

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE *Vibrio cholerae* O1 EN LOS MEDIOS DE TRANSPORTE AMIES Y STUART

Ana Cevallos M, A Guillén, Gerardo Gamarra B, Mirtha Roque A.

RESUMEN

Se analizó el tiempo de permanencia de *Vibrio cholerae* O1 en los medios de transporte Amies, Amies con carbón y Stuart. Las heces diarreicas de trece pacientes con síntomas clínicos de cólera fueron recolectadas en dichos medios incluyendo el medio Cary-Blair.

Luego de realizar los coprocultivos quincenales de cada muestra, *V. cholerae* O1 fue aislado hasta el día 30 en el medio Stuart ($p=1.00$), hasta el día 45 en el medio Cary-Blair ($p=0.0956$) y hasta el día 60 en el medio Amies con Carbón ($p=0.1992$). Estos resultados indican que *V. cholerae* O1 puede ser transportado en los medios evaluados, excepto en el medio Amies. En los restantes medios, *V. cholerae* ha sido recuperado bajo su forma viable y cultivable durante el periodo de estudio.

Palabras claves: *Vibrio cholerae* O1, medios de transporte, viabilidad.

SUMMARY

It was studied the time of permanence of *Vibrio cholerae* O1 in the transport media Amies, Amies with charcon and Stuart. Thus, the faecal samples of thirteen cholera patients were collected and transported in those media included Cary – Blair medium. Through the fortnight cultures of each sample, *V. cholerae* O1 was isolated as follow: during the firsts 30 days in Stuart medium ($p=1.00$). During 45 days Cary-Blair medium ($p=0.095$) and during 60 days in Amies with charcoal medium ($p=0.199$). Results indicate that *V. cholerae* O1 could be transported in all the media evaluated, except in Amies medium. In those media *V. cholerae* O1 has recovered under its culturable and viable form during the study time.

Key words: *Vibrio cholerae* O1, transport media, viability.

INTRODUCCION

Vibrio cholerae, agente casual de la enfermedad del cólera es una bacteria gram-negativa que se adapta a los medios acuáticos, donde prolifera cuando ciertos factores ambientales le son favorables, pudiendo ser transmitidos hacia la población humana, ocasionando focos infecciosos según un patrón estacional (6,14). El cólera persiste en algunas regiones naturales del Perú, donde *V. cholerae* Biotipo El Tor se adaptaría debido a sus características endémicas.

Cuando aparecen casos sospechosos de cólera, el agente infeccioso es identificado mediante el coprocultivo de la muestra fecal la cual debe ser adecuadamente obtenida y transportada hacia un laboratorio referencial (9). El transporte de una muestra fecal desde una zona rural hasta un laboratorio referencial puede tardar hasta dos semanas (12).

De acuerdo a los manuales de identificación la muestra diarreica debe ser transportada solo en el medio Cary Blair (11, 15). En el presente estudio se plantea la posibilidad de usar estudio otros medios, donde se asegure la viabilidad de *Vibrio cholerae* durante el

tiempo de transporte y de donde la bacteria pueda ser recuperada mediante coprocultivo.

La viabilidad de la bacteria permitirá identificar el posible primer caso de cólera que determinara a su vez la ubicación del foco infeccioso donde se podrán implementar las medidas de control y la provisión de asistencia oportuna (8).

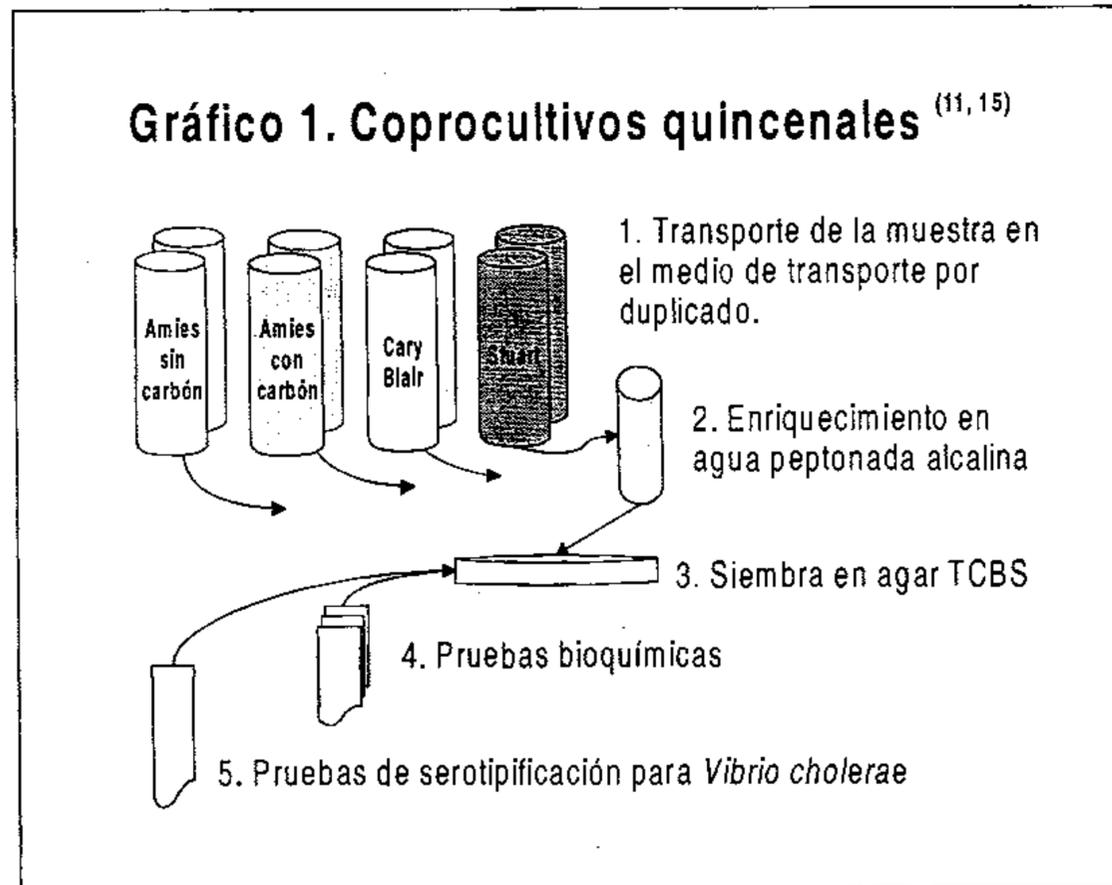
MATERIALES Y METODOS

Se colectaron las muestras de trece pacientes con síntomas de cólera atendidos en el Hospital María Auxiliadora, Lima. Cada hisopo con muestra fue depositado en los medios de transporte: Cary – Blair, Amies con carbón, Amies sin carbón y Stuart y fueron llevados al laboratorio a temperatura AMBIENTE. La muestra de cada paciente se obtuvo por duplicado para cada medio de transporte (Gráfico 1). Las muestras contenidas en cada medio de transporte fueron conservadas a temperatura ambiente (25°C) durante el estudio. El coprocultivo se realizó según los métodos descritos (11, 15).

El tiempo de permanecía de la bacteria se analizó mediante la prueba exacta de Fisher (26) y se utilizó el paquete

estadístico Epiinfo (25). Dicho análisis permitió comparar la proporción de muestras positivas a *V. cholerae* en el primer día y la proporción de muestras positivas a *V. cholerae* en cada una de

las siguientes quincenas posteriores. La prueba fue aplicada para cada medio de transporte evaluado, según la construcción de las tablas de contingencia para cada caso.



RESULTADOS

La evaluación quincenal de las trece muestras en cada medio de transporte microbiológico fue el siguiente:

Medio de Transporte Amies sin Carbón.

– El valor “p” de la probabilidad, según la prueba de Fisher para la comparación entre la proporción de bacterias recuperadas en el primer día y la proporción de bacterias recuperadas en las siguientes quincenas, indico que dichas proporciones siempre fueron diferentes. ($p \leq 0.0052$). Medio de Transporte Amies con Carbón. –El

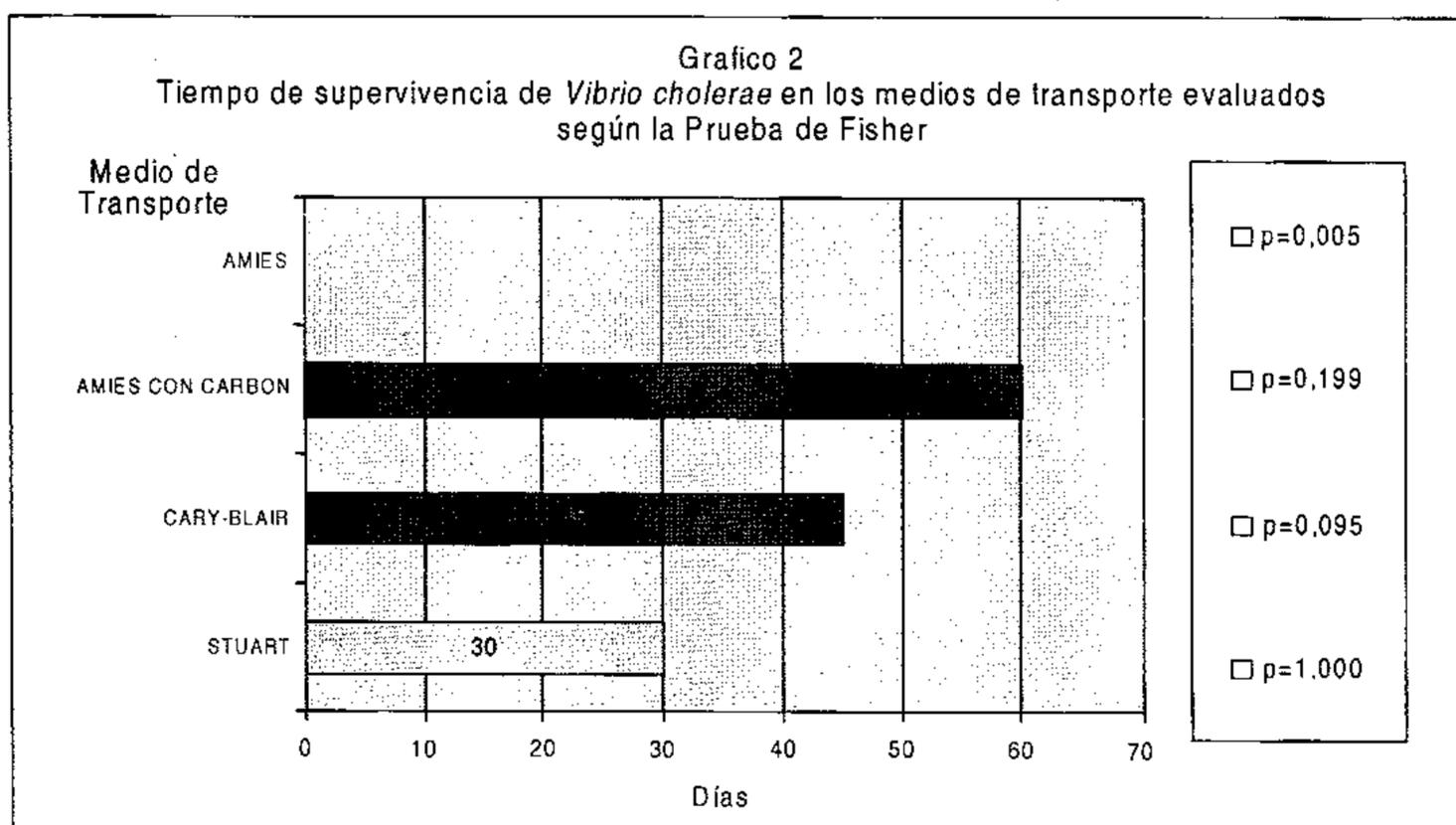
valor “p” de la probabilidad, según la prueba de Fisher para comparar la proporción de bacteria recuperada en el primer día y la proporción de bacteria recuperada en las siguientes quincenas, indicó que dichas proporciones fueron iguales desde la primera hasta la cuarta quincena ($p=0.1992$), después de este tiempo, las proporciones siguientes no fueron iguales a la proporción obtenida en el primer día ($p \leq 0.0391$).

Medio de Transporte Cary-Blair. El valor “p” de la probabilidad, según la prueba de Fisher para la comparación entre proporción de bacteria recuperada

de las muestras en el primer día y la proporción de bacteria recuperada en las siguientes quincenas, indicó que dichas proporciones fueron iguales de la primera hasta la tercera quincena ($p \geq 0.0956$). Las proporciones siguientes no fueron iguales a la proporción obtenida en el primer ($p \leq 0.0149$).

Medio de Transporte Stuart.-El valor "p" de la probabilidad, según la prueba

de Fisher para la comparación entre la proporción de bacteria recuperada de las muestras en el primer día y proporción de bacteria recuperada de las muestras de la siguientes quincenas, indicó que dichas proporciones fueron iguales hasta la segunda quincena ó 30 días ($p = 1.000$), después de este tiempo, las proporciones no fueron iguales a la proporción obtenida en el primer día ($p \leq 0.0149$).



DISCUSIÓN

V. cholerae fue aislado del medio Amies sin carbón en el primer coprocultivo pero su recuperación luego de quince días no es estadísticamente aceptable. Es posible que *V. cholerae* haya adoptado su estado viable no cultivable, el cual no es útil para el

oportuno diagnóstico clínico del cólera (3, 18). Por lo contrario, *V. cholerae* fue recuperado en el medio Amies con carbón durante sesenta días. Dicha persistencia puede deberse a la presencia del carbón que tiene afinidad por sus compuestos orgánicos (7), descomponiendo las formas reducidas de oxígeno y secuestrando los radicales

libres (10); sin embargo, el carbón dificulta las tinciones gram.

La recuperación de *V. cholerae* en el medio Stuart disminuye drásticamente después de treinta días. Se ha descrito que el medio Stuart permite el transporte de especímenes fecales debido a la presencia de una solución balanceada de sales y un amortiguador de fosfato orgánico (4). Es posible que la disminución de la concentración de oxígeno debido a la presencia de tioglicolato de sodio, la ausencia de cloruro de sodio y la menor Stuart (2) hayan afectado a la recuperación cultivable y viable de *V. Cholerae*. Los iones sodio son necesarios para la supervivencia y el desarrollo de *V. cholerae* (20) y la combinación de bajas concentraciones de salinidad-nutrientes afecta la recuperación de éste, logrando detectar sólo bacterias no cultivables(19).

En el medio Cary-Blair, *V. cholerae* tuvo un comportamiento inicial similar a los medios Stuart y Amies con carbón, manteniéndose constante hasta los treinta días, resultado reportado anteriormente (13). El medio Cary-Blair es recomendable para el transporte de *V. cholerae* debido a su pH alcalino (pH=8.4) y a la presencia de cloruro de

sodio (5, 13, 15, 21); pero, *V. cholerae* también se establece a pH neutro como ocurre en el ambiente y como se ha podido demostrar en el presente estudio con los medios Amies con carbón Stuart, que han sido recomendados para el transporte de las muestras, pero sólo por periodos de breves (uno o dos días), dado que aparentemente el pH de estos medios no era óptimo para *V. cholerae* (15).

Es posible que en todos los medios de transporte utilizados, *V. cholerae* haya sufrido alteraciones fisiológicas debido al prolongado tiempo de exposición. Sin embargo, la mayoría de medios utilizados a excepción del medio Amies, han sido apropiados para mantener *V. cholerae* viable y cultivable durante 30n días como mínimo, (probabilidad > 0.05). Es posible que estos medios de transporte puedan también mantener cultivos puros de la bacteria, pudiendo ser usados en ceparios.

Medios de transporte para *Vibrio cholerae*

Se ha logrado demostrar la permanencia de *Vibrio cholerae* O1, Biotipo El Tor en los medios de transporte Amies (Gráfico 2).

Las muestras fecales de pacientes con

síntomas clínicos de cólera podrían ser eventualmente transportadas en los medios de transporte Amies con carbón y Stuart, cuando no se dispone del medio de transporte Cary-Blair. Las muestras así transportadas permitirán identificar al agente casual, reportar la enfermedad e implementar las medidas de control (8).

El tratamiento del cólera ha sido eficiente en el Perú dado que se conocían los programas de control de las enfermedades diarreicas antes del primer brote de cólera (17). La prevención y control del cólera requiere del abastecimiento del agua segura y la detección inmediata del primer caso (24). Por ello, siempre será importante rescatar las muestras biológicas de los primeros casos que permitan identificar al agente infeccioso.

La notificación de brotes epidémicos de cólera causados por *Vibrio cholerae* O139, distinto del serogrupo O1, ha alertado al Perú y a muchos países propensos a desarrollar esta nueva epidemia. La identificación de *V. cholerae* O139 es similar a la de *V. cholerae* O1; por ello los métodos se aplican por igual, incluyendo su transporte (1, 15, 16, 22, 23).

CONCLUSIONES

1. *Vibrio cholerae* O1 permanece viable y cultivable durante sesenta días en el medio de transporte Amies con carbón, durante cuarenta y cinco días en el medio transporte Cary Blair y durante treinta días en el medio de transporte Stuart.
2. Los coprocultivos de las muestras transportadas por los medios evaluados deberán ser pre-enriquecidos en agua peptonada alcalina para asegurar la viabilidad de la bacteria.
3. *Vibrio cholerae* O1 permanece viable y cultivable en el sistema de transporte Amies durante cuarenta y cinco días y en el sistema de transporte Cary-Blair durante treinta días, a pesar de haberse empleado productos vencidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BHATTACHARYA SK, ET AL. 1992 Acute secretory traveller's diarrhoea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 which does not produce cholera-like or heat stable enterotoxin. J. Diarrhoeal Dis. Res. 10:161-163.g
2. BENNINGTON J. 1991. Diccionario Enciclopédico del

- Laboratorio Clínico. P. 1348. Ed. Panamericana, Argentina.
3. BLOOMFIELD S, et al. 1998. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology* 144:1-2 g
 4. CARY SG and BLAIR EB. 1964. New transport medium for shipment of clinical specimens. *J. Bact.* 88:96 g
 5. CDC. Technical Guidelines on the detection and control of cholera epidemics. CDC Atlanta, Georgia, USA. (sin año de publicación).
 6. Cevallos A. 1994. Evaluación de aguas superficiales y residuales en la Provincia de Huara para aislar *Vibrio cholerae* antes del posible brote de cólera. Tesis. URP, Lima.
 7. CONSIDINE, D 1995. Van Nostrand's Scientific Encyclopaedia 8th edition. International Thomson Publishing Inc. USA New York. First volumen, 46 g
 8. GLASS R et al..1991. Cholera in Africa: lessons on transmission and control for Latin America. *Lancet*, 338:791-795 g
 9. HEYMANN D. 1991. Emerging Infectious Diseases. World Health, The Magazine of the WHO 1:4-6. g
 10. HOFFMAN PS; BELL S. 1983. Production of superoxide and hydrogen peroxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl Environ Microbiol.* 45:784-791 g
 11. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS). 1991. Manual de laboratorio de cólera. Serie de Normas Técnicas N° 2, Lima.
 12. ISAACSON M et al. 1974. The recent cholerae outbreak in the South African gold mining industry. *South African Med. J.* 49:2557-25602 g.
 13. KELLY MT, HICKMAN-BRENNER and FARMER III 1991. *Vibrio*, en Manual of clinical microbiology. 5th Ed. Balows. ASM, Washington, DC.
 14. MILLER CJ, FEACHEM RG. 1985. Cholera epidemiology in developed and developing countries: New thoughts on transmission, seasonality and control. *Lancet* 2:261-263 g
 15. OPS CDC/NCID. 1994 Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. CDC.
 16. PHO/WHO. 1993. *Vibrio cholerae* serogrupo O139: un Nuevo serogrupo con potencial epidémico. HMP/CDD/COLERA/581/93.
 17. QUEVEDO, F y GONZÁLEZ S. 1995. El cólera en Latinoamérica. *Revisiones en Salud Pública* 4:35-56