

***Vibrio cholerae* No O1 EN MUESTRAS DE AGUAS NO CLORADAS CONSUMIDAS POR POBLADORES DE LAS LOCALIDADES DE SANTA Y COISHCO (ANCASH), 2003 - 2004**

Ana García P¹, Leoncio Pedreros R¹, Blanca Huapaya²

RESUMEN

Objetivo: Identificar la presencia de *Vibrio cholerae* en muestras de agua no cloradas para consumo humano en las localidades de Santa y Coishco. **Materiales y métodos:** Entre julio de 2003 a junio de 2004 se tomaron muestras de agua, en forma semanal, provenientes de siete pozos con bomba manuable y de seis pozos con reservorio. A cada muestra de agua se le midió *in situ* el cloro residual mediante un comparador de cloro *Hatch*, método colorimétrico, usando para ello las pastillas DPD 1. En las muestras con cloro <0,05mg/L se realizó el cultivo según los manuales de procedimientos del Instituto Nacional de Salud (INS, Lima). Las cepas aisladas se enviaron al INS para confirmación diagnóstica y pruebas serológicas. **Resultados:** Se incluyeron 308 muestras de agua para consumo humano en ambos distritos (201 de pozos con bomba manuable y 107 con reservorio). Se realizó el aislamiento en 70(22,7%) muestras: *Aeromonas caviae* 34(11,0%), *Aeromonas hydrophyla* 17(5,5%) y *Vibrio cholerae* No O1 19(6,2%), no se encontró *V. cholerae* del serotipo O139. El *Vibrio cholerae* No O1 se aisló en 11(5,5%) muestras de pozos con bomba manuable y en 8(7,4%) pozos con reservorio, respectivamente. **Conclusión:** El agua de consumo humano proveniente de pozos tubulares representa un reservorio potencial para bacterias como *Aeromonas* y *Vibrio cholerae*, resaltando la necesidad de realizar la desinfección correspondiente de ésta antes de su consumo.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* no-O1; *Aeromonas*; Aguas subterráneas; Consumo de agua (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: Identify the presence of *Vibrio cholerae* in unchlorinated water samples intended for human consumption in locations of Santa and Coishco. **Materials and methods:** Between July 2003 and June 2004, water samples were collected weekly from seven water wells with manual pumps and from six wells with reservoir. Residual chlorine levels were measured at the site using a *Hatch* chlorine comparing tool, chlorimetric method, using DPD 1 pills. Well samples were cultured according to National Institute of Health (INS Lima) standard operating procedures. Isolated strains were submitted to the INS for diagnostic confirmation and serologic testing. **Results:** A total of 308 drinking water samples from both districts were included (201 from wells with manual pumps and 107 with reservoir). Isolates were obtained from 70(22,7%) samples. *Aeromonas caviae* 34(11,0%), *Aeromonas hydrophyla* 17(5,5%) and *Vibrio cholerae* non-O1 19(6,2%) were detected; *V. cholerae* O139 was not found. *Vibrio cholerae* non-O1 was isolated in 11(5,5%) samples from manual pump wells and 8(7,4%) from wells with reservoirs. **Conclusions:** Drinking water from tubular wells represents a potential reservoir for bacteria, such as *Aeromonas* and *Vibrio cholerae*, highlighting the need for disinfection before use.

Keys word: *Vibrio cholerae* non-O1; *Aeromonas*; Groundwaters; Water consumption (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

En 1991 el cólera golpeó a Latinoamérica luego de aproximadamente 100 años de ausencia^{1,2}. Esta enfermedad se dispersó tan rápidamente en el Perú que, según los resultados de coprocultivos confirmados en 1995, los casos de diarrea acuosa fueron ocasionados en 52,7% por *Vibrio cholerae* serovar Ogawa^{3,4}.

El *V. cholerae* se clasifica en dos serogrupos O1 y No O1, dentro del serogrupo O1 existen tres serotipos (Ogawa, Inaba e Hikojima) y dos biotipos (Clásico y El Tor), en el grupo No O1 se han identificado hasta 154 variedades antigénicas, algunas de ellas responsables también de casos de cólera, como el serotipo O139^{5,6,7}.

¹ Hospital de Apoyo La Caleta. Dirección Regional de Salud Ancash. Chimbote, Perú.

² Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Esta investigación contó con el apoyo técnico - financiero del proyecto "Enfrentado las amenazas de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes" Vigía (MINSa / USAID) en el marco del IV Concurso para Proyectos de Investigación en Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes – año 2003.

A través de los años se ha logrado un mejor control de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en nuestro país, las tasas de morbi-mortalidad han ido disminuyendo y el grado de saneamiento ambiental ha ido mejorando, reduciendo los reportes de aislamientos de *V. cholerae*⁷.

Sin embargo, en ciertas zonas del país la situación es diferente, tal es el caso de la jurisdicción de la Unidad Territorial de Salud (UTES) La Caleta, ubicada en Chimbote, Ancash, ciudad de la costa del Perú, donde la frecuencia de casos de EDA durante los años 2001 y 2002 fue alta: 18112 y 17951 casos, respectivamente. Además, según los coprocultivos realizados en dicha UTES, desde el año 1999 el *Vibrio cholerae* No O1 fue identificado como otro agente causal de EDA (datos estadísticos obtenidos en el Área de Microbiología del Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital La Caleta Chimbote).

Por otro lado, pese a la promoción del consumo de agua segura por parte del sector salud, hasta el año 2003 el Laboratorio de Microbiología de dicha UTES ha reportado muestras de agua no cloradas con un alto número de coliformes totales, las cuales en su mayoría provienen de los distritos Santa y Coishco. En estos distritos algunas localidades se proveen de agua para consumo humano a través de pozos tubulares, que son abastecidos por las aguas subterráneas que contienen cierto grado de salinidad, necesaria para el crecimiento de algunas especies de *Vibrio cholerae*⁶.

Un tipo de pozos tubulares son los construidos artesanalmente, provistos de una bomba manual para extraer el agua subterránea desde aproximadamente 11 metros de profundidad, no requieren personal dedicado, pero no permiten la cloración del agua (pozo con bomba manual). Otro tipo son los pozos subterráneos provistos de motores con capacidad de extraer agua a unos 50 metros de profundidad y poseen reservorios ubicados a una altura aproximada de 10 a 15 metros, y requieren personal dedicado para su mantenimiento y cloración del agua (pozo con reservorio).

Dentro de las actividades para el control de la diarrea y el cólera, el Laboratorio de Microbiología y la Unidad de Saneamiento Ambiental de la UTES La Caleta realizan en forma conjunta el control del agua de consumo humano directo en casas y reservorios, midiendo la presencia de cloro residual y realizando cultivos bacteriológicos para la detección de coliformes fecales y totales, restringiendo la búsqueda de *Vibrio cholerae* sólo a las aguas del mar, donde se encuentra mayoritariamente⁸.

Por lo expuesto, a fin de contribuir al planteamiento de estrategias donde las comunidades participen en

el control de sus servicios como la cloración de agua, decidimos investigar la presencia de *Vibrio cholerae* en muestras de agua no cloradas para consumo humano en las localidades de Santa y Coishco

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio descriptivo prospectivo, realizado en localidades de los distritos de Santa y Coishco, de la provincia de Santa, departamento de Ancash, en la costa central del Perú (Figura 1); durante un periodo de 12 meses, de julio de 2003 a junio de 2004. Los distritos tienen una población de 32 234 habitantes, y en sus respectivos centros de salud acuden un promedio de 700 pacientes con síntomas diarreicos al año.

Para la muestra del estudio, se seleccionaron arbitrariamente los pozos de las localidades que según estudios bacteriológicos realizados por la Dirección Ejecutiva de Saneamiento Ambiental tenían agua contaminada con mayor frecuencia, escogiendo para el seguimiento seis pozos tubulares de cada tipo. En cada pozo tubular se tomó una muestra de agua con las respectivas condiciones de esterilidad, en forma semanal, durante un año. A cada muestra de agua se le midió *in situ* el cloro residual mediante un comparador de cloro *Hatch*, método colorimétrico, usando para ello las pastillas DPD 1 (Dietil Parafenileno Diamino). Aquellas muestras de agua con valores de $\geq 0,05$ mg/L de cloro residual fueron excluidas (según el reglamento de la Ley General de Aguas Ley N.º 17752).



Figura 1. Ubicación de la provincia de Santa (distrito de Coishco y Santa), departamento de Ancash, Perú.

Cuando el cloro residual era $<0,05\text{mg/L}$, se tomó una segunda muestra de agua para ser llevada al Laboratorio de Saneamiento Ambiental de la UTES La Caleta donde se realizó el respectivo análisis bacteriológico, además de medir el pH y la temperatura de la muestra. El método de aislamiento consistió en filtrar 100 mL de muestra con el equipo de filtración Millipore, mediante una membrana de acetato de celulosa de $0,22\ \mu$ de porosidad, seguido de incubación en agua peptonada alcalina (APA) por seis a ocho horas a $35\ ^\circ\text{C}$, y, finalmente, se sembró una alícuota del caldo de enriquecimiento en una placa de TCBS por estriado para el aislamiento de colonias. La metodología fue realizada siguiendo las pautas establecidas por el Instituto Nacional de Salud (INS) para el aislamiento *V. cholerae* en muestras ambientales⁹. El control de calidad de los aislamientos se realizó en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos, del Centro Nacional de Salud Pública del INS en Lima, para confirmación diagnóstica y enfrentamiento a los serotipos O1 y O139.

El presente estudio contó con la aprobación de la Dirección del Hospital La Caleta, la jefatura del Departamento de Laboratorio Clínico y la jefatura de la Unidad Técnica de Saneamiento Ambiental. Por no involucrar a seres humanos, fue exonerado de revisión por un comité de ética en investigación.

Los datos fueron incluidos en un base de datos, previo control de calidad se analizaron con el paquete estadístico SPSS v.11.0, para comparación de promedios se usó la prueba *t student* para muestras independientes previa comprobación de su distribución normal con la prueba de Kolomogorov-Smirnov. Se consideró significativo con un $p<0,05$.

RESULTADOS

De julio de 2003 a junio de 2004 se realizó la colecta de muestras de agua en siete pozos con bomba manuable y en seis con reservorio; al tercer mes de seguimiento, una localidad inauguró un pozo con reservorio y clausuró su bomba manuable.

RESULTADOS

Fueron tomadas 389 muestras de agua para consumo humano en ambos distritos. De ellas 76 fueron excluidas.

Tabla 1. Evaluación microbiológica de las muestras de agua de consumo humano según procedencia. UTES La Caleta, julio 2003 – junio 2004.

N.º	Pozo Tubular	Localidad	Muestras excluidas*	Muestras cultivadas							
				<i>Aeromonas sp.</i>		<i>Vibrio cholerae</i>		Negativa		Total	
				n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Con Bomba Manuable (BM)											
1	Santa	Castillo	0	0	(-)	0	(-)	10	(100)	10	(5,0)
2	Santa	Pampa la Grama	0	9	(19,1)	5	(10,6)	33	(70,2)	47	(23,4)
3	Santa	Rami	0	6	(20,7)	1	(3,4)	22	(75,9)	29	(14,4)
4	Santa	Rio Seco*	0	0	(-)	0	(-)	3	(100)	3	(1,5)
5	Santa	Santa Cruz	0	8	(22,9)	1	(2,9)	26	(74,3)	35	(17,4)
6	Santa	Santa Rosa	0	10	(20,4)	4	(8,2)	35	(71,4)	49	(24,4)
7	Coishco	Coishco	0	3	(10,7)	0	(-)	25	(89,3)	28	(13,9)
		Subtotal	0	36	(17,9)	11	(5,5)	154	(76,6)	201	(65,3)
Con Reservorio (RES)											
1	Santa	Javier Heraud	9	1	(3,6)	2	7,1	25	(89,3)	28	(26,2)
2	Santa	Rio Seco*	5	0	(-)	0	(-)	8	(100)	8	(7,5)
3	Santa	San Carlos	22	0	(-)	0	(-)	4	(100)	4	(3,7)
4	Santa	San Dionisio	3	6	(21,4)	1	(3,6)	21	(75,0)	28	(26,2)
5	Santa	Santa Cruz 2	0	6	(18,2)	3	(9,1)	24	(72,7)	33	(30,8)
6	Coishco	Coishco 1	21	1	(33,3)	1	(33,3)	1	(33,3)	3	(2,8)
7	Coishco	Coishco 2	21	1	(33,3)	1	(33,3)	1	(33,3)	3	(2,8)
		Subtotal	81	15	(14,0)	8	(7,5)	84	(78,5)	107	(34,7)
Total			81	51	(16,6)	19	(6,2)	238	(77,3)	308	100

* Presentaron cloro residual $\geq 0,05\ \text{mg/L}$ o no se realizó esta medición (cinco casos).

Tabla 2. Características físico-químicas del agua según aislamiento y tipo de pozo de procedencia. UTES La Caleta, julio 2003 - junio 2004.

Características del agua	Según aislamiento			Según tipo de pozo		
	(+)	(-)	p	Manuable	Reservorio	p
Cloro residual	0,007	0,019	NS	0,001	0,043	<0,001
pH	6,70	6,59	NS	6,59	6,66	NS
Temperatura (°C)	24,1	23,2	0,001	23,4	23,4	NS

das por presentar cloro residual $\geq 0,05$ mg/L y otras cinco por no contar con tal medición; todas provinieron de pozos con reservorio.

De las 308 muestras finalmente incluidas, 201 correspondieron a pozos tubulares con bomba manuable y 107 a pozos tubulares con reservorio (Tabla 1), los resultados microbiológicos mostraron aislamiento en 70 (22,7%) muestras: *Aeromonas caviae* en 34 (11,0%), *Aeromonas hydrophyla* en 17 (5,5%) y *Vibrio cholerae* No O1 en 19 (6,2%), no se identificaron *V. cholerae* del serotipo O139.

Se realizó el aislamiento en 47 (23,4%) muestras de pozos con bomba manuable y en 23 (21,5%) de pozos con reservorio. El *Vibrio cholerae* No O1 se aisló en 11 (5,5%) muestras de pozos con bomba manuable y en ocho (7,4%) muestras de pozos con reservorio, respectivamente.

Al comparar los valores promedio de cloro residual, pH y temperatura en muestras con (+) y sin (-) aislamiento, se encontró diferencia significativa sólo en el nivel de temperatura, aproximadamente 1 °C más en las que se aisló algún agente. De la misma manera, al comparar estas características según tipo de pozo de procedencia, se observó diferencias significativas sólo en el nivel de cloro residual, que fue superior en los pozos con reservorio (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado la presencia del *Vibrio cholerae* en agua marina de la costa norte, centro y sur de nuestro país (1998-2000)¹⁰, reportándose inclusive cuadros compatibles de cólera antes del inicio de la epidemia¹¹; afortunadamente, ninguno encontró presencia del serogrupo O139⁷. Este estudio muestra que el agua de consumo humano proveniente de pozos tubulares presenta un reservorio potencial para bacterias como *Aeromonas* y *Vibrio cholerae*, resaltando la necesidad de realizar la desinfección correspondiente de ésta antes de su consumo, ya sea hirviéndola o adicionándole

cloro. Tanto *Aeromonas* como *Vibrio cholerae* No O1 causan alteraciones gastrointestinales, por lo que una ingesta considerable de estos gérmenes podría provocar enfermedades diarreicas agudas^{13,14}.

Existe evidencia que muestra la presencia natural de *Vibrio cholerae* en ambientes cálidos y salinos^{6,12}. Debemos considerar que, incluso en áreas endémicas, resulta difícil el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 del ambiente, particularmente durante periodos interepidémicos, mientras que el *Vibrio cholerae* No O1 es detectado con mayor facilidad¹⁵. Ello podría explicar el hecho de encontrar serotipos No O1; sin embargo, dados los antecedentes en nuestra región, podemos acreditar que la ausencia del serotipo O1 se debe a una situación real más que a un defecto de aislamiento.

Si bien el nivel óptimo de salinidad para el crecimiento está entre 5 y 25‰, *Vibrio cholerae* es uno de los pocos *Vibrios* que pueden tolerar salinidades menores^{16,17}. Al respecto, se realizó un seguimiento de cinco meses (hasta diciembre de 2004) en las mismas localidades, encontrándose valores de salinidad de 0 a 1‰ en pozos con bombas manuales y de 0 a 0,7‰ en pozos con reservorio, con sólo un aislamiento (*Aeromonas* sp.) en 86 muestras de cuatro pozos con bomba manuable y ninguno en las 35 muestras de seis pozos con reservorio. Considerando que la salinidad del agua subterránea se mantiene estable a lo largo del año, entonces el aislamiento de especies del género *Vibrio* demostraría su tolerabilidad a niveles bajos de salinidad.

Por otro lado, la ausencia de aislamientos durante el seguimiento indicaría la existencia de otros factores influenciando este crecimiento bacteriano. Por ejemplo, en la costa peruana, se encontró una correlación significativa entre la incidencia del cólera y la elevada temperatura de la superficie marina desde octubre de 1997 a junio de 2000, periodo que incluye el fenómeno de El Niño 1997-1998¹⁸. En este estudio encontramos que una mayor temperatura del agua (1 °C) está asociada con un aislamiento positivo, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente. Otros factores am-

bientales, en el caso del agua marina, son la carga de zooplancton y fitoplancton derivados de las condiciones acuáticas globales o locales, y la presencia de vibriofagos relacionados con el cese de brotes epidémicos¹⁹.

Este estudio sirvió para demostrar además la necesidad de estimular la cloración del agua (práctica promovida por el Estado), no sólo de aquella que proviene de pozos con bombas manuales (donde debería ser obligatorio), sino incluso de los reservorios, ya que los niveles encontrados resultaron inadecuados para el fin propuesto en la mayoría de muestras (107 de 188). Esto resulta aún más importante considerando que un gran sector de la población de estas localidades se dedica a actividades agrícolas, la mayor parte del día fuera de casa, consumiendo agua derivada de los pozos. Por lo que es imperativo educar a la población en aspectos de promoción y prevención en el consumo de agua potable para evitar más episodios de diarrea²⁰.

En conclusión, si bien se encontró *Vibrio cholerae* No O1 solamente en 4,6% de las muestras de agua para consumo humano en dos localidades costeras de la provincia Santa, los aislamientos ocurrieron en la mayoría de pozos, independientemente de tener o no reservorio. Acciones educativas y de saneamiento ambiental en forma oportuna resultan prioritarias a fin de evitar el desencadenamiento de brotes epidémicos de enfermedades diarreicas agudas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barua D. History of cholera. En: Barua D, Greenough WB, eds. Cholera. New York, NY: Plenum Medical Book Co; 1992, 1-35.
2. García U. El cólera en la historia de la medicina social peruana: comentarios sobre un decreto precursor. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002; 19(2): 97-101.
3. Seas C, Alarcón M, Aragon JC, Beneit S, Quiñonez M, Guerra H, et al. Surveillance of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in Lima, Peru. Int J Infect Dis 2000; 4(2): 96-99.
4. Seas C, Gotuzzo E. Cholera: overview of epidemiologic, therapeutic, and preventive issues learned from recent epidemics. Int J Infect Dis 1996; 1: 38-46.
5. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev 2002; 26(2): 125-39.
6. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(4): 1301-14.
7. Huapaya B, Padilla C, Suárez V, Gavilán R. Aislamiento de *Vibrio cholerae* O139 en el sur de Lima, Perú, diciembre 2004. Bol Inst Nac Salud 2005; 11(1-2): 10-12.
8. Instituto Nacional de Salud. Manual de laboratorio de cólera para muestras ambientales. Lima: INS; 1991.
9. Lipp E, Rivera I, Gil A, Espeland E, Choopun N, Louis V, et al. Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian coastal water and plankton by PCR. Appl Environ Microbiol 2003; 69(6): 3676-80.
10. Seas C, Miranda J, Gil AI, León-Barúa R, Patz J, Huq A, et al. New insights on the emergence of cholera in Latin America during 1991: the Peruvian experience. Am J Trop Med Hyg 2000; 62(4): 513-17.
11. Colwell RR. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. Int Microbiol 2004; 7(4): 285-89.
12. Guevara JM, Huamaní C, Zerpa R, Valencia E, Guevara JMM, Anaya M, et al. *Aeromonas* en la diarrea aguda de niños menores de 5 años. An Fac Med 2002; 63(2): 125-29.
13. Bravo L, Monte R, Silva M, Ramirez M, García B, Fernández A, et al. Acute diarrhea associated with heat-stable enterotoxin producing strains of *Vibrio cholerae* non-O1: first report from Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(2):255-56.
14. Hug A, Colwell RR, Rahman R, Ali A, Chowdhury MAR, Parveen S, et al. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent monoclonal antibody and culture method. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 2370-73.
15. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. Lancet 2004; 363(9404): 223-33.
16. Singleton FL, Attwell RW, Jangi MS, Colwell RR. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. Appl Environ Microbiol 1982; 44(5): 1047-58.
17. Gil AI, Louis VR, Rivera IN, Lipp E, Huq A, Lanata CF, et al. Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. Environ Microbiol 2004; 6(7): 699-706.
18. Faruque SM, Nacer IB, Islam MJ, Faruque AS, Ghosh AN, Nair GB, et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(5): 1702-7.
19. Fewtrell L, Kaufmann RB, Kay D, Enanoria W, Haller L, Colford JM. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2005; 5(1): 42-52.

Correspondencia: Ana Victoria García Pino.

Dirección: Hospital de Apoyo La Caleta. Urb. Nicolás Garatea Mz. 45 Lte. 24. Nuevo Chimbote, Santa. Ancash, Perú.

Teléfono: (51) 043-310646.

Correo electrónico: anagp14@hotmail.com, anagp_14@yahoo.com.