

#### D. Preparación de reactivos

##### Amortiguador de carbonatos, pH 9,6 (amortiguador de recubrimiento para la prueba ELISA anti-TC)

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 1,59 g     |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 2,93 g     |
| NaN <sub>3</sub>                | 0,2 g      |
| Agua destilada                  | 1.000,0 ml |

**Preparación:** Se mezclan todos los ingredientes hasta que se disuelvan. Se almacena el reactivo a 4 °C durante un tiempo no superior a 2 semanas.

*Preparación de medios de cultivo y reactivos*

**Amortiguador de dietanolamina (10%) para sustrato de la fosfatasa alcalina**

|   |          |
|---|----------|
| Dietanolamina                             | 97,0 ml  |
| Azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ )         | 0,2 g    |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 100,0 mg |
| Agua destilada                            | 800,0 ml |

**Preparación del amortiguador de dietanolamina:** Se ajusta el pH a 9,8 con HCl 1 M, y se afora a 1,0 litro. Se almacena el amortiguador en la oscuridad a 4 °C.

**Nota de seguridad:** La azida de sodio, además de ser sumamente tóxica, se combina con las sales de los metales que se utilizan comúnmente en las cañerías (cobre y plomo) y forma compuestos muy explosivos susceptibles de activarse por los choques. Si los materiales que contienen azida se vierten regularmente en los drenajes y alcantarillas, deben tratarse periódicamente los conductos metálicos para eliminar los depósitos de estos compuestos.

**Preparación del sustrato de fosfatasa alcalina:** Se toma una alícuota del amortiguador de dietanolamina (descrito antes) y se entibia a temperatura ambiente antes de usarse. Se disuelve una tableta del sustrato de la fosfatasa (*p*-nitrofenil fosfato disódico, tableta de 5 mg; Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri) en 5 ml de amortiguador de dietanolamina.

**Patrones de turbidez de McFarland**

Se prepara una solución al 1,75% (peso/volumen) de cloruro de bario ( $[\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ ; si se utiliza cloruro de bario anhidro  $[\text{BaCl}_2]$ , se prepara una solución acuosa al 1%). Se prepara una solución al 1% (por volumen) de ácido sulfúrico químicamente puro y se mezclan las dos soluciones según los volúmenes que aparecen en el Cuadro XI-3. Se cierran los tubos con cera, cinta selladora Parafilm o por algún otro medio para evitar la evaporación. Se refrigeran o se almacenan a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta 6 meses. Se desecha después de 6 meses o antes si disminuye el volumen. Antes de cada uso, se agita bien para mezclar el precipitado blanco fino de sulfato de bario en el tubo. La turbidez de un tubo bien mezclado será aproximadamente la turbidez de las suspensiones bacterianas correspondientes que aparecen en el Cuadro XI-3.

**Reactivo de oxidasa**

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina | 1,0 g    |
| Agua destilada                       | 100,0 ml |

**Preparación:** Se disuelve el reactivo en agua destilada (no se calienta para disolverse). De manera alternativa, se puede usar una solución al 1% de dimetil-*p*-fenilendiamina empleada para la prueba de la oxidasa. El

Cuadro XI-3. Composición y concentraciones bacterianas equivalentes de los patrones de turbidez de McFarland

| Patrón de turbidez No. | Contenido (ml)           |                      |
|------------------------|--------------------------|----------------------|
|                        | Cloruro de bario (1,75%) | Acido sulfúrico (1%) |
| 0,5                    | 0,5                      | 99,5                 |
| 1                      | 0,1                      | 9,9                  |
| 2                      | 0,2                      | 9,8                  |
| 3                      | 0,3                      | 9,7                  |
| 4                      | 0,4                      | 9,6                  |
| 5                      | 0,5                      | 9,5                  |
| 6                      | 0,6                      | 9,4                  |
| 7                      | 0,7                      | 9,3                  |
| 8                      | 0,8                      | 9,2                  |
| 9                      | 0,9                      | 9,1                  |
| 10                     | 1,0                      | 9,0                  |

reactivo debe ser incoloro cuando se prepara y se refrigerará en un frasco con tapón de vidrio, protegido de la luz. Para lograr dicha protección, el reactivo se puede almacenar en frascos ámbar; si se utiliza un frasco de vidrio claro, debe envolverse en papel de aluminio o papel oscuro. Alternativamente, el reactivo se puede repartir en cantidades pequeñas (2 a 5 ml) en viales de tapón de rosca y congelarse hasta que se necesite. Los viales no se congelarán nuevamente después de descongelarlos. Con el tiempo, el reactivo se oxidará y tomará paulatinamente un color azul. Es aceptable que el reactivo tenga un tinte azul; sin embargo, cuando el reactivo, sin agregar otra sustancia, manche de azul el papel filtro, se debe desechar.

**Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), 0,01 M, pH 7,2**

**Solución primaria concentrada (50x):**

|  |            |
|--|------------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , anhidro         | 54,8 g     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O | 15,75 g    |
| Agua destilada                                     | 1.000,0 ml |

**Solución de trabajo (diluida):**

|  |         |
|--|---------|
| Solución primaria (50x, véase antes)   | 20,0 ml |
| NaCl                                   | 8,5 g   |
| Aforar con agua destilada a 1.000,0 ml |         |

(El pH final debe ser de 7,2 a 7,3)

Para el PBS-Tween, se agregan 0,5 ml de Tween 20 a 1.000 ml de PBS.

*Preparación de medios de cultivo y reactivos*

**Reactivo de desoxicolato de sodio (0,5%) para la prueba del hilo mucoide**

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Desoxicolato de sodio  | 0,5 g    |
| Agua destilada estéril | 100,0 ml |

**Preparación:** Se agrega agua destilada estéril al desoxicolato de sodio y se mezcla bien. Se almacena a temperatura ambiente.

---

**Bibliografía**

Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991.

Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editors. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1986.

World Health Organization. *Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections*. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev. 1.

## XII. Almacenamiento y envío de los aislamientos

### A. Almacenamiento de los aislamientos

Los cultivos puros de *Vibrio cholerae* suelen conservarse viables durante varios días en medio sólido a temperatura ambiente (22° a 25 °C) mientras el medio no se deshidrate ni se acidifique. Sin embargo, si los cultivos han de mantenerse por varios días, se prepararán adecuadamente para almacenamiento (Figura XII-1). La selección de un método de almacenamiento depende del tiempo que se van a mantener los microorganismos y del equipo de laboratorio y los recursos con que se cuenta.

#### 1. Almacenamiento a corto plazo

Los vibriones no se deben almacenar en un medio que contenga carbohidratos, porque los subproductos ácidos del metabolismo rápidamente disminuyen su viabilidad. El agar base de sangre (BAB, en inglés), el agar de tripticasa de soja (TSA), el T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y el agar de infusión de corazón (HIA) son buenos medios de almacenamiento para los vibriones. No se usará el agar nutritivo puesto que no contiene sal y *V. cholerae* no crece adecuadamente como lo haría en un medio con NaCl, como los medios BAB, TSA o HIA. Se prepara un medio de almacenamiento, se distribuye en volúmenes de 3 a 4 ml en tubos pequeños (aproximadamente de 13 × 100 mm) y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Mientras los tubos estén todavía calientes, se colocan en posición inclinada para obtener un área pequeña de plano inclinado y un fondo profundo.



Figura XII-1. Diversos métodos de almacenamiento para los aislamientos (izquierda a derecha): un criotubo, cultivo primario en plano inclinado con aceite mineral, tubo de agar con corcho parafinado y un liofilizado.

## *Almacenamiento y envío de los aislamientos*

Para inocular, se introduce la aguja de inoculación por picadura al fondo del medio una o dos veces, luego se estría el plano inclinado. Se incuba de un día para otro a una temperatura de 35° a 37 °C. Se sella el tubo con tapones de corcho previamente empapados en parafina caliente o tratados de alguna otra forma para brindar un cierre hermético. Se almacenan los cultivos a temperatura ambiente (cerca de 22 °C) en la oscuridad. También se puede utilizar aceite mineral estéril para evitar la desecación de los medios de plano inclinado. Se esteriliza aceite mineral en un horno de aire caliente a 170 °C durante una hora. Se agrega suficiente aceite mineral estéril para cubrir los medios hasta 1 cm por arriba del borde más alto del agar. Cuando se requieren subcultivos se recogen las colonias que se encuentran en el plano inclinado. Las cepas mantenidas así en cultivo puro por lo general sobrevivirán varios años.

### **2. Almacenamiento a largo plazo**

Los cultivos bacterianos pueden almacenarse congelados o liofilizados en diversos medios ideados para ese propósito. Hay muchas fórmulas para preparar estos medios pero, en general, se utilizan para la liofilización los medios con leche descremada, con suero o con polivinilpirrolidona (PVP); por el contrario, los medios con leche descremada, con sangre o con caldo con amortiguador y enriquecidos, como el caldo de tripticasa de soja (con 15% a 20% de glicerol de grado reactivo) se utilizan para el congelamiento.

#### ***Método de almacenamiento en congelación (congelador ultrabajo, -70 °C; o congelador de nitrógeno líquido, -196 °C)***

Los vibriones se pueden almacenar por tiempo indefinido si se mantienen congelados a -70 °C o menos.

- 1) Se inocula un tubo de agar con plano inclinado de TSA o HIA (u otro medio de crecimiento, no inhibitorio, que contenga sal) y se incuba de un día para otro a una temperatura de 35° a 37 °C.
- 2) Se toman células del plano inclinado y se hace una suspensión en medio de congelación.
- 3) Se deposita la suspensión en criotubos (viales de congelación ideados especialmente para usarse a temperaturas muy bajas). Precaución: se recomienda no utilizar ampollitas de vidrio para congelación en nitrógeno líquido debido a que pueden estallar al sacarlas del congelador.
- 4) Se congelará rápidamente la suspensión colocando los viales sellados en un baño de alcohol y hielo seco (CO<sub>2</sub> congelado) hasta la congelación. Los viales congelados se transferirán a un congelador.

#### ***Recuperación de los cultivos almacenados en congelación***

- 1) Se colocan los cultivos congelados tomados del congelador en hielo seco o en un baño de alcohol y hielo seco y se transfieren a un gabinete de seguridad del laboratorio o a una zona limpia si no se cuenta con este.

- 2) Se raspa la porción superior del cultivo con un asa estéril y se transfieren las colonias al medio de crecimiento, con mucho cuidado para no contaminar la porción superior o el interior del vial.
- 3) Se cierra nuevamente el vial antes de que el contenido se descongele por completo y se regresa al congelador. Con una técnica cuidadosa, se pueden hacer varias transferencias del mismo vial.

### **Liofilización**

Los vibriones se pueden almacenar satisfactoriamente después de la liofilización (deseccación por congelamiento). El proceso incluye la eliminación del agua de las suspensiones bacterianas congeladas por sublimación bajo presión reducida. Los cultivos liofilizados de vibriones se mantienen mejor a 4 °C.

De preferencia se recomienda llenar las ampollas al vacío.

## **B. Transporte y envío de cultivos y muestras**

### **1. Organizaciones normativas**

El Comité de Expertos en Transporte de Mercancías de Alto Riesgo de las Naciones Unidas formula los procedimientos recomendados para el transporte seguro de estos productos peligrosos. La Organización de Aviación Civil Internacional (OACI) ha utilizado estas recomendaciones como base para la reglamentación del transporte seguro de productos peligrosos por vía aérea. Las normas de la Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA) contienen todos los requisitos de las instrucciones técnicas de la OACI para el transporte seguro de productos peligrosos. Sin embargo, la IATA ha incluido otros requisitos más restrictivos que los de la OACI. Las aerolíneas afiliadas a la IATA han adoptado las normas de esta sobre productos peligrosos y los transportistas deben cumplirlas, además de cualesquiera de los reglamentos aplicables en el Estado de origen, tránsito o destino.

El embarque aéreo de agentes infecciosos o muestras diagnósticas debe cumplir con los reglamentos locales, nacionales e internacionales. Las normas del transporte aéreo internacional se pueden encontrar en la publicación de la OACI titulada *Dangerous Goods Regulations* [Normas sobre productos peligrosos]. Esta referencia se publica anualmente en enero. Las normas pueden cambiar de un año a otro. Es factible obtener un ejemplar de los reglamentos de la IATA en inglés, español, francés o alemán dirigiéndose a una de las oficinas que se mencionan en seguida.

## *Almacenamiento y envío de los aislamientos*

Pedidos de América del Norte, Central y del Sur, Asia, Australia y el Pacífico:

|                            |                          |
|----------------------------|--------------------------|
| Asistente de Publicaciones | Teléfono: (514) 844-6311 |
| Asociación de Transporte   | FAX: (514) 844-5286      |
| Aéreo Internacional (IATA) | Télex: 05-267627         |
| 2000 Peel Street           | Cable: IATA MONTREAL     |
| Montreal, Quebec           | Teletipo: YULTPXB        |
| Canadá H3A 2R4             |                          |

Pedidos de Europa, África y el Oriente Medio:

|                            |                          |
|----------------------------|--------------------------|
| Asistente de Publicaciones | Teléfono: (22) 799-25-25 |
| Asociación de Transporte   | FAX: (22) 798-35-53      |
| Aéreo Internacional (IATA) | Télex: 415586            |
| IATA Centre                | Cable: IATA GENEVA       |
| Route de l'Aéroport 33     | Teletipo: GVATPXB        |
| Apartado postal 672        |                          |
| CH-1215 Ginebra 15         |                          |
| Suiza                      |                          |

## **2. Directrices para embalar y rotular sustancias infecciosas**

Las directrices que se enuncian a continuación para embalar o empacar sustancias infecciosas se han tomado de la publicación de la IATA de 1992 *Dangerous Goods Regulations*. Se presentan como ejemplo de procedimientos para embalar materiales infecciosos de manera aceptable. Sin embargo, quizá no reflejen los requisitos nacionales, estatales o de la IATA vigentes para embalar y rotular sustancias infecciosas. Para obtener información al día sobre los requisitos de embalaje y rotulación, consúltense los reglamentos nacionales y estatales pertinentes, así como la mencionada publicación de la IATA del año corriente.

Las personas que transporten agentes infecciosos o muestras diagnósticas deben cumplir con todas las normas locales e internacionales pertinentes al empaquetado y manipulación de estos productos. Dichas personas deberán velar por que las muestras lleguen a su destino en buenas condiciones y porque no planteen peligro para los seres humanos ni para los animales durante el transporte.

### **Directrices para embarcar o embalar agentes infecciosos**

El paquete interno debe incluir:

- Un recipiente primario interno, a prueba de agua
- Un recipiente secundario, resistente a los impactos y a prueba de agua
- Material absorbente entre los recipientes primario y secundario. Si se colocan varios recipientes primarios en un paquete secundario único, deben envolverse individualmente para impedir el contacto entre sí. El

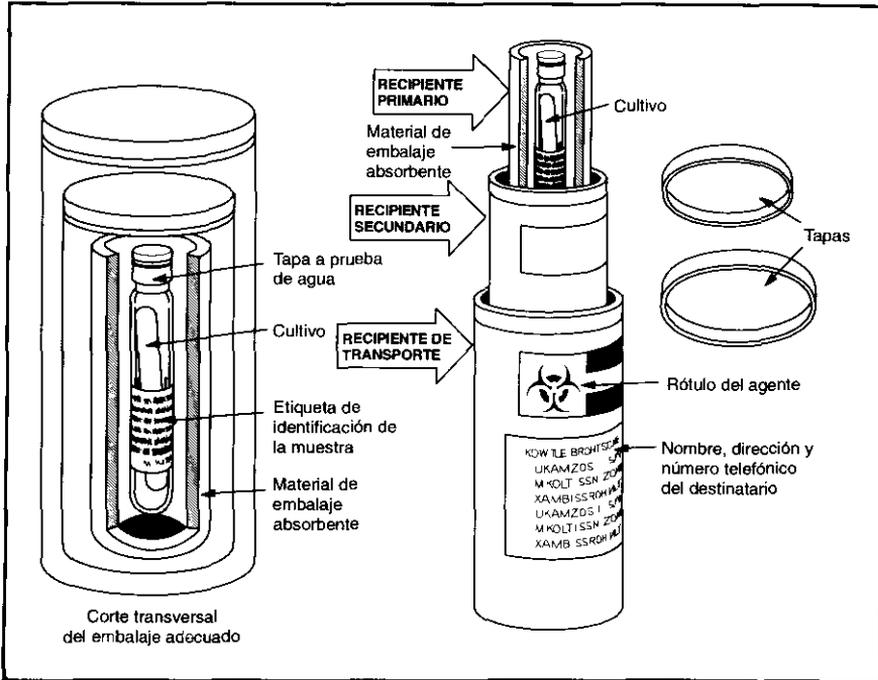


Figura XII-2. Requisitos de empaque para el transporte de agentes infecciosos.

material absorbente, como algodón en rama, debe ser suficiente para absorber el contenido de todos los recipientes primarios.

El paquete externo debe tener suficiente resistencia para proteger y contener adecuadamente el contenido. El diámetro exterior más pequeño del recipiente externo medirá por lo menos 100 mm. Entre el paquete secundario y el paquete externo se incluirá una lista pormenorizada del contenido. Es necesario que los paquetes estén rotulados de manera indeleble y legible en el exterior con la dirección y el número telefónico del destinatario. Se fijará una etiqueta de advertencia de riesgo biológico en el exterior del recipiente externo, y llevará la inscripción "Sustancia infecciosa. En caso de daño o fuga, notifíquese de inmediato a las autoridades sanitarias". La Figura XII-2 ilustra estas recomendaciones de embalaje.

## Bibliografía

International Air Transport Association. Annual Publication. "Dangerous Goods Regulations." IATA Publications Office, Montreal, Quebec, Canada.

World Health Organization. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.

### **XIII. Aspectos de seguridad en el laboratorio**

Los laboratorios de microbiología plantean riesgos especiales a las personas que trabajan en ellos o en sus inmediaciones. Los trabajadores del laboratorio deben tomar las precauciones adecuadas para reducir al mínimo los riesgos para ellos mismos y para los demás. La mayor parte de las infecciones adquiridas en el laboratorio se pueden atribuir a uno o varios de los siguientes procedimientos peligrosos comunes.

- 1) Procedimientos que producen aerosoles y constituyen riesgos de inhalación. Por ejemplo, sembrar mediante estriación en placas de agar, pipetear, centrifugar, homogenizar, flamear las asas, abrir cultivos.
- 2) Procedimientos que pueden propiciar la ingestión, como pipetear con la boca o manipular muestras, frotis y cultivos.
- 3) Procedimientos que pueden propiciar la inoculación de la piel con equipo tal como agujas hipodérmicas, pipetas de Pasteur o material de vidrio roto.
- 4) Procedimientos que entrañan contacto directo con materiales infecciosos o animales infectados.

Todos los laboratorios deben adoptar un código de principios de bioseguridad y de prácticas de seguridad en el trabajo. Este código tiene que ser apoyado por los directivos y el director del laboratorio se encargará de hacerlo cumplir. Los visitantes y trabajadores tendrán que cumplirlo estrictamente.

Es conveniente preparar un manual de seguridad u operaciones que identifique los riesgos conocidos y potenciales, al tiempo que especifique las normas y procedimientos para reducir al mínimo o eliminar tales riesgos. Se alertará al personal sobre los riesgos especiales y se le pedirá que lea y cumpla las normas y procedimientos corrientes. A continuación se presenta una serie de normas básicas de bioseguridad que han de aplicarse universalmente en los laboratorios de microbiología y ser parte de los procedimientos de bioseguridad en el laboratorio:

- 1) No pipetear con la boca.
- 2) No comer, beber, fumar, guardar alimentos ni aplicarse cosméticos en la zona de trabajo del laboratorio.
- 3) Mantener pulcro y ordenado el laboratorio; es decir, limpio y sin material innecesario.
- 4) Se descontaminarán las superficies de trabajo por lo menos una vez al día y después de cada derrame de material viable o potencialmente infeccioso.
- 5) Lavarse las manos con agua y jabón después de manipular materiales infecciosos y animales, así como al salir del laboratorio.
- 6) Reducir al mínimo la generación de aerosoles durante los procedimientos de laboratorio; los procedimientos que puedan generar aerosoles potencialmente infecciosos o peligrosos se llevarán a cabo en un gabi-

## *Aspectos de seguridad en el laboratorio*

nete de bioseguridad o bajo una campana extractora de emanaciones químicas dotada de filtros apropiados.

- 7) Desinfectar líquidos o desechos sólidos contaminados antes de eliminarlos o manipularlos de otra forma.
- 8) Usar ropa especial, batas o uniformes en el laboratorio, pero no en las áreas públicas.
- 9) Usar siempre anteojos de seguridad, máscaras protectoras, guantes u otros dispositivos protectores, según corresponda.
- 10) Solo se permitirá entrar al laboratorio a las personas enteradas del peligro potencial, que hayan recibido inmunización específica y que cumplan otros requisitos de entrada.
- 11) Mantener las puertas cerradas cuando se esté trabajando y controlar el acceso al laboratorio.
- 12) No admitir en el laboratorio a personas que se encuentren en alto riesgo de infección o para quienes la infección pueda ser especialmente peligrosa, como niños, embarazadas e individuos inmunocomprometidos.
- 13) Limitar el uso de agujas hipodérmicas y jeringas a la inyección parenteral y a la aspiración de líquidos de los animales de laboratorio y de botellas de vacuna con diafragma. Podrían otros usos restringidos, si los aprueba el director del laboratorio. No se tapan nuevamente las agujas y las jeringas antes de desecharlas en un recipiente destinado a la eliminación de objetos punzocortantes. Al manipular líquidos infecciosos, los instrumentos de pipeteo automático no deben sustituirse con agujas y jeringas hipodérmicas.
- 14) Se informará inmediatamente al supervisor del laboratorio sobre derrames, accidentes y exposición manifiesta o potencial a materiales infecciosos.
- 15) Cuando se manipulen sueros humanos, se seguirán los procedimientos para la prevención de las infecciones de laboratorio causadas por microorganismos patógenos transmitidos por la sangre.

---

## **Bibliografía**

Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington, DC: US Government Printing Office, 1993; stock no. 017-040-00523-7.

National Research Council. *Biosafety in the Laboratory: Prudent Practices for the Handling and Disposal of Infectious Materials*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989.