

COMUNICACIONES

Aislamiento de *Vibrio cholerae* no-01 en el Golfo de Nicoya, Costa Rica

Florencia Antillón G. y Evelyn Rodríguez C.

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

(Rec. 29-V-1991. Acep. 3-III-1992)

Abstract: In a bacteriological study on samples of bivalves, mud and surface waters from the Gulf of Nicoya, Costa Rica, 18 strains of non-01 *Vibrio cholerae* and 50 of *V. mimicus* were isolated. The samples were enriched in alkaline peptone water, and streaked on MacConkey and inositol-brilliant green bile agars. Biochemical and serological tests were used for their identification. Both species were isolated from all sampling sites (Lepanto, Jicaral and Puntarenas) with either of the two agar media, even though these were not specific for vibrios.

Key words: non-01 *Vibrio cholerae*, water, bivalves, mud, Costa Rica.

Las bacterias de la familia Vibrionaceae (*Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*) se encuentran generalmente en ambientes marinos y esteros, lo que puede afectar la calidad sanitaria de los productos de consumo humano. Los alimentos más frecuentemente incriminados son los bivalvos, debido a que propician la retención de microorganismos en sus cuerpos al filtrar y capturar nutrientes del agua.

A. hydrophila, *P. shigelloides* y *V. cholerae* serotipo 01 son los miembros de esta familia que tradicionalmente se han implicado como agentes casuales de gastroenteritis y diarrea severa; sin embargo, existen evidencias que indican que otras especies pueden ser responsables de casos esporádicos y brotes de enteritis, como *V. mimicus* y *V. cholerae* no-01 (Kenyon *et al.* 1983). Dichas especies fueron aisladas como parte de una investigación que demostró la presencia de *Aeromonas* y *Plesiomonas* en agua, cieno y bivalvos del Golfo de Nicoya (Rodríguez y Antillón 1989). Debido a la epidemia de cólera que está afectando a Sur América y a que *V. cholerae* no-01 fue aislado en el Golfo de Nicoya, consideramos oportuno presentar esta comunicación.

Se eligieron tres estaciones de muestreo en el Golfo de Nicoya, Costa Rica: Jicaral (85° 7.1' W; 9° 58.5' N), Lepanto (85° 2.1' W; 9° 57.7' N) y Puntarenas (84° 50.6' W; 9° 59.4' N). Durante 38 semanas comprendidas entre marzo de 1986 y mayo de 1987 se recolectaron muestras de 200 ml de agua y 500 g de cieno en recipientes de vidrio estériles, así como 25 ejemplares vivos de bivalvos (*Anadara*, *Dosinia* y *Tagellus*) en bolsas plásticas. Todas las muestras se colocaron de inmediato sobre hielo y en menos de 6 horas se comenzaron a procesar en el laboratorio. Siguiendo las indicaciones de Hunt *et al.* (1984), se obtuvieron entre 100 y 200 g de material de los bivalvos, los que se diluyeron 1:4 al homogenizar la muestra con agua peptonada al 0.5% en la licuadora por 70 segundos; de la misma manera se diluyeron las muestras de cieno. De uno y otro material así diluido se tomaron porciones de 25 ml para sembrar volúmenes de 225 ml de agua peptonada alcalina pH 8.4, como medio de enriquecimiento (Von Graevenitz 1985). Las bacterias del agua se concentraron según el método de Seidler *et al.* (1980), mediante filtración de 100 ml de agua a través de una membrana con un

poro de 0.45 μm (Millipore Corp., Bedford, Mass.), la que se colocó en un matraz erlenmeyer con 225 ml de agua peptonada alcalina. Todos los materiales se incubaron 24 horas a 35°C. A partir de la película formada en cada uno de los cultivos anteriores se sembraron dos placas con agar Mac Conkey (BBL) y dos con agar Inositol Bilis Verde Brillante (IBB) preparado según Von Graevenitz y Bucher (1983). Las placas se incubaron a 35°C por 18 horas.

Para determinar la presencia de *Plesiomonas* y *Aeromonas* se purificó un total de 1178 colonias en agar sangre, cuya identificación posterior se realizó con base en las pruebas de tinción de Gram, agar triple azúcar hierro, oxidasa, catalasa, movilidad, descarboxilasas de la lisina, arginina y ornitina, hidrólisis de esculina y gelatina, Voges-Proskauer, fermentación de glucosa, inositol, manitol, salicina, arabinosa, xilosa y sacarosa, según los esquemas del "Manual of Clinical Microbiology" (Lennette *et al.* 1985) y los de Bergey's "Manual of Systematic Bacteriology" (Krieg *et al.* 1984). Las cepas identificadas como *V. cholerae* fueron probadas con antisuero polivalente Difco (Hikojima, Inaba, Ogawa), serotipo 01.

Los resultados revelaron la presencia de 136 cepas de *Aeromonas*, 7 de *Plesiomonas* (Rodríguez y Antillón 1989), 18 de *V. cholerae* no 01 y 50 de *V. mimicus*; la gran mayoría de las colonias seleccionadas inicialmente se identificaron como *Pseudomonas*.

Fue posible aislar *V. cholerae* no 01 y *V. mimicus* de bivalvos, aguas y sedimento de las tres estaciones de muestreo (Jicaral, Lepanto, Puntarenas), tanto en agar Mac Conkey como en agar IBB, a pesar de que la metodología empleada no era específica para el aislamiento de vibrios.

En un estudio simultáneo, García y Antillón (1991) investigaron las mismas muestras en cuanto a la presencia específica de vibrios y aislaron únicamente especies halofílicas. Dichos autores consideraron que la razón principal por la que no encontraron *V. cholerae* y *V. mimicus* se debió al sobrecrecimiento de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* en el agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS). Es por esto que la propuesta de

Massad y Oliver (1987) referente al uso de agar celobiosa-polimixina B-colistina para el aislamiento de *V. cholerae* debe ser considerada, puesto que establecen que el agar TCBS no es un medio adecuado para muestras contaminadas con otras especies de vibrios.

No es el propósito de esta comunicación recomendar el uso de los agares Mac Conkey o IBB como medios selectivos para el aislamiento de *V. cholerae*, sino alertar acerca de la presencia de la especie en el Golfo de Nicoya y su hallazgo en medios de cultivo que tradicionalmente han sido empleados con otros propósitos.

REFERENCIAS

- García, V. & F. Antillón. 1991. Aislamiento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cieno del Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* (en prensa).
- Hunt D., J. Miescier, J. Redman, A. Salinger & J. Lucas. 1984. Molluscan shellfish, fresh or freshfrozen oysters, mussels, or clams, p. 590-607. *In* M. Speck (ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Second ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Kenyon, J.E., D.C. Gillies, D.R. Piexoto & B. Austin. 1983. *Vibrio cholerae* (non-01) isolated from California coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1232-1233.
- Krieg, N. & J. Holt (eds.). 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, p. 518-550. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Lennette, E.H., A. Balows, W. Hausler & H. Shadomy (eds.). 1985. Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. p. 278-301. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Massad, G. & J.D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2262-2264.
- Rodríguez, E. & F. Antillón. 1989. *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en bivalvos, cieno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 37:69-74.
- Seidler, R.J., D.A. Allen, H. Lockman, R.R. Colwell, S.W. Joseph & O.P. Daily. 1980. Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1010-1018.