

Modificación de una técnica de muestreo para mejorar la recuperación de *Vibrio cholerae* en aguas superficiales y residuales

Edgar Podlesky¹, Omayda Cárdenas²

Resumen

Para mejorar la eficiencia en la recuperación de *V. cholerae* en aguas, se modificó el hisopo de Moore incrementando su área de muestreo. El hisopo se ensayó en concentraciones de *V. cholerae* O1 y no O1 de $7,5 \times 10^3$, $1,5 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ y $7,5 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro tanto en aguas superficiales como residuales bajo dos modelos: dinámico, con el agua en continuo movimiento, y, estático, con el agua quieta. Los ensayos se realizaron en acuarios de vidrio de 20 litros tomándose muestras a las 12, 24, 36 y 48 horas y cultivándose en agar BHI y TCBS.

La recuperación del *Vibrio* fue del 99,4% (174/175), en aguas superficiales y del 100% (188/188), en aguas residuales cuando se cultivaron en agar BHI. La positividad en agar TCBS fue del 60% (105/175), en aguas superficiales y del 92,6% (174/188) y en aguas residuales.

Para el total de las muestras estudiadas, la capacidad de recuperación del hisopo fue del 99,7% (362/363), en agar BHI y del 76,3% (279/363) en agar TCBS.

El tiempo óptimo de muestreo fue de 24 horas.

Summary

To improve retrieval of *Vibrio cholerae* from fresh and sewage water, a new design of the Moore swab, increasing its sampling area several-fold, was tested.

The new swab was exposed to concentrations of 7.5×10^3 , 1.5×10^4 , 3.0×10^4 and 7.5×10^4 colony forming units (CFU) of *Vibrio cholerae* O1 and no O1 in trials involving fresh as well as sewage water, using two models: dynamic, water in constant movement, and static, being still water. 20-liter glass containers were used to run the assays in samples being taken at 12, 24, 36 and 48 hours. Brain-heart infusion (BHI) and thiosulfate-citrate-bile-sucrose (TCBS) were used as growing media.

The new swab retrieved 99.4% (174/175), of *V. cholerae* from fresh water and 100% (188/188) from sewage water when grown on BHI, in both models. On TCBS, *V. cholerae* was positive in 60% (105/174) of the samples for fresh water and 92.6% (174/188), for sewage water.

Overall, retrieval on BHI was 99.7% (362/363), and 76.3% (279/363) on TCBS. The best sampling time was established at 24 hours.

¹ Coordinador de Investigación, Laboratorio de Salud Ambiental, INS.

² Bacterióloga, Laboratorio de Salud Ambiental, INS.

Vibrio cholerae, al igual que otros miembros de la familia Vibrionaceae, tiene su hábitat natural en el agua (1).

Comúnmente, la detección de contaminantes químicos y biológicos se realiza analizando muestras puntuales o muestras compuestas de agua. Sin embargo, las muestras puntuales son poco representativas y las compuestas son dispendiosas de recolectar requiriendo normalmente mayores recursos humanos, de materiales y logísticos que lo hace poco costo-efectivo.

Dado que las descargas de los contaminantes se realiza de manera intermitente, es siempre deseable establecer un sistema de muestreo continuo de la fuente.

Para el muestreo de microorganismos en aguas, se han venido utilizando diferentes modalidades de hisopos que se sumergen en la fuente durante el tiempo deseado y luego se cultivan en medios apropiados.

B.B. Moore introdujo el uso de hisopos de gasa para el aislamiento de microorganismos entéricos en agua. Fueron fabricados con gasa de 60x15 cm, doblándola varias veces hasta formar una almohadilla compacta (2, 3) (figura 1).

T.J. Barret y S. Giono emplearon rollos cilíndricos de gasa de longitud variable para el aislamiento de *V. cholerae* 01 en sistemas de alcantarillado en Estados Unidos (3-5) (figuras 2 y 3). Otra versión de la almohadilla de Moore fue utilizada por M. Isaacson en Suráfrica, para la detección de *V. cholerae* en aguas residuales (6, 7).

En la epidemia de cólera de Perú, se utilizaron bolsas de gasa de 10 x 5 cm rellenas de algodón, con una pesa en la parte inferior del hisopo para mantenerlo sumergido en la fuente (7, 8) (figura 4). W.M. Spira construyó filtros con botellas plásticas con gasa como material filtrante para muestrear agua estancada (9).

Los hisopos tipo almohadilla se utilizaron en Colombia durante la epidemia de cólera para detectar *Vibrio* en aguas de mar y efluentes hospitalarios con resultados poco satisfactorios, pues, no se obtuvo un aislamiento eficiente del microorganismo (10). Este hecho motivó el presente estudio, bajo la premisa de que un

incremento substancial en el área de muestreo del hisopo, mejoraría la captación y retención de *Vibrio*, para su posterior identificación en el laboratorio.

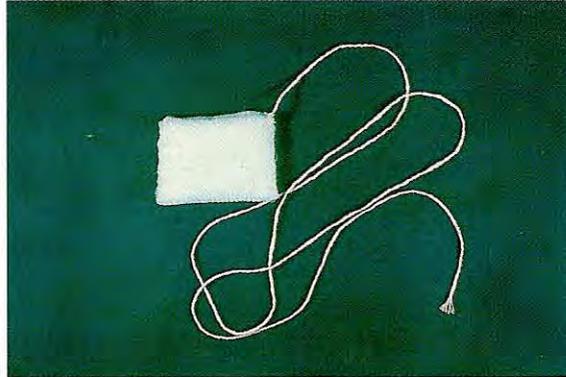
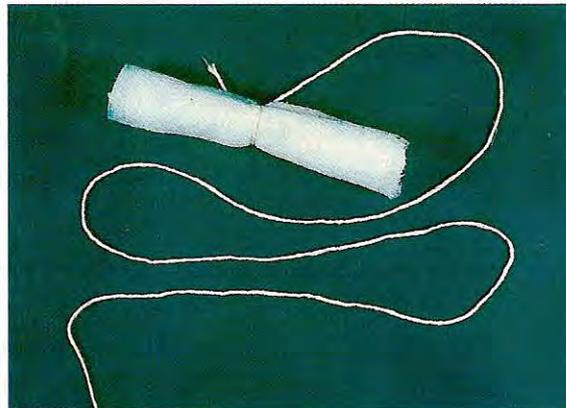


Figura 1. Hisopo de Moore.



Figuras 2 y 3. Hisopo Barret-Giono.

Materiales y métodos

Fabricación del hisopo: para aumentar la superficie de muestreo del hisopo, se cortaron piezas de gasa de 45 cm de ancho por 60 cm de largo, doblándola a la mitad longitudinalmente y tres veces consecutivas a lo ancho, cortando en cada costado y quedando tiras de 30 cm de largo por 5 cm de ancho, aproximadamente, atándose el extremo superior con una cuerda (figura 5).

El hisopo se envolvió en papel Kraft y se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 PSI durante 20 m.

Muestras: se utilizó agua del río San Francisco como fuente de agua superficial y aguas negras de la planta de bombeo El Salitre, como fuente de aguas residuales. Las características fisicoquímicas y bacteriológicas de cada fuente fueron determinadas antes de los ensayos.

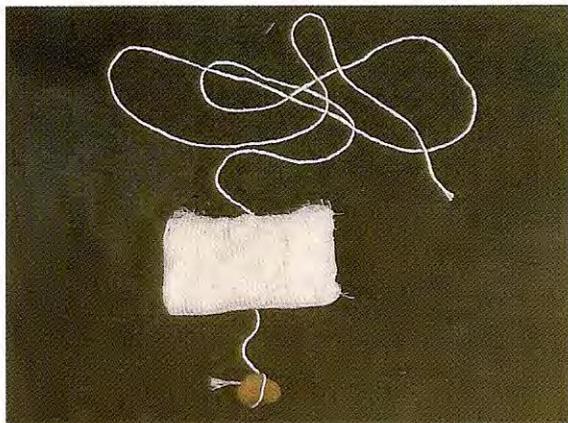


Figura 4. Hisopo Perú.



Figura 5. Modificación de los autores.

Diseño experimental: las dos clases de agua se estudiaron bajo dos modelos: a) dinámico, agua en movimiento para simular una corriente de agua, y, b) estática para simular agua almacenada o estancada. Los ensayos se realizaron en acuarios de vidrio utilizando 20 litros de agua en cada ensayo.

Para simular el agua en movimiento, se utilizó un motor de dos salidas con rueda y mangueras de aireación. En el modelo estático no se utilizaron estos accesorios.

Cepas: se utilizaron cepas puras de *V. cholerae* 01 y no 01 tomadas en la fase logarítmica de crecimiento.

Concentraciones ensayadas: considerando que, bajo condiciones normales, la dosis oral infectante de *V. cholerae* en individuos sanos no aclorhídricos está en el orden de 1×10^8 a 1×10^{10} microorganismos (7, 11-14), se ensayaron concentraciones finales de $7,5 \times 10^3$, $1,5 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ y $7,5 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) partiendo de turbiedades correspondientes a los tubos número 0,5, 1,0, 2,0 y 5,0, respectivamente, de la escala de McFarland (15).

Tiempo de muestreo: se estudiaron tiempos de 12, 24, 36 y 48 horas.

Enriquecimiento: cumplido el tiempo de muestreo, el hisopo se resuspendió en 200 mL de agua peptonada alcalina (APA), pH $8,9 \pm 0,3$ y se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 h.

Identificación: cumplido el tiempo de preenriquecimiento, se tomó un inóculo con asa de la superficie del APA y se sembró por agotamiento en agar infusión cerebro-corazón (BHI) y en agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS), incubándose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

A las colonias sugestivas de *V. cholerae* en agar BHI, se les practicaron las pruebas de oxidasa y cuerda. Las colonias cuerda y oxidasa positivas se confirmaron a través de pruebas bioquímicas y serológicas.

A las colonias con características morfológicas sugestivas de *V. cholerae* se les realizó un sub-

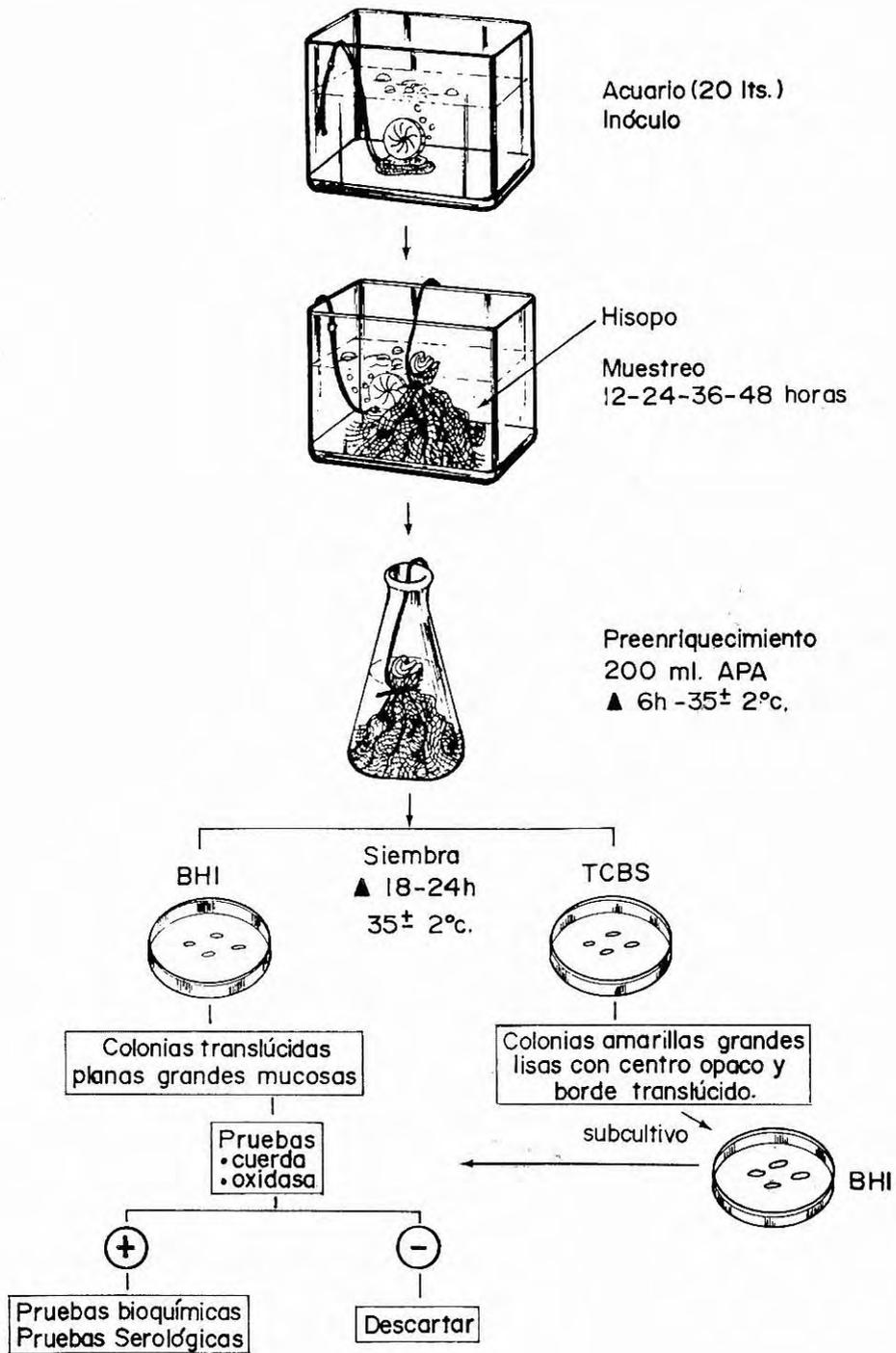


Figura 6. Esquema para la detección de *Vibrio cholerae* con hisopo de Moore modificado en aguas superficiales y residuales.

cultivo en agar BHI. El diagrama de todo el procedimiento se presenta en la figura 6.

Interpretación de resultados: el crecimiento se calificó mediante conteo directo de las UFC típicas de *V. cholerae* en cada uno de los medios utilizando la siguiente escala:

- Negativo: no hubo crecimiento de UFC típicas de *V. cholerae*.
- Positivo: hubo crecimiento de UFC típicas de *V. cholerae*.
- Ocasional: 1 a 4 UFC
- Escaso: 5 a 20 UFC
- Moderado: 21 a 80 UFC
- Abundante: más de 80 UFC a incontable

Evaluación de eficiencia: se calificó con base en la capacidad mostrada por el hisopo para detectar *V. cholerae* en la concentración más baja y en el menor tiempo de muestreo, tanto en aguas superficiales como residuales en ambos modelos.

Resultados

Se realizaron un total de 363 ensayos, 175 en aguas superficiales y 188 en aguas residuales observándose resultados positivos en 362 (99,7%) de los cultivos en BHI y 279 (76,3%) en medio TCBS (tabla 1).

En aguas superficiales, el hisopo detectó *V. cholerae* en el 99,4% (174/175) de las pruebas cultivadas en agar BHI y 60% (105/175) en agar TCBS.

Para aguas residuales, el crecimiento fue 100% positivo (188/188) en agar BHI y 92,6% (174/188) en agar TCBS (tabla 1).

Con relación al tiempo de muestreo, se observó crecimiento a las 12 h en agar BHI en todas las concentraciones tanto en aguas superficiales como residuales, conformándose un gradiente con respecto a la concentración de los inóculos utilizados (figuras 7 y 8), presentándose el mejor crecimiento en aguas superficiales a las 24 h con descenso a las 36 h que fue más marcado a las 48 h (figura 7).

El mayor crecimiento para aguas residuales en BHI también se observó a las 24 h con tendencia a disminuir a las 36 y 48 h (figura 8).

No se obtuvo crecimiento con el inóculo de $7,5 \times 10^3$ UFC/mL para aguas superficiales en agar TCBS en ninguno de los tiempos de muestreo. Sin embargo, hubo crecimiento evidente para las demás concentraciones a partir de las 12 h de muestreo, obteniéndose el mejor crecimiento a las 24 h con un notorio descenso a partir de las 36 y 48 h (figura 9).

El crecimiento de *V. cholerae* en agar TCBS a partir de aguas residuales, se observó en todas las concentraciones, en todos los tiempos de muestreo, obteniéndose la mayor recuperación a las 24 h (figura 10).

En relación con la recuperación de los diferentes tipos de *V. cholerae*, el hisopo mostró igual eficiencia para *V. cholerae* 01 como para *V. cholerae* no 01 en las dos clases de aguas en ambos modelos (tabla 2).

Tabla 1. Recuperación de *Vibrio cholerae* en muestras de aguas superficiales y residuales.

| Fuente | Lugar | Ensayos | BHI | | TCBS | |
|---------------|-------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | | | n(%) | % | n(%) | % |
| Superficiales | Río San Francisco | 175 | 174 | 99,4 | 105 | 60,0 |
| Residuales | Planta El Salitre | 188 | 188 | 100,0 | 174 | 92,6 |
| Total | 2 | 363 | 362 | 99,7 | 279 | 76,3 |

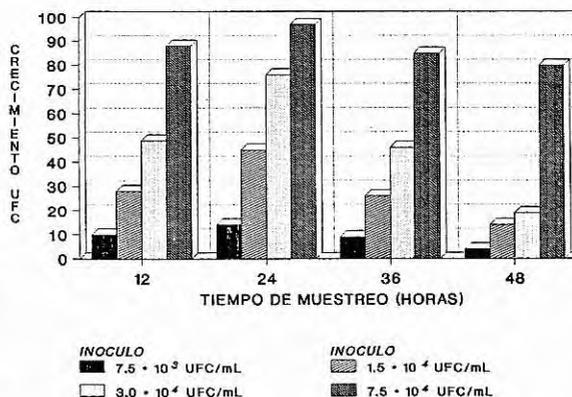


Figura 7. Aislamiento de *V. cholerae* en aguas superficiales, en agar BHI, según inóculo y tiempo de muestreo.

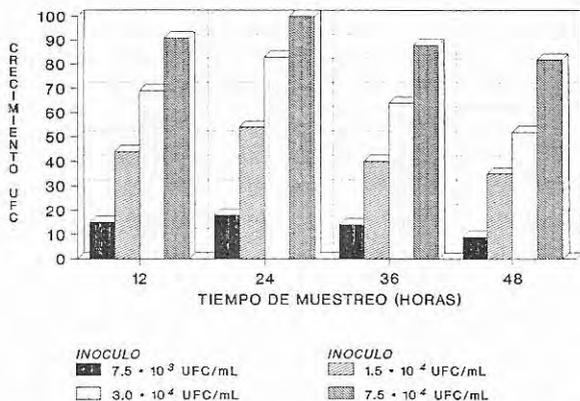


Figura 8. Aislamiento de *V. cholerae* en aguas residuales, en agar BHI, según inóculo y tiempo de muestreo.

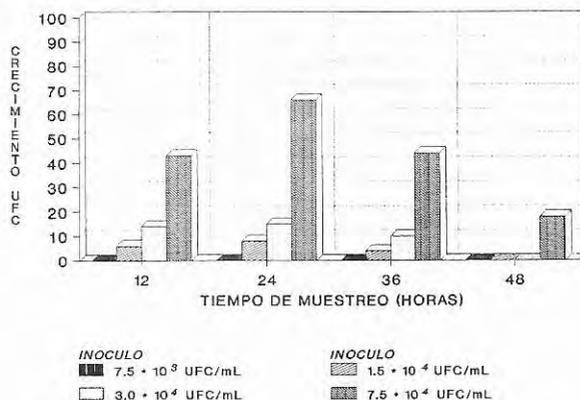


Figura 9. Aislamiento de *V. cholerae* en aguas superficiales, en agar TCBS, según inóculo y tiempo de muestreo.

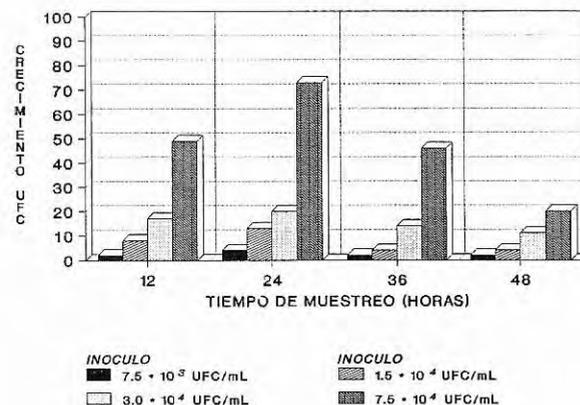


Figura 10. Aislamiento de *V. cholerae* en aguas residuales, en agar TCBS, según inóculo y tiempo de muestreo.

Discusión

Bajo las condiciones experimentales estudiadas, el hisopo modificado recuperó eficientemente ambas cepas de *Vibrio cholerae*, tanto en aguas superficiales como residuales. El hecho de que pudiera identificarse plenamente *Vibrio* a la concentración inicial más baja ensayada (7.500 UFC/mL), podría ser de importancia en salud pública ya que el cólera se relaciona con poblaciones socialmente deprimidas con carencia de servicios públicos, incluyendo acueducto, que los obliga a mantener agua almacenada para bebida y preparación de alimentos.

El modelo estático ensayado simula una situación real en la cual un sistema de agua almacenada que fue contaminado con una concentración inicial baja ($7,5 \times 10^3$ UFC/mL), pudo ser detectada por el hisopo modificado dentro de un tiempo de muestreo corto (12 a 24 h), lo cual ofrece a las autoridades de salud la oportunidad de implementar medidas tempranas y rápidas de prevención y control.

Dado que el modelo dinámico ensayado no refleja fielmente la situación de una corriente de agua contaminada con *Vibrio*, el tiempo de muestreo con el hisopo podría extenderse a 48 h o más para permitir una mejor acumulación de *Vibrio* en el hisopo en caso de que su circulación en aguas se esté dando a muy bajas concentraciones.

En lo que respecta a los medios de cultivo ensayados, *Vibrio* creció mejor en agar BHI. Se destaca el hecho que, en este medio y no en TCBS, se pudo identificar plenamente *Vibrio cholerae* en la concentración inicial más baja ensayada ($7,5 \times 10^3$ UFC/mL). Es, además en el medio BHI y no en TCBS, donde se realizan las pruebas confirmatorias de *Vibrio cholerae*. A pesar de la conveniencia de seguir utilizando ambos medios, BHI y TCBS, para la identificación de *Vibrio cholerae*, es muy importante que el personal de laboratorio desarrolle una muy buena técnica para garantizar el aislamiento de las colonias en BHI ya que, a bajas concentraciones del microorganismo, es posible que no crezca en el agar TCBS, pero que sí lo haga en el BHI como sucedió en este estudio.

Tabla 2. Recuperación de *Vibrio cholerae* en aguas superficiales y residuales, utilizando hisopo de Moore modificado.

| TIEMPO DE EXPOSICION | TIPO DE VIBRIO | MODELO | 7.5 x 10 ⁵ UFC/ml | | 1.5 x 10 ⁴ UFC/ml | | 3.0 x 10 ⁴ UFC/ml | | 7.5 x 10 ⁴ UFC/ml | |
|----------------------|-------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | | | SUPERF | RESIDU | SUPERF | RESIDU | SUPERF | RESIDU | SUPERF | RESIDU |
| | | | BHI/TCBS | BHI/TCBS | BHI/TCBS | BHI/TCBS | BHI/TCBS | BHI/TCBS | BHI/TCBS | BHI/TCBS |
| 12 HORAS | V. cholerae 01 | dinámico | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | m / e | a / m | a / m |
| | | estático | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | m / e | a / m | a / m |
| | V. cholerae No.01 | dinámico | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | m / e | a / m | a / m |
| | | estático | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | m / e | a / m | a / m |
| 24 HORAS | V. cholerae 01 | dinámico | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | a / e | a / m | a / m |
| | | estático | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | a / e | a / m | a / m |
| | V. cholerae No.01 | dinámico | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | a / e | a / m | a / m |
| | | estático | e / n | e / o | m / e | m / e | m / e | a / e | a / m | a / m |
| 36 HORAS | V. cholerae 01 | dinámico | e / n | e / o | m / o | m / o | m / e | m / e | a / m | a / m |
| | | estático | e / n | e / o | m / o | m / o | m / e | m / e | a / m | a / m |
| | V. cholerae No.01 | dinámico | e / n | e / o | m / o | m / o | m / e | m / e | a / m | a / m |
| | | estático | e / n | e / o | m / o | m / o | m / e | m / e | a / m | a / m |
| 48 HORAS | V. cholerae 01 | dinámico | o / n | e / o | e / n | m / o | e / n | m / e | a / e | a / e |
| | | estático | o / n | e / o | e / n | m / o | e / n | m / e | a / e | a / e |
| | V. cholerae No.01 | dinámico | o / n | e / o | e / n | m / o | e / n | m / e | a / e | a / e |
| | | estático | o / n | e / o | e / n | m / o | e / n | m / e | a / m | a / e |

o = Ocasional (1 a 4 UFC)
m = Moderado (21 a 80 UFC)

e = Escaso (5 a 20 UFC)
a = Abundante (mas de 80 UFC)

n = Negativo

En conclusión, a pesar de que el hisopo modificado permite recuperar eficientemente *Vibrio*, el tiempo mínimo que debe transcurrir para su plena identificación es de 48 h, si se considera un tiempo de muestreo de 24 h, 6 h de pre-enriquecimiento en APA y 18 h de incubación.

Sería conveniente validar nuevas tecnologías desarrolladas recientemente: pruebas inmunoenzimáticas, de fluorescencia directa, etc., que aseguran poder identificar *V. cholerae* en aguas en tiempos de 15 m a 6 h dependiendo de la concentración de *Vibrio* en la fuente, y comprobar

el costo-efectividad que podrían tener frente al procedimiento empleado en este estudio, lo que permitiría identificar la mejor propuesta para la eventual implantación de un sistema de monitoría permanente de *V. cholerae* en aguas superficiales y residuales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las estudiantes de bacteriología Liliana Rincón y Mónica Saavedra, por la colaboración en la realización de este trabajo.

Referencias

1. **Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Organización Panamericana de la Salud (OPS).** Examen de muestras ambientales. Métodos de laboratorio para *Vibrio cholerae*. Guatemala, 1992:29-8.
2. **Moore BB, Perry EL, Chard ST.** A survey by the sewage swab method of latent enteric infection in an urban area. *J Hyg* 1952;50:137-56.
3. **Barret TJ, Blake PA, Morris GK, Puhr ND, Bradford HB, Wells JG.** Use of Moore swabs for isolating *Vibrio cholerae* from sewage. *J Clin Microbiol* 1980;11:385-8.
4. **Giono S, Gutiérrez L, Hinojosa AM.** Hisopo de Moore para el muestreo de aguas negras o de corrientes para el aislamiento de *Vibrio cholerae*. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. México, D.F., 1991;14-8.
5. **Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS).** Aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 de las muestras ambientales. Curso de métodos de laboratorio en el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Caracas, 1991:31-5.
6. **Isaacson M.** Practical aspects of a cholera surveillance programme. *S Afr Med J* 1975;49:1699-2.
7. **Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS), Programa de salud ambiental (CEPIS).** *Vibrio cholerae* and cholera. El cólera. Lima, 1991:1-29.
8. **Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS).** Salud ambiental y el cólera. Guía para la prevención y control del cólera. Quito, 1991:157-9.
9. **Spira WM, Ahmed QS.** Gauze filtration and enrichment procedures of recovery of *Vibrio cholerae* from contaminated waters. *Appl Environ Microbiol* 1981;42:730-3.
10. **Podlesky E.** Medidas de saneamiento ambiental para evitar la diseminación del cólera. Bogotá, D.C.: Manual INS, 1991:28.
11. **Jawetz E, Adelberg E, Melnick J.** Vibriones. Microbiología médica. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, 1987:262-6.
12. **Paroid C, Olano J, Huaman R.** Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio del cólera. Manual de laboratorio cólera. Lima: Serie de Normas Técnicas No. 2, 1991:18-19.
13. **Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS).** Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington, D.C.: Programa de Salud Pública Veterinaria, 1991:1-4.
14. **Cash RA, Music SI, Libonati JP, Snyder MJ, Wenzel RP, Hornick RB.** Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic and bacteriologic responses to a known inoculum. *J Infect Dis* 1974;129:45-2.
15. **Center for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Infectious Diseases (NCID).** Preparation of media and reagents. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Washington, D.C.: NCID, 1993:125-6.