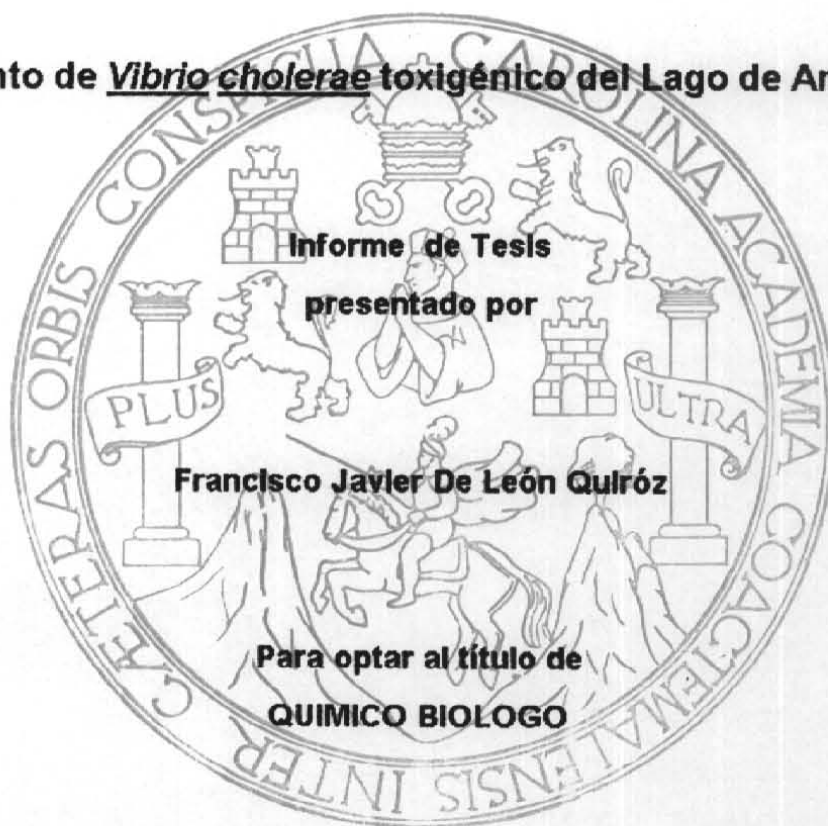


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

Aislamiento de Vibrio cholerae toxigénico del Lago de Amatitlán



Guatemala, mayo de 1998.

06
T(1849)
C.4

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. HERBERTH RAUL AREVALO ALVARADO
VOCAL V	BR. MANOLA ANLEU FORTUNY

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Sergio Rodrigo de León Fon y Elda Quiróz de de León, por su amor ejemplo y ayuda.

A mi asesora, Licda. Karin Herrera, por su asesoría y ayuda.

A la Licda. Olga Torres, Lic. Gerardo Arroyo, Licda Evelyn Rodas, Licda. Sandra Armas , Lic. Hayro García, Rosita Jo, Javier Armas y Ana María Rodas por su valiosa colaboración.

A el Laboratorio Microbiológico de Referencia(LAMIR), Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC), Instituto de nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) y Dirección General de servicios de Salud.

A el Comité Pro-mejoramiento del Lago de Amatitlán por su valiosa colaboarción durante el muestreo del Lago de Amatitlán.

A la Autoridad para el manejo sustentable de la Cuenca y del Lago de Amatitlán, por su asesoría y colaboración.

Al Laboratorio Clínico San Lucas y Luca Benvenuto por su colaboración.

DEDICO ESTA TESIS

Al Dios de Jesús y María, por la vida y la naturaleza.

**A mis padres: Sergio y Eida
con todo mi amor y respeto.**

**A mis hermanos: Sergio y Anel
con muchísimo cariño**

**A mi novia: Ana María
con amor y admiración**

DEDICO ESTE ACTO

Al Dios de la Vida y el Amor.

A mi Familia en general.

A Ana María y su Familia

A mis amigos del grupo Aventura en especial al diácono José Creazza, Melanie, Karla, Alex, Ximena, Jorge, Fabiola, Brenda e Ingrid.

INDICE

	Página
1. Resumen	01
2. Introducción	02
3. Antecedentes	04
4. Justificación	20
5. Objetivos	21
6. Hipótesis	22
7. Materiales y Métodos	23
8. Resultados	31
9. Discusión de Resultados	34
10. Conclusiones	36
11. Recomendaciones	37
12. Anexos	38
13. Bibliografía	42

1. Resumen

El presente estudio tuvo por propósito dar una base científica respecto a la presencia de Vibrio cholerae toxigénico en pescados del Lago de Amatitlán.

Se realizó un muestreo tomando en cuenta cinco puntos geográficos del Lago, en donde pescadores artesanales, extrajeron veinte pescados por lugar muestreado. A cada unidad de análisis se le realizó la marcha microbiológica para el aislamiento de Vibrio cholerae, utilizando veinte y cinco gramos de pescado. Finalmente a las cepas aisladas, que correspondieran al género Vibrio, se le determinó su capacidad toxigénica, por medio de la detección del gen ctxA; gen que codifica la producción de la toxina del cólera.

Del total de cien unidades de análisis, que constituyeron pescados del género Cichlasoma y Tilapia, no se aisló ninguna cepa de Vibrio cholerae 01 productor de toxina. Sin embargo, al 82 por ciento de los pescados, se les aisló Vibrio cholerae no 01. Para evaluar, la importancia epidemiológica del aislamiento de cepas de Vibrio cholerae no 01, se les realizó a las mismas, la determinación del gen ctxA. Como resultado se obtuvo que ninguna de estas cepas es toxigénica.

Tomando en cuenta que las condiciones del producto pesquero, están directamente relacionadas con la calidad del medio acuático de los peces, se concluye que el Lago de Amatitlán posee condiciones favorables para que bacterias del género Vibrio, sean parte importante de la microbiota de los peces del mismo. Se debe tomar en cuenta, que el Lago puede ser un foco de contaminación con bacterias patógenas como el Vibrio cholerae 0139, ya que el mismo ofrece las condiciones favorables para su supervivencia dentro de su flora y fauna. Así mismo, la contaminación bacteriana es muy alta, lo que puede indicar un riesgo para los consumidores de pescado y pescadores del Lago de Amatitlán.

Se recomienda, implementar y mantener un programa de prevención y vigilancia epidemiológica del cólera en especial en los lugares dónde se comercializa la pesca del Lago.

2. Introducción

En América Latina se estima una población de 600 millones de personas que habitan en territorios de una variada ecología. Se caracteriza además por albergar grandes núcleos de población que vive en áreas marginales, en las grandes ciudades, estimándose en un 40 por ciento. Son grandes las diferencias sanitarias entre los países, pero lo son aún mayores dentro de un mismo país como Guatemala, por las diversas condiciones de vida que determinan la existencia de grupos de mayor y menor riesgo y la poca cobertura de los servicios de salud que no sólo es de tipo geográfico, sino también de tipo técnico y económico, contribuyendo a una mayor vulnerabilidad a los agentes etiológicos prevalentes.

En Guatemala, la segunda causa de morbi-mortalidad por enfermedades infecciosas transmisibles, lo constituyen las enfermedades diarréicas; en 1996 se reportaron a los servicios de Salud 43,902 casos con una tasa de mortalidad del 12.18 por ciento (1).

Ese es el escenario que ha ofrecido el Continente Americano a Vibrio cholerae, el que hace su aparición a finales de 1991 en Perú y rápidamente se disemina la pandemia hasta llegar a Guatemala en ese mismo año.

En Guatemala, la infección ha permanecido endémica en territorio nacional, con zonas y temporadas del año de mayor cantidad de brotes. En 1996, se reportaron 368 casos sospechosos de cólera de los cuales 10 (2.71 por ciento) fueron confirmados, 129 hospitalizados (35.05 por ciento) y cero defunciones. Siendo las áreas de salud con mayor número de casos sospechosos: Amatitlán con 242 casos, Suchitepequez con 63, Retalhuleu con 35 y Escuintla con 7 casos (1).

Uno de los principales vehículos de transmisión del cólera, lo constituye el consumo de alimentos contaminados con Vibrio cholerae. De los alimentos consumidos que se incriminan en numerosos brotes lo constituyen pescados, mariscos y otros, crudos o mal cocidos (2,3).

Hasta el año de 1993, se consideraba únicamente a Vibrio cholerae 01 como etiológico de las grandes Pandemias que ha producido a lo largo de siglos en la humanidad. Sin embargo, ha surgido una cepa de V. cholerae no 01, capaz de

producir la toxina colérica. Además, se ha determinado que las características epidemiológicas de propagación son prácticamente idénticas a la de V. cholerae 01. Se especula que el apareamiento de esta nueva cepa en el continente Asiático podría ser el inicio de la llamada Octava pandemia del cólera.

Se sabe que Vibrio cholerae no 01 es prevalente en ríos y mares como microbiota de algas y peces; y que la posibilidad de que fueran toxigénicos muy pocas veces se tomaba en cuenta.

El lago de Amatitlán se encuentra ubicado en jurisdicción del Municipio de Amatitlán y colindante con los municipios de Villa Canales y Villa Nueva, en el Departamento de Guatemala. Es un lago que se encuentra en avanzado estado de eutrificación y que pese a este hecho desembocan en él aproximadamente 75 por ciento de las aguas negras de la ciudad de Guatemala, así como aguas residuales de Industrias privadas. Además este lago ha sido por años lugar de esparcimiento para muchos guatemaltecos, y por lo tanto existe una parte de la población de Amatitlán que tiene ingresos económicos de diversas tareas que se desarrollan alrededor del lago. Parte de esta población se dedica a la pesca de peces del Lago los cuáles posteriormente comercializan para que sean de consumo humano en la población de Amatitlán(4,5).

El presente estudio pretende evaluar la presencia de Vibrio cholerae 01 y no 01 de peces del Lago de Amatitlán; y determinar si las cepas aisladas pueden o no tener los genes responsables de la síntesis de la toxina del cólera.

3. Antecedentes

3.1. Generalidades

Vibrio cholerae pertenece a la familia Vibrionaceae a la cual pertenecen también los géneros Aeromonas y Pleisomonas (6).

Las especies de Vibrio causan un número determinado de infecciones a humanos que se pueden clasificar como intestinales y extraintestinales. Se han asociado cinco especies como causantes de diarrea en humanos. Vibrio cholerae es el agente causal del cólera, que clínicamente se logra diferenciar de otras diarreas secretorias en la mayoría de casos. Vibrio paraheamolyticus es agente causal de gastroenteritis aguda por ingesta de mariscos contaminados. Otros Vibrios como: V. fluvialis, V. hollisae, V. mimicus y V. furnissi, también se han reportado como causantes de diarrea en humanos, sin embargo no desarrollando epidemias como las que causa el Vibrio cholerae (2).

3.2. V. cholerae 01

3.2.1 Historia

Se cree que la enfermedad del cólera se originó desde hace miles de años en la India, en el delta del río Ganges. Durante el siglo XIX, se reportaron varias epidemias en todo el mundo, estas oleadas pandémicas se propagaron desde el sur de Asia siguiendo las rutas de comercio, peregrinación y migración(7).

Fue en 1854, en la ciudad de Florencia, que el microbiólogo Pacini, lo observo en heces de pacientes infectados, y le dio el nombre de Vibrio cholerae.

Ese mismo año, el modo de transmisión del cólera fue descrito acertadamente por John Snow, durante la tercera pandemia, relacionó el aparecimiento de un brote epidémico en Inglaterra con la ingestión de agua contaminada de un pozo en donde según sus descripciones, se encontraba "el veneno"(8).

Años más tarde, en 1884, Koch y sus colaboradores, en sus trabajos en Egipto e India, lograron aislar al microorganismo y comprobaron su patogenicidad(9).

La primera pandemia se reportó de 1816 a 1817; después han ocurrido seis pandemias iniciando, cada una, en las siguientes fechas: 1829, 1863, 1881, 1889 y 1961(6).

En Guatemala existe información acerca de dos epidemias, una en 1837 y otra en 1857, que respectivamente formaron parte de la segunda y tercera pandemias; ambas epidemias, a pesar de las medidas tomadas (cordón sanitario y cuarentena) dejaron saldos de más de 10 mil muertos, a pesar del saldo en muertes que dejaron las mismas es afortunado el hecho de haberlas erradicado en menos de un año (8).

La última pandemia, que inició en 1961, causada por V. cholerae O1 toxigénico biotipo el Tor, se propagó rápidamente por Asia meridional, Oriente Medio y sudeste de Europa, hasta llegar a África en 1970. Hasta 1991, América estuvo a salvo de la séptima pandemia, con excepción de algunos brotes epidémicos de carácter aislado. En enero de 1991, el cólera epidémico apareció en Perú y paso rápidamente a los países colindantes de América del Sur. A fines de 1991, el cólera se había propagado a 18 países de América Latina, registrándose más de 391 000 casos y casi 3 900 defunciones(10,11,12).

La última pandemia aun permanece hasta la fecha y durante estos últimos años se han dado grandes descubrimientos sobre la epidemiología, patogénesis, estructura molecular del Vibrio cholerae (9,13).

El 23 de julio de 1991, se notifica el primer caso de cólera en Guatemala, luego de 134 años de la última epidemia, se trataba de una persona de sexo masculino residente en Tecún Uman, San Marcos. De aquí, la enfermedad se diseminó hacia todo el país siguiendo el curso de la Carretera Interamericana, hacia la capital de la República, en forma de brotes aislados. Posteriormente se dirigió hacia el Nor-Oriente generalizándose luego al resto del territorio nacional. Al finalizar 1991, los 22 departamentos de la República, notificaron un total de 2,157 casos no confirmados, 1506 confirmados y 50 defunciones (8).

El número de casos ha variado en los últimos años desde 3,664 en 1991, 30,821 casos en 1993 y 8,280 en 1995. Hasta agosto de 1996 se han reportado 1,362 casos. La tasa de incidencia por 100,000 habitantes varió desde 38.7 en 1991, 162.8 en 1992, 307.3 en 1993, 1164 en 1994 y 77.59 en 1995. La letalidad

fue de 1.4 por ciento en 1991 y 1992, de 1.18 en 1995 y de 0.9 por ciento hasta agosto de 1996. De acuerdo al perfil epidemiológico del cólera en Guatemala, se puede observar que su incremento tiene relación con la precipitación de las lluvias, y eventos que permiten el consumo de alimentos en mayor cantidad. En los años pasados de la epidemia se observa que entre los meses de mayo y junio se ha presentado el mayor número de casos (1).

3.2.2 Patogénesis y Manifestaciones Clínicas

El primer paso en la patogenia del cólera es la ingestión de los microorganismos viables y en cantidad suficiente para que atraviesen la barrera del pH del jugo gástrico. Una vez salvado el primer obstáculo y gracias a sus flagelos polares, se movilizan rápidamente y atraviesa el espeso moco intestinal al que fluidifican con mucinas y proteasas, la quimiotaxis y ciertos factores de adherencia les permiten colonizar las células del epitelio del intestino delgado. Aquí los vibriones se multiplican favorecidos por el pH. alcalino y el contenido rico en bilis(6,8,14).

Durante su crecimiento exponencial los vibriones excretan una exotoxina. 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 Gm1 en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Después de la unión, se separan la subunidad A1 y el componente A2, lo cual facilita la entrada del componente A1 en la célula. El componente A1 estimula la producción de la enzima adenilciclase, 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 electrolitos 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. Las heces se presentan bastante acuosas, blanquecinas y pueden contener moco, asumiendo el aspecto de agua de arroz; además están prácticamente privadas de proteínas. Después de la pérdida de agua y de electrolitos, el paciente se encuentra rápidamente deshidratado, luego se produce una acidosis metabólica e

hipopotasemia, que pueden provocar Shock hipovolémico y un consiguiente colapso cardiocirculatorio (15).

Sin embargo, aproximadamente el 75 por ciento o más de las infecciones iniciales por V. cholerae O1 biotipo el Tor son asintomáticas, lo cual depende de la dosis infectante. Del 25 por ciento de personas con infecciones sintomáticas, la mayoría padece una infección leve. Aproximadamente 5 por ciento de los pacientes presentan un cuadro clínico moderado que requiere atención médica pero no hospitalización. En tan solo un 2 por ciento de los pacientes la afección progresa a "cólera gravis" potencialmente mortal. En general la enfermedad grave se relaciona con exposición a dosis elevadas, baja acidez gástrica y poseer grupo sanguíneo "O" factor "Rh positivo" (7).

3.2.3 Epidemiología y Distribución

En el apareamiento de la enfermedad entran en juego los factores condicionantes de un hospedero susceptible, en este caso el hombre, un agente infectivo, y un ambiente de inadecuado saneamiento, determinado por la situación socioeconómica del lugar (8).

El cólera puede afectar a todos los grupos de edad, cuando éste afecta por primera vez a una población. Sin embargo en poblaciones donde existen tasas elevadas de la forma endémica de la enfermedad, la mayoría de los adultos han adquirido cierto grado de inmunidad natural (7)

Las fases primarias o desencadenantes de una epidemia se dan en su mayoría por ingesta de mariscos o comidas altamente contaminadas; mientras las etapas tardías en una epidemia se dan por contaminación del medio ambiente y sus habitantes, así como portadores asintomáticos (16).

El factor esencial para la transmisión y propagación del cólera son las malas condiciones de saneamiento ambiental, en especial la disposición inadecuada de excretas y la falta de suficiente agua para atender las necesidades individuales (8,17).

Los alimentos constituyen otro importante medio de transmisión del cólera. V. cholerae sobrevive mejor en agua que en los alimentos, dependiendo del pH, temperatura, grado de contaminación, materia orgánica presente, presión osmótica, humedad, sal y contenido de carbohidratos, y presencia de otras bacterias (2).

En el agua de mar, puede permanecer de 10 a 13 días a temperatura ambiente, y hasta 60 días en refrigeración. El organismo sobrevive mejor en el agua de mar que en los alimentos de mar, y en lugares se han reportado prevalencias en aguas estuarias hasta por más de 16 años. La viabilidad de V. cholerae El Tor en agua embotellada es entre 1 y 19 días(2,18). En un estudio microbiológico, de las aguas del río Ganges en Varanasi, en 407 muestras de agua, se aislaron: Vibrio cholerae O1 (1.72 por ciento), Vibrio cholerae no O1(3.69 por ciento), Vibrio fluvialis (0.74 por ciento), Aeromonas sp (0.49 por ciento), Pleisomonas sp (0.25 por ciento), de éste y otros estudios han evidenciado que la familia Vibrionaceae es endémica en ambientes acuáticos (19).

Varios trabajos de investigación han determinado que bacterias del género Vibrio, se encuentran en lugares con agua fresca, aguas marinas y estuarias, así como en la flora y fauna de las mismas. El cólera se ha asociado siempre por ser periódico en algunas épocas del año cuando las algas florecen en diversas costas. Se han identificado por medio de técnicas con anticuerpos fluorescentes, formas viables pero no cultivables de Vibrio cholerae, en una amplia gama de vida marina, incluyendo cianobacterias, diatomeas, copépodos, y en aguas frescas se ha asociado a plantas acuáticas como jacintos entre otras. En condiciones no favorables V. cholerae asume formas latentes; al tener de nuevo éste un medio con nutrientes, pH y temperatura apropiados, éste se revierte a estados infecciosos y transmisibles. V. cholerae se ha aislado de phyto- y zooplankton en aguas marinas alrededor del mundo. Existe la hipótesis que las algas y las poblaciones de Vibrio crecen exponencialmente a la vez; favorecidas por los procesos de eutrificación. Los procesos de eutrificación se ven a la vez acelerados por la presencia de nitratos y fosfatos presentes en aguas negras y aguas residuales con fertilizantes. Se cree que a haber una sobrepoblación de algas contaminadas con especies de Vibrio, éstas son consumidas por peces, moluscos y crustáceos, los cuales sirven como vectores de una posible cepa toxigénica (20,21).

El V. cholerae ha estado asociado con el consumo de numerosos tipos de productos del mar, incluyendo a los crustáceos (camarón, cangrejo, langosta), mariscos (ostras, almejas, mejillón, molusco bivalvo) y pescado, incluyendo pescado seco procesado (2).

El pescado de las profundidades marinas es poco probable que sea infectado, pero puede ser contaminado durante su manipuleo. La microbiota del pez vivo depende de los microorganismos que existen en las aguas donde vive. En los peces de zonas templadas, predominan las bacterias psicrófilas, entre las cuales son más frecuentes las Gram negativo, por ejemplo, Pseudomonas, Vibrio, Achromobacter, Flavobacterium, Cytophaga, Corynebacterium, Alteromonas, Moraxella y Acinetobacter (22).

El congelamiento de los alimentos no implica necesariamente la destrucción de los vibriones. El Vibrio puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en estado de congelamiento. Teóricamente estos alimentos, poseen un riesgo para la transmisión de la enfermedad, en casos de ser ingeridos crudos o se permita su contagio con otros alimentos contaminados.

En pescados, moluscos y crustáceos la supervivencia de V. cholerae es de dos a cinco días a temperatura ambiente y de siete a catorce días en refrigeración (2,23).

América latina produjo en 1991, 16 millones de toneladas de pescado, conquistando una importante presencia en el mercado mundial de productos pesqueros. La calidad de los productos latinoamericanos es excelente, lo que se debe a las buenas condiciones de las plantas exportadoras y a un entendimiento positivo entre importadores y exportadores. Sin embargo, en el consumo interno de cada país, los servicios oficiales de inspección son prácticamente inexistentes y se consideran como una interferencia en la producción o como una imposición policial. Así mismo, en el consumo interno hay problemas de contaminación de productos e históricamente la inspección carece de tradición. Las condiciones del producto pesquero están directamente relacionadas con la calidad del medio acuático de los peces y mariscos (24).

Con relación al hecho de que los vibriones prácticamente desaparecen del ambiente en los periodos interepidémicos, se discute acerca de la probabilidad de que el reservorio más importante sea algún nicho ecológico que albergue vibriones ino cuos que luego presentan cambios genéticos que los conviertan en patógenos y de esa forma inicien los nuevos ciclos epidémicos (8).

3.3. Vibrio cholerae no 01

Antes de 1992, todas las bacterias del género Vibrio cholerae no pertenecientes al serogrupo 01 se habían, denominado distintos del 01 o Vibrios no aglutinables; y solamente se habían relacionado con infecciones intestinales esporádicas, oportunistas y limitadas, así como en infecciones extraintestinales extremadamente raras. Algunos de los serogrupos involucrados que se han conocido podemos mencionar el 05, 011 y 034, sin embargo ninguno tiene valor epidemiológico. En el año de 1992, surge una nueva cepa de Vibrio cholerae que se le denominó 0139 o Bengal.

La epidemia dio inicio en 1992, en el sur de Bangladesh, se esparció por toda al ciudad y a finales de marzo de 1993 se habían reportado 107,297 casos de diarrea y 1,473 defunciones (7,6,25,26,27).

3.3.1. Importancia, Epidemiología y Distribución de V. cholerae 0139.

Como ya se mencionó, la epidemia causada por Vibrio cholerae 0139 comenzó en Bangladesh, la India. Sin embargo, por lo menos 11 países del continente asiático ya han sido afectados por la epidemia. En 1994, ya se habían reportado 3 casos confirmados de cólera causado por la cepa 0139 en los Estados Unidos de América(11).

Al surgir la nueva cepa no correspondía a ninguno de los 138 serogrupos ya existentes por lo que se le denominó 0139 y se le propuso el nombre de Bengal, a la cual se le confirió potencial para ocasionar y dar inicio la octava pandemia (26).

En el lugar donde dio inicio la epidemia, o sea Bangladesh, la cepa de Vibrio cholerae 01 es endémica y causa por lo menos dos brotes epidémicos al año, desde el inicio de la nueva epidemia, la cepa 0139 desplazó a la 01 en un 95 por ciento de todos los aislamientos en un lapso de 1 año; afectando a la población adulta y con características epidemiológicas indistinguibles de las de la cepa 01.

Sin embargo, en otro estudio, hecho en Tailandia, que fue el segundo país que afectó la epidemia, la cepa 0139 no desplazó a la cepa 01, permaneciendo la frecuencia en igual proporción a la de la cepa 01; además la población más afectada por la nueva cepa, fue la infantil.

De lo anterior, se creen que estas diferencias se deben a variables como ambiente, inmunidad de la población y sanidad entre la población de la India y Tailandia. Sin embargo, los medios de transmisión de la enfermedad por la cepa 0139 son prácticamente iguales a los de la cepa 01: consumo de agua no tratada, mariscos y pescados crudos o mal cocinados y comida contaminada (7,28).

En cuanto a las características clínicas, parámetros hematológicos y características de la diarrea son prácticamente las mismas (29).

En cuanto al aislamiento e identificación, es el mismo aunque sus características biológicas son: producción de grandes cantidades de toxina del cólera, hemaglutinación, propiedades hemolíticas débiles, resistencia a la Polimixina B y resistencia a los fagos específicos del biotipo El Tor, de ahí que se ha determinado una similitud entre Vibrio cholerae 0139 y Vibrio cholerae el Tor (30).

3.4. Aislamiento e identificación de Vibrio cholerae en alimentos.

Las bacterias del género Vibrio poseen una forma curva, en su longitud son cortas, son bacilos gram negativo, móviles en medios líquidos por medio de un sólo flagelo polar de longitud bastante larga. En medios sólidos se ha observado que las bacterias de este género producen flagelos laterales de longitud corta. No forman esporas, sin embargo, algunas especies han producido estadios viables, pero no cultivables, por lo que se cree que forma intermediarios o formas latentes. Son anaerobios facultativos y tienen metabolismo, tanto fermentativo como aeróbico. Con excepción de muy pocas especies fermentan la glucosa a ácido sin formación de gas y son oxidasa positivo. El porcentaje mol. de Guanina más Citosina (G+C) de su DNA está en el rango de 39 por ciento al 51 por ciento (9).

La mayoría de especies son tolerantes a condiciones alcalinas, creciendo a pH de 8.6 y hasta extremos de pH 11 en algunos casos. En contraste son bastante lábiles a pH por debajo de 5.0. La mayoría de especies de importancia clínica son tolerantes a las sales biliares, telurito, tiosulfato y citrato, los que se utilizan como

ingredientes en medios de aislamiento. Los requerimientos nutricionales son bastante simples y son producto de su metabolismo un gran rango de enzimas extracelulares, que incluyen proteasas, nucleasas, lipasas y quitinasas. Algunas especies son capaces de crecer extremadamente rápido con tiempos de replicación de 10 a 15 minutos bajo condiciones óptimas (9).

3.4.1 Aislamiento

A continuación se detallará todos los procedimientos para el aislamiento de Vibrio cholerae de alimentos.

Las muestras de alimentos y agua sospechosos de estar contaminados deben ser recolectadas y refrigeradas (a 4-10 °C, no congelar), y ser procesadas lo antes posible. Las muestras procedentes de aguas marinas y de estuarios pueden contener muchas de otras especies de Vibrio que crecen de la misma manera que Vibrio cholerae en el agua peptonada alcalina y en el agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (TCBS). En alimentos sólidos o carnes se prepara una dilución 1:10 . Se pesan 25 gramos del alimento, se adicionan a 225 ml de agua peptonada alcalina al recipiente y se tritura por completo y se ajusta finalmente al volumen final de 225 ml. Seguidamente se incuba por 6 a 8 horas a 35 °C- 36. El período de enriquecimiento es crítico y no debe pasar de 8 horas; el crecimiento competitivo de otros organismos puede enmascarar a Vibrio cholerae. En muestras muy contaminadas las muestras se pueden diluir en décuplos hasta 10^{-3} , para reducir el número de microorganismos competidores. Se pueden hacer diluciones de 10^{-6} , si se desea hacer el recuento. 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. 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 a 35 - 37 °C (7,31).

El agar TCBS es de color verde cuando se prepara. El crecimiento durante 18 a 24 horas de V. cholerae produce colonias grandes (2-4 mm de diámetro), ligeramente planas y amarillas con centros opacos y periferias traslúcidas (6,7,31).

El color amarillo se debe a la fermentación de la sucrosa en el medio. Los microorganismos que no fermentan sucrosa, como por ejemplo Vibrio parahaemolyticus, producen colonias grandes).

3.4.1 Identificación

a. Medios sin sal.

La mayoría de Vibrios 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 (32).

b. Hemólisis en placa.

Se utiliza Agar Sangre de Carnero al 5-10 por ciento, el cual debe estriarse de manera de aislar colonias individuales. Las placas se incuban no más de 18 a 20 horas a 35-37°C, ya que la incubación por más de 24 horas afecta las reacciones de hemólisis. La hemólisis se debe determinar alrededor de las colonias aisladas, no en las áreas de crecimiento confluyente donde los subproductos metabólicos no relacionados con la hemolisina pueden hacer que los glóbulos rojos se lisen. Las colonias hemolíticas tienen zonas claras alrededor de ellas, donde los glóbulos rojos han sido totalmente lisados (hemólisis verdadera "beta") (7,32).

c. Pruebas Bioquímicas

Si el agar TCBS utilizado, no fue lo suficientemente selectivo para inhibir competidores como Aeromonas, Pseudomonas y Enterobacteriaceae y si dichos competidores son abundantes en el ambiente muestreado; es necesario practicar pruebas bioquímicas antes de utilizar antisueros contra Vibrio cholerae O1. Las pruebas comprobadas como útiles para excluir microorganismos diferentes de Vibrio cholerae son: la arginina, lisina, hilo mucoide, oxidasa y agar hierro de Kigler (KIA) o agar hierro de azúcar triple (TSI).

A continuación se detallarán las pruebas más útiles en su identificación:

I. La prueba de oxidasa se realiza a partir de un crecimiento fresco de cualquier medio que no contenga azúcar. No debe utilizarse el crecimiento del agar de TCBS. Se colocarán de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa sobre un pedazo de papel filtro en una caja de Petri. El cultivo se extenderá sobre el papel húmedo con un asa de platino o palillo de madera, o un palillo de dientes. Una reacción positiva hace que el crecimiento bacteriano adquiera un color púrpura oscuro en 10 segundos. Los controles positivos y negativos se deben probar al mismo tiempo. Los microorganismos de los géneros Vibrio, Neisseria, Campylobacter, Aeromonas, Pleisomonas, Pseudomonas y Alcaligenes son oxidasa positivo; todas las enterobacterias son oxidasa negativo (7,31,32).

II. Prueba de cordón o hilo mucoso se realiza a partir de un cultivo de 18 a 24 horas del microorganismo sospechoso en un medio no inhibitorio. Se suspende una asada del crecimiento en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5 por ciento sobre un porta objetos. Si la prueba es positiva, las células bacterianas serán lisadas por el desoxicolato de sodio, la suspensión perderá turbidez y se liberará DNA de las células lisadas, haciendo que la mezcla se vuelva mucoso. Un cordón mucoso se forma cuando se levanta lentamente el asa bacteriológica de la suspensión. La mayoría de los vibrios son positivos, mientras que las especies de Aeromonas generalmente son negativas (7).

III. Agares Hierro de Kligler y agar de tres azúcares y hierro (TSI). Son medios selectivos que contienen carbohidratos y que se utilizan ampliamente, aunque son de uso similar, ambos medios varían en los carbohidratos que contienen. Las reacciones de V. cholerae en KIA son similares a las de los enteropatógenos no fermentadores de lactosa (K/A, sin gas y sin H₂S). El TSI contiene sucrosa, que es fermentada dando reacciones de A/A, sin gas y sin H₂S. La fermentación de la sucrosa diferencia V. cholerae de V. mimicus. Los tubos de medio inclinado de TSI, se inoculan picando el fondo y sembrando estrias en la superficie del medio. Los tubos de medio inclinado se deben incubar aeróbicamente (con el tapón flojo) a 35-36 °C y examinar después de 18 - 24 horas (6). El patrón de descarboxilación de aminoácidos también es útil en la identificación de V. cholerae. Las reacciones de

Arginina negativo, Lisina positivo y Ornifina positivo diferencian a la especie de otras bacterias oxidasa positivo del género *Aeromonas* y *Pleisomonas* (6,7).

d. Pruebas Serológicas

La clasificación serológica de V. cholerae se basa en las características del antígeno somático ("O") el cuál está constituido por una proteína termolábil y otra termoestable, y varios polisacáridos(31).

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 01) se habían asociado con la producción de toxina antes de 1993, cuando surgió una cepa no 01 productora de toxina(7).

Se sabe que las cepas de V. cholerae 01 contienen tres componentes antigénicos discernibles, los cuales se denominan por las letras A, B y C. El A es el antígeno específico 01 común. Los aislamientos que carecen del antígeno A pertenecen a serogrupos diferentes de 01. En el serogrupo 01 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 (7).

Las cepas sospechosas aisladas se deben someter a la prueba de aglutinación en portaobjetos con antisuero polivalente de Vibrio 01. Las cepas aisladas que aglutinen con el antisuero polivalente para V. cholerae 01 deben ser sometidas a aglutinación con antisueros monovalentes Ogawa e Inaba y analizarse para la producción de toxina del cólera(8).

3.5. Detección de la Toxina del cólera.

El valor de la prueba para determinación de producción de la toxina del cólera varía según las características epidemiológicas del cólera en un país o comunidad determinada. Se sugiere que en circunstancias de endemicidad, con incidencia baja del cólera, o al principio de un brote, la mayor parte de las cepas de V. cholerae 01 aisladas de heces diarreicas deben someterse a prueba para la detección de la toxina. Debido a que las cepas de V. cholerae 01 no toxigénico se encuentran ocasionalmente en muestras ambientales (en particular en aguas de mares y de los estuarios), todos los aislamientos de Vibrio cholerae obtenidos de alimentos o del ambiente se someterán a prueba para determinar la producción de toxina del cólera después de confirmar la identificación(7,33).

Existen varias formas de determinar la producción de la toxina de las cuales podemos mencionara: (a) Biovaloraciones con animales experimentales y con cultivos celulares,(b) Inmunovaloraciones con técnicas de Inmunoensayos enzimáticos (ELISA), Coagulación y Aglutinación con látex y (c) Análisis basados en el DNA. Las técnicas más sensibles son las basadas en pruebas moleculares que identifican a los microorganismos patógenos con base en las secuencias específicas de DNA. Las secuencias específicas de DNA en el gen o en los genes que codifican la toxina del cólera se han usado como sondas para detectar secuencias de DNA homologas en aislamientos de V. cholerae toxigénico. Esta técnica se mejora aún más con el empleo de la reacción en cadena de la Polimerasa en inglés (PCR). En la PCR se utiliza la enzima DNA polimerasa para sintetizar o amplificar copias múltiples de una secuencia específica de DNA, la cual puede entonces detectarse en una gel de agarosa o con sondas de DNA. El blanco de la PCR es un gen de virulencia o una secuencia de DNA exclusivo de un microorganismo patógeno.

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 presentan 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 biolina y desoxigenina , ha eliminado los problemas técnicos asociados con los radioisótopos. Mientras 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.(7,33,34)

3.6. El Lago de Amatitlán

2.6.1 Situación geográfica, Flora y Fauna.

La parte del lago de Amatitlán forma parte de una cuenca. Una cuenca está formada por un río o un lago y sus afluentes, que son ríos más pequeños que allí terminan. La cuenca del Lago de Amatitlán es una subcuenca del río Marialinda o sea una parte de la cuenca del mencionado río y se ubica dentro de las coordenadas $14^{\circ}23'25''$ y $14^{\circ}40'25''$ latitudes norte y $90^{\circ}27'15''$ longitud oeste del meridiano de Greenwich y comprende una extensión de 381.31 Km^2 . Los límites de la subcuenca son los siguientes: al norte divisoria continental de aguas (Calzada Roosevelt y Boulevard Liberación, siguiendo los Arcos en la ciudad de Guatemala) y la cuenca del río Motagua de la vertiente del Océano Atlántico; al oeste con la cuenca del río Achiguate; al este con la cuenca del río Los Esclavos; al Sur con el río Michaloya y parte media del río Marialinda, que constituye una de las cuencas de la vertiente del Pacífico.

La altitud varía entre 1,200 y 2,500 metros sobre el nivel del mar (msnm), en 80 por ciento del territorio y abajo de 1,300 metros msnm en el restante del territorio.

La parte alta de la subcuenca del Lago de Amatitlán es escarpada con mesetas planas; la parte media es de escarpada a ondulada y la parte baja es de ondulada a plana.

El promedio de lluvias en el año 1995 fue de 1,500 milímetros (mm) y la humedad relativa del aire fluctúa entre 75 por ciento y 80 por ciento, en cuanto que el promedio de temperatura está alrededor de los 20 °C.

La dirección predominante del viento es de Noreste en un 90 por ciento y del sudeste en 10 por ciento con velocidad de 20 a 30 Km/h, hacia el sur, en dirección del Cañón de Palín, pasando sobre el lago(35,36).

La transparencia del agua está entre 1.75 a 2.75 metros. Los sólidos totales varían entre 1,000 y 1,400 mg/lit. El pH. Varía entre 6.1 y 7.9. La presencia de cloruros fluctúa entre 100 y 180 mg/lit; el nitrógeno entre 62mg/lit (628mg/lit. El fósforo entre 44 y 62 mg/lit, la demanda bioquímica de oxígeno es de 1 a 9 mg/lit. El promedio anual de clorofila es de 1,075 g/m³(35).

La fauna característica la constituyen la Cichlasoma nigrafasciatum (guapote), Tilapia mossambica (tilapia) y la carpa o mojarra(5,35)

3.6.2. Contaminación del Lago de Amatitlán.

Los lagos como todo lo natural, tiene etapas de desarrollo o envejecimiento. En el estudio de los lagos se pueden dividir, de acuerdo a factores biológicos y químicos en oligotróficos ("jóvenes"), mesotróficos y eutróficos. Los lagos eutróficos se caracterizan por su enorme producción biológica, crecimiento de algas y grandes poblaciones de peces. El proceso de eutrificación es de característica lenta, pero este proceso se ve sumamente acelerado por la contaminación, producto de poblaciones y actividades humanas. De ahí que estudio limnológicos del lago determinan un tiempo de vida de no más de 20 años para el lago, si no se frena la contaminación (4,5,37).

La cuenca posee gran cantidad de suelos con susceptibilidad a la erosión, lo que tiene que ver con la utilidad agrícola de las tierras a su alrededor. Por ejemplo el río Villa Lobos arrastra un promedio de 500,000 toneladas de sedimentos hacia el lago, lo cual hace que pierda un promedio al año de 0.70 centímetros de su profundidad total.

Los principales municipios que conforman su alrededor son: Guatemala, Mixco, Villa Nueva, San Miguel Petapa, Villa Canales, Amatitlán y Santa Catarina Pinula, y de las 24 plantas de tratamiento de aguas negras existentes no funciona ninguna.

Dentro de la cuenca viven actualmente 1,100 millones de habitantes y para el año 2,010 habrán 2,220 millones, con una tasa de crecimiento del 7 por ciento anual.

La población que vive dentro de la cuenca genera 775mts³/seg. Que para el año 2,010 generarán un total de 22 millones de mts cúbicos al año.

Además el 67por ciento de las industrias del país están ubicadas dentro de la cuenca del lago y aproximadamente el 10por ciento posee sistemas de tratamiento de aguas servidas industriales. La composición de los desechos industriales(existiendo 700 industrias en la cuenca) en su mayoría son tóxicos, como: cromo, plomo, zinc, aceites colorantes, etc. que finalmente se depositan en el Lago.

Se localizan 27 beneficios de café de los cuales ninguno cuenta con sistemas de tratamiento de aguas mieles en forma apropiada , cada beneficio de café contamina el equivalente a 7,000 HB.

Actualmente se están desarrollando alrededor 20 proyectos habitacionales , con un incremento de aproximadamente 15,000 nuevas viviendas (37).

Se han localizado 7 tipos de fitoplanctón que son indicadoras de contaminación y ha disminuido la flora nativa a consecuencia de aquello.

La cantidad de coliformes fecales encontrada en la desembocadura del río Villalobos, la falta de saneamiento ambiental en el área de la cuenca determina que que la población a su alrededor, el 10 por ciento presenta cuadros de enfermedades infecto-contagiosas ; en el hospital de Amatitlán se registró que para 1995, el 80 por ciento del presupuesto es empleado en medicina curativa predominando las enfermedades antes mencionadas(35).

Hasta la fecha no se había investigado la presencia de Vibrio cholerae en los pescados del lago por lo que no hay datos antecedentes sobre el tema.

4. Justificación

El lago de Amatitlán es considerado como una de las áreas ecológicas más contaminadas en nuestro país. Es por ello que el gobierno de Guatemala decidió instituir La Autoridad para el rescate y resguardo del Lago de Amatitlán, creada con el fin de planificar, coordinar y ejecutar las acciones del sector público y privado que sean necesarias, para preservar el Lago de Amatitlán; ya que ésta está integrada por instituciones con la facultad de aplicar las leyes y colaborar en resolver los problemas de contaminación del Lago. Ellos son Gobernador departamental de Guatemala, quien la preside; la Procuraduría del Medio Ambiente del Ministerio Público; CONAMA; Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, La Municipalidad de Guatemala por medio de EMPAGUA; así como también la Municipalidad de Amatitlán, El Comandante de la Región Militar Guatemala-Sur, los Clubes Rotarios de Guatemala, El Comité del Lago y recientemente Universidad de San Carlos de Guatemala, a través de una carta de entendimiento suscrita por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia(38).

Este trabajo de tesis evaluó la presencia de Vibrio cholerae toxigénico en los pescados el Lago de Amatitlán, lo que da a conocer la calidad microbiológica de los mismos, así como la calidad de saneamiento del medio acuático de dónde fueron extraídos.

Con los resultados obtenidos se podrán tomar medidas que orienten a las autoridades y población en general, para la preservación del lago y el aprovechamiento del mismo como fuente de pesca. Así mismo se pudo determinar la importancia del aislamiento de cepas de Vibrio cholerae no 01 de los peces del lago, ya que se determinó de éstas cepas, la característica epidemiológica más importante, que es la producción de la toxina responsable de la enfermedad.

5. Objetivos

- 5.1 Determinar la contaminación con Vibrio cholerae en peces del Lago de Amatitlán.
- 5.2 Identificar por medio de pruebas bioquímicas y serológicas las especies del género Vibrio aisladas en peces del Lago de Amatitlán.
- 5.3 Identificar cepas de Vibrio cholerae 01 y no 01 productoras de la toxina del cólera por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

PROGRAMA DE LA ESCUELA DE LA INVESTIGACION
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INVESTIGACION EN LA ZONA DE LA INVESTIGACION

6. Hipótesis

Los peces del lago de Amatillán poseen dentro de su microbiota intestinal Vibrio cholerae toxigénico.

7. Materiales y Métodos

7.1 Universo:

Peces del Lago de Amatitlán obtenidos por los pescadores de la localidad en cinco diferentes puntos geográficos del lago, para después ser vendidos para consumo humano. La muestra se realizará por estratos, tomando 5 estratos (cada estrato es un punto geográfico) y cada uno consistirá en 20 unidades de análisis, para hacer un total de muestra de 100 peces. (**ANEXO 1**).

7.2 Materiales

7.2.1 Cristalería

Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.

Probeta de 100 y 500 ml.

Pipetas volumétricas de 1 ml

Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml

Varillas de vidrio

Tubos de ensayo de 150 X 13 mm con tapón de rosca

Porta objetos de vidrio de 75 X 25 mm

Cajas de Petri descartables de 15 X 100 mm

7.2.3 Reactivos y medios de Cultivo

Desoxicolato de sodio al 0.5 por ciento

Reactivo de Oxidasa (N,N,N tetrametil-p-fenilendiamina dihidrocloruro al 0.5-1por ciento)

Agua destilada

Agua estéril

Antisuero polivalente anti V. cholerae 01 marca INCAP

Agar TCBS(sales biliares-citrato- tiosulfato-sucrosa) marca BBL

Agar Mueller Hinton marca BBL

Cloruro de sodio grado analítico marca Merck

Hidróxido de sodio 1N

Peptona

Sonda marcada con desoxigenina

Hidróxido de sodio 10 N.

Tris 1 M, ph. 8.0

NaCl 5 M

Dodecilsulfato de sodio al 20por ciento

SSC 20X: 175,3 g 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 1por ciento (Boehringer Mannheim), N-laurilsarcosina al 0.1por ciento, SDS al 0.02 por ciento.

Amortiguador A: Tris 100 mM, pH 7.5 NaCl 150 mM

Amortiguador C: Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM

Leche descremada en polvo

Conjugado de fragmento Fab de antidesoxigenina/fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim)

Azul de tetrazolio (NBT): 75 mg/ml en agua

5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato toluidino (BCIP) : 175 ug/ml en agua

7.2.4

Aparatos de Laboratorio

Incubadora a 36 °C

Autoclave

Balanza semianalítica

Mechero bunsen o Incinerador

Digestor o Stomacher

Horno de Secado

Agitador de Plataforma

Aparato de sellado mediante calor

Baño de María a 65 °C con agitación

Medidor de pH de electrodos

7.2.5

Otros

Guantes descartables

INSTITUTO DE LA UNIÓN DE REPÚBLICAS SOCIALISTAS
BIBLIOTECA

7.2.5**Otros**

Guantes descartables

Hielo seco

Hielera para transporte de muestras

Palillos de madera

Papel filtro

Espátulas

Papel adsorbente

Masking tape y cinta testigo

Filtros de nailon circulares de 8 cm de diámetro

Papel de cromatografía Whatman 3MM

Bolsas de Plástico sellables con calor

Bolsas de Plástico para 5 libras

Jabón desinfectante para cristalería

Hipoclorito de sodio para desinfección.

7.3 Procedimiento**7.3.1 Toma de Muestra**

Se procedió a recolectar el pescado obtenido por pescadores de diferentes áreas del lago, teniendo el cuidado que el pescado fuera del área donde se encontrara al pescador. Se tomaron 5 puntos del lago para toma de muestras:

estos puntos geográficos coincidieron con los lugares de muestreo, de los investigadores de la Autoridad para el manejo Sustentable de la Cuenca y del Lago de Amatillán, para su ilustración se anexó al documento un mapa con los puntos ahí señalados (**Ver Anexo 1**)

El pescado tuvo la menor manipulación, por parte de los pescadores. Se introdujo en bolsas estériles, y se transportó al laboratorio en una hielera entre 4 °C y 10 °C; se anotó la fecha, hora y el lugar geográfico del lago de donde el pescado fue extraído.

7.3.2 Aislamiento e Identificación

Cada pescado fue pesado en su totalidad. Seguidamente, se cortaron pedazos del pescado (incluyendo intestinos) que pesaron 25 gramos y se le agregó

250 ml. de agua peptonada alcalina (APA) pH. 8.8-9.0 y se procesó en un digestor Stomacher o en una licuadora, para su homogenización.

De los 250 ml de homogenizado 1: 10, se prepararon diluciones, 1:100 y 1:1000; las cuales se incubaron a 37 °C de 6 a 8 horas. De cada dilución se procedió a tomar aproximadamente 0.1 ml, y se inoculó 1 caja de Petri con el medio de agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS).

Para inocular cada caja de TCBS se utilizó la técnica de rayado y se incubaron a 37°C de 24 a 48 horas. De esta manera se evaluó semi-cuantitativamente la presencia de Vibrio cholerae.

Se procedió a identificar en el medio de TCBS, a aquellas colonias grandes, ligeramente aplanadas, amarillas con el centro opaco y la periferia traslúcida. Las colonias características se sembraron en agar Mueller Hinton y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Al crecimiento en el medio no inhibitorio se le realizó las pruebas de oxidasa, prueba de cordón y finalmente la prueba serológica con el antisuero polivalente anti - Vibrio cholerae O1 proporcionado por el INCAP.

La identificación bioquímica se realizó por medio de los medios de TSI y KIA.

Finalmente se procedió a realizar la prueba de la hibridación de colonias para la detección de los genes de la toxina del cólera.

7.3.3 Preparación de Improntas de colonias para hibridación usando sondas marcadas con desoxigenina.

1. Se tomó las colonias aisladas con un palillo estéril, usando una rejilla numerada para organizar las colonias sobre placas de agar Luria (Agar LB) muy secas. Se anotaron el número de cada cultivo antes de picar cada colonia. Siempre se incluyó un control positivo y un negativo.
2. Se incubó la caja inoculada a 37 °C durante 4 a 6 horas.
3. Se marco en un filtro de nylon de 8 cm con una flecha, para orientar la posición de las colonias, se identificó apropiadamente con un lápiz. Este filtro se colocó (con el lado rotulado hacia abajo) sobre el plato de LB. Se removió cualquier burbuja cuidadosamente.
4. Se incubó la caja durante una noche a temperatura ambiente o a 37 °C.

6. El filtro de nylon, se removió, de la caja de LB, con unas pinzas. Luego se colocó la membrana cara hacia arriba (el lado de las colonias) en el papel saturado con NaOH. Las colonias se lisaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, sin movimiento.
7. Oras dos hojas de papel cromatográfico 3 MM, se saturaron, con Tris 1.0 M , pH. 8.0.
8. Los filtros de nylon, se removieron, del papel saturado con NaOH . Seguidamente se colocaron cara hacia arriba sobre el papel saturado con Tris. La neutralización se llevó a cabo durante 10 minutos.
9. Seguidamente se saturaron otras dos hojas de papel cromatográfico 3 MM con Tris 1.0M, pH. 8.0, NaCl 1.5M.
10. Se removió el filtro de nylon del papel saturado con Tris 1M, y se colocó el filtro cara hacia arriba sobre el papel saturado con Tris-NaCl . Se dejó reposar por 10 minutos.
11. Se desaguó brevemente en 2X SSC.
12. El filtro, se dejó secar al aire entre papel 3MM a temperatura ambiente o a 37°C. El filtro se horneó durante 0.5 a 2horas. El filtro estaba ahora listo para su hibridación. Pudo almacenarse en cajas de petri plásticas, en bolsas plásticas, en papel de aluminio o de otra forma conveniente hasta que se procesara (39,40).

7.3.4. Hibridación de Improntas de colonias usando sondas no radioactivas

- 1.El filtro, se introdujo, en una bolsa sellable, y se le agregó 10 ml. De solución de pre-hibridación.
2. Las burbujas de aire, se eliminaron, rodando una pipeta a lo largo y secando las burbujas por arriba. Se tuvo especial cuidado de no perder el líquido junto con las burbujas.
3. La bolsa, se selló con calor.
4. El filtro, se incubó en la bolsa a 65°C durante una hora en baño de María con agitación.
5. Las sondas, se prepararon 15 a 20 minutos antes de finalizar la prehibridación. La cantidad deseada de sonda, se diluyó a un volumen total de 100 ul en un tubo

de microcentrifuga; se utilizaron de 2-5 μ l de sonda, dependiendo de la concentración de la misma.

6. La sonda se colocó en un baño de María hirviendo durante 10 minutos.
7. Se enfrió en hielo por unos minutos. Seguidamente se centrifugó durante unos segundos en la microcentrifuga y se mantuvo la muestra en hielo.
8. Se removió el filtro de baño de María, seguidamente se cortó una esquina de la bolsa y se removió con una pipeta la solución de prehibridación.
9. A la bolsa se le agregó 2.5ml de solución de prehibridación y la cantidad apropiada de sonda.
10. Se removieron las burbujas de aire como en el paso número 2. Se selló la esquina de la bolsa. La bolsa se selló lo más cercano posible al filtro, sin mascarlo, para maximizar la exposición de las muestras a la sonda.
11. El filtro, se hibridizó durante la noche a 65 °C en un baño de María con agitación.

Al día siguiente:

1. Se preparó la solución de lavado (500 ml/sonda) y se pre-calentó a 65°C usando un horno de microondas .
2. El filtro se removió de la bolsa plástica y se colocó en una bandeja de vidrio.
3. Se agregaron 100 ml de solución de lavado a la bandeja de vidrio y se desaguó brevemente el filtro. La solución de lavado, se descartó después de usada.
4. Se agregaron 200 ml de solución de lavado a la bandeja de vidrio y se lavaron el filtro a 65 °C en un baño con agitación durante 15 minutos.
5. El paso numero 4, se repitió otra vez.
6. El filtro se procedió directamente a desarrollar (39,40).

7.3.5 Detección usando sondas marcadas con desoxigenina

1. El filtro, se desaguó, en una caja de Petri conteniendo 40 ml de buffer Tris-NaCl, pH 7.5 sobre un agitador, durante un minuto. El filtro se removió del buffer, permitiendo que el exceso de solución se eliminara durante algunos segundos.
2. El filtro se colocó en una caja de Petri conteniendo 40 ml de buffer y leche descremada al 5 por ciento en un agitador por una hora.

3. Se descartó el sobrenadante y se le agregó 10 ml de buffer más leche descremada al 5 por ciento a la caja con el filtro. Seguidamente se le agregaron 3 ul de conjugado anti-desoxigenina a la solución, mezclando bien por rotación la caja.
4. Permitir que el filtro se exponga al conjugado durante 30 minutos con agitación. Remover el filtro de la solución, permitiendo que el exceso de solución gotee por unos cuantos segundos.
5. El filtro se lavó en una caja de Petri conteniendo 40 ml de buffer en un agitador, durante 15 minutos. Se descartó la solución de lavado, permitiendo que el exceso goteara por unos segundos.
6. Se repitió el paso número 5 una vez más.
7. El filtro, se desaguó en una caja de Petri conteniendo 40 ml de buffer Tris-NaCl-MgCl₂ pH 9.5 en el agitador durante dos minutos. Se removió el filtro del buffer, permitiendo que el exceso goteara durante unos segundos.
8. El filtro se colocó en una caja de Petri conteniendo 10 ml de buffer utilizado en el paso anterior. A la solución se le agregaron 45 ul de NBT (75 mg/ml) y 35 ul de BCIP, mezclando por rotación.
9. La caja de Petri, se selló con Parafilm.
10. La caja de Petri, se colocó en un lugar oscuro(una gaveta que no se abra por unas horas, que se requieren para el desarrollo completo).

Interpretación de los resultados

Los aislamientos positivos para *ctx A* aparecieron como manchas o parches de un color entre morado oscuro y café sobre los filtros de nailon. Los aislamientos y los festigos negativos se observan como parches débilmente teñidos (39,40).

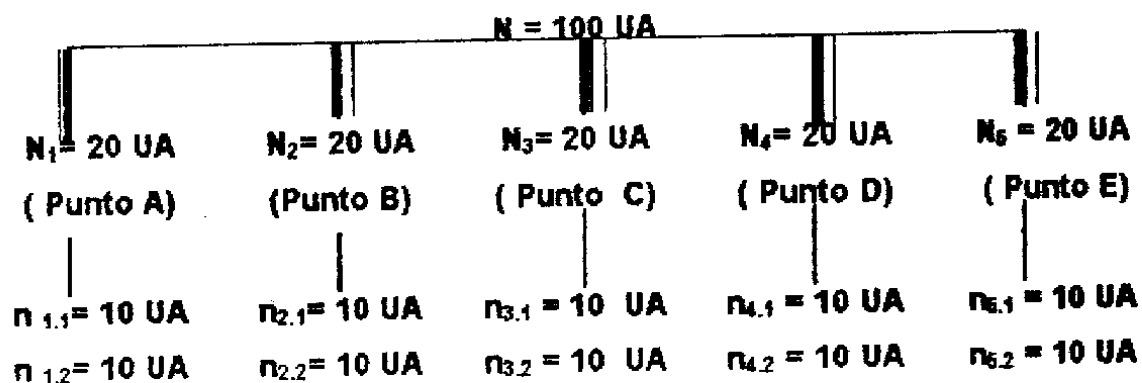
7.4. Diseño de Investigación

El diseño de investigación, fue un estudio descriptivo, donde la variable a investigar es la presencia de Vibrio cholerae productor de toxina.

7.4.1. Diseño de muestreo:

Para el muestreo se utilizó un diseño estratificado, en donde el Universo estuvo constituido por los peces del Lago de Amatitlán y se dividió en estratos constituidos por 5 puntos (A : Parte centro este, B: Punto del Relleno ,C: Parte Centro Oeste, D: Desembocadura del Río Villalobos, E: Desembocadura del Río Michatoya.). A partir de cada estrato se tomaron dos muestras constituidas por 10 pescados, para un total de 100 unidades de análisis (UA).

7.4.2. Análisis de datos



Dónde:

N: Universo, totalidad de peces del Lago de Amatitlán

N₁: Estrato Punto A

N₄: Estrato Punto D

N₂: Estrato Punto B

N₅: Estrato Punto E

N₃: Estrato Punto C

A partir de los resultados obtenidos se determinó la proporción de Vibrio cholerae 01 para cada estrato.

8. Resultados

8.1 Muestreo y Análisis Bacteriológico

En el presente estudio se analizaron pescados del Lago de Amatitlán; se determinó la presencia o no de V. cholerae 01, según cinco puntos de muestreo. Asimismo, a las bacterias del género V. cholerae no 01 se les determinó si eran toxigénicas o no.

De los resultados obtenidos, se calculó el porcentaje de pescados, que mostraron recuperación bacteriana, para V. cholerae, su cuantificación en tres diluciones (1:10, 1:100, 1:1000), así como la toxicidad de las cepas aisladas.

La obtención de los pescados se realizó directamente con pescadores que se encontraban pescando en los puntos escogidos. Los pescados recolectados pertenecían a las especies Cichlasoma nigrofasciatum (guapote) y del género Tilapia spp. Los peces en su mayoría se encontraban aún vivos a la hora de introducirlos a una bolsa plástica, para su posterior transporte refrigerado al laboratorio. El promedio del peso de los peces de acuerdo al punto de muestreo fue el siguiente:

TABLA No 1. Promedio del peso de los pescados según el punto de muestreo.

Punto de Muestreo (20 peces por Punto)	Promedio de peso en gramos (20 peces por Punto)
Punto E Desembocadura Río Michatoya	99.8 gr.
Punto C Parte Centro Oeste (Silla del Niño)	120.3 gr..
Punto D Desembocadura Río Villalobos	65.92 gr.
Punto B Punto del Relleno (Estrechamiento)	76.94 gr.
Punto A Parte Centro Este	82.26

De los cien peces todos mostraron crecimiento bacteriano en el agua peptonada alcalina (APA). Para todas las pruebas se utilizó una cepa control de Vibrio cholerae 01 y una cepa de E. coli, proporcionadas por el LAMIR.

Al evaluar los crecimientos bacterianos en el APA, en las tres diferentes diluciones, se observó que el 22 por ciento de los peces mostraron crecimiento en la dilución 1:10, 39 por ciento en la dilución 1:100 y 39 por ciento en la dilución 1:1000.

Al inocular el medio selectivo de tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS), el 82 por ciento mostró colonias amarillas típicas del género Vibrio. El restante 18 por ciento, mostró crecimientos profusos de colonias diversas.

A las colonias amarillas típicas del agar TCBS, se les procedió a aislar en el medio Mueller Hinton. Ya aisladas se les procedió hacer la prueba de Oxidasa, dando el 100 por ciento de las 82 cepas, la prueba positiva. Seguidamente se les realizó la prueba de cordón con desoxicolato de sodio, dando también el 100 por ciento de las 82 cepas la prueba positiva. Seguidamente se procedió a inocular los medios para la identificación bioquímica: TSI y LIA. Los resultados para las 82 cepas fueron exactamente los mismos: TSI; A/A, sin gas, sin H₂S y para el LIA; K/A, sin gas y sin H₂S.

Finalmente a las 82 cepas, se les realizó a la prueba de aglutinación en portaobjetos con el antisuero polivalente para Vibrio cholerae 01. De la totalidad de las 82 cepas, ninguna demostró aglutinación.

Los resultados de acuerdo a cada punto de muestreo se pueden observar en el ANEXO No.2

Según los estratos de muestreo se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla No.2

Número de Unidades de análisis (UA) con aislamiento positivo para V. cholerae no 01 (porcentaje según cada estrato)

	Punto A	Punto B	Punto C	Punto D	Punto E
No. de UA con <u>V. cholerae</u> no 01 (porcentaje de 20UA)	11 (55 %)	19 (95%)	20 (100%)	18 (90%)	14 (70%)

El punto E, que se encuentra en la desembocadura del Río Michatoya (también nombrado La Playa), mostró un 70 por ciento de crecimiento para Vibrio cholerae no 01 y 30 por ciento para otras bacterias. Semicuantitativamente todos los pescados mostraron crecimientos en una dilución 1:10 y 50 por ciento en una dilución mayor de 1:1000.

El punto C, denominado parte centro oeste o silla del niño, los peces mostraron un 100 por ciento de crecimiento para V. cholerae no 01 y 0 por ciento para otras bacterias. Todos los pescados de éste punto mostraron crecimientos arriba de la dilución 1:10 y 30 por ciento en una dilución mayor a 1:1000.

Para el punto D, denominado, desembocadura del Río Villalobos, las muestras, demostraron un crecimiento bacteriano del 90 por ciento para V. cholerae no 01 y un 10 por ciento de crecimiento para otras bacterias. Todos las muestras de éste punto mostraron crecimientos arriba de la dilución 1:10 y 75 por ciento en una dilución mayor a 1:1000.

En el punto B, denominado punto del relleno o estrechamiento del lago, los 20 pescados tomados como muestra, mostraron un 95 por ciento de crecimiento para V. cholerae no 01 y 5 por ciento de crecimiento para otras bacterias. También la muestra en su totalidad, mostró crecimientos arriba de la dilución 1:10 y un 35 por ciento en una dilución arriba de 1:1000.

El punto A, denominado también parte centro este se observó que el 55 por ciento de los pescados mostró un crecimiento para V. cholerae no 01, mientras el 45 por ciento fue positivo para otras bacterias. Los crecimientos bacterianos de los veinte pescados, fué positivo en la primera dilución 1:10 y únicamente el 5 por ciento tuvo un crecimiento mayor de 1:1000.

8.2 Detección de la Toxina del cólera

Las 82 cepas correspondientes a V. cholerae no 01, fueron sometidas, a la detección del gen *ctxA* (gen productor de la toxina del cólera), por medio de hibridación con sondas de DNA marcadas con desoxigenina, sobre blots de las colonias aisladas. Como resultado se obtuvo que, ninguna de las 82 cepas tenían dentro de su genoma el gen *ctxA*, por lo tanto ninguna de las cepas eran toxigénicas.

9. Discusión de Resultados

Como se mencionó, anteriormente, las condiciones del producto pesquero, están directamente relacionadas, con la calidad del medio acuático de los peces y mariscos. De ahí, que los resultados obtenidos pueden indicar las condiciones favorables para el desarrollo de V. cholerae, en las especies Cichlasoma y Tilapia recolectadas en los cinco puntos geográficos del Lago de Amatitlán. Así mismo, se pudo determinar la capacidad toxigénica de las cepas del género Vibrio aisladas.

De acuerdo al peso en gramos y su promedio de la totalidad de los pescados recolectados en los cinco puntos geográficos del Lago, su orden decreciente fue el siguiente: Punto C (Silla del Niño), Punto E (Desembocadura Río Michatoya o Playa), Punto A (Parte Centro Este), Punto B (Estrechamiento) y finalmente Punto D (Desembocadura Río Villalobos). De lo anterior, cabe destacar que el lugar con mayor afluencia de pescadores es el Punto D (Desembocadura Río Villalobos), el muestreados, oscilando desde un 100 por ciento hasta un 55 por ciento, y 82 pescados de los 100 recolectados tuvieron un crecimiento positivo para cuál a la vez fue donde se recolectó los pescados más pequeños; ello se puede deber al agotamiento constante de la pesca de este lugar.

El aislamiento del género Vibrio, fue muy alto en todos los puntos Vibrio cholerae no 01. Ninguna de las especies de Tilapia o Cichlasoma tuvo un aislamiento positivo para Vibrio cholerae 01.

Los restantes 18 pescados, mostraron crecimientos de bacterias sucrosa negativo, oxidasa negativo, pudieron haberse tratado de colonias de enterobacterias, la cuales no fueron plenamente identificadas. Esto confirma que el Lago de Amatitlán posee características para el desarrollo del género Vibrio, dentro de su flora y fauna acuática. Lo cual indica que el Lago de Amatitlán, puede ser un reservorio especial para cepas patógenas emergentes como el Vibrio cholerae 0139.

De acuerdo a los puntos de muestreo, los pescados más contaminados con Vibrio cholerae no 01 se aislaron en el Punto C (Silla del Niño), seguido en orden decreciente por los puntos: B (Estrechamiento), D (Desembocadura Río Villalobos), E (Desembocadura Río Michatoya) y A (Parte Centro Este). Se puede observar que los tres puntos más contaminados con esta bacteria (Puntos C, B y D), se

encuentran contiguos al mayor afluente de aguas negras del Lago que es, la desembocadura del Río Villalobos.

Al evaluar semi-cuantitativamente el crecimiento bacteriano total, en Agua Peptonada Alcalina, todos los pescados mostraron crecimiento arriba de la dilución 1:10. Los puntos con pescados con mayor contaminación, o sea que crecieron en la dilución mayor (1:1000), tuvieron mayor proporción en el Punto D (Villalobos), seguido en orden decreciente por el Punto E (La Playa o Desembocadura del Río Michatoya), Punto B (Estrechamiento), Punto C (Silla del Niño) y por último el Punto A (Parte Centro Este). Estos resultados confirman que el área más contaminada del Lago se encuentra en la desembocadura del Río Villalobos. Es también importante destacar que el segundo punto con mayor presencia de conteos bacterianos totales fue en el Punto E, correspondiente a la Playa, lugar que se ve contaminado con desechos orgánicos e inorgánicos de la población de Amatillán y visitantes que llegan a la Playa.

Así mismo, todas las cepas de Vibrio se les determinó la presencia del gen ctxA, gen que contiene la información genética para la producción de la toxina del cólera epidémico. Esta ensayo se realizó en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) y no se obtuvo ninguna cepa positiva para éste hallazgo. Se puede decir que las especies de Cichlasoma y Tilapia utilizadas en este estudio, no poseen cepas de Vibrio tóxicas, sin embargo, los conteos bacterianos y las condiciones del medio acuático , no son ideales para flora y fauna para consumo humano.

10. Conclusiones

10.1 El porcentaje de Vibrio cholerae 01 toxigénico aislado de especies del género Tilapia y Cichlasoma pescadas en el Lago de Amatitlán, fue del cero por ciento.

10.2 El punto de muestreo o estrato del Lago de Amatitlán más contaminado con Vibrio cholerae no 01 lo constituyó el punto C llamado también silla del niño.

10.3 El punto de muestreo con mayores conteos bacterianos totales fue el punto D o desembocadura del Río Villalobos

10.4 Todas las cepas de Vibrio cholerae no 01, aisladas de los peces del Lago de Amatitlán, no poseen el gen ctxA, por lo tanto son cepas no toxigénicas.

11. Recomendaciones

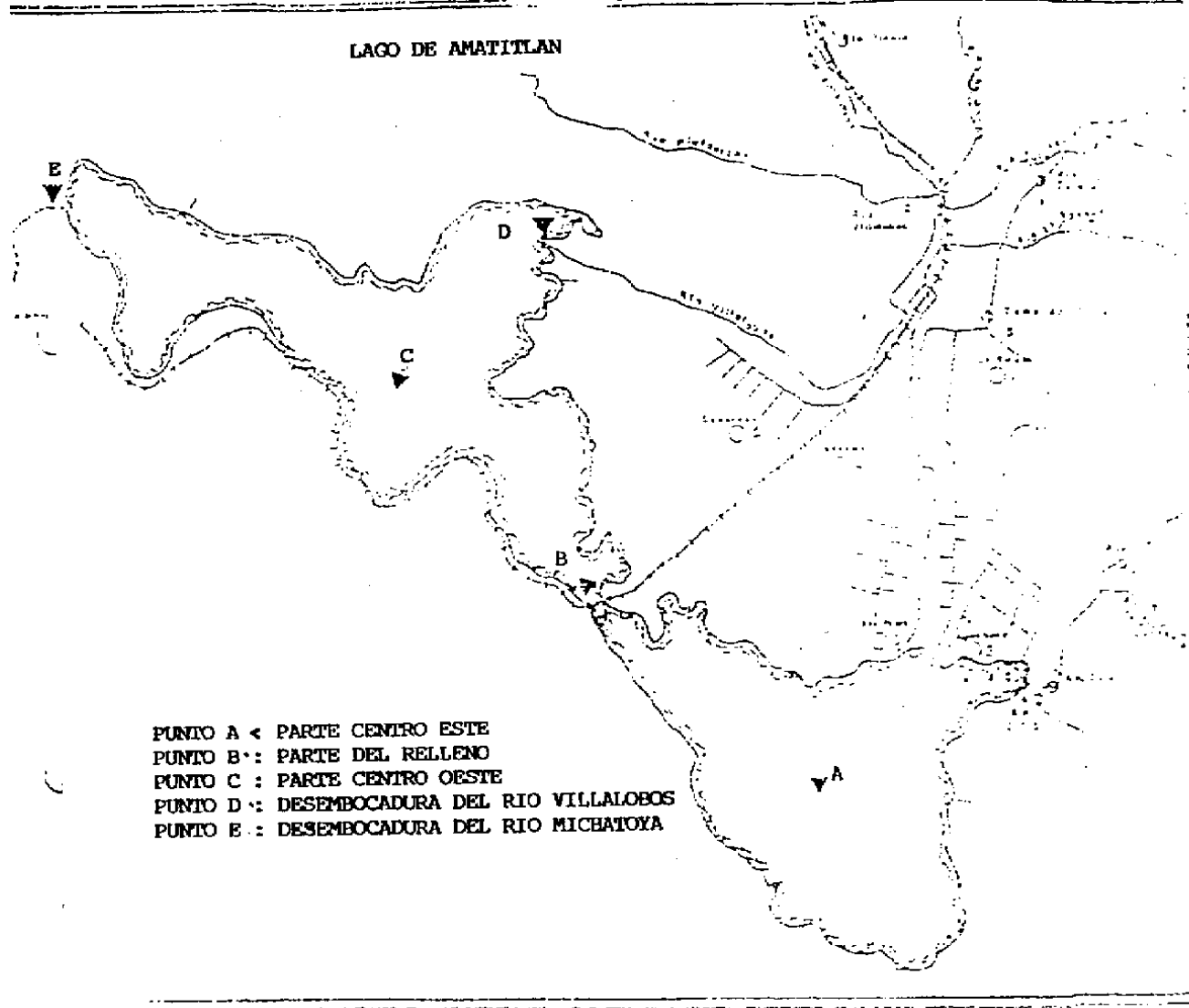
11.1 Realizar este estudio utilizando jaulas fijas en los puntos de muestreo para que se asegure que los peces se encuentran exactamente en los puntos de muestreo realizados.

11.2 Realizar la identificación completa de las especies de Vibrio cholerae no O1 aisladas, por ejemplo utilizando varios antisueros, para saber que serotipos son los predominantes en las especies que se pescan en el Lago de Amatitlán.

11.3 Educar a los pescadores y población de Amatitlán, para que tenga especiales cuidados al comercializar y consumir los pescados del Lago, con el objeto de que se desinfecten plenamente y evitar al máximo enfermedades diarreicas.

11.4 Implementar y mantener un programa de vigilancia epidemiológica del cólera, en los mercados y ventas de comida, donde los pescadores venden sus productos y garantizar la calidad microbiológica, de los pescados.

ANEXO No.1



PROPIEDAD DE LA

BIOLOGIA

ANEXO 2

No.	Lugar	Peso en grs	Ultima Dil Pos.	V. cholerae no 01	V. cholerae 01	Otros	Reac. de PCR
1	Punto E	90	1:10	X			NEG
2	Punto E	105	1:100			X	
3	Punto E	190	1:100			X	
4	Punto E	110	1:100			X	
5	Punto E	98	1:100			X	
6	Punto E	105	1:10	X			NEG
7	Punto E	78	1:100	X			NEG
8	Punto E	110	1:1000	X			NEG
9	Punto E	110	1:1000	X			NEG
10	Punto E	105	1:1000	X			NEG
11	Punto E	100	1:1000	X			NEG
12	Punto E	80	1:1000	X			NEG
13	Punto E	140	1:10	X			NEG
14	Punto E	75	1:100	X			NEG
15	Punto E	70	1:10	X			NEG
16	Punto E	64	1:1000			X	
17	Punto E	93	1:1000			X	
18	Punto E	90	1:1000	X			NEG
19	Punto E	88	1:1000	X			NEG
20	Punto E	95	1:1000	X			NEG
21	Punto C	87	1:100	X			NEG
22	Punto C	57	1:10	X			NEG
23	Punto C	88	1:100	X			NEG
24	Punto C	53	1:100	X			NEG
25	Punto C	115	1:1000	X			NEG
26	Punto C	62	1:1000	X			NEG
27	Punto C	180	1:10	X			NEG
28	Punto C	203	1:100	X			NEG
29	Punto C	154	1:1000	X			NEG
30	Punto C	136	1:1000	X			NEG
31	Punto C	159	1:100	X			NEG
32	Punto C	120	1:100	X			NEG
33	Punto C	141	1:100	X			NEG
34	Punto C	140	1:100	X			NEG
35	Punto C	193	1:1000	X			NEG

ANEXO 2

36	Punto C	190	1:100	X			NEG
37	Punto C	91	1:1000	X			NEG
38	Punto C	86	1:100	X			NEG
39	Punto C	60	1:10	X			NEG
40	Punto C	91	1:100	X			NEG
41	Punto D	80.4	1:1000	X			NEG
42	Punto D	77.3	1:1000	X			NEG
43	Punto D	68.9	1:1000	X			NEG
44	Punto D	78.3	1:1000	X			NEG
45	Punto D	110	1:1000	X			NEG
46	Punto D	64.3	1:1000	X			NEG
47	Punto D	44.3	1:100	X			NEG
48	Punto D	67.9	1:1000	X			NEG
49	Punto D	55.1	1:1000			X	
50	Punto D	53	1:100	X			NEG
51	Punto D	39.7	1:1000	X			NEG
52	Punto D	57.7	1:1000	X			NEG
53	Punto D	44.2	1:100	X			NEG
54	Punto D	37.1	1:1000	X			NEG
55	Punto D	52.9	1:1000	X			NEG
56	Punto D	57.6	1:100	X			NEG
57	Punto D	91.4	1:1000	X			NEG
58	Punto D	86.6	1:1000			X	
59	Punto D	60	1:100	X			NEG
60	Punto D	91.8	1:1000	X			NEG
61	Punto B	101	1:100	X			NEG
62	Punto B	76	1:1000	X			NEG
63	Punto B	74	1:100	X			NEG
64	Punto B	65	1:1000	X			NEG
65	Punto B	85	1:1000			X	
66	Punto B	79	1:100	X			NEG
67	Punto B	69	1:100	X			NEG
68	Punto B	90	1:100	X			NEG
69	Punto B	65	1:100	X			NEG
70	Punto B	72	1:100	X			NEG
71	Punto B	57.8	1:100	X			NEG
72	Punto B	90	1:1000	X			NEG

REPUBLICA DE LA GUAYANA FRANCESA
 MINISTERIO DE LA ECONOMIA Y FINANZAS
 DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICA

10. BIBLIOGRAFIA

1)Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Dirección General de Servicios de Salud . División de Vigilancia y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico Nacional. 1997; 15: 62p.

2)Programa de Salud Pública Veterinaria de la OPS / OMS . Riesgos de Transmisión del Cólera por alimentos. Washington D.C., Estados Unidos de América. 1991. 12p.

3)Programa de Salud Pública Veterinaria, Organización Panamericana de la Salud. Inocuidad y comercialización de alimentos frente a la epidemia del cólera en las Américas . Buenos Aires: OPS, OMS, ONU. Doc. Tec. 1992. 36p.

4)Duarte Monroy, G. Amatitlán Y YO. Comité del Lago de Amatitlán. Inventario 1988 . Guatemala 1988. Doc. Tec. 79p.

5)Cordón, LR. Breve resumen de la Situación actual del Lago de Amatitlán y Sugerencias para su mejoramiento. Guatemala, 1992 . Doc. Tec. 10p.

6)Lennette, E, et al. Manual of clinical Microbiology . 4ta edición. Washington D.C. , USA, 1985. 1149 p.

7)Centro para el control y prevención de enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas, Organización Panamericana de la Salud. Manual de Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae* . Washington, D.C, Estados Unidos de América, 1994. 148 p.

8)Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Dirección General de Servicios de Salud. Manual de normas y procedimientos para la vigilancia y control del cólera; versión actualizada. Guatemala : INCAP, OPS / OMS. Doc. Tec. 1992. 49p.

- 9) Lee JV. Vibrio cholerae; The species and the characteristic of the strains causing epidemic cholera. PHLS Microbiol Dig. 1992; 9 (1): 14-17.
- 10) CDC. Cholera-Perú, 1991. MMWR 1991; 40(6):108-110.
- 11) CDC. Update: *Vibrio cholerae* 01 - Western Hemisphere, 1991-1994, and *V. cholerae* 0139-Asia 1994. MMWR 1995; 44(11): 215-219.
- 12) CDC. Importation of Cholera from Perú. MMWR 1991; 40(15): 258-259.
- 13) CDC. Surveillance for Cholera- Cochabamba Department, Bolivia; January-June 1992. MMWR 1993; 42(33): 636-637.
- 14) Sincharoenkul R. et al. Localization of *Vibrio cholerae* in the intestinal tissue. Asian-Pac-J- Allergy-Immunol. 1993; 11(2): 155-65.
- 15) Nicoletti G, Nicolosi VW. Diccionario de bacteriología humana. Barcelona: Doyma, 1989. 295p.
- 16) St Louis ME. et al. Epidemic cholera in West Africa; the role of food handling and high risk foods. Amer. J. Epidemiol. 1990; 131 (4) : 719-725.
- 17) CDC. Cholera- New Jersey and Florida. MMWR 1991; 40(17): 287-289.
- 18) Onishenko GG. et al. Cholera in Ukraine and Moldova during the 7th. Pandemic. Zh. Mikrobiol- Epidemiol-immunobiol. 1993; (2):52-7.
- 19) De-A; Sen P C; Tewari IC. Enteropathogenic bacteria in River Ganges in Varanasi. Indian-J-Pathol-microbiol. 1993; 36(4): 425-32.

20) Epstein PR. Algal blooms in the spread and persistence of cholera. *Biosystems*. 1993; 31(2-3): 209-21.

21) Islam S. Aziz KMS. Association of Vibrios with some hydrophytic plants. Short Communication. International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, India; 1982. 2p.

22) Rivera N, ME. Eliminación de Vibrio cholerae 01, Biotipo El Tor, Serotipo Inaba, del Filete de Tiburón contaminado in vitro usando Zumo de Limón. Guatemala : Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1993. 66p.

23) CDC. Cholera Associated with Imported Frozen Coconut Milk, Maryland 1991. *MMWR* 1991; 40(49): 844-845.

24) Material Informativo sobre el Cólera. Dirigido a personal Multidisciplinario de Salud, San Salvador, El salvador: OPS, OMS, ONU. Doc. Tec. 1991. 140p.

25) Shelton CH. Martino RL. Ramsey KM. Recurrent no-01 Vibrio cholerae bacteremia in a Patient with multiple myeloma. *Cancer*. 1993; 72(1) : 105-7.

26) Cholera Working Group, International Centre for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by Vibrio cholerae 0139 synonym Bengal. *Lancet* 1993; 342(8868): 387-390.

27) Ramamurthy T. et al. Virulence patterns of Vibrio cholerae non 01 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J Med Microbiol*. 1993; 39(4): 310-7.

28) Hoge Ch W. *et al* . Epidemiologic Study of Vibrio cholerae 01 and 0139 in Thailand: At the Advancing Edge of the Eighth Pandemic. Am J Epid. 1996; 143 (3): 263-8.

29) Bhattacharya SK. *et al* . Clinical profile of acute diarrhoea cases infected with the new epidemic strain of Vibrio cholerae 0139: designation of the disease as cholerae. J. Infect. 1993; 27(1):11-5.

30) Higa N. *et al* . Characterization of Vibrio cholerae 0139 synonym Bengal Isolated from patients with cholera like disease in Bangladesh. Microbiol Immunol. 1993; 37(12): 971-4.

31) Torres MF. *et al* . Etiología y diagnóstico de laboratorio del cólera. OPS. Guatemala, 1991. 22p.

32) Gini, G A. Manual de Procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica. 2 da edición. Guatemala 1995. 140 p.

33) Fields PI. *et al* Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic Vibrio cholerae 01 strains from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol. 1992; 30(8): 2118-2121.

34) Olsvik O, *et al* . Use of automated sequencing of polymerase chain reaction generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in Vibrio cholerae 01 strains. J Clin Microbiol. 1993; 31(1): 22-25.

35) Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca y del Lago de Amatitlán, A.M.S.A.. ¿Se Salvará el Lago de Amatitlán?. Guatemala, 1997. 10p
Autoridad para el manejo Sustentable de la cuenca y del Lago de Amatitlán. A.M.S.A. Cuenca del Lago de Amatitlán: Caracterización, Físico Biótica. Guatemala, 1997 Doc. Tec. Vol1.13p.

36)Tejeda, Luis .Características de la Subcuenca del Río María Linda. Cuenca del Lago de Amatitlán. Autoridad para el manejo sustentable de la cuenca y del Lago de Amatitlán. Doc tec. 1995.10p.

37) Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca y del Lago de Amatitlán, A.M.S.A.. ¿Se Salvará el Lago de Amatitlán?. Guatemala, 1997. 10p

38)Comité del lago de Amatitlán. Reporte Anual de Labores 1995. Guatemala. Doc.Tec. 1995. 6p.

39)Boehringer Mannheim Biochemichals. The Genius System User s guide for filter hybridization version 2.0 USA,1992; 49-52.

40)Sanbrook J, Fritsch E. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2 nd. Edition. Cold spring Harbor Lab. Press. 1989. USA.1190;1.104.

PROFESOR DE LA UNIVERSIDAD DON CARLOS DE GUATEMALA



Francisco Javier De León Quiróz

Tesista



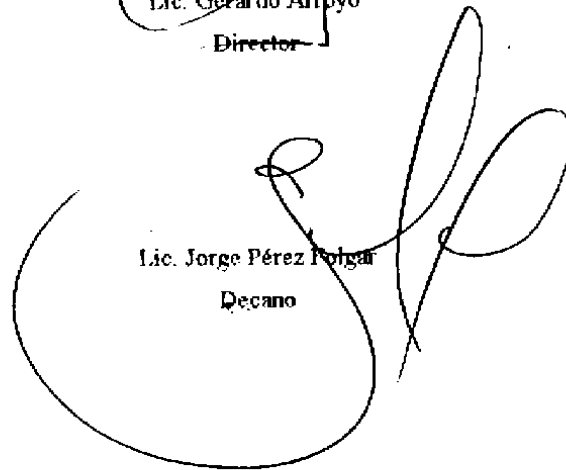
Lic Karin Herrera

Asesora



Lic. Gerardo Arroyo

Director



Lic. Jorge Pérez Polgar

Decano