

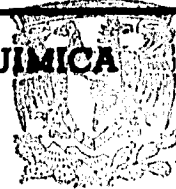
23

zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE BACILOS DE LA FAMILIA
ENTEROBACTERIACEAE Y VIBRIONACEAE DE
IMPORTANCIA MEDICA AISLADOS EN OSTRAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:

JOSE CORTES ARELLANO



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

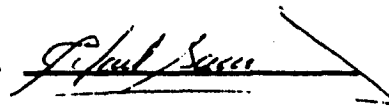
Jurado asignado:

Presidente	Prof.	Elda Peniche Quintana
Vocal	Prof.	Rafael García González
Secretario	Prof.	María Elsa Escudero García
1er. suplente	Prof.	Raúl Garza Velasco
2do. suplente	Prof.	Maite Astigarraga Zavaleta

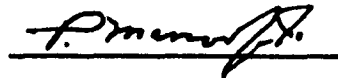
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina.

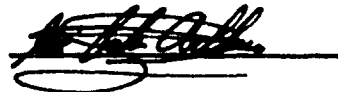
Asesor del tema, M. en C. Rafael García González.



Supervisor técnico, Dr. Pablo Mendoza Hernández.



Sustentante, José Cortés Arellano.



*A mis padres por su comprensión, apoyo y sabios consejos que siempre
han sido una guía de gran valor.*

ÍNDICE

	Página
OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	2
I. GENERALIDADES	4
A. Particularidades sobre el ostión	4
B. Zona geográfica de estudio	7
1. Laguna de El Carmen y Machona, Tabasco, México	7
2. Laguna de Tamiahua, Veracruz, México	10
C. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	13
1. Características	13
2. <i>Escherichia coli</i>	16
3. <i>Salmonella</i>	19
4. <i>Shigella</i>	26
5. Vacunas y susceptibilidad antimicrobiana	31
D. Familia <i>Vibrionaceae</i>	32
1. Características	32
2. <i>Vibrio cholerae</i> O1	36
3. <i>Vibrio cholerae</i> no O1	43
4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	48
5. Otros vibrios de importancia clínica	52
6. Vacunas y susceptibilidad antimicrobiana	54
II. PARTE EXPERIMENTAL	56
A. Material y equipo	56
B. Medios de cultivo y reactivos	58
C. Muestreo	60
D. Método de aislamiento	61
E. Método de identificación	63
III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	76
CONCLUSIONES	98
APÉNDICE	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

OBJETIVOS

- 1. Aislar bacilos Gram negativos facultativos de importancia médica a partir de ostras provenientes de la Laguna de El Carmen-Machona, Tabasco y la Laguna de Tamiahua, Veracruz.**
- 2. Identificar a las bacterias aisladas en ostras por métodos bioquímicos y serológicos.**
- 3. Determinar las probables fuentes y mecanismos de contaminación bacterianos en los ostiones.**
- 4. Establecer las características de contaminación bacteriana en las ostras de acuerdo al clima y zona geográfica en estudio.**

INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades infecciosas intestinales representan la séptima causa de muerte (1990) y el 5.2% de las defunciones (tasa de 27.4/100,000 habitantes). Dentro de estas infecciones, las de origen bacteriano sobresalen por ser las más frecuentes.

Los miembros de las enterobacterias son responsables de una parte importante de las enfermedades intestinales en el ser humano. Si bien muchas enterobacterias se han implicado como causa de diarrea, sólo se han establecido claramente como patógenos entéricos, miembros de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*.

Las infecciones intestinales muestran una distribución geográfica, como reflejo de las condiciones sanitarias y sociales, originando que entidades federativas con bajas coberturas de servicio de salud, nivel socioeconómico y saneamiento, tengan mayor riesgo en comparación a las entidades con mejores condiciones sociales y de saneamiento.

A partir de Junio de 1991, se une al grupo de enfermedades intestinales el cólera, que junto con las demás enfermedades gastrointestinales bacterianas, se introduce en entidades que carecen de buenas condiciones sanitarias y de agua limpia. Además, ciertas características geográficas de las zonas afectadas, permiten el surgimiento de brotes epidémicos; por ejemplo, estados con ecosistemas acuáticos y climas cálidos como Guerrero, Veracruz y Tabasco, ocupan el primero, cuarto y octavo lugar dentro de los casos confirmados de cólera (*V. cholerae* O1 Inaba El Tor) hasta el mes de Noviembre de 1992, de un total de 7,814 casos con 99 defunciones y tasa de incidencia igual a 8.81/100,000 habitantes.

La familia *Enterobacteriaceae* incluye algunos de los patógenos intestinales más importantes del hombre, por ejemplo, los agentes de disentería bacilar y fiebre tifoidea; ésta última, un importante problema de salud que involucra a miles de personas y representa la tercera causa de enfermedades gastrointestinales en México con 2,230,846 casos reportados hasta Julio de 1992. Las fuentes de infecciones por *Salmonella* y otros microorganismos que originan diarrea, son los alimentos, aguas y bebidas contaminadas con patógenos entéricos. Entre los alimentos que transmiten estas infecciones se tiene a los mariscos que provienen de agua contaminada.

A diferencia de las enterobacterias, el género *Vibrio* forma parte de la flora bacteriana normal de costas de agua cálida, esteros y raramente aguas continentales donde los vibrios pueden ser nativos, especialmente si son aguas salobres. Las infecciones por *Vibrio* se asocian con viajes, exposición al agua de mar y manipulación o ingestión de alimentos principalmente de origen marino (ostras, almejas, etc.).

El presente trabajo se refiere a la investigación de la presencia de bacilos Gram negativos facultativos de importancia médica, su aislamiento en ostras e identificación por métodos bioquímicos y serológicos; identificación de las probables fuentes de contaminación y sus mecanismos de transmisión, así como el establecimiento de las características de contaminación de acuerdo al clima y zona geográfica en estudio.

El ostión actúa como portador de patógenos entéricos al contaminarse en los esteros. La contaminación se debe en parte a las características fisiológicas de los ostiones que le permiten nutrirse al filtrar partículas orgánicas en suspensión y de esta misma manera originar la contaminación por microorganismos que se encuentran en su ambiente. Por otra parte, también puede contaminarse a los ostiones por manipulación y/o al transportarlos a los centros de distribución.

Algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, y *Vibrio* pueden encontrarse en los ostiones y originar enfermedades gastrointestinales. Los vibrios se hallan en esteros, donde se favorece el desarrollo de bacterias enteropatógenas como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y otros.

En esta investigación se analizaron muestras de ostiones adquiridas en el mercado de "La Viga" y procedentes de la laguna de Tamiahua, Veracruz, y del sistema lagunar El Carmen-Machona, Tabasco. El estudio de las condiciones microbiológicas de los ostiones, nos permite apreciar el índice de contaminación bacteriana y conocer las características sanitarias de nuestros esteros, así como los factores que llevan a su contaminación, beneficiándose de esta manera a la población que los consume.

I. GENERALIDADES

A. Particularidades sobre el ostión.

El ostión es un molusco bivalvo (marino-salobre, epifaunal, constituye bancos, suspensívoro filtrador), pertenece a la familia *Ostreidae* que incluye a un número de especies altamente productivas e importantes, distribuidas en diversas regiones del mundo; favorece al hombre como alimento dado su alto contenido de proteínas, carbohidratos de primera calidad, sales minerales indispensables (Fe, Cu, I, etc.) y vitaminas (vitamina A, tiamina, riboflavina y niacina). Las ostras se consideran como los alimentos proteínicos de más fácil digestión. Del Golfo de San Lorenzo, Canadá, al Golfo de México y Antillas, la especie de ostra predominante y explotada comercialmente es *Crassostrea virginica* (ostión de placer).⁵

Las ostras son habitantes típicos de los esteros, desembocaduras de ríos, lagunas costeras y de todas aquellas formaciones litorales en las que se mezclan las aguas marinas con las continentales, dando lugar a salinidades adecuadas y, por supuesto, el requisito indispensable de un sustrato adecuado para que se fijen las larvas y prosperen los adultos. El ostión se alimenta de pequeñas partículas que están flotando en el agua donde vive y que filtra por los cilios del manto y las branquias, conduciéndolas a los palpos labiales y de ahí a la boca (Figura 1).^{9,42}

Entre las características morfológicas de los bivalvos, se encuentra la presencia de 2 valvas calcificadas, unidas sobre la línea media dorsal por un ligamento flexible que forma el istmo, con escaso carbonato de calcio y gran cantidad de proteínas. Las ostras, organismos sésiles, carecen de mecanismos de locomoción una vez fijadas al sustrato; su forma está determinada por sus hábitos de vida sedentaria, pero principalmente por razones filogenéticas y funcionales. La concha inferior sirve para adherirse al fondo y permanecer fija al sustrato; la superior se cierra y abre, permite el paso del agua que contiene su alimento y el oxígeno necesario para vivir.⁹

El manto es un pliegue de tejido conectivo que contiene músculos, vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y constituye la estructura externa que cubre las partes blandas y, a su vez, encierra casi completamente la masa visceral de las ostras. Forman dos lóbulos denominados "lóbulos del manto o

paleales", libres en todas las ostras a lo largo de los márgenes del manto. Aunque la función principal del manto es la secreción de la concha y la formación del ligamento, interviene en la dispersión de los huevos durante el desove, en la respiración por intercambio de gases entre la superficie del tejido de la ostra y el agua circulante, almacena materiales de reserva (lípidos y proteínas), secreta grandes cantidades de mucus y ayuda a la excreción de productos de desecho.

Los palpos labiales se disponen en dos partes, uno a cada lado de la boca. Los dos palpos externos se unen para formar el labio superior; los internos se unen hacia abajo de la boca para formar el labio inferior.

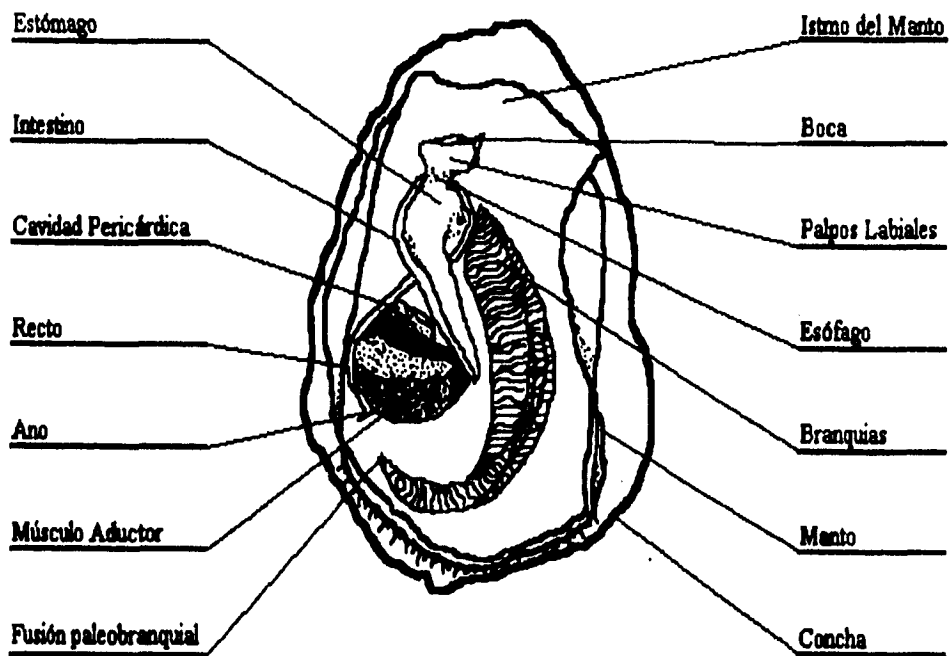
Las branquias en las ostras, están formadas por 4 láminas denominadas semibranquias. Estas 4 semibranquias están unidas en 2 partes, por el eje de la branquia que constituye el tejido conectivo y músculos propios de la región. Cada semibranquia, a su vez, presenta un gran número de lamelas o laminillas, las cuales están constituidas por un gran número de filamentos tubulares. La función ciliar de las branquias es muy importante, este órgano mantiene una corriente estable, filtrando agua y colectando las partículas en suspensión, selecciona por tamaño de partícula el detritus orgánico y los materiales inertes. El movimiento ciliar es el único que mantiene la corriente dentro del sistema de las cámaras, ya que las ostras carecen de válvulas y de movimientos peristálticos que las regulen.

La masa visceral ocupa la mitad dorsal del cuerpo por arriba del músculo aductor y comprende el corazón, aparato digestivo y riñones.

El músculo aductor es una masa orgánica que controla el abrir y cerrar de las valvas.^{2,9}

Figura 1.

Características anatómicas de la ostra.⁹



B. Zona geográfica de estudio.

1. Laguna de El Carmen y Machona, Tabasco, México.

Ubicación: El sistema lagunar El Carmen-Machona, se encuentra localizado en el Estado de Tabasco entre los 18° 15' y 18° 30' de latitud norte y entre los 93° 30' y 93° 55' de longitud oeste (Figura 2.), ocupando una superficie total de 190 Km², siendo la mayor, la Laguna El Carmen con una longitud de 15 Km y un ancho de 6 Km, se comunica con la Laguna Machona de 14 Km de largo por 6 Km de ancho, a través de un canal alargado denominado Laguna Pajonal que mide 9.5 Km de longitud por 1.5 Km de ancho.⁴⁷

En estas lagunas se encuentran establecidos bancos ostrícolas de *Crassostrea virginica*, que constituyen la fuente económica de sociedades cooperativas. Actualmente se explotan a nivel comercial los bancos de ostiones localizados en la Laguna Pajonal.⁴⁶

La comunicación del sistema lagunar con el Golfo de México, es franca y se realiza a través de dos bocas. Una, situada en la Laguna El Carmen, es natural y se le denomina como Boca Santa; otra, localizada en la Laguna Machona, es artificial y se conoce con el nombre de Boca de Panteones.⁴⁷

El aporte de agua dulce proviene principalmente de los ríos San Felipe y Chico Zapote que desembocan en la Laguna El Carmen y el río Santana en la Laguna Machona. Durante la época de lluvias se forman numerosos escurrimientos temporales, principalmente en el litoral sur del sistema.

Parámetros fisicoquímicos: El clima es cálido húmedo con lluvias intensas en verano y una época relativamente seca a fines del invierno. La temperatura media anual es de 26°C y la precipitación media de 2,000 mm, con una mínima variable entre 30 y 40 mm. A fines del otoño y durante el invierno suelen presentarse en la zona tormentas tropicales o "Nortes" con vientos de dirección Norte acompañados con lluvias y notables descensos de la temperatura. Durante el resto del año, los vientos dominantes siguen una dirección SE y NE.

La transparencia promedio es de 0.50 m, debido a la mezcla del agua lagunar con la fluvial cargada de sedimentos. En las zonas de las bocas y canales próximos a ellas, la transparencia llega a los 2 metros.

La temperatura promedio anual es de 30°C, estable en la mayor parte del cuerpo de agua y una variación mínima entre la superficial y la del fondo. En las zonas de las bocas, la temperatura varía entre los 25 y 33°C, dependiendo de las condiciones de flujo y reflujos.

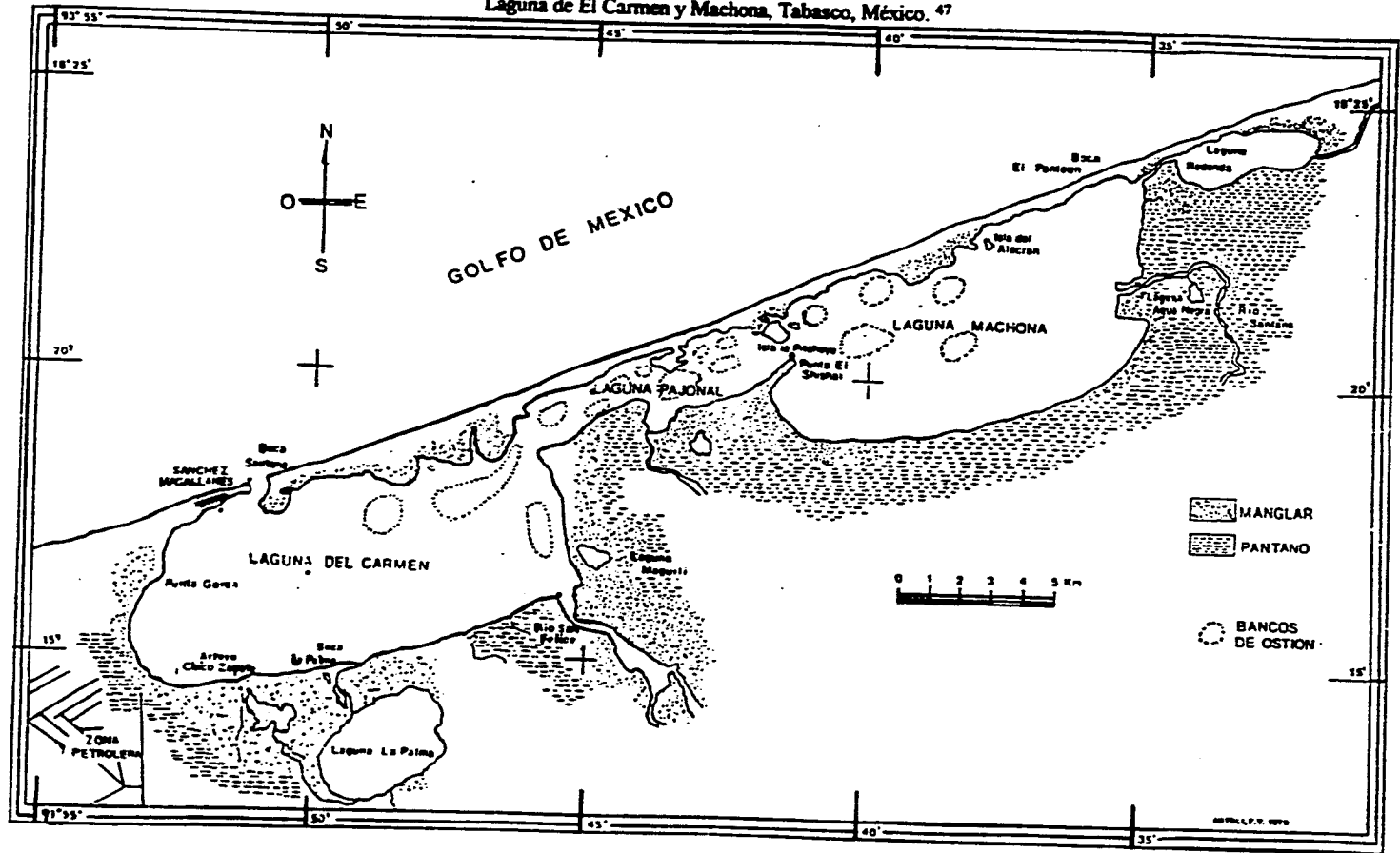
En el mes de Marzo la mayor parte del cuerpo lagunar muestra salinidades con valores entre 18 a 25 ‰; las zonas de desembocaduras de los ríos, la laguna de la Palma, parte del Pajonal y porción SW de la Laguna de El Carmen tienen salinidades entre 10 y 18 ‰; en las bocas, la salinidad va de 25 a 34‰.

En el mes de Octubre en la mayor parte del cuerpo de agua la salinidad es de 10 a 18 ‰; en las desembocaduras de los ríos va de 0.0 a 5‰ y en el Pajonal en su totalidad muestra valores de 5 a 10 ‰, extendiéndose hacia la parte central de la Laguna de El Carmen. En las bocas y sus proximidades la salinidad es de 18 a 25‰.

Como generalidad, en la época de secas, los valores de la salinidad van de 10 a 30%. y en la época de lluvias de 0 a 25‰. El gradiente de salinidad disminuye de la boca Panteón (35‰) hacia el Pajonal (5‰). Este gradiente se debe en gran parte a la mayor actividad de la boca Panteón que de la boca Santana.⁵

Figura 2.

Laguna de El Carmen y Machona, Tabasco, México. 47



2. Laguna de Tamiahua, Veracruz, México.

Ubicación: Tamiahua es una típica laguna costera localizada en la porción norte del Estado de Veracruz, entre los ríos Pánuco y Tuxpan. Se extiende desde los 21° 06' hasta los 22° 06' de latitud norte y de los 97° 23' a los 97° 46' de longitud oeste (Figura 3). Su longitud aproximada es de unos 85 Km (medida del Canal de la Ribera hasta la Barra de Corazones), por unos 18 Km en su anchura mayor. Está separada del mar por una barra arenosa de anchura variable a lo largo de la laguna, llamada Cabo Rojo, hoy cortada en la porción norte por el Canal del Chijol y en la porción sur por la Barra de Corazones. Es precisamente a través de esta última barra, por donde se establece la principal influencia marina de dicha laguna. Recibe en su porción occidental las aportaciones de los arroyos La Laja, Cucharas, Carbajal, Tancochín, Tampache y Milpas, cuyo escurrimiento durante la temporada de lluvias llega a ser considerable, si bien en el estiaje su gasto disminuye en forma notable.

Parámetros fisicoquímicos: Las clorinidades en los meses de Enero y Abril son muy parecidas, mientras que las de Julio y Octubre contrastan notablemente. En efecto, en el primer caso, la clorinidad más baja es de 8.6 ‰ y corresponde al mes de Enero, ésta fue tomada de una estación de muestreo localizada en el canal norte de la laguna, frente a la Ribera. Desde Punta Calaveras hasta frente a la Isla del Toro, las clorinidades de la mayor parte del centro, oscilan solamente entre < 11.0 y 13.0 ‰ en los dos periodos señalados. Continuando hacia la Isla del Idolo por los canales occidental y oriental hasta la Barra de Corazones situada al sur, las clorinidades se elevan rápidamente, alcanzando un valor máximo de 21.0 ‰ en el canal oriental de la citada isla en el mes de Abril.

Las muestras de clorinidad del mes de Julio, arrojan los valores más altos en la laguna. En el canal de Bustos se registran valores de 14.7 ‰. Dichos valores ascienden ligeramente, hasta que en la mayoría de la porción central se mantienen estables, entre > 15.0 y < 17.0 ‰; continuando hacia el sur, frente a la Isla del Idolo, se encuentran clorinidades de 19.7 ‰ que nuevamente se elevan en el canal occidental de la mencionada isla, alcanzando 22.0 ‰. A partir de ahí, descienden ligeramente, encontrándose valores de 20.3 ‰ en la Barra de Corazones.

La influencia de la temporada lluviosa se hace sentir en tal forma, que el flujo de aguas de baja

clorinidad se proyecta hasta las playas occidentales de Cabo Rojo

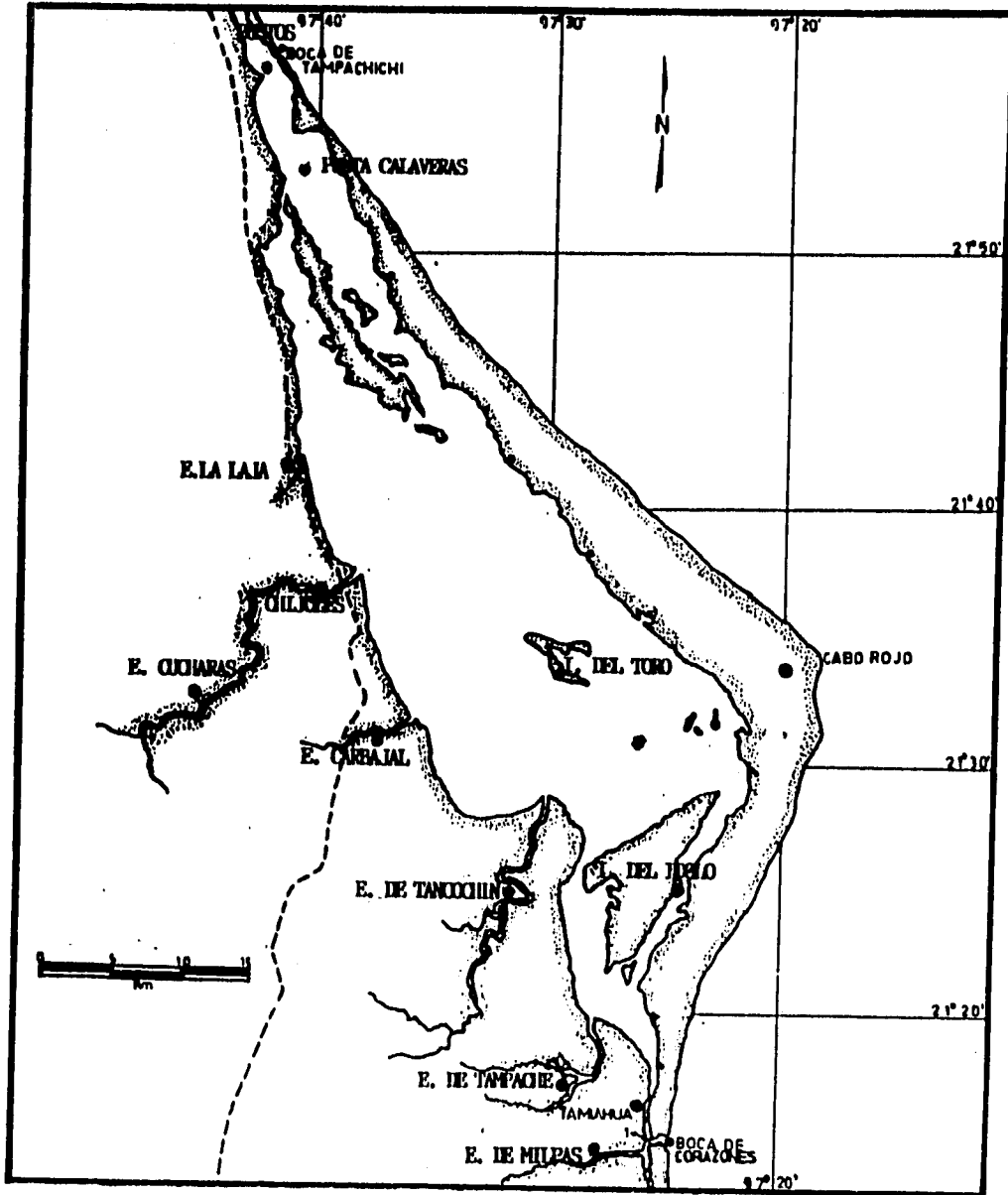
La salinidad está regida por la acción de las mareas, la precipitación y la descarga de los ríos. De las observaciones anteriores, se cree que el factor más importante en el régimen salino de la laguna, es el de sus precipitaciones de Verano. La homogeneidad constante de su clorinidad en gran parte del año, probablemente se deba a los fuertes vientos que mezclan sus aguas, especialmente de la parte central de la laguna.

Las temperaturas registradas en diferentes áreas, oscilan alrededor de 10.3°C, que es la temperatura más baja observada en una helada invernal del mes de Enero de 1967 y 33.0°C durante el período de máxima insolación en los meses de Mayo y Julio del mismo año.

La temperatura de la laguna, tanto de la superficie como del fondo, se halla determinada principalmente por el efecto de la insolación y, secundariamente, por las características físicas de las aguas de invasión marina y continental.⁴⁴

Figura 3.

Laguna de Tamiahua, Veracruz, México. 44



C. Familia *Enterobacteriaceae*.

1. Características.

La familia *Enterobacteriaceae* se compone de un gran número de géneros estrechamente relacionados, que habitan en el intestino grueso del hombre y animales, suelos y agua. Debido a su hábitat normal en el hombre, a menudo se denominan "bacilos entéricos". En este grupo de microorganismos se incluyen algunos de los patógenos intestinales más importantes del hombre, por ejemplo, los agentes de la fiebre tifoidea, diarrea y disenteria bacilar.

Las enterobacterias son pequeños bacilos Gram negativos (0.5 a 3.0 micras), no formadores de esporas, facultativos, fermentan gran variedad de carbohidratos, algunos se desarrollan utilizando glucosa como única fuente de carbón, mientras otros requieren vitaminas y/o aminoácidos adicionales, son quimioorganótrofos, oxidasa negativa, reducen nitratos a nitritos excepto para algunas cepas de *Erwinia* y *Yersinia*, no son halófilos y presentan la enzima catalasa excepto para *Shigella dysenteriae* O grupo 1 y *Xenorhabdus nematophilus*.²⁷

En condiciones anaerobias o con poco oxígeno, atacan fermentativamente a los carbohidratos; pero con oxígeno suficiente, utilizan el ciclo del ácido tricarbóxico y el sistema de transporte de electrones para la producción de energía. Diversas especies difieren en los carbohidratos que fermentan. Estas diferencias, junto con las variaciones en los productos finales y la utilización de sustratos, forman la base para la disimilitud de las especies dentro de la familia. Por definición, todos los bacilos entéricos fermentan glucosa con producción de ácido. La formación de gas, en forma de hidrógeno y dióxido de carbono, durante la fermentación de glucosa, varía con las especies y representa una herramienta útil en la identificación preliminar de los microorganismos; por ejemplo, *Salmonella typhi* y varias especies de shigelas, importantes enteropatógenos, característicamente no producen gas.⁵⁴

Una de las particularidades taxonómicas clave para identificar los diversos géneros de las bacterias entéricas es el límite y la proporción de los productos finales logrados por fermentación anaerobia de la glucosa. Dos amplios patrones se reconocen: la fermentación de ácido mixto y la fermentación

2,3-butanodiol. En la fermentación ácido mixto se forman tres ácidos en cantidades significativas, acético, láctico y succínico, además de etanol, CO₂ e H₂. Como resultado de la fermentación ácido mixto se originan iguales cantidades de CO₂ e H₂. Esto se debe a que los fermentadores ácido mixtos producen CO₂ sólo a partir de ácido fórmico por medio del sistema de enzimas formicahidrogenliasa y esta reacción origina iguales cantidades de CO₂ e H₂. Los fermentadores butanodiol también producen CO₂ e H₂ a partir de ácido fórmico, pero originan CO₂ adicional en las reacciones que producen butanodiol.⁸

Los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Pueden ser móviles, debido a la presencia de flagelos peritriquiales, una propiedad que ayuda en la diferenciación de los bacilos entéricos, de las bacterias flageladas polares de las familias *Pseudomonadaceae* y *Vibrionaceae*. Dos géneros, *Shigella* y *Klebsiella*, son característicamente inmóviles. Los bacilos entéricos pueden tener una cápsula bien definida, como en el género *Klebsiella*. Se observan fimbrias en muchas especies que sirven para adherirse a otras bacterias, bacteriófago y/o células del hospedero, y pili sexual en la transferencia de material genético. El porcentaje en moles de guanina y citosina del ADN varía entre 39 y 59.⁵⁴

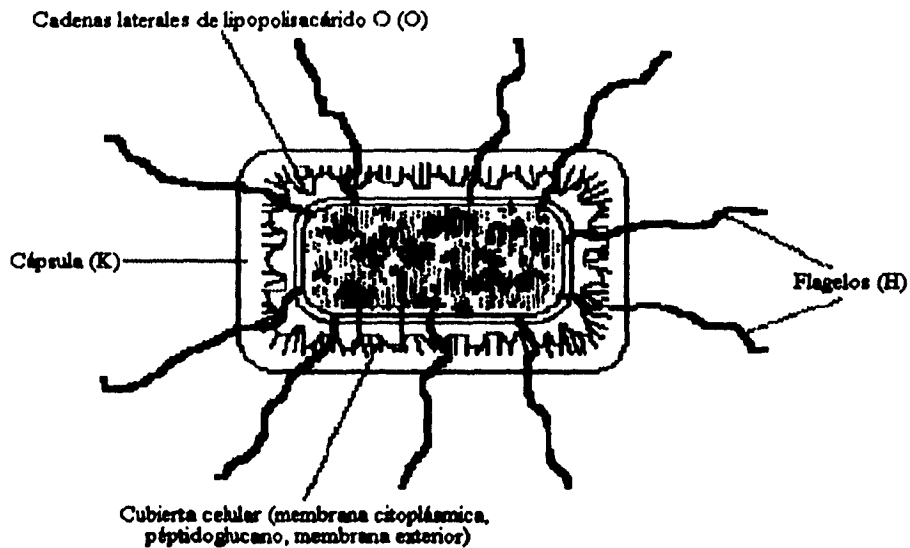
La taxonomía de las enterobacterias es compleja, y está cambiando con rapidez conforme se efectúan otros estudios de homología del ADN. Se han definido más de 20 géneros y 100 especies.²²

Las enterobacterias tienen una estructura antigénica compleja (Figura 4.). Se clasifican por medio de antígenos somáticos O termoestables (lipopolisacáridicos), antígenos K termolábiles (envoltura o superficie) y antígenos H (flagelares). En *Salmonella typhi*, el antígeno capsular se llama antígeno Vi.

El lipopolisacárido (LPS) de la pared celular está compuesto de tres regiones diferentes. El antígeno O específico, constituye la parte más externa del lipopolisacárido, está contenido en la región I y es un polímero de unidades oligosacáridas repetidas de tres o cuatro monosacáridos. En ciertos géneros, como *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, la diversidad de estos antígenos O permite el subagrupamiento serológico y proporciona una herramienta epidemiológica útil. Unida al antígeno O se halla la región II, que consiste en un polisacárido central que parece ser constante dentro de un género en particular de enterobacterias, pero que difiere entre géneros. El lípido A, o región III, está unida al polisacárido central y sirve para unir el LPS a la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Además de ser útil como un

Figura 4.

Estructura antigénica de las enterobacteriáceas.²²



marcador serológico, el antígeno O puede servir como un importante factor de virulencia porque es tóxico y puede servir como una forma de unión de las bacterias a ciertos tejidos durante la infección.⁵⁴

Los antígenos O son resistentes al calor y al alcohol, y suelen identificarse mediante aglutinación. Aunque cada género de *Enterobacteriaceae* se relaciona con grupos O específicos, un solo microorganismo puede tener varias determinantes antigénicas. En ocasiones los antígenos O se relacionan con enfermedades humanas específicas, por ejemplo, en el caso de diarrea y de infecciones de las vías urinarias se encuentran tipos O específicos de *E. coli*.²²

Los antígenos K son externos en relación con los antígenos O, se encuentran sobre algunas de las

enterobacterias. Algunos son polisacáridos, incluso los antígenos K de *E. coli*; otros son proteínas. Los antígenos K pueden interferir en la aglutinación con el suero anti-O, y quizá se relacionen con la virulencia; por ejemplo, los antígenos K de *E. coli* producen fijación de las bacterias a las células epiteliales antes de la invasión de las vías gastrointestinales o urinarias. Las klebsielas forman grandes cápsulas que consisten en polisacáridos (antígenos K) que cubren a los antígenos somáticos O, y se pueden identificar mediante pruebas de hinchamiento capsular con sueros anti-especie específicos.

Los antígenos H están localizados sobre los flagelos, y el calor y el alcohol los desnaturalizan o eliminan. Estos antígenos H se aglutinan con anticuerpos anti-H. Los aspectos determinantes en los antígenos H son una función de la secuencia de aminoácidos de la proteína flagelar (flagelina). Dentro de un mismo serotipo puede haber antígenos flagelares en una o ambas formas, que se llaman antígenos de fase 1 (designados por acuerdo, con letras minúsculas) y de fase 2 (designados por acuerdo, con números arábigos). El microorganismo tiende a cambiar de una fase hacia otra, esto se llama variación de fase. Los antígenos H de la superficie bacteriana pueden interferir en la aglutinación que produce el anticuerpo anti-O.²²

2. *Escherichia coli*.

E. coli es el microorganismo más comúnmente aislado en laboratorios de Microbiología Clínica. Este es un importante agente etiológico de infecciones intestinales y extraintestinales, diferentes factores virulentos parecen estar involucrados en estos diversos procesos infecciosos. *E. coli* usualmente está presente como flora normal en el intestino de humanos y animales, pero algunas cepas pueden causar diarrea, particularmente en niños y viajeros en naciones subdesarrolladas.⁵⁴

Cinco grupos principales de *E. coli* se han definido como patógenos entéricos: La cepa o serotipos enteropatógenos clásicos (ECEP); aquéllos que producen enterotoxina(s) termolábil y/o termocstable (ECET); cepas enteroinvasivas (ECEI) que se parecen a las cepas de *Shigella* en su capacidad para invadir y multiplicarse dentro de células epiteliales intestinales; cepas que causan colitis hemorrágica o producen toxina(s) Shiga-like (ECEH); y cepas con capacidad para adherirse a la membrana del enterocito de manera

intima con destrucción de las vellosidades intestinales (ECEA). Estudios en diferentes países muestran que ciertos serotipos (basándose en los antígenos O y H) están asociados con aquellos cinco grupos.

***E. coli* enteropatógena (ECEP):** En 1940, se aislaron cepas de *E. coli* durante muchos brotes de diarrea severa en donde la relación de mortalidad fue tan alta como del 70%. Aquellas cepas de *E. coli* declinaron en países industrializados. Cepas enteropatógenas de *E. coli* son todavía importantes en países subdesarrollados.

***E. coli* productora de enterotoxina (ECET):** Las cepas productoras de enterotoxinas comprenden unos cuantos serotipos y causan diarrea por colonización del intestino delgado y producción de enterotoxina(s). Son comunes en países subdesarrollados pero raros en países industrializados como los EE.UU.. Estas a menudo causan diarrea en viajeros a Centro América, Asia, y África. Las cepas producen una o más enterotoxinas: la termolábil (ST), que es estructuralmente similar a la toxina colérica y algunas pruebas inmunológicas usualmente detectan ambas toxinas. La enterotoxina termoestable (ST) se sabe ahora que tiene un grupo de péptidos pequeños estructuralmente similares, que también son parecidos en su estructura química a la enterotoxina termoestable producida por algunas otras bacterias. Los genes para la producción de enterotoxinas LT, ST y factores de colonización son usualmente originados por plásmidos.

***E. coli* enteroinvasiva (ECEI):** Estas cepas pertenecen a unos cuantos serotipos y usualmente producen una diarrea aguda autolimitada, a menudo con moco y leucocitos polimorfonucleares pero raramente con sangre. En muchos estudios las cepas enteroinvasivas parecen ser relativamente raras tanto en países subdesarrollados como en industrializados, aunque éstas no siempre se observan adecuadamente y los métodos no son óptimos para su detección. Como *Shigella*, las cepas ECEI tienen genes tanto cromosómicos como en plásmidos, que son necesarios para su virulencia.

***E. coli* productora de toxinas Shiga-like (verotoxina):** Recientemente se descubrió que algunas cepas de *E. coli* producen una o ambas de dos toxinas antigénicamente distintas que son citotóxicas para células HeLa y Vero en cultivos de tejidos. En la literatura, aquellas son referidas como verotoxina 1 y 2 y también como toxina Shiga-like I y II. Cepas de *E. coli* que producen una o ambas de aquellas toxinas pueden aparentemente causar diarrea que es a menudo sanguinolenta; en su forma severa a esta condición se le conoce como colitis hemorrágica. Además, aquellas cepas productoras de toxinas se asocian con dos

enfermedades extraintestinales severas conocidas una, como síndrome urémico hemolítico y la otra como púrpura trombocitopénica.

***E. coli* 0157:H7** : En 1982, *E. coli* 0157:H7 causó dos brotes de una enfermedad entérica llamada colitis hemorrágica, caracterizada por severo dolor abdominal con tenesmo, diarrea aguda seguida por diarrea espesa sanguinolenta y evidente inflamación del colon con poca o nada de fiebre. Desde entonces, *E. coli* 0157:H7 ha sido un importante patógeno entérico que se halla más frecuentemente que cepas de *Salmonella* o *Shigella* en algunos lugares.²⁸

***E. coli* enteroadherente (ECEA)**: Las ECEP con capacidad adherente fueron descritos desde 1985 y se han descrito tres tipos de adherencia, la localizada, la difusa y la agregativa. En México se ha encontrado asociación de ECEA-L y ECEA-D con diarrea aguda líquida y ECEA-A con diarrea persistente en niños. Adicionalmente se ha informado de ECEA no ECEP como causa de diarrea del turista en México.

Determinantes de patogenicidad

Antígenos de superficie: *E. coli* produce por lo menos dos tipos diferentes de fimbrias sensibles a manosa o comunes y resistentes a manosa. Se ha demostrado que ambos tipos son importantes para la colonización de tejidos. Los antígenos factores de colonización (AFC) resistentes a manosa I y II fijan *E. coli* enteropatógenas al intestino humano, mientras que las fimbrias K88 y K99 actúan en una forma similar en animales.

Enterotoxinas: Se han aislado dos enterotoxinas, una termolábil (LT) y otra termoestable (ST) de *E. coli*. La capacidad para producir estas enterotoxinas se asocia con dos plásmidos transferibles, uno que codifica ambas toxinas, el segundo que codifica sólo la toxina ST.

Tanto la toxina LT como la enterotoxina del cólera estimulan la adenilciclasa en las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado. Esta estimulación de la actividad enzimática, incrementa la permeabilidad del revestimiento intestinal, con la posterior pérdida de líquido, con la diarrea resultante. La estructura de las dos toxinas también es similar. Sin embargo, hay algunas diferencias antigénicas entre la enterotoxina del cólera y la toxina de *E. coli*. La potencia de la toxina LT de *E. coli* es aproximadamente

100 veces menor que la de la enterotoxina de *V. cholerae*.

A diferencia de la toxina LT y la enterotoxina del cólera, la toxina ST no estimula la actividad de adenilciclase. Cuando se inyecta en asas ileales de conejo, la toxina ST produce su máxima respuesta en 4 horas en lugar de las 10 horas que requiere la toxina LT. El ratón lactante es único en su capacidad para detectar toxina ST y es positivo a las 4 horas de la inoculación. Tiene un peso molecular de 1.970 kilodaltones, no contiene aminoácidos básicos y posee una o más uniones disulfuro que explican su pH y termoestabilidad. La toxina ST parece activar la guanilciclase para producir monofosfato de guanosina cíclico, alterando la absorción neta de cloro y sodio. La toxina ST también parece reducir la motilidad del intestino delgado.

Otros factores: La producción de hemolisina por *E. coli* está mediada por la presencia de un plásmido de 40 megadaltones. La pérdida de este plásmido se asocia con la pérdida de nefropatogenicidad. No está claro el papel exacto de la hemolisina de *E. coli* en la infección, pero es citotóxica para células en cultivos de tejidos y las *E. coli* hemolíticas son más patógenas en diversos modelos animales que las cepas no hemolíticas.⁵⁴

3. *Salmonella*.

El género *Salmonella* tiene varias especies que son patógenas para el hombre y algunos animales. Se diferencia de otros microorganismos entéricos y dentro de su género, por reacciones bioquímicas, aspecto de las colonias en medios de cultivo diferenciales y tipificación serológica.

Estructura antigénica de *Salmonella*

Los antígenos O y H son los principales antígenos utilizados para la tipificación de las salmonelas. Los antígenos O son similares a aquéllos de otras enterobacterias, pero los antígenos H de algunas salmonelas son difásicos; es decir, pueden existir en cualquiera de dos fases importantes, fase uno o específica y fase dos o no específica. Los antígenos de fase uno son compartidos por sólo unos pocos

microorganismos y reaccionan únicamente con sueros anti-especie homólogos, mientras que los antígenos de fase dos son compartidos por muchos microorganismos y pueden presentar reacción cruzada con sueros anti-especie heterólogos. Los numerosos tipos antigénicos de *Salmonella* fueron organizados por Kauffmann y White para formar un sistema de clasificación lógico que es muy importante para el trabajo epidemiológico.⁵⁴

De acuerdo con el esquema de Kauffmann-White, los microorganismos se representan por números y letras dados a los diferentes antígenos. Los antígenos O son los somáticos y se numeran del 1 al 67. Algunos antígenos somáticos fueron borrados del esquema por una u otra razón, por tanto no hay una completa continuidad de los números. Por conveniencia, los números arábigos utilizados para identificar los antígenos O del género *Salmonella*, se colocan dentro de "serogrupos" de acuerdo con su contenido somático. Existen serogrupos de la A hasta la Z, el microorganismo serogrupo somático Z posee el antígeno número 50. Después que los antígenos adicionales fueron delineados y el alfabeto agotado, el siguiente antígeno (No. 51) también se llama serogrupo 51, etc. Los H son los antígenos flagelares que se encuentran sólo en los flagelos de las bacterias móviles. Los de la fase 1 se denominan por letras de la "a" a la "z", z₁ hasta la z₆₃; los de la fase 2 originalmente se numeraron, pero debido a las reacciones cruzadas ahora comprende muchas expresiones de la fase 1. Existe ahora otra clasificación, la de Edwards y Ewing, quienes emplean los mismos tipos antigénicos de Kauffmann-White en su clasificación; la única diferencia entre dichos sistemas es la de la taxonomía. El primero designa a cada tipo antigénico como una especie, mientras que el sistema de Ewing designa el mismo tipo antigénico como un serotipo de *S. enteritidis*, este último sistema sólo reconoce tres especies de salmonelas: *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella enteritidis*. Por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, como antes se conocía, sería *Salmonella enteritidis* serotipo *typhimurium*.^{27,54}

Los antígenos de envoltura desempeñan un papel menor en la clasificación serológica de las salmonelas, pero pueden tener un importante significado patógeno. El antígeno de envoltura de *S. typhi*, el antígeno Vi (de virulencia), puede desempeñar un papel en la prevención de la destrucción intracelular de este microorganismo. Este antígeno puede hallarse rara vez en otras salmonelas u otros bacilos entéricos, como *Citrobacter* y *Escherichia*.⁵⁴

Modos de transmisión de salmonelosis

Portadores: De todas las especies de *Salmonella*, *S. typhi* se adapta únicamente a humanos y los portadores representan el único reservorio natural de estos microorganismos. Estos portadores pueden ser de dos tipos, convalecientes que excretan el microorganismo durante un corto lapso o crónicos que eliminan al microorganismo durante más de un año. El estado de portador crónico se establece en aproximadamente el 3% de los pacientes que presentan fiebre tifoidea y albergan a los microorganismos en vesícula biliar, vías biliares o, rara vez, intestino o vías urinarias. Los portadores contaminan los alimentos y el agua, diseminando la infección a otros individuos.

El portador humano también desempeña un papel en la salmonelosis no tifoidea. Pacientes con gastroenteritis por *Salmonella* puede eliminar microorganismos en las heces durante varias semanas. En contraste con los portadores de *Shigella*, el tratamiento antibiótico de esta infección prolonga el estado de portador. En los Estados Unidos, los portadores han sido la fuente de cierto número de enfermedades transmitidas por alimentos y agua, pero en general estos brotes se han limitado a un pequeño grupo, con aquellas personas que comen en un restorán o en un picnic. El nivel general de higiene y las medidas sanitarias habitualmente tomadas en dicho país, limitan el papel del portador humano a estos grupos. Sin embargo, en países en desarrollo, donde las prácticas de manipulación de alimentos y del agua no están normatizadas, los portadores humanos representan una fuente importante de infección por *Salmonella*.

Fuentes de infección: *S. typhi* también puede diseminarse por alimentos como se evidenció en los casos ocurridos a principios de siglo que involucraron a un portador que era una cocinera (María tifoidea). Recientes brotes en gran escala en Aberdeen, Escocia (515 casos) y Alemania (344 casos) involucraron respectivamente carne enlatada y ensalada de papas contaminadas.

Como con la fiebre tifoidea, los alimentos y agua contaminados son los mecanismos de transmisión de todas las otras salmonelas. En contraste con la fiebre tifoidea, en la cual el portador humano es la única fuente del microorganismo, los animales y productos animales contaminados representan la principal fuente de otras salmonelosis. En países como los Estados Unidos, donde se llevan a cabo intensas prácticas de economía animal, el 50% de una manada o rebaño puede alojar salmonelas. Cierta número de estas

salmonelas animales pueden ser resistentes a muchos antimicrobianos, porque se usan antibióticos indiscriminadamente en la alimentación animal.

Los productos de granja representan la mayor fuente de *Salmonella* no responsable de tifoidea en los EE.UU.. Los productos cárnicos se contaminan durante la matanza, y en aquellos que se cocinan o refrigeran en forma inapropiada, las salmonelas pueden proliferar hasta niveles infectantes. Se ha visto contaminación de mezclas para tortas y otros productos con huevos desecados, por medio de procesos que no llegan a una temperatura de destrucción de los microorganismos.⁵⁴

Las fuentes de infección, como ya se mencionó, son los alimentos y las bebidas contaminadas con salmonelas. Son importantes las siguientes fuentes:

1. Agua: La contaminación con excrementos suele dar por resultado epidemias explosivas.
2. Leche y otros productos lácteos (helados, queso, flan): Al contaminarse con excremento por manipulación inapropiada y pasteurización deficiente.
3. Mariscos: Cuando éstos provienen de aguas contaminadas.
4. Huevos desecados o congelados: Estos huevos provienen de aves contaminadas o se contaminaron durante su procesamiento industrial.
5. Carnes y sus derivados: Cuando provienen de animales infectados (aves de corral) o están contaminados por excremento de roedores o seres humanos.
6. Sustancias "recreativas": Estas son marihuana y otras.
7. Colorantes animales: Estos son colorantes (por ejemplo, carmín) que se emplean en fármacos, alimentos y cosméticos.
8. Mascotas del hogar: Los perros y otras mascotas alojan salmonelas durante largos períodos. Los animales de sangre fría también son portadores efectivos de *Salmonella* y se han implicado como fuentes de infecciones humanas. Las tortugas como mascotas, constituyen una fuente significativa de infecciones por *Salmonella* en niños.

Prevención y control

Deben aplicarse medidas sanitarias para prevenir la contaminación de los alimentos y el agua por roedores y otros animales que excretan salmonelas. Es indispensable cocinar concienzudamente las aves de corral, las carnes y los huevos. No debe permitirse que los portadores trabajen como manipuladores de alimentos y es indispensable que observen precauciones higiénicas estrictas.²²

El control de los portadores, eliminación apropiada de las aguas de albañal y agregado de cloro al agua, son medidas que han reducido la incidencia de fiebre tifoidea en los EE.UU., de más de 5,000 casos en 1942 a poco más de 500 casos en 1980. Más de la mitad de todos los casos observados en los EE.UU. hoy en día, se adquieren durante viajes a regiones endémicas. En países en desarrollo, sin las medidas de control adecuadas, la fiebre tifoidea continúa siendo un importante problema de salud que involucra a miles de personas. En estas áreas endémicas, el agua contaminada representa una fuente de infección.⁵⁴

La aplicación de dos inyecciones de suspensión bacteriana de *S. typhi* que se han inactivado con acetona, seguidas por un refuerzo unos meses después, brinda resistencia parcial contra los inóculos infecciosos pequeños de bacilos de la tifoidea, pero no contra los de gran tamaño. La administración bucal de una cepa mutante avirulenta viva de *S. typhi* ha brindado protección importante en las zonas muy endémicas. Las vacunas contra otras salmonelas no se producen.²²

Patología por *Salmonella*

La salmonelosis es una importante enfermedad entérica. Este punto fue enfatizado por el reciente brote de *S. typhimurium* en Chicago que estuvo estimado en 150,000 a 300,000 casos y por el reciente brote de *S. enteritidis* que estuvo asociado con huevos. Cepas de *Salmonella* causan una amplia gama de enfermedades entéricas humanas, desde gastroenteritis autolimitadas con ligeros síntomas de corta duración, a cuadros severos con o sin septicemia y hasta una severa, debilitante y potencialmente fatal fiebre tifoidea. *S. choleraesuis*, *S. paratyphi A* y *S. typhi* son importantes por su frecuente asociación con enfermedades severas y septicemia. Estos serotipos son comunes en muchos países desarrollados pero no en los EE.UU.. Otros serotipos de *Salmonella* pueden causar también septicemia, pero éstas causan más comúnmente gastroenteritis sin complicaciones. Algunas cepas de *Salmonella* típicamente invaden la mucosa intestinal y

se multiplican en la lámina propia. Según la virulencia de las cepas y la respuesta del hospedero, pueden invadir el torrente sanguíneo, tejido linfático o ambos. Las salmonelas son la causa más común de diarrea bacteriana en los EE.UU..²⁸

La salmonelosis puede presentarse como cualquiera de tres diferentes entidades clínicas; una gastroenteritis, una septicemia con lesiones focales, o como fiebres entéricas, principalmente la tifoidea.

Gastroenteritis: la gastroenteritis por *Salmonella*, como la shigelosis, representa una infección real del intestino y por lo general ocurre aproximadamente 18 horas después de la ingestión del microorganismo. La enfermedad se caracteriza por fiebre, y dolor abdominal que habitualmente es autolimitado y dura de 2 a 5 días. En caso extremo, los síntomas pueden durar más tiempo. La deshidratación y el desequilibrio electrolítico constituyen las mayores amenazas en los niños pequeños y en los ancianos. Aunque el microorganismo puede ser aislado de las heces durante varias semanas, la aparición de portadores crónicos que eliminan el microorganismo después de 1 año es rara. Cualquier serotipo de *Salmonella* puede producir la enfermedad, pero la más común es *S. enteritidis* serotipo *typhimurium*.⁵⁴

Fiebre tifoidea: Este síndrome es producido principalmente por *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *S. schottmülleri*. Las salmonelas ingeridas llegan al intestino delgado, desde el cual entran en los vasos linfáticos y a continuación en la sangre. Se transportan en ella hasta muchos órganos incluso el intestino. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfático intestinal y se excretan por el excremento.

Después de un período de incubación de 10 a 14 días, sobreviene fiebre, malestar general, cefalalgia, estreñimiento, bradicardia y mialgias. La fiebre se incrementa hasta alcanzar una meseta elevada; aumenta de tamaño el bazo e hígado. Por corto tiempo se observa en casos raros la aparición de manchas sonrosadas (roséola), por lo general en la piel del abdomen o tórax. La cuenta de leucocitos es normal o baja.

Las lesiones principales consisten en hiperplasia y necrosis del tejido linfático (es decir, las placas de Peyer), hepatitis, necrosis focal del hígado e inflamación de vesícula biliar, periostio, pulmones y otros órganos.

Septicemia con lesiones focales: Estas se relacionan a menudo con *S. choleraesuis*, pero puede ser causada por cualquier serotipo de *Salmonella*. Después de la infección por vía bucal ocurre invasión

temprana de la sangre (con posibles lesiones focales en pulmones, huesos, meninges, etc.), pero a menudo hay manifestaciones intestinales. Los hemocultivos son positivos.²²

Determinantes de patogenicidad

Las salmonelas son microorganismos complejos que producen cierto número de factores de virulencia. Estos incluyen: 1) antígenos de superficie, 2) invasividad, 3) endotoxina y 4) enterotoxinas.

Antígenos de superficie: La capacidad de las salmonelas para adherirse a las células intestinales del hospedero y sobrevivir intracelularmente, puede deberse a los antígenos O de superficie, o en el caso de *S. typhi*, también a la presencia de antígeno Vi. Estudios en voluntarios humanos demuestran que aquellos microorganismos que contienen antígeno Vi son claramente más virulentos que aquellos que no poseen el antígeno. El antígeno Vi puede servir para proteger al antígeno O contra los anticuerpos y prevenir la fagocitosis. Las variantes de colonias rugosas que carecen de cadenas laterales O específicas en el lipopolisacárido (LPS) son avirulentas, mientras que las variantes de colonias lisas son virulentas.

Invasividad: La salmonela virulenta atraviesa el revestimiento epitelial del intestino delgado; sin embargo, a diferencia de la shigela, la salmonela no reside simplemente en el revestimiento epitelial, sino que pasa directamente a través de las células epiteliales hacia el tejido subepitelial. Se desconocen los mecanismos bioquímicos de la penetración, pero el proceso parece ser similar a la fagocitosis. A medida que las bacterias se acercan al epitelio, las microvellosidades de las células comienzan a degenerar y las bacterias ingresan en las mismas, luego son rodeadas por membranas citoplasmáticas invertidas similares a las vacuolas fagocíticas. Las salmonelas atraviesan las células epiteliales hacia la lámina propia; ocasionalmente, ocurre penetración epitelial a nivel de la unión intercelular. Luego de la penetración, los microorganismos se multiplican y pueden pasar hacia otros sitios del cuerpo. La destrucción epitelial se observa en los estadios tardíos de la enfermedad.

Endotoxina: La endotoxina puede desempeñar un papel en la patogenia de la infección por salmonela, especialmente durante los estadios bacterémicos de la fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas. La

fiebre podría ser producida por la endotoxina actuando directa o indirectamente a través de la liberación de pirógenos leucocitarios endógenos. La activación de las propiedades quimiotácticas del sistema del complemento puede causar la localización de leucocitos en las clásicas lesiones entéricas observadas en la fiebre tifoidea.

Enterotoxina: Estas enterotoxinas tienen las mismas propiedades de las enterotoxinas termoestable y termolábil de *E. coli*. La actividad enterotóxica parece estar muy relacionada con la pared celular o la membrana externa de la célula bacteriana; esta estrecha asociación con la célula bacteriana podría explicar por qué es necesaria la penetración hística para la inducción de diarrea.⁵⁴

4. *Shigella*.

El género *Shigella* está esencialmente restringido a los humanos que son sus hospederos naturales. Aunque pueden infectar a los primates, los hombres son sus reservorios naturales y su principal mecanismo de disseminación. Durante el periodo de 1964 a 1973, se informaron 105,832 casos de shigelosis al Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta. De los microorganismos aislados, 73% fueron *S. sonnei*, 26% *S. flexneri*, 0.7% *S. boydii* y 0.6% *S. dysenteriae*. Datos recientes muestran la misma distribución de estos microorganismos aislados. En países en desarrollo donde la higiene es pobre, el patrón de aislamientos es inverso: *S. dysenteriae* y *S. flexneri* son los aislados más frecuentes, seguidos por *S. boydii* y *S. sonnei*. Las infecciones por *S. dysenteriae* en los EE.UU. están limitadas a personas que viajan a áreas endémicas. *S. dysenteriae* se ha extendido con amplitud por América Central y del Sur. En 1969 hubo 110,000 casos con 8,000 defunciones en Guatemala.

Estructura antigénica de *Shigella*

Todas las shigelas poseen antígenos O, y algunas poseen antígenos K, éste último no es significativo en la tipificación serológica de las shigelas pero, cuando está presente, interfiere con la determinación del antígeno de tipo O. Esta interferencia habitualmente puede neutralizarse por ebullición de

la suspensión de células. Las shigelas se dividen en cuatro grupos principales por los antígenos O, denominados A, B, C y D, que corresponden a las especies *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*, respectivamente. Cada grupo o especie se subdivide en tipos sobre la base del antígeno O. Estos subgrupos se designan con números arábigos.⁵⁴

Hay 13 grupos antigénicos O en *S. dysenteriae*, 6 (13 incluyendo subfactores) en *S. flexneri*, 18 en *S. boydii* y 1 en *S. sonnei*, que incluye una variante lisa (forma I) y otra rugosa (forma II).²⁸

Modos de transmisión de shigelosis

Dado que no hay hospederos animales, la diseminación ocurre de hombre a hombre, y los reservorios son portadores que eliminan los microorganismos en sus heces. El estado de portador habitualmente dura de 1 a 4 semanas; sin embargo, se han descrito portadores a largo plazo. Desde estos portadores, las shigelas pueden diseminarse por moscas, dedos, alimentos o heces. Pueden aislarse shigelas de vestimentas, asientos de baño o aguas contaminadas por individuos infectados. Casi la mitad de los aislamientos informados corresponden a niños menores de 5 años y dos tercios del total de casos ocurren en niños menores de 10 años. Los brotes que involucran a mucha gente ocurren en grupos cerrados, como hospitales para pacientes mentales, reservaciones indias, guarderías, campos de prisioneros de guerra, o en áreas en las cuales el agua ha sido contaminada. La transmisión secundaria es muy alta, siendo los más susceptibles los niños menores de 1 año y presentando una tasa de infección del 60%, comparada con una tasa del 20% para otras edades. La alta transmisibilidad de estos microorganismos se ha atribuido a la baja dosis infecciosa necesaria para producir la enfermedad. Estudios en voluntarios sanos indican que se requieren tan poco como 200 bacilos para producir la enfermedad en algunos individuos. El porcentaje de individuos afectados aumenta a medida que lo hace el número de microorganismos infectantes.⁵⁴

Prevención y control

Se ha hecho un intento de quimioprofilaxis masiva durante periodos limitados (por ejemplo, en el

personal militar), pero tienden a aparecer con rapidez cepas resistentes de shigelas. Como el ser humano es el único hospedero reconocido de las shigelas patógenas, deben aplicarse medidas importantes de control para eliminar a los microorganismos de este reservorio mediante: (1) control sanitario del agua, los alimentos, y la leche, eliminación de aguas negras y control de las moscas; (2) aislamiento de los pacientes y desinfección de las excretas y (3) identificación de los casos subclínicos y de portadores, en particular los manejadores de alimentos.²²

Patología por *Shigella*

Las especies de *Shigella* producen la clásica disentería bacilar caracterizada por severos dolores abdominales y diarrea con sangre y moco. Estos microorganismos invaden las células de la mucosa, causando la muerte y desprendimiento de éstas hacia el lumen intestinal. Sin embargo, rara vez invaden más allá de la mucosa. Las infecciones por *Shigella* siguen siendo una de las causas más comúnmente reconocidas de diarrea bacteriana en los EE.UU., y *S. sonnei* junto con *S. flexneri* son las especies más comúnmente aisladas.²⁸

Las infecciones por *Shigella* se limitan casi siempre al tubo gastrointestinal; es muy rara la invasión de la sangre. La infección por shigelas es muy transmisible. La dosis infecciosa es menor de 10^3 microorganismos (en tanto que es de 10^5 a 10^8 en el caso de las salmonelas y los vibriones). El proceso patológico esencial consiste en invasión del epitelio mucoso, la formación de microabscesos en la pared del intestino grueso y el íleon terminal produce necrosis de la mucosa, ulceración superficial de la misma, hemorragia y formación de una "seudomembrana" en la zona ulcerada. Ésta está constituida por fibrina, leucocitos, desechos celulares, mucosa necrótica y bacterias. Conforme cede el proceso, las úlceras se llenan de tejido de granulación y se produce en ellas tejido cicatrizal.²²

En adultos previamente sanos, puede haber curación espontánea en 2 a 7 días. Sin embargo, en niños pequeños, ancianos y en individuos mal nutridos, la enfermedad es de larga duración y la mortalidad por deshidratación y desequilibrio electrolítico es mayor. Es más probable observar decesos en la población pediátrica y cuando *S. dysenteriae* es el microorganismo causal.⁵⁴

Tras la recuperación, la mayor parte de las personas expulsan bacilos de la disentería durante un período breve nada más, pero unos cuantos quedan como portadores intestinales crónicos y pueden experimentar crisis recurrentes de la enfermedad. Para recuperarse de la infección, la mayor parte de las personas desarrollan anticuerpos circulantes contra las shigelas, pero éstos no las protegen contra la reinfección.²²

Determinantes de patogenicidad

Las shigelas virulentas poseen tres factores que contribuyen a la patogenicidad: 1) una estructura de lipopolisacárido (LPS), 2) invasividad, y 3) producción de toxinas.

Lipopolisacárido : La importancia del LPS en la virulencia de las shigelas se ha demostrado con *S. sonnei* y *S. flexneri*. Sansonetti y colaboradores han demostrado que *S. sonnei* virulenta posee un plásmido grande de 120 megadaltones que codifica la producción de cadenas laterales O específicas de ácido 2-amino-2-desoxi-1-altrurónico, dando como resultado la formación de colonias lisas o en fase I. La ausencia de este plásmido da como resultado la pérdida de estas cadenas laterales y se evidencia por la producción de colonias rugosas o en fase II. Las variantes en fase II son avirulentas, mientras que las colonias en fase I son virulentas.

Invasividad: Las shigelas virulentas penetran en las células epiteliales del colon en forma irregular. Los microorganismos rara vez penetran en la lámina propia y existen intracelularmente en vacuolas citoplasmáticas. La invasión de las células del hospedero depende tanto del estado metabólico de éstas, como del de las células bacterianas. Cationes bivalentes como calcio, magnesio y hierro ayudan en este proceso. Luego de adherirse a las células epiteliales, los microorganismos producen una sustancia de bajo peso molecular que induce un movimiento de plegamiento de la membrana celular de las células del hospedero e inicia la pinocitosis en células normalmente no fagocíticas. Una vez dentro de la célula, las shigelas inducen cierto número de cambios degenerativos en la ultraestructura, indicando lesión celular, ésta puede relacionarse con la producción de toxina. La invasividad de las células epiteliales está mediada por un gen ligado al cromosoma que se ubica cerca de las regiones purina E y lactosa-galactosa.

Toxina: La toxina shiga tiene actividad enterotóxica y produce acumulación de líquido en asas ileales de conejo. La actividad enterotóxica no parece deberse a un aumento de la actividad de adenilciclase como se observa en la toxina termolábil de *E. coli* o en la enterotoxina del cólera y la toxina no está inmunológicamente relacionada con estas toxinas.

La toxina nativa (P.M.= 74,000) como otras toxinas bacterianas, existe como una proenzima y está compuesta por cadenas A y B. Hay un protómero B compuesto de cinco subunidades monoméricas (P.M.= 7,791) y un protómero A en cada molécula de toxina. La cadena A consiste en dos subunidades, A₁ (P.M.= 30,500) y A₂ (P.M.= 3,000) unidas por una unión disulfuro. La subunidad A₁ es una enzima que adhiere la subunidad ribosomal 28S del ARN a la subunidad 60S de las células eucarióticas en un sitio altamente específico (base de adenina 4324). La actividad glicosidasa de A₁ resulta en una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas y consiguiente muerte celular. El protómero B interviene en la unión de la toxina a los receptores de membrana celular (globotriaosilceramida). La globotriaosilceramida está presente en las microvellosidades de las células epiteliales del yeyuno. De manera más específica la globotriaosilceramida se encuentra en las vellosidades del yeyuno pero no en las células cripticas, y sólo las células de las vellosidades se unen a la toxina e inhiben la síntesis de proteínas. El resultado de esto es que la absorción de sodio en células vellosas del intestino delgado ya sea por vía pasiva o facilitada por glucosa está deteriorada selectivamente, es decir sin efecto sobre la secreción de cloruro en las células cripticas. La disminución de sodio y absorción de agua conduce a la acumulación de fluido en el lumen intestinal y por tanto, a la diarrea. Las subunidades aisladas no son tóxicas.

La toxina puede desempeñar dos papeles en la patogenia de las infecciones por *Shigella*. En primer lugar, puede actuar como una enterotoxina en el yeyuno, produciendo la diarrea acuosa asociada con la enfermedad temprana. En segundo lugar, su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas y su citotoxicidad puede explicar la muerte celular y producción de úlceras colónicas.

Se ha aislado una segunda toxina que produce cambios morfológicos en células ováricas de hámsters chinos, pero todavía no se conoce el papel de esta toxina en la patogenia de la shigelosis, si es que tiene alguno.²³

5. Vacunas y susceptibilidad antimicrobiana.

Vacunas: Se ha demostrado que diversas vacunas orales con híbridos de *Shigella* y *E. coli* son efectivas en voluntarios humanos. Otras vacunas orales con cepas mutantes de *Shigella* han sido efectivas ofreciendo una inmunidad específica de serotipo durante 6 a 12 meses. Sin embargo, estas vacunas no alteran la tasa de portadores asintomáticos y requieren por lo menos cuatro dosis de la vacuna administrada en solución de bicarbonato. Formal y col. han tenido éxito en formar un híbrido de *Shigella sonnei-Salmonella typhi* Ty21a. Una vacuna oral consistente en *S. typhi* Ty21a se ha usado exitosamente para reducir la incidencia de fiebre tifoidea en niños que viven en áreas endémicas. Todavía queda por determinar la utilidad de esta vacuna con híbridos.⁵⁴

Susceptibilidad antimicrobiana: Algunas enterobacterias presentan resistencia a los antibióticos, ésta puede ser intrínseca o no intrínseca. La primera es una propiedad genética que han desarrollado algunas especies mucho antes del uso clínico de antibióticos. La resistencia no intrínseca a los antibióticos, hoy en día ocurre por el uso prematuro de antibióticos y muchas cepas de géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que causan enfermedades, llegan a convertirse en altamente resistentes a los antibióticos a través de mecanismos evolutivos. Estudios genéticos muestran que este tipo de resistencia a los antibióticos es usualmente mediado por plásmidos.²⁸

D. Familia *Vibrionaceae*.

1. Características.

La familia *Vibrionaceae* comprende bacilos rectos o curvos, quimioorganótrofos, no desnitrifican, no son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales y son facultativos, es decir, poseen metabolismo respiratorio y fermentativo. Su hábitat natural parece ser el agua. La mayoría de los integrantes de la familia *Vibrionaceae*, utilizan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, son móviles por flagelos polares y todos utilizan D-glucosa como única o principal fuente de carbono y energía. El porcentaje en moles de guanina + citosina del ADN varía entre 38 a 63.²⁷

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* a la que también pertenecen los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium*. En años recientes se ha propuesto la incorporación de dos nuevos géneros, *Listonella* y *Shewanella*. En esta familia se incluyen tres géneros que son de importancia médica: *Vibrio*, *Aeromonas*, y *Plesiomonas*. Los dos últimos géneros rara vez causan enfermedad en el hombre, pero se han aislado de casos de diarrea. *Aeromonas* también se ha aislado de fuentes extraintestinales.⁵⁴

Dentro del género *Vibrio*, los laboratorios clínicos pueden restringir sus esfuerzos a la identificación de 12 especies clínicamente significativas: *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. carchariae* y *V. cincinnatiensis*. Pueden reportarse aislamientos que asemejan vibrios pero que no encajan dentro de las 12 especies asociadas con infecciones humanas, como son especies de vibrios marinos. Tales microorganismos deben ser oxidasa positiva, fermentan D-glucosa y requieren de NaCl para crecer en caldo nutritivo.²⁸

Las especies del género *Vibrio* se encuentran en hábitats acuáticos con un amplio rango de salinidad. Son muy comunes en ambientes marinos, estuarios, en la superficie y contenido intestinal de animales marinos. Todos desarrollan a 20°C y la mayoría a 30°C; pueden tolerar condiciones alcalinas moderadas y crecer a pH 9.0. Otras especies como *V. cholerae* y *V. metschnikovii* soportan un pH de 10.

La mayoría de los vibrios son oxidasa positivos, una propiedad que está correlacionada con la presencia de citocromos del tipo c, se han encontrado citocromos tanto del tipo b como del c en la mayoría de las especies. *V. metschnikovii*, que es oxidasa negativa, contiene citocromos b, d, o y a₁ pero carece de citocromos del tipo c.

Todos los vibrios utilizan D-glucosa, D-fructosa, maltosa y glicerol. Bajo condiciones anaerobias, las especies de *Vibrio* fermentan D-glucosa por medio de una fermentación ácido mixta dando como productos finales ácidos generalmente sin gas. Estos productos finales son los ácidos: fórmico, acético, láctico, succínico y pirúvico, así como el alcohol etílico. Al completar la fermentación, el pH del medio varía de 4.6 a 5.8. Algunas especies producen acetoina y/o diacetilo como también 2,3-butanodiol.

La D-glucosa es catabolizada por la vía del fosfoenolpiruvato, sistema D-glucosa fosfotransferasa y el ciclo constitutivo de Embden-Meyerhof, mientras que el D-gluconato es degradado por medio de la inducción del ciclo de Entner-Doudoroff. La D-fructosa es utilizada por vía de una fosfoenolpiruvato inducida: sistema D-fructosa fosfotransferasa y la 1-fosfofructocinasa que convierte este azúcar a fructosa-1-fosfato y fructosa-1,6-difosfato; el siguiente paso en el catabolismo de este azúcar fosfatado, se realiza por enzimas del ciclo de Embden-Meyerhof.

Varias especies de *Vibrio* tienen un sistema constitutivo de arginina deshidrolasa que se identifica por pruebas de producción de ornitina a partir de arginina bajo condiciones anaerobias. La mayoría de las especies de *Vibrio* poseen hidrolasas extracelulares como son la amilasa, gelatinasa, lipasa, quitinasa, alginasa y desoxirribonucleasa. El género *Vibrio* está constituido por bacterias cuyo crecimiento se estimula por iones sodio y para la mayoría son un requerimiento necesario; la concentración mínima necesaria para un óptimo crecimiento varía de 5 a 700 mM.²⁷

Los vibrios de importancia médica pueden ser clasificados de acuerdo a sus requerimientos de sal; *V. cholerae* y *V. mimicus*, crecen en medios con y sin adición de NaCl al 1%, son halotolerantes, mientras que *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y otras especies son halófilas, requieren de medios de cultivo con NaCl al 1% o más. Otras especies, como *V. metschnikovii*, se diferencia fácilmente por ser oxidasa negativo y nitrato negativo; *V. holllisae* es negativo para arginina deshidrolasa, lisina y ornitina (triple descarboxilasa negativa) que lo diferencia de las especies restantes de *Vibrio*; *V. cincinnatiensis* es el único que da prueba

positiva para el mio-inositol. Las siete especies restantes de interés clínico se subdividen en dos grupos, uno arginina deshidrolasa positivo que incluye *V. damsela*, *V. fluvialis*, y *V. furnisii* y el otro, arginina deshidrolasa negativo pero lisina descarboxilasa positivo, que comprende *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Son necesarias pruebas bioquímicas adicionales para la diferenciación de las especies (Tabla 3).²⁸

El serogrupo O1 de *V. cholerae* se divide en dos biotipos, El Tor y Clásico, estos se distinguieron originalmente por la prueba de Voges-Proskauer, por la aglutinación de eritrocitos de pollo y su capacidad para producir una hemolisina soluble que se secreta dentro del medio extracelular (pruebas positivas para el biogrupo El Tor). Cepas del biotipo Clásico son invariablemente no hemolíticas; sin embargo, cepas de El Tor pueden interconvertirse en hemolíticas y no hemolíticas.

El gen estructural hly A para la hemolisina de ambos biogrupos ha sido secuenciada, revelando la presencia de una supresión de 11 pares de bases en cepas Clásicas que generan un codón de paro. Esto produce una proteína de 27 kilodaltones que se traduce en una proteína no hemolítica en comparación con la hemolisina del biotipo El Tor de 82 kilodaltones.

Considerando las bases genéticas para el fenotipo no hemolítico; una prueba más eficiente para distinguir ambos biotipos es aquella que utiliza pruebas de hibridación con un oligodesoxinucleótido que contiene los 11 pares de bases de la mutación. Los genes que codifican para la hemolisina producida por *V. cholerae* no O1 y *V. mimicus* muestran homogeneidad con el ADN que codifica para la hemolisina de El Tor.⁴

Los biotipos de *V. cholerae* O1 se diferencian de acuerdo con su capacidad hemaglutinante; cepas El Tor que crecieron en medios sólidos podían aglutinar eritrocitos, mientras que el biotipo Clásico no. Estudios previos han demostrado tres distintas hemaglutininas celulares dentro de *V. cholerae* O1. Una es sensible a L-fucosa y resistente a D-manosa y requiere de Ca⁺⁺ para la actividad hemaglutinante; ésta se encuentra dentro del biotipo Clásico y se detecta transitoriamente en la fase log de cultivos líquidos usando eritrocitos humanos o de pollo. El segundo tipo es resistente a L-fucosa, sensible a D-manosa y no requiere de Ca⁺⁺ para la actividad hemaglutinante; ésta se encuentra entre el biotipo El Tor y se detecta tanto en cultivos líquidos como en placas de agar con eritrocitos de pollo o humanos. El tercer tipo es resistente tanto

a L-fucosa como a D-manosa; se encuentra distribuida entre ambos biotipos y se detecta en cultivos líquidos usando eritrocitos de pollo.⁵⁵

La flagelina del flagelo polar de muchas especies de *Vibrio* muestra determinantes antigénicos comunes. El flagelo lateral presente en algunos vibrios son antigenicamente distintos de sus flagelos polares.

Vibrio cholerae se divide en base a sus antígenos O. Se utilizan dos esquemas que tipifican el antígeno O, uno con 60 serotipos (Sakazaki, 1970; Shimada y Sakazaki, 1977) y el otro con 72 serotipos (Smith, 1979). Indudablemente hay más serotipos, ya que únicamente cerca del 60% de las cepas se han tipificado hasta el momento. El serogrupo O1 es el mismo en ambos esquemas y dentro de éste caen todas las cepas responsables del cólera epidémico o pandémico. Usando sueros tipificantes, el serogrupo O1 se divide en subtipos Ogawa e Inaba, se ha propuesto el subtipo Hikojima pero se requiere trabajos adicionales para establecer su existencia.²⁷

El serogrupo O1 contiene los biotipos El Tor y Clásico. Se emplean tres factores antigénicos, A, B, y C, para subdividir el O1 en los respectivos serotipos Ogawa (A, B), Inaba (A, C) e Hikojima (A, B, C). Puede ocurrir conversión entre estos serotipos tanto en animales de experimentación como en la infección natural. La conversión serológica parece estar relacionada con la aparición de anticuerpos aglutinantes en el suero.

Estudios de la composición química del lipopolisacárido de *V. cholerae*, *V. metschnikovii*, y *V. fluvialis* han demostrado que no tienen el ácido 2-ceto-3-desoxi-octanoato en su polisacárido central. Este es similar al de *Aeromonas* y *V. parahaemolyticus* pero difiere de la mayoría de otras bacterias Gram negativas. Como el LPS de otros microorganismos, el de *V. cholerae* contiene lípido A, una región central de polisacáridos y cadenas laterales O específicas de oligopolisacáridos, que son responsables de las diferencias antigénicas entre las especies.⁵⁴

Vibrio parahaemolyticus se serotipifica con base en sus antígenos O y K. El esquema de tipificación serológica incluye 11 antígenos O numerados y 55 antígenos K numerados. El antígeno O se determina primero por aglutinación en portaobjetos con un antígeno calentado en autoclave. El antígeno K se determina luego por aglutinación en portaobjetos con una suspensión sin calentar.²⁸

2. *Vibrio cholerae* O1.

La séptima pandemia de cólera El Tor comenzó en las islas Célebes en 1961, se diseminó a través de Asia en la década de los sesenta, y después al medio oriente en 1970. En Agosto de ese mismo año, se localizó el primer caso africano dentro de Guinea. La consiguiente epidemia, con más de 150,000 casos y 20,000 muertes se diseminó rápidamente sobre la costa occidental y el interior siguiendo rutas comerciales y de pesca.

Vibrio cholerae O1 llegó a Perú en Enero de 1991, causando más de 200,000 casos y 1,500 muertes en 6 meses. El arribo de la enfermedad ya pandémica, a Ecuador, Colombia, Brasil, Chile, México, Guatemala y El Salvador, es preocupante puesto que puede diseminarse más y persistir.

Modos de transmisión del cólera

La transmisión del cólera se ha asociado con migraciones, alimentos, brotes hospitalarios y hábitos culturales como consecuencia de la contaminación fecal-oral.

Asociado con migraciones: Las migraciones, movimientos de nómadas, comerciantes y viajeros infectados, ayudan a establecer focos de cólera en nuevas áreas donde la persistencia de la enfermedad no se podría predecir. Infecciones asintomáticas y casos leves o moderados de diarrea, pueden ser más numerosos que los casos severos, en relación de 100 a 1; particularmente donde la enfermedad es endémica. Medidas de salud pública destinadas a controlar el movimiento de personas infectadas (cuarentenas y cordones sanitarios) no son efectivos porque la mayoría de los viajeros infectados son probablemente asintomáticos.

Transmisión por alimentos: Las investigaciones demuestran que el cólera se puede transmitir por agua y alimentos como cangrejos, calamares y moluscos bivalvos (ostras, almejas). Algunas estrategias que se requieren para prevenir la transmisión de cólera por alimentos marinos, incluye el completo cocimiento y prohibición del consumo de pescado crudo capturado en agua contaminada con *V. cholerae*. Los alimentos de vendedores ambulantes también están asociados con el cólera, los vibrios pueden permanecer viables por varios días en los alimentos y aún sobrevivir a calentamientos de 60°C. Alimentos con pH ácido pueden

inhibir la transmisión de cólera.

Un inóculo de 10^8 *V. cholerae* O1, biotipo Clásico, es necesario para la infección y se requiere de una concentración mínima para la transmisión por agua. La dosis infectante para el biotipo El Tor es de 10^5 y se reduce a 10^3 si el inóculo es amortiguado contra el ácido gástrico con bicarbonato o por la presencia de alimento.

Hábitos culturales: Algunas prácticas funerarias pueden contribuir a la diseminación de la enfermedad, por ejemplo, las mujeres que preparan el cuerpo, también preparan alimentos para los parientes del fallecido, colaborando con la dispersión de *V. cholerae*.

Diseminación hospitalaria: En los hospitales, el modo de contagio puede ser a través de la repartición de los alimentos, agua y por contacto de persona a persona.

Estrategias para el control del cólera

Algunas estrategias para controlar el cólera son la quimioprofilaxis y la vacunación.

Quimioprofilaxis: En la década de los sesenta, el tratamiento con tetraciclina demostró una disminución en la duración y volumen de diarrea, así como en la excreción de *V. cholerae* O1. Se recomienda la tetraciclina como tratamiento profiláctico para prevenir el cólera por contagio familiar. Esto es costeable cuando existe una alta probabilidad de contagio (15-25%) o seleccionando al individuo más expuesto por ejemplo, madres de niños con cólera. El tratamiento en masa con antibióticos es inefectivo porque conduce al surgimiento de microorganismos resistentes y no puede recomendarse.

Vacunación: El uso comercial de la vacunación por vía parenteral lo ha descartado la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) porque las vacunas sólo son modestamente efectivas y no impiden infecciones asintomáticas. Además, durante la vacunación en zonas epidémicas se adquiere un falso sentido de seguridad y hace que se olviden medidas de control más importantes como son el tratamiento de agua potable, cuidado de pacientes e investigación de otras fuentes de contagio.

Impacto socioeconómico

La actual pandemia de *V. cholerae*, El Tor se ha introducido en aproximadamente 100 países, en algunos ha llegado a ser epidémico mientras que en otros no. Aquellos países donde la introducción del cólera no causa problemas epidémicos (Australia, Portugal, Italia, y USA), presentan buenas condiciones sanitarias, agua limpia y, si acaso, bajos índices de enfermedades diarreicas en niños; en otros, se tienen limitados los vehículos de transmisión y focos endémicos debido a la ausencia de ecosistemas acuáticos disponibles para la supervivencia de la bacteria a largo plazo. El cólera es endémico en otras áreas y se asocia con patógenos entéricos comunes que se adquieren por la vía fecal-oral. Aquellas áreas de América Latina con mayores problemas sanitarios, pobreza y desorganización social que reflejan un alto índice de mortalidad en diarreas infantiles, pueden esperar un mayor impacto con el cólera. El establecimiento de la enfermedad dependerá de la facilidad con que la contaminación fecal ocurra en suministros de agua y alimentos. La llegada de *Vibrio cholerae* en un país trae problemas políticos y económicos. El turismo internacional junto con las exportaciones de alimentos marinos y productos agrícolas se ven afectados.¹⁷

En México, el cólera observa un desarrollo epidémico en ascenso según las cifras de su distribución por edad y sexo. A las altas tasas de infecciones intestinales existentes se agrega el cólera, que asociado al crecimiento y pobreza económica, afecta las condiciones de vida de las clases desposeídas. El desarrollo epidémico y endémico del cólera en México se determina por parámetros geoeconómicos del país, que conduce a que entidades federativas con menos recursos económicos, menor nivel educativo y servicios de salud pública, tengan mayor riesgo y amenaza de convertirse en zonas endémicas de la enfermedad, es decir que permanezca por mucho tiempo y sea de difícil erradicación.^{30,32}

Patología por *Vibrio cholerae* O1

V. cholerae serogrupo O1 está bien adaptado al tracto intestinal humano. La gran mayoría de cepas proviene de las heces humanas debido a infecciones intestinales, sólo unos pocos aislamientos son extraintestinales. La toxina colérica que origina el cólera clínico se encuentra entre los principales factores

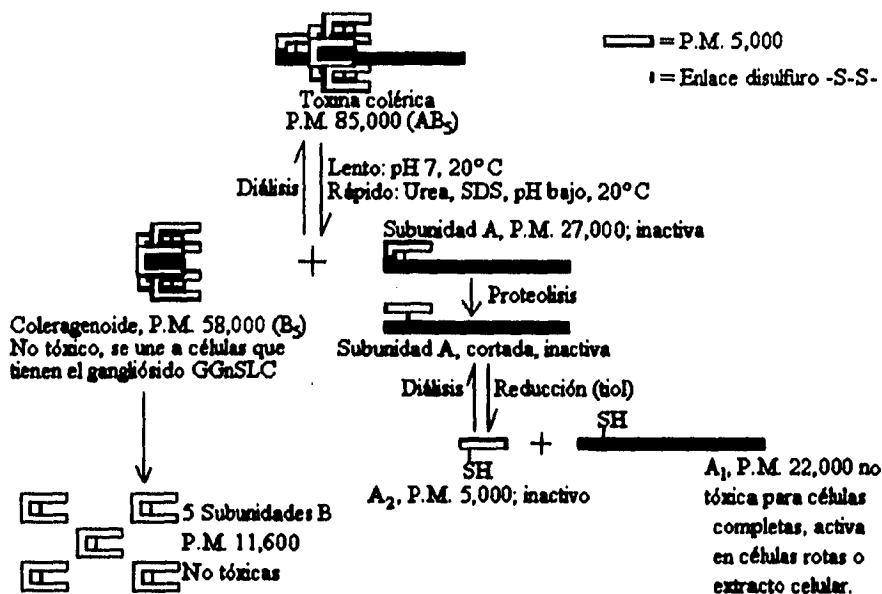
de virulencia provocados por este microorganismo.

El cólera es una enfermedad diarreaica aguda tan severa que un paciente puede perder hasta 30 litros de agua al día por evacuaciones, la muerte se presenta como resultado de la deshidratación. El gen de la toxina colérica reside dentro de los cromosomas de ambos biotipos y serotipos. La toxina del cólera causa diarrea al estimular la salida de Cl^- y HCO_3^- de las células cripticas inmaduras, e inhibir la absorción de Na^+ acoplado con Cl^- por células maduras del borde en cepillo de las vellosidades del intestino delgado. Aquella acción sigue como consecuencia de un incremento en la elaboración de adenosin-3':5'-monofosfato cíclico (AMP-cíclico) que resulta de estimular la enzima adenilato ciclasa (AC) por la toxina colérica. La toxina actúa sobre todas las células eucarióticas que contienen AC, y el gangliósido G_{M1} .

La toxina del cólera (CT) es un complejo proteico (P.M. = 85,000) formado por dos protómeros, estos se mantienen unidos por enlaces no covalentes (enlaces de hidrógeno, iónico, interacciones hidrofóbicas, y fuerzas de Van der Waals). Al romperse los enlaces que unen los protómeros se origina un protómero A (P.M. = 27,000) y un protómero B (P.M. = 58,000) conocido como "coleragenoide"; éste último es biológicamente inerte e inmunológicamente casi idéntico a la holotoxina. El protómero B puede bloquear el efecto tóxico de la toxina colérica al unirse a receptores específicos sobre la superficie celular e interferir con la adhesión de la toxina completa. El protómero A incluye dos cadenas polipeptídicas, que se mantienen juntas a través de un enlace peptídico y un enlace sulfhidrilo. El enlace peptídico se corta usualmente por proteólisis natural y el sulfhidrilo por reducción a tiol para producir una cadena polipeptídica corta A_2 (P.M. = 5,000) y otra larga A_1 (P.M. = 22,000). El péptido A_1 se genera después que el protómero A penetra o cruza la membrana plasmática; la reducción del enlace disulfuro puede ocurrir dentro de la membrana por una proteína disulfuro:tiol oxidorreductasa o en el lado citoplásmico de la membrana por glutatión. El protómero B existe como un agregado de cinco cadenas polipeptídicas idénticas (P.M. = 11,600) en forma de anillo, con el protómero A centrado en el canal formado por los polipéptidos del protómero B; así, el péptido A_1 probablemente descansa abajo del plano del anillo formado por los polipéptidos del protómero B y es atado a éste a través del péptido A_2 (Figura 5).

Figura 5.

Estructura de la toxina colérica.⁵²



La actividad biológica de la toxina colérica reside en el polipéptido A₁; éste es una enzima que puede catalizar (i) la hidrólisis de NAD a ADP-ribosa y nicotinamida y (ii) la transferencia de ADP-ribosa de NAD a componentes guanidínicos como arginina y otras proteínas. La función del coleragenoide es unir la toxina a la membrana celular a través de una unión pentavalente, en donde cada uno de los cinco sitios de adhesión están asociados con los cinco polipéptidos del protómero B que se adhieren a una cadena oligosacáridica y así permiten la entrada del componente activo A₁ dentro de la membrana celular por la interacción de regiones hidrofóbicas en el protómero A con la bicapa lipídica. El receptor de membrana que reconoce y une la parte del coleragenoide de la toxina colérica, se ha identificado como un

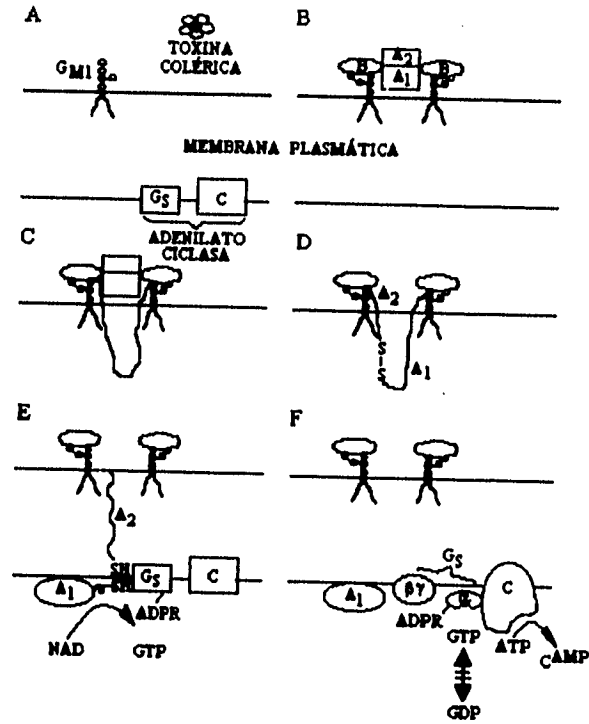
monosialosilgangliósido (GGnSLC) estable a la sialidasa (neuraminidasa), generalmente conocido como G_{M1} , este gangliósido es móvil en el plano de la membrana; lo cual facilita la adhesión pentavalente del protómero B. Las células que no contienen este gangliósido no son susceptibles a la acción de la toxina.

El mecanismo a través del cual la toxina colérica activa la adenilato ciclasa, involucra a la proteína llamada G_s que es el componente regulador estimulador, que se acopla al componente catalítico de la adenilato ciclasa. Este es un compuesto heterotrímico formado de subunidades alfa, beta y gamma. G_{s-alfa} es la subunidad que se une a nucleótidos de guanina, tiene actividad GTPasa, y es ADP ribosilada por el protómero A_1 en un residuo de arginina. Esta modificación estabiliza la proteína en su forma activa "atada a GTP" e inhibe su actividad GTPasa. Así, la modificación que sufre G_{s-alfa} activa persistentemente la subunidad catalítica de adenilato ciclasa ya que la reacción de hidrólisis de GTP a GDP es inoperante (Figura 6).^{14,52}

El gen de la toxina colérica está flanqueado por elementos genéticos repetidos llamados RSI (secuencia de inserción repetida) responsables del rearreglo del ADN, que causa supresión, duplicación o amplificación del gen de la toxina. El RSI puede ocasionar cepas de *V. cholerae* O1 no productoras de toxina. Además, el RSI contiene un sistema recombinante sitio-específico capaz de convertir cepas no toxigénicas a toxigénicas con alta frecuencia. Tal conversión parece ocurrir en la naturaleza y sería prudente inactivar el sistema replicación-recombinante de cepas vivas atenuadas, para asegurar que éstas no adquieran del intestino o en el ambiente, genes tóxicos de otro microorganismo enterotoxigénico.⁴⁹

Figura 6.

Mecanismo de acción de la toxina colérica.¹⁴



3. *Vibrio cholerae* no O1.

Vibrio cholerae no O1 es bioquímicamente indistinguible de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y, a diferencia de éste último, no aglutina con suero anti-O1, no causa cólera (se han reportado casos esporádicos) y raramente provoca brotes de enfermedades diarreicas.⁴⁰

Hábitat

Las cepas de *V. cholerae* no O1 se han aislado de pacientes con diarrea en todo el mundo. Estos microorganismos son parte de la flora bacteriana normal de las costas de agua cálida, estuarios y raramente de aguas del interior, donde el microorganismo puede ser nativo, especialmente si son aguas salobres (Na^+ , mayor o igual a 5 mmol/L).

El serogrupo no O1 de *V. cholerae* se ha aislado del Atlántico, Pacífico, y la costa oriente de EE.UU. desde el Golfo de México hasta Cape Cod; de esta área se han reportado la mayoría de las infecciones junto con unos pocos casos procedentes de aguas frías de la costa oeste.

La mayoría de las vibriosis ocurren durante los meses calurosos y en verano, cuando el número de vibrios en los estuarios y áreas de cosecha de mariscos son muy altos.^{13,38,40.}

Mecanismos de transmisión

En años recientes, se han incrementado los reportes de infecciones entéricas por *Vibrio cholerae* no O1 en los EE.UU., éstas se asocian con viajes, exposición al agua de mar o ingestión de alimentos marinos (principalmente mariscos).⁴⁰

V. cholerae no O1 es frecuentemente aislado de mariscos, por ejemplo, en las ostras. Un estudio realizado por la Administración de Alimentos y Drogas de los EE.UU. muestra el aislamiento de *V. cholerae* no O1 a partir de ostras crudas, en 111 (14%) de 790 muestras investigadas.¹⁸

Zafari y colaboradores reportan que los peregrinos iraníes que retornaban de Arabia Saudita, un

área endémica para *V. cholerae* no O1, a menudo portaban al microorganismo en sus evacuaciones, pero eran asintomáticos. En los siguientes 12 meses, se monitorearon los contactos de pacientes que tenían este microorganismo identificándose casos secundarios de diarrea o infecciones intestinales asintomáticas, mediante series de coprocultivos. El número de casos secundarios aumentó gradualmente en los primeros seis meses, lo cual sugiere, que los pacientes llevan al microorganismo por períodos prolongados. El aislamiento de *V. cholerae* a partir de bilis de pacientes sin diarrea, presupone que algunos individuos son portadores crónicos en el tracto biliar, como ocurre con el serogrupo O1. Otros pacientes desarrollaron enfermedades intestinales más severas y un número importante necesitó hospitalización y administración de fluido intravenoso.⁴⁰

En el verano de 1988 muchos casos de enfermedades entéricas por *V. cholerae* no O1 fueron importados por gente que retornaba a Kuwait después de pasar sus vacaciones en áreas endémicas, como la India y Bangladesh. Se identificaron cinco casos en el laboratorio del hospital Al-Adan, dos de los pacientes no viajaron al extranjero, y es probable que ellos se infectaran por un contacto en Kuwait.¹¹

Control de *Vibrio cholerae* no O1

Las vibriosis a menudo son seguidas por baños en agua de mar y manipulación o ingestión de alimentos marinos. Por tanto, el desconche de ostras y algunos otros mariscos se debe realizar con cuidado, y es preferible comer productos marinos bien cocidos. La buena higiene en los alimentos evita contaminación y multiplicación de estos patógenos y es importante tanto en este grupo de alimentos como en otros.¹³

Patología por *Vibrio cholerae* no O1

Las cepas de *V. cholerae* no O1 tienden a incrementarse y ser reconocidas como el agente etiológico de enfermedades diarreicas en humanos. El espectro clínico incluye infecciones leves, autolimitadas, así como severas deshidrataciones diarreicas y disentería. Menos comunes pero dramáticas en apariencia, son

las infecciones extraintestinales, que comprenden infección de heridas y septicemias primarias.¹⁸

Infecciones gastrointestinales

La gastroenteritis ocurre por acción coordinada de numerosos factores virulentos; sin embargo, ninguno es codificado por plásmidos (los plásmidos son raros en *V. cholerae*). La diarrea es consecuencia de varios eventos, la motilidad y la quimiotaxis se emplean para penetrar en el moco que cubre el intestino delgado; proteasas, DNAasas, y neuraminidasas degradan esta mucosidad; hemaglutininas y pili facilitan la adherencia a las células del epitelio intestinal, lo cual permite la colonización y eficaz liberación de las toxinas entéricas.

Varias toxinas están involucradas en la patogenicidad. Algunas cepas producen una enterotoxina marcadamente parecida a la colérica; otras producen la enterotoxina termoestable (NAG-ST) y también se han hallado cepas con una hemolisina (NAG-rTDH) que es biológica e inmunológicamente similar a la hemolisina termoestable directa de *V. parahaemolyticus*. Estas toxinas son responsables de los diferentes síntomas presentes en la gastroenteritis.⁶

Factores de virulencia

Hemaglutininas: Estudios efectuados con *V. cholerae* serogrupo O1, no O1 y *V. parahaemolyticus* involucran hemaglutininas bacterianas como factores de adherencia celular. Lo anterior se manifiesta al llevar a cabo experimentos en donde cepas bacterianas crecidas durante 3 horas a 37°C, muestran índices elevados de hemaglutininas (HA) y adherencia, mientras el crecimiento durante 20 horas a 37°C produce disminución en ambos índices.^{34,35}

Pili o fimbrias: Los pili de muchas bacterias patógenas se han identificado como factores de colonización. *V. cholerae* no O1, aislado de pacientes con diarrea del viajero, poseen pili en sus superficies y éstos se asocian estrechamente con la hidrofobicidad bacteriana (tanto la hidrofobicidad como la morfología de los pili son estables a 60°C durante 15 minutos). Ya que los pili de *Escherichia coli*

enterotoxigénica sirven como factores de colonización y se relacionan con una alta hidrofobicidad, por analogía, Honda y colaboradores postularon que los pili de *V. cholerae* no O1 explican, en parte, su papel como factores de colonización y virulencia.¹⁹

Se han purificado y caracterizado pili de *V. cholerae*. La subunidad proteica de los pili descritos por Taylor y colaboradores tiene un peso molecular de 20,500 Daltons y claramente se identificaron como factores de colonización.³⁴

Proteínas de membrana externa: Las proteínas de superficie celular juegan un papel importante en la adhesión intestinal y subsiguiente proceso de colonización por *V. cholerae*. El descubrimiento de que los anticuerpos contra proteínas de membrana externa (PME) pueden inhibir, al menos en parte, la adherencia intestinal, apoya esta consideración. Algunas PME críticas para la adherencia son inmunogénicas y probablemente comunes [36 y 20-25 kilodaltones (KD)] indiferentemente del biotipo, serogrupo y serotipo. Las PME del serogrupo O1 y no O1 muestran algunas diferencias; la mayor PME de la cepa no O1 estuvo cerca de los 38 KD, mientras que para la cepa O1 fue de 43 KD. Sin embargo, la incapacidad del suero anti-PME para inhibir completamente la adherencia intestinal de *V. cholerae* indica el posible involucramiento de componentes no-PME en la adhesión.⁴⁸

Hemolisina termolábil (El Tor): Muchas especies de *Vibrio cholerae* no O1 y El Tor producen una hemolisina soluble. Esta proteína se encuentra en el espacio periplásmico y en el medio extracelular de cepas productoras de hemolisina (Hly⁺) y son excretadas activamente. Las hemolisinas de los vibrios El Tor y no O1 son biológica e inmunológicamente indistinguibles, mientras una segunda hemolisina, distinta de la del biogrupo El Tor, es producida por cepas del biogrupo Clásico.

La hemolisina (regulada por la concentración de hierro en el ambiente) lisa eritrocitos de numerosas especies animales para incrementar el nivel de hierro disponible en el hospedero, vía lisis de eritrocitos y subsiguiente liberación de hemoglobina. Sin embargo, enfermedades idénticas pueden ser producidas por cepas Hly⁺ y Hly⁻.

Es importante en la patogénesis, la citotoxicidad de las hemolisinas hacia las células del epitelio intestinal debido a la liberación de hemo intracelular o ferritina para uso de *V. cholerae* durante su crecimiento. La diarrea con sangre debido a varias cepas del serogrupo no O1, demuestra la presencia de

hemolisinas que liberan hemoglobina utilizable por el microorganismo como fuente de hierro.³⁴

Vibriobactina: La vibriobactina es un sideróforo tipo catecol, el cual se une al hierro con gran afinidad, en respuesta a un ambiente que contiene poco hierro libre. Los sideróforos se han señalado como factores de virulencia; éstos funcionan incrementando el hierro elemental esencial para especies patógenas, la mayor parte del hierro en el cuerpo es intracelular y la pequeña cantidad extracelular se une a la transferrina o lactoferrina. El establecimiento de la infección bacteriana involucra la competencia con el hospedero para la adquisición de hierro. El sideróforo puede removerlo directamente de la transferrina. Un represor parecido a Fur (proteína que une hierro reprimiendo la síntesis de sideróforos) regula la expresión de vibriobactina y hemolisina. La utilización de hemina y hemoglobina como única fuente de hierro es independiente de la vibriobactina. Esto sugiere que además del transporte de hierro por la vibriobactina, existe un mecanismo alternativo para adquirir este nutriente. La producción de hemolisina y vibriobactina son beneficios para *V. cholerae* durante el establecimiento de la infección, a condición de que haya mecanismos cooperativos o alternativos para obtener hierro del hospedero.⁵⁰

Esterotoxina termoestable (NAG-ST): La enterotoxina termoestable (NAG-ST) producida por *V. cholerae* no O1 es un factor de virulencia que origina enfermedades diarreicas.

El gen que codifica la enterotoxina termoestable es cromosómica y da un producto de 78 aminoácidos, con un peso molecular igual a 8.814 KD. Los primeros 18 aminoácidos del grupo NH₂ terminal son hidrofóbicos, sugiriendo que esta región del polipéptido actúa como señal de secuencia para la toxina. Los últimos 17 aminoácidos del grupo carboxilo terminal del precursor, corresponden a la toxina proteica activa NAG-ST.³⁷

La enterotoxina termoestable es soluble en metanol y se clasifica entre las toxinas termoestables activas en ratón lactante designadas como ST. Las propiedades biológicas, inmunológicas y los aminoácidos constituyentes de la toxina son marcadamente similares a las enterotoxinas termoestables presentes en *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Yersinia enterocolitica*.⁵¹

Infecciones extraintestinales

V. cholerae serogrupo no O1 posee un espectro más amplio de enfermedades que el serogrupo O1. Las cepas no O1 se han aislado principalmente en pacientes con heridas infectadas y en septicemias. El microorganismo también se aisló de pacientes con celulitis, meningitis, otitis media y neumonía.¹²

Infecciones del tejido blando: *V. cholerae* no O1 puede producir varias toxinas extracelulares incluyendo citolisinas, que son tóxicas en cultivo de tejidos y letales cuando se inyectan en ratones. La actividad citolítica es importante en la patogénesis del tejido blando, y también juega un papel en el desarrollo de lesiones tisulares e inflamación.⁷

Bacteremias: *V. cholerae* no O1 causa bacteremias, usualmente por el consumo de alimentos marinos como ostiones (al parecer las bacterias son absorbidas del intestino). Pacientes inmunosuprimidos y/o con enfermedades subyacentes crónicas como cirrosis hepática y malignidades hematológicas, son particularmente susceptibles a contraer bacteremias por este microorganismo.

El hierro es necesario para el crecimiento bacteriano, y la capacidad para obtener hierro del hospedero es esencial para la patogenicidad. Por lo tanto, alteraciones en el metabolismo del hierro pueden, al menos en parte, explicar el incremento de virulencia bacteriana en individuos cirróticos.

Las bacteremias pueden complicarse originando septicemias y hasta la muerte (la mortalidad es de 61.5%).^{11,39,53,21}

Cistitis: Infecciones del tracto urinario provocadas por *V. cholerae* no O1 son infrecuentes pero pueden considerarse cuando ocurre cistitis después de exponerse al agua de mar, o esteros. La capacidad para originar infecciones del tracto urinario no es de sorprender, ya que se ha documentado su invasividad y capacidad para causar infecciones extraintestinales asociadas con exposición al agua de mar.¹²

4. *Vibrio parahaemolyticus*.

En Japón, donde se consume una gran variedad de productos marinos, *V. parahaemolyticus* se reconoce como un importante enteropatógeno que causa más del 70% de todos los casos de gastroenteritis

aguda.³ Lo aislaron inicialmente Fujino y colaboradores en 1950 de un brote de intoxicación alimentaria en donde murieron 20 de 270 víctimas. La enfermedad causada por este microorganismo está ampliamente distribuida por todo el mundo y es el resultado de manejos inadecuados en la preparación de alimentos marinos (falta de higiene y mal cocimiento). El frecuente aislamiento de *V. parahaemolyticus* a partir de intoxicaciones alimentarias en Japón, es mayor que el de otros enteropatógenos.³⁵

V. parahaemolyticus se encuentra en la naturaleza asociado con ambientes marinos (estuarios salobres y aguas costeras), alimentos del mar (pescado, almejas, ostras, cangrejos) y plancton. En verano puede ser aislado de medios acuáticos.⁴¹

En la costa oeste de los EE.UU. y México surgió un nuevo biotipo de *V. parahaemolyticus* que hidroliza la urea (ureasa positiva), pero fuera de eso, exhibe rasgos clásicos de la cepa tipo. Además, pacientes que presentan gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* ureasa positiva en California, EE.UU., albergan el serogrupo O4:K12. El historial alimenticio indica que los individuos infectados con dicho serogrupo, ingirieron mariscos antes de la infección, principalmente ostras; y dos viajaron a México. Ninguno de los aislamientos se relacionó temporal o geográficamente. Sin embargo, se sospecha que los mariscos de cultivos locales (California, EE.UU.) o aquellos recibidos de la costa oeste (Washington, EE.UU. y México) son el vehículo de transmisión de *V. parahaemolyticus*. En contraste, muchos otros aislamientos ureasa positiva y negativa se recuperaron de individuos que recientemente habían viajado al suroeste de Asia o México. Todas las cepas de *V. parahaemolyticus* O4:K12 asociadas con gastroenteritis en la costa oeste de los EE.UU. y México, son positivas para el fenómeno Kanagawa, que consiste en la presencia de la hemolisina termoestable directa y patogenicidad del organismo.¹

Un estudio efectuado en Columbia Británica, Canadá; demuestra que cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de infecciones extraintestinales en el noroeste del Pacífico (aislamientos locales) son ureasa negativa, Kanagawa negativo; aislamientos a partir de infecciones gastrointestinales adquiridos localmente presentan ureasa positiva, Kanagawa negativo; y aislamientos provenientes de diarreas del viajero están relacionadas con el fenotipo ureasa negativa, Kanagawa positivo. También ocho por ciento de los aislamientos ambientales locales muestran ureasa positiva y Kanagawa negativo. Aquellos hallazgos sugieren que la expresión del fenómeno Kanagawa no es esencial para la patogénesis de

V. parahaemolyticus y que la gastroenteritis por este microorganismo en el Noroeste del Pacífico se asocia con un biotipo ureasa positiva, Kanagawa negativo.²⁴

Patología por *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus se asocia principalmente con gastroenteritis provocadas por el consumo de alimentos marinos contaminados y secundariamente con infecciones extraintestinales adquiridas durante la exposición a ambientes marinos.²⁴

Infecciones gastrointestinales

Después de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* es el microorganismo más comúnmente recuperado de fuentes intestinales dentro del género *Vibrio*. La gastroenteritis originada por este microorganismo se caracteriza generalmente por diarrea, dolor abdominal, náusea y vómito.⁴⁹

El fenómeno Kanagawa, que causa hemólisis debido a una hemolisina termoestable directa (Vp-TDH) producida por *V. parahaemolyticus* sobre agar Wagatsuma, se cree que se asocia estrechamente con la enteropatogenicidad del microorganismo, por ejemplo, la mayoría de los aislamientos clínicos (96.5%) son Kanagawa positivo, mientras el 99% de los aislamientos ambientales son Kanagawa negativo. Así, la Vp-TDH se considera como una toxina estrechamente relacionada a la patogénesis de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la asociación del fenómeno Kanagawa con la patogénesis no se ha probado y estudios recientes presentan cepas Kanagawa negativo en el noroeste del Pacífico asociadas con infecciones gastrointestinales.^{1,3,20,24,56.}

El biotipo ureasa positiva de *V. parahaemolyticus* presente en la costa oeste de Norte América también está vinculado con gastroenteritis.^{1,24.}

Factores de virulencia

Pili: La colonización del intestino por enteropatógenos es un paso inicial en el proceso de gastroenteritis infecciosa aguda en donde la adherencia puede estar mediada por flagelos laterales, proteínas de membrana externa, proteínas capsulares, o pili.

Algunas cepas de *V. parahaemolyticus* han demostrado que sus pili actúan como factores de colonización, por ejemplo, en un estudio realizado con cepas de esta bacteria crecidas en caldo para evitar la influencia de flagelos laterales (producidos en medios sólidos), mostraron su adherencia mediada por pili a células intestinales. La adhesión se inhibe por el tratamiento de los microorganismos con anticuerpos anti-pili o bloqueando el receptor epitelial con pili purificados, también la inhibición de la adhesión celular se relaciona con la dosis de anticuerpos o pili.³⁵

Hemolisina termoestable directa (Vp-TDH): Los aislamientos clínicos de *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo producen una toxina proteica termoestable (Vp-TDH) con peso molecular igual a 45,000, punto isoeléctrico de 4.9, hemolítica, cardiopélica, y capaz de originar acumulación de fluido en el asa ileal ligada de conejo, causando al mismo tiempo cambios degenerativos (a diferencia de la toxina colérica). Esta toxina es bloqueada por un trisialosilgangliósido (SGGnSSLC) sensible a la sialidasa.^{20,52}

Hemolisina relacionada a Vp-TDH (Vp-TRH): Aislamientos clínicos de *V. parahaemolyticus* Kanagawa negativo producen una toxina inmunológicamente relacionada a la Vp-TDH llamada Vp-TRH. Esta toxina tiene las mismas propiedades biológicas que la Vp-TDH y muestra un 63% de homología entre sus aminoácidos. Estudios epidemiológicos señalan que todos los aislamientos clínicos producen alguna de aquellas dos toxinas, pero los aislamientos ambientales no producen ninguna, lo cual sugiere que ambas hemolisinas juegan un papel importante en la producción de gastroenteritis.⁴⁹

La Vp-TRH tiene un peso molecular aproximado de 48,000, está compuesta por dos subunidades, cada una de las cuales presenta un peso molecular de aproximadamente 23,000, lisa varios tipos de eritrocitos (camero, pollo y ratón), tiene actividad hemolítica que disminuye al calentar la toxina a 60°C o a una mayor temperatura durante 10 minutos, posee actividad letal en los ratones (mueren al cabo de 1 minuto después de ser inyectados con 10 microgramos de Vp-TRH purificada) y su punto isoeléctrico es de 4.6.²⁰

Blanco de adherencia en el intestino humano

V. parahaemolyticus y *V. cholerae* serogrupo O1 y no O1, muestran sitios adherentes comunes en la mucosa del intestino delgado. El moco secretado por células caliciformes de la mucosa intestinal es un blanco de adherencia primario para *V. cholerae* en infecciones humanas pero no para *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, el epitelio folicular linfoide del intestino humano, en particular las células M de las placas de Peyer, proporciona el mejor sitio de adherencia para *V. parahaemolyticus* así como para *V. cholerae*. Las células en borde de cepillo del yeyuno e ileon también son blancos de adherencia para estos microorganismos. La importancia que tienen las células M del folículo linfoide como blanco de adherencia para *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* O1 y no O1, radica en que la fagocitosis de los vibrios por las células M durante la colonización de la mucosa intestinal, inicia la respuesta inmune local controlando de esta manera la infección del intestino.^{55,56.}

Infecciones extraintestinales

Se han reportado aislamientos clínicos extraintestinales de *V. parahaemolyticus* en heridas infectadas, oídos, ojos, esputo, líquido sinovial, y sangre. Todas las infecciones de heridas involucran exposición previa al agua de mar.³

5. Otros vibrios de importancia clínica.

Vibrio mimicus: Este es un nuevo patógeno aislado de pacientes con diarreas en Bangladesh y de fuentes ambientales. Menos del 1% de los aislamientos ambientales y ligeramente más del 10% de los aislamientos clínicos producen una toxina parecida al cólera. El 25% de los aislamientos ambientales y el 74% de los aislamientos humanos inducen acumulación de líquidos en asa ileal de conejo. *V. mimicus* puede dividirse dentro de tres grupos con base en la producción de toxinas: (i) microorganismos que producen una enterotoxina termolábil inmunológicamente parecida a la toxina colérica, (ii) microorganismos que

producen una toxina parecida a la enterotoxina termoestable y (iii) microorganismos cuyos cultivos tienen alguna actividad característica de la toxina termolábil (por ejemplo, acumulación de líquidos en asa ileal ligada de conejo y factor de permeabilidad positiva) pero no son positivos para la prueba de ELISA utilizando G_{M1}.¹⁰

Vibrio alginolyticus: Este microorganismo no se ha asociado con diarrea, pero a menudo causa infecciones de heridas, oídos, ojos y también se ha aislado de esputo y quemaduras infectadas. La mayoría de los aislamientos clínicos provienen de heridas expuestas a los ambientes marinos y que llegan a infectarse.

Vibrio damsela: Se ha aislado de heridas infectadas en pacientes expuestos a ambientes marinos, pero tales infecciones parecen ser raras.

Vibrio fluvialis: Está asociado con casos esporádicos de diarrea en todo el mundo, y también es capaz de causar brotes diarreicos. La diarrea usualmente es líquida y puede estar asociada con vómito, dolor abdominal, y ocasionalmente severa deshidratación.

Vibrio cincinnatiensis: Este vibrio se aisló de sangre y líquido espinal de un paciente en Cincinnati. Otros cinco aislamientos clínicos se identificaron en la colección de cultivos del Centro para el Control de Enfermedades (C.C.E.), EE.UU.. Por tanto, el microorganismo puede causar infecciones humanas, pero tales infecciones son raras.

Vibrio hollisae: Este microorganismo causa diarrea en humanos, aunque la infección es rara y sólo 30 aislamientos se han reportado a la C.C.E..²⁸

V. hollisae es un patógeno humano no frecuente, asociado con ingestión de alimentos marinos que puede conducir a bacteremias. Comparte con *V. vulnificus* una predilección por la invasión del torrente sanguíneo en gente con anomalías hepáticas.⁴³

Vibrio metschnikovii: Esta bacteria se ha recuperado de sangre, orina y otras fuentes humanas. Parece que el microorganismo es capaz de originar infecciones humanas, pero ello ocurre muy raramente.²⁸

V. metschnikovii también se ha aislado en evacuaciones de un paciente con diarrea. Esta cepa bacteriana produce una citolisina cuyo peso molecular es de 50,000, tiene un punto isoeléctrico igual a 5.1, se inactiva por calentamiento a 60°C durante 5 minutos, lisa eritrocitos de varias especies animales (ternero,

conejo, cobayo, ratón, humano, cordero, pollo, y caballo) y células cultivadas (Vero y ovario de hámster chino), causa acumulación de líquidos en el intestino de ratón lactante e incrementa la permeabilidad vascular en piel de conejo.³¹

6. Vacunas y susceptibilidad antimicrobiana.

Vacunas: Propuestas recientes sobre el desarrollo de vacunas contra el cólera se enfocan en la inmunización oral. Lo anterior se deriva de estudios en voluntarios humanos en donde se muestra que las infecciones coléricas confieren 90 a 100% de protección contra subsecuentes contagios por serotipos homólogos o heterólogos, al menos por tres años (que es la duración que lleva la prueba).

La inmunidad contra la toxina colérica es importante en la protección contra el cólera; aunque la inmunidad antibacteriana lo es aún más. Esta conclusión se deriva de dos observaciones principales; primero, la inmunización con una sola dosis oral de cepas recombinantes no productoras de la subunidad A y B de la toxina colérica (A⁻B⁻), crea anticuerpos anti-vibrio pero no antitoxina y da protección en un 89%. Segundo, el resultado de probar dos vacunas coléricas inactivadas en Bangladesh muestra que la protección es mayor al combinar la inmunidad en contra de ambas, la toxina y la bacteria. La combinación de bacterias inactivas y de la subunidad B de la toxina, en la vacuna oral, proporciona significativamente una mayor protección (85% de eficacia en la vacunación) a diferencia de la vacuna oral con solo bacterias inactivas (58% de eficacia). Sin embargo, después de tres años, la protección conferida por las vacunas orales es virtualmente igual (cerca de 50%). La primera y segunda generación de cepas coléricas vacúnales preparadas con la metodología del ADN recombinante, están marcadamente atenuadas en comparación con la cepa virulenta de la cual proceden y además son incapaces de provocar diarreas severas, no obstante causan reacciones adversas en tan alto grado que ya se juzgaron inaceptables. La tercera generación de cepas recombinantes atenuadas, *V. cholerae* CVD 103 y CVD 103-HgR, es bien tolerada en voluntarios norteamericanos así como en tailandeses. Una vacuna colérica oral viva, puede conferir protección después de administrarla con apenas una sola dosis. CVD 103 es una cepa atenuada de *V. cholerae* O1, en donde los genes que codifican la subunidad A de la toxina colérica se suprimen por la técnica de ADN recombinante.

CVD 103-HgR es un derivado de CVD 103, en donde un gen que codifica resistencia a Hg²⁺ fue recombinado dentro del cromosoma en el locus hly A para proporcionar una marca que distinga la cepa vacunal de la silvestre. Aquellas cepas vacunales atenuadas por ingeniería genética son bien toleradas (no causan fiebre, diarrea, vómito, anorexia o dolor abdominal) y son altamente inmunogénicas; además, con una sola dosis, estas vacunas vivas orales proporcionan un alto nivel de protección contra ambos biotipos (Clásico o El Tor) o los serotipos (Inaba u Ogawa). Una de las ventajas de CVD 103-HgR sobre CVD 103 es que, con la primera, la excreción fecal disminuye significativamente lo cual minimiza la diseminación ambiental.^{23,45.}

Susceptibilidad antimicrobiana: La resistencia a los antibióticos es infrecuente en las especies de *Vibrio*, en comparación con especies de la familia *Enterobacteriaceae*. En casi todos los casos la resistencia es probablemente intrínseca en las diferentes especies, más bien que adquirida a través de transferencia de plásmidos. Una excepción a esta generalización es la resistencia a los antibióticos por algunas cepas de *V. cholerae*, que se han vuelto resistentes al adquirir factores R. La resistencia a polimixina B y colistina puede ser útil para detectar un cultivo del biogrupo El Tor, de *V. cholerae* o *V. vulnificus*. La mayoría de los aislamientos de *Vibrio* son susceptibles a trimetoprim-sulfametoxazol y norfloxacin.²⁸

Las especies del género *Vibrio* son sensibles a cloramfenicol, gentamicina, tetraciclina y algunas quinolonas. No obstante, unos cuantos aislamientos de algunas especies, particularmente *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, muestran resistencia inusual y múltiple a aquellas drogas, incluyendo cloramfenicol y tetraciclina.¹⁵

II. PARTE EXPERIMENTAL

A. Material y equipo.

Equipo utilizado en la investigación.

1. Balanza analítica "Sartorius" con capacidad máxima de 160 gramos y precisión de 0.01 miligramos.
2. Balanza granataria "OHAUS" con capacidad de 2 kilogramos y precisión de 0.1 gramo.
3. Incubadora con termostato (temperatura ajustada a 35°C).
4. Refrigerador con termostato (temperatura ajustada a 4°C).
5. Horno para esterilizar a 180°C.
6. Licuadora "Osterizer" de dos velocidades controladas por reostato (15,000 a 20,000 r.p.m.).
7. Microscopio Zeiss de 10X, 40X, 100X.
8. Olla express "Presto" con capacidad de 21 litros e indicador de presión (18 libras) y temperatura (124°C).
9. pH metro "CORNING" modelo 125.

Material empleado en el estudio.

1. Agitador magnético.
2. Asa de platino.
3. Cajas Petri desechables de 15 X 100 mm.
4. Espátulas.
5. Filtros millipore de 13 mm. y tamaño de poro de 0.45 micras.
6. Gradilla de metal
7. Matraces Erlenmeyer de 250 ml. de capacidad.

8. **Matraces Erlenmeyer de 500 ml. de capacidad**
9. **Mecheros Bunsen.**
10. **Mecheros Fisher.**
11. **Pinzas de disección de punta fina.**
12. **Pipetas graduadas de 0.1 ml.**
13. **Pipetas graduadas de 1 ml.**
14. **Pipetas graduadas de 5 ml.**
15. **Pipetas graduadas de 10 ml.**
16. **Porta filtro de plástico "Swinney" de 13 mm.**
17. **Porta objetos de 75 X 75 mm.**
18. **Probeta graduada de 100 ml.**
19. **Probeta graduada de 500 ml.**
20. **Tela de alambre con asbesto.**
21. **Tijeras.**
22. **Tripié de acero.**
23. **Tubos de ensayo de 12 X 75 mm.**
24. **Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.**
25. **Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.**
26. **Tubos de ensayo de 16 X 150 mm. con tapón de rosca.**
27. **Vaso de metal con tapa para licuadora (capacidad de 1000 ml.).**
28. **Vasos de precipitado de 150 ml**
29. **Vasos de precipitado de 250 ml.**
30. **Vaso de vidrio con tapa para licuadora (capacidad de 250 ml.).**

B. Medios de cultivo y reactivos.

1. **Caldo de enriquecimiento.**
 - a. **Caldo Gram negativo (GN).**
 - b. **Caldo tetracionato.**
 - c. **Caldo peptona alcalino (NaCl 1%).**

2. **Medios de aislamiento.**
 - a. **Agar eosina azul de metileno (EMB).**
 - b. **Agar *Salmonella-Shigella* (SS).**
 - c. **Agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (TCBS).**

3. **Medios para pruebas bioquímicas.**
 - a. **Medio de citrato de Simmons.**
 - b. **Medio de agar hierro de Kligler (KIA) y agar hierro triple azúcar (TSI).**
 - c. **Medio de sulfuro-indol-movilidad (SIM).**
 - d. **Medio de agar urea de Christensen.**
 - e. **Medio de agar lisina hierro (LIA).**
 - f. **Medio movilidad-indol-ornitina (MIO).**
 - g. **Medio de Clark y Lubs (Caldo Rojo de Metilo/Voges-Proskauer).**
 - h. **Medio de agar nutritivo (para realizar la prueba de oxidasa por el método de placa directa).**
 - i. **Medio de gelatina nutritiva para punción.**
 - j. **Medio de caldo base descarboxilasa de Moeller.**
 - k. **Medio caldo base rojo de fenol.**

4. **Reactivos.**

- a. **Reactivo de Kovacs.**
- b. **Reactivo rojo de metilo.**
- c. **Reactivo de Voges-Proskauer.**
- d. **Reactivo de Kovacs para prueba de oxidasa.**

C. Muestreo.

Los ostiones se obtuvieron en el Centro Distribuidor de Pescados y Mariscos también conocido como "La Viga", ubicado en el D.F. sobre Calzada de la Viga esquina Lorenzo Boturini, delegación Venustiano Carranza. Uno de ellos se abastece de ostiones de Sánchez Magallanes (Sistema lagunar Del Carmen-Machona), Tabasco, y el otro de la Laguna de Tamiahua, Veracruz.

Los ostiones desconchados, desde las regiones ostrícolas mencionadas se colocaron en bolsas de polietileno con agua helada, aproximadamente 2,000 ejemplares para su transporte a los diferentes centros de distribución, entre ellos está el mercado de "La Viga" donde son reenvasados.

La presentación final de los ostiones para su venta en "La Viga", es en frascos de vidrio con capacidad de 500 ml que contienen aproximadamente 36 ostiones y 350 mililitros de agua del envasaje inicial. Los frascos se ofrecen al público en tinas con hielo para mantener en buen estado el producto.

Para la elección de la muestra se toman en cuenta sus características organolépticas es decir, que no presenten maceración, que el agua de envasaje sea clara y, en general, que tenga un buen aspecto.

El muestreo se llevó a cabo los lunes y/o miércoles por la mañana e inmediatamente se transportó al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina en la U.N.A.M. para su análisis microbiológico. Las muestras no analizadas el día de adquisición, se conservaron a 4°C por no más de 24 horas.

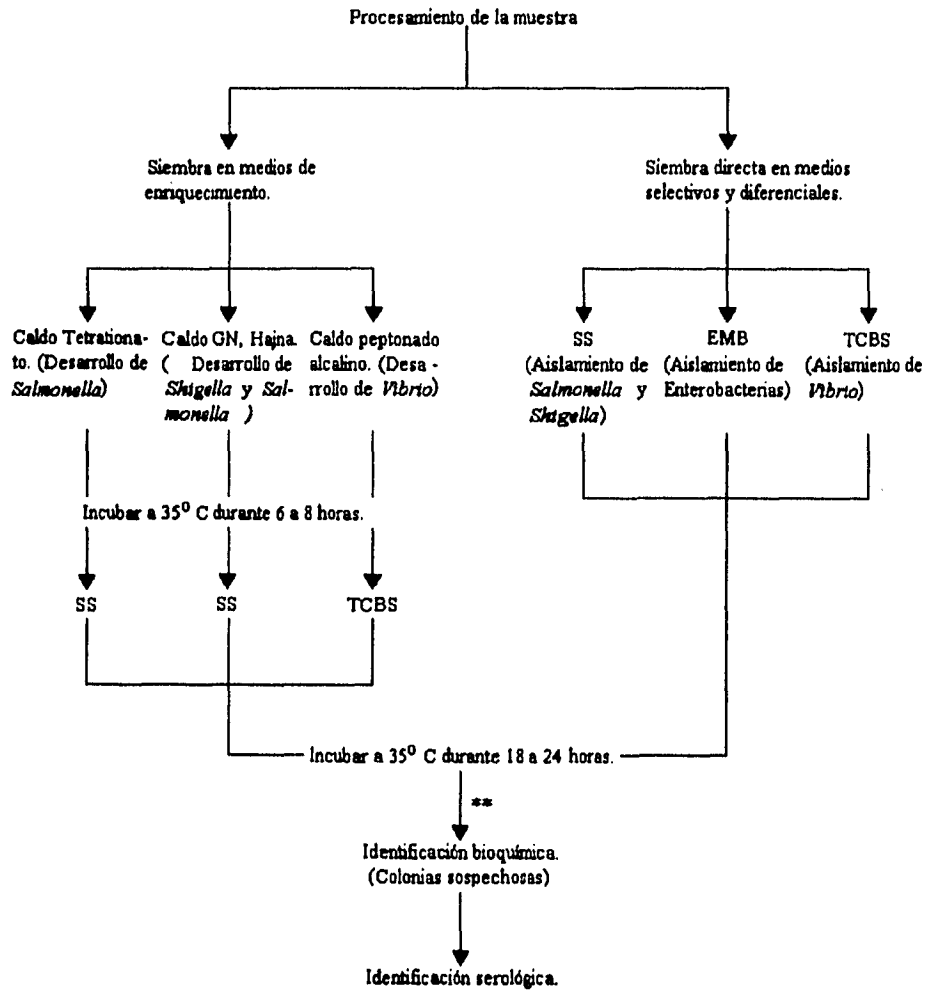
D. Método de aislamiento.

Las bacterias de importancia médica que contaminan a los ostiones se aislaron de acuerdo a la siguiente técnica (Diagrama 1).

1. Pesar 50 gramos de ostión en un vaso de precipitado estéril (250 ml) y adicionar 50 ml de agua con la que están envasados. La manipulación de los ostiones se efectúa en condiciones de asepsia, esto se logra al trabajar alrededor del área estéril que proporciona la llama del mechero y al utilizar instrumentos estériles.
2. Transferir el contenido del vaso de precipitado a un vaso estéril de licuadora con tapa y homogeneizar la muestra durante 2 minutos a 20,000 r.p.m.
3. Para favorecer el desarrollo de *Salmonella*, *Shigella*, y *Vibrio* inocular cada uno de los medios de enriquecimiento (caldo tetracionato, caldo Gram negativos "GN" y caldo peptona alcalino) con 1 ml del homogeneizado e incubar 6 a 8 horas a 35°C.
4. Sembrar directamente en medios selectivos y diferenciales (agar eosina-azul de metileno EMB, agar *Salmonella-Shigella* SS, agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa TCBS) 0.1 ml del homogeneizado e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas.
5. Después de haber incubado los medios de enriquecimiento, tomar de cada uno de estos una asada de la parte superior del caldo y sembrar en los respectivos medios selectivos (caldo tetracionato y GN en agar-SS; caldo peptona alcalino en TCBS). Incubar 18 a 24 horas a 35°C.
6. Observar las características macroscópicas y microscópicas de las colonias, así como su acción sobre los medios, para realizar una identificación preliminar de las diferentes bacterias aisladas.^{33, 36.}

Diagrama 1.

Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* de importancia médica.



SS = Agar *Salmonella-Shigella*.
EMB = Agar eosina azul de metileno.
TCBS = Agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa.
** = Observación microscópica.

E. Método de identificación.

1. Identificación bioquímica.

La clasificación de las enterobacterias y vibrios se basa en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas que guían el metabolismo de las bacterias a lo largo de una de las diversas vías que pueden detectarse a través de pruebas bioquímicas.

La identificación bioquímica se realiza, para toda colonia sospechosa aislada en medios selectivos y diferenciales, cuya morfología macroscópica (color, tamaño, forma, textura) e interacción con las sustancias que componen a los medios en los que desarrollan (nutrientes, amortiguadores, inhibidores, indicadores de pH), hace suponer que está constituida por bacterias patógenas; por ejemplo: colonias con brillo verde metálico en EMB pueden ser *Escherichia coli*; colonias mucoides en EMB presuponen la presencia de *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella* que no utilizan lactosa, producen colonias transparentes en SS y algunas especies de *Salmonella* dan colonias con centro oscuro por la producción de H₂S; en TCBS *V. cholerae* origina colonias amarillas por la fermentación de sacarosa, mientras que las colonias de *V. parahaemolyticus* son verdes (no fermentan sacarosa).

Antes de inocular los medios de cultivo para pruebas bioquímicas se efectúan observaciones microscópicas para verificar la pureza de la colonia y comprobar que se trata de bacilos Gram negativos con la morfología característica de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*.

Las bacterias del género *Vibrio*, además de ser Gram negativas presentan morfología microscópica de bacilos curvos o comas.

Identificación bioquímica para la familia *Enterobacteriaceae*.

La identificación bioquímica de las enterobacterias se hace por medio de catorce pruebas que incluyen: utilización de citrato, pruebas de fermentación (glucosa, lactosa, y sacarosa), producción de gas a partir de glucosa, H₂S, indol, movilidad, ureasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, pruebas de rojo de metilo, Voges-Proskauer y oxidasa; estas fueron suficientes para la identificación de la mayoría de los aislamientos a nivel de género y especie (Tabla 1). De este modo, mediante ocho medios de cultivo (citrato de Simmons, agar hierro de Kligler, agar hierro triple azúcar TSI, medio de sulfuro-indol-movilidad SIM, agar urea de Christensen, agar lisina hierro LIA, medio de movilidad-indol-ornitina MIO y medio de Clark y Lubs Caldo Rojo de Metilo/Voges Proskauer), se pueden obtener catorce reacciones.

La prueba de oxidasa es necesaria para la identificación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* ya que todos son oxidasa negativos; esta prueba se realiza en cultivos crecidos en placa de agar nutritivo, ya que la prueba puede dar reacciones falsas negativas si se realiza con colonias desarrolladas en medios selectivos-diferenciales.

Tabla 1.

"Características bioquímicas de *Enterobacteriaceae* clínicamente significativas." 28

Especie.	Reacción bioquímica.																		
	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LISINA	ORNITINA	ROJO DE MEILO	VOCES - PROSKAUER	OMDASA	CATALASA	GELATINASA	ARGININA	MANTOL	INOSITOL
<i>Citrobacter freundii.</i>	95	100	95	50	30	80	5	95	70	0	20	100	0	0	100	0	65	99	3
<i>Enterobacter gergoviae.</i>	99	100	98	55	98	0	0	90	93	90	100	5	100	0	100	0	0	99	0
<i>Escherichia coli.</i>	1	100	95	95	50	1	98	95	1	90	65	99	0	0	100	0	17	98	1
<i>Escherichia coli inactiva.</i>	1	100	5	25	15	1	80	5	1	40	20	95	0	0	100	0	3	93	1
<i>Escherichia fergusonii.</i>	17	100	95	0	0	0	98	93	0	95	100	100	0	0	100	0	5	98	0
<i>Escherichia hermannii.</i>	1	100	97	45	45	0	99	99	0	6	100	100	0	0	100	0	0	100	0
<i>Escherichia vulneris.</i>	0	100	97	15	8	0	0	100	0	85	0	100	0	0	100	0	30	100	0
<i>Escherichia blattae.</i>	50	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	100	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	98	100	97	98	99	0	0	0	95	98	0	10	98	0	100	0	0	99	95
<i>Klebsiella planticola.</i>	100	100	100	100	100	0	20	0	98	100	0	100	98	0	100	0	0	100	100
<i>Klebsiella ozaenae.</i>	30	100	50	30	20	0	0	0	10	40	3	98	0	0	100	0	6	100	55
<i>Proteus mirabilis.</i>	65	100	96	2	15	98	2	95	98	0	99	97	50	0	100	90	0	0	0

Cada número representa el porcentaje de positividad para la reacción bioquímica.

Tabla 1 (continuación).

Reacción bioquímica. Especie.	INDATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LINNA	ORNITINA	ROJO DE MEILO	VOCES - PROKALER	OXIDASA	CATALASA	GELATINASA	AMONIACA	MANTIL	NCBIOL
<i>Proteus vulgaris.</i>	15	100	85	2	97	95	98	95	95	0	0	95	0	0	100	91	0	0	0
<i>Salmonella typhi.</i>	0	100	0	1	0	97	0	97	0	98	0	100	0	0	100	0	3	100	0
<i>Salmonella choleraesuis.</i>	25	100	95	0	0	50	0	95	0	95	100	100	0	0	100	0	55	98	0
<i>Salmonella paratyphi A.</i>	0	100	99	0	0	10	0	95	0	0	95	100	0	0	100	0	15	100	0
<i>Salmonella cepas del subgrupo 3b.</i>	98	100	99	85	5	99	2	99	0	99	99	100	0	0	100	0	70	100	0
<i>Serratia marcescens, biogrupo 1.</i>	30	100	0	4	100	0	0	17	0	55	65	100	60	0	100	30	4	96	30
<i>Shigella boydii.</i>	0	100	0	2	0	0	25	0	0	0	2	100	0	0	100	0	18	97	0
<i>Shigella dysenteriae.</i>	0	100	0	0	0	0	45	0	0	0	0	100	0	0	100	0	3	0	0
<i>Shigella flexneri.</i>	0	100	3	2	2	0	50	0	0	0	0	100	0	0	100	0	2	95	0
<i>Shigella sonnei.</i>	0	100	0	2	2	0	0	0	0	0	98	100	0	0	100	0	2	100	0
<i>Yersinia enterocolitica.</i>	0	100	5	5	95	0	50	2	75	0	95	97	2	0	100	0	0	98	30
<i>Yersinia kristensenii.</i>	0	100	23	8	0	0	30	5	77	0	92	92	0	0	100	0	0	100	15

Cada número representa el porcentaje de positividad para la reacción bioquímica.

Identificación bioquímica para *Vibrio*

Los microorganismos del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos, facultativos y fermentan la glucosa. Las pruebas empleadas para identificar cultivos de enterobacterias se aplican también para las especies de *Vibrio*. Pero como la mayoría de los vibrios de interés clínico, son halófilos (requieren de NaCl para su desarrollo y expresión de sus rutas metabólicas que no se satisfacen con la cantidad de NaCl del medio ordinario), sólo *V. cholerae* y *V. mimicus* son halotolerantes, necesitan medios con NaCl al 1%.

Para clasificar a los vibrios de importancia médica, se requieren catorce pruebas como identificación, que corresponden a las utilizadas para identificar a las enterobacterias y cuatro pruebas complementarias (gelatinasa, arginina deshidrolasa, fermentación de manitol, fermentación de mio-inositol) para mayor seguridad (Tabla 3).

La prueba de oxidasa es de gran importancia en la identificación de la familia *Vibrionaceae* y muy en particular del género *Vibrio*, ya que todas las especies son oxidasas positivas, en contraste con las de la familia *Enterobacteriaceae*, que son oxidasas negativas. La única excepción es la especie *V. metschnikovii*, aunque es sumamente rara en muestras clínicas.

Las especies de *Vibrio* pueden dividirse en 6 grupos con base en sus requerimientos de Na, producción de oxidasa, reducción de nitrato a nitrito, fermentación de mio-inositol, producción de arginina deshidrolasa y lisina descarboxilasa (Tabla 2). El agrupamiento de los aislamientos por esta vía es un paso inicial útil en la identificación de *Vibrio*. Son necesarias pruebas bioquímicas adicionales para identificar los vibrios dentro de los 6 grupos.

Tabla 2.
Pruebas claves para dividir a las 12 especies de *Vibrio* de muestras clínicas en seis grupos. 28

Prueba. / Especie.	Grupo 1.		Grupo 2.	Grupo 3.	Grupo 4.	Grupo 5.			Grupo 6.				
	<i>V. cholerae.</i>	<i>V. mimicus.</i>	<i>V. metschnikovii.</i>	<i>V. cincinnatiensis.</i>	<i>V. hollisae.</i>	<i>V. damsela.</i>	<i>V. fluvialis.</i>	<i>V. furnissii.</i>	<i>V. alginolyticus.</i>	<i>V. parahaemolyticus.</i>	<i>V. vulnificus.</i>	<i>V. carchariae.</i>	
Crecimiento en caldo nutritivo.													
NaCl 0%.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NaCl 1%.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxidasa.			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
NO ₃ ⁻ a NO ₂ ⁻ .			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mio-Inositol fermentación.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arginina dihidrolasa.						-	+	+	+	-	-	-	
Lisina descarboxilasa.						-				+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa.						-							

Tabla 3.

"Características bioquímicas de especies de *Vibrio* que son encontradas en muestras clínicas humanas." 28

Reacción bioquímica. Especie.	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LENA	ORNITINA	ROJO DE METILO	VOGES - PROSKAUER	OXIDASA	CELULOSA	ARABINA	MANITOL	INOSITOL
<i>Vibrio cholerae.</i>	97	100	0	7	100	0	99	99	0	99	99	99	75	100	90	0	99	0
<i>Vibrio mimicus.</i>	99	100	0	21	0	0	98	98	1	100	99	99	9	100	65	0	99	0
<i>Vibrio metschnikovii.*</i>	75	100	0	50	100	0	20	74	0	35	0	96	96	0	65	60	96	40
<i>Vibrio cincinnatiensis.*</i>	21	100	0	0	100	0	8	86	0	57	0	93	0	100	0	0	100	100
<i>Vibrio hollisae.*</i>	0	100	0	0	0	0	97	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
<i>Vibrio damsela.*</i>	0	100	10	0	5	0	0	25	0	50	0	100	95	95	6	95	0	0
<i>Vibrio fluvialis.*</i>	93	100	0	3	100	0	13	70	0	0	0	96	0	100	85	93	97	0
<i>Vibrio furnissii.*</i>	100	100	100	0	100	0	11	89	0	0	0	100	0	100	86	100	100	0
<i>Vibrio alginolyticus.*</i>	1	100	0	0	99	0	85	99	0	99	50	75	95	100	90	0	100	0
<i>Vibrio parahaemolyticus.*</i>	3	100	0	1	1	0	98	99	15	100	95	80	0	100	95	0	100	0
<i>Vibrio vulnificus.*</i>	75	100	0	85	15	0	97	99	1	99	55	80	0	100	75	0	45	0
<i>Vibrio carchariae.*</i>	0	50	0	0	50	0	100	0	0	100	0	100	50	100	0	0	50	0

Cada número representa el porcentaje de positividad para la reacción bioquímica.

* = Microorganismos halófilos estrictos.

Todos los medios para pruebas bioquímicas contienen 1% de NaCl.

2. Identificación serológica.

Identificación serológica para *Salmonella*.

Se utilizan sueros anti-*Salmonella* "O" para la identificación de antígenos somáticos por la técnica de aglutinación en lámina, mientras que se emplean sueros anti-*Salmonella* "H" para antígenos flagelares por técnica de aglutinación en tubo.

La serotipificación de *Salmonella* se basa en la detección de componentes antigénicos específicos. Primero el microorganismo se reconoce por su composición antígeno-somática y después, se confirma por la identificación de sus antígenos flagelares.

Ocasionalmente, puede estar presente un tercer tipo de antígeno llamado Vi, éste es un antígeno somático envolvente, termolábil, que rodea la pared celular enmascarando el antígeno somático e impide la aglutinación con el suero anti-*Salmonella* O.

El principio de la identificación serológica para *Salmonella* involucra una reacción antígeno-anticuerpo del microorganismo con el suero inmune. Si el suero contiene anticuerpos para el antígeno presente en el microorganismo, ocurre una rápida aglutinación (para la serología se puede tomar el microorganismo directamente de agar hierro triple azúcar).

El siguiente procedimiento se usa para la tipificación serológica de *Salmonella*.

1. Colocar una gota del suero anti-somático apropiado en el portaobjetos.
2. Transferir una gota de solución salina 0.85% al portaobjetos y mezclar con una asada del microorganismo.
3. Rotar el portaobjetos un minuto para mezclar ambas gotas evitando la evaporación excesiva.
4. Reportar la lectura antes de dos minutos.

Los antígenos más frecuentes son los del grupo somático B seguido del D y C₁. El procedimiento más eficiente para la identificación serológica de *Salmonella* es empleando suero anti-*Salmonella* O poli-grupos A y B (Diagrama 2) continuando con C, D, E, F, y G.

Cuando se obtienen reacciones negativas con sueros poli C, D, E, F, y G, el microorganismo no corresponde a *Salmonella*.

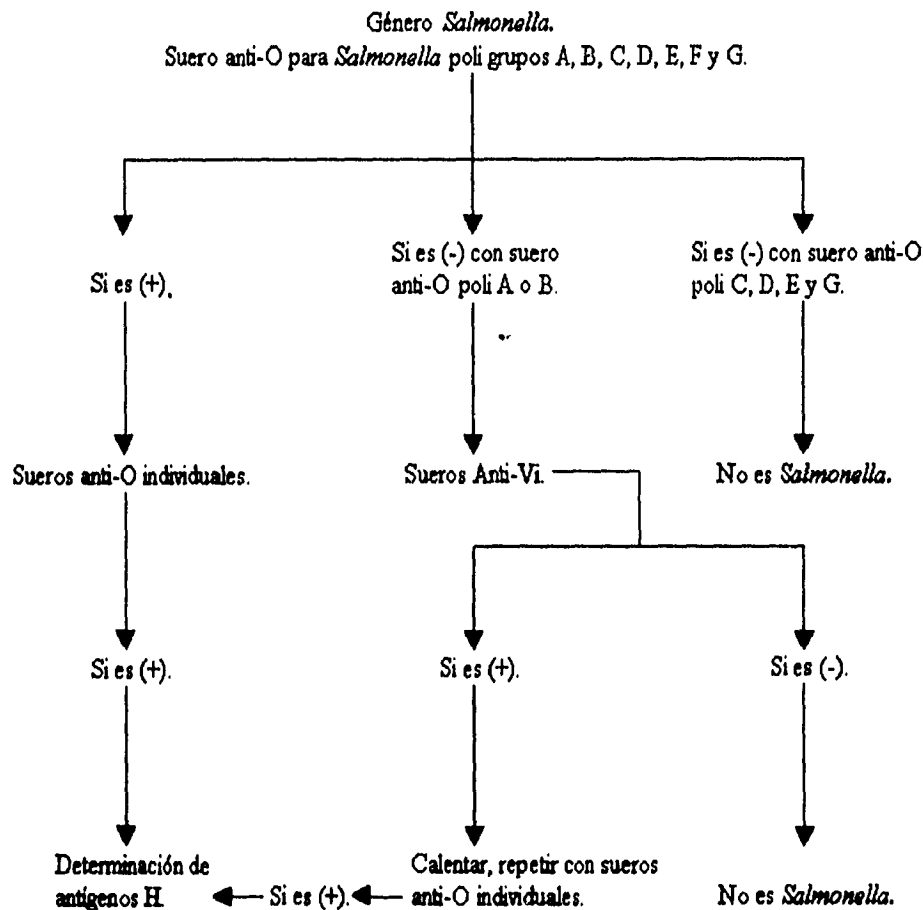
Si el resultado es negativo con poli A o B, éste se prueba con suero anti-Vi, en caso de no observar aglutinación, el cultivo no pertenece al género *Salmonella*.

Si el cultivo reacciona con suero anti-Vi, se calienta en baño maría durante 10 minutos una suspensión densa del cultivo, una vez frío, se prueba con el suero anti-somático para *Salmonella* contra los factores 9, 7, y Vi. Si no reacciona con anti-Vi después de calentar, pero reacciona con el anti-factor 9, lo más probable es que sea *Salmonella typhi* y se confirme con el suero anti-flagelar d. Cuando no reacciona contra el factor 9 pero lo hace con el anti-factor 7, es *S. enteritidis* serotipo *paratyphi C* y puede confirmarse usando suero anti-flagelar c (fase 1), 5 (fase 2).

Microorganismos que dan aglutinación positiva con sueros anti-somáticos individuales pueden analizarse además por sus antígenos flagelares mediante técnicas de aglutinación a través de los sueros anti-*Salmonella* H y llegar a su serotipo. Por ejemplo, un microorganismo que reaccionó con el poli A, los factores somáticos 4, 5 y los flagelares i (fase 1), 2 (fase 2) se considera *Salmonella enteritidis* serotipo *typhimurium*.

Diagrama 2.

Identificación serológica para *Salmonella*.



Suero anti-O para *Salmonella*.

Poli A (grupos somáticos A, B, D, E₁, E₂, E₃, E₄ y L).

Poli B (grupos somáticos C₁, C₂, F, G y H).

Poli C (grupos somáticos I, J, K, M, N y O).

Poli D (grupos somáticos P, Q, R, S, T y U).

Poli E (grupos somáticos V, W, X, Y y Z).

Poli F (grupos somáticos 51 al 55).

Poli G (grupos somáticos 56 al 61).

Suero anti-Vi.

Identificación serológica de *Shigella*.

La identificación serológica del género *Shigella* se basa solamente en la detección de sus antígenos somáticos. A menudo es necesario calentar la suspensión a 100°C, durante 15 a 60 minutos, para eliminar un antígeno de envoltura que inhibe la aglutinación de la célula viva.

El principio y procedimiento para la serotipificación de *Shigella* es el mismo que para los antígenos somáticos de *Salmonella*, sólo que usando suero anti-*Shigella*, comenzando con suero anti-grupo B que es el más frecuente.

Si no ocurre aglutinación usando el suero arriba mencionado, probar con Poli-Grupos A, A₁, C, C₁, C₂, D.

Los cultivos que se sospecha sean *Shigella*, pero que aglutinan pobremente o no lo hacen, se suspenden y se calientan en un baño de agua a 100°C durante 15 a 60 minutos, para eliminar sustancias termolábiles inhibitorias de la aglutinación, una vez frío, se vuelve a probar con la batería de sueros anti-*Shigella*.

La identificación final, para el tipo específico, se realiza usando sueros anti-especie contra los tipos individuales de cada grupo (Diagrama 3).

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo A reacciona con *S. dysenteriae* tipos 1 a 7.

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo A₁ reacciona con *S. dysenteriae* tipos 9, 10.

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo B reacciona con *S. flexneri* tipos 1 a 6.

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo C reacciona con *S. boydii* tipos 1 a 7.

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo C₁ reacciona con *S. boydii* tipos 8 a 11.

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo C₂ reacciona con *S. boydii* tipos 12 a 15.

Suero anti-*Shigella* Poli-Grupo D reacciona con *S. sonnei* I y II.

Identificación serológica de *Vibrio*.

Las colonias sospechosas se subcultivan en un medio no selectivo como agar sangre o agar triptecina soya, que no contiene hidratos de carbono. Después de 5 a 8 horas, puede haber un buen desarrollo que es posible analizar con suero anti-especie polivalente contra el serogrupo O1 de *V. cholerae* (los laboratorios experimentados usan con frecuencia desarrollo de una placa TCBS para la prueba de aglutinación). La presencia de aglutinación es evidencia de *V. cholerae* serogrupo O1.

Se emplean tres factores A, B y C, para subdividir el antígeno O:1 en los serotipo Ogawa (A, B), Inaba (A, C), e Hikojima (A, B, C); ver diagrama 4.

Las cepas de *V. cholerae* que no son del grupo O:1 pueden diferenciarse por serotipificación. Se han descrito dos sistemas para tipificar *V. cholerae* no O1.

En un sistema descrito por Sakazaki y Shimada, los sueros anti-especie se preparan contra células calentadas y se determina el antígeno O por aglutinación. Hay más de 60 antígenos O en este esquema. En el sistema descrito por Smith, los sueros anti-especie se preparan contra células sin calentar y se determina el tipo por aglutinación de cultivos vivos en portaobjetos, en este esquema se consideran alrededor de 72 tipos diferentes.

Diagrama 3.

Identificación serológica de *Shigella*.

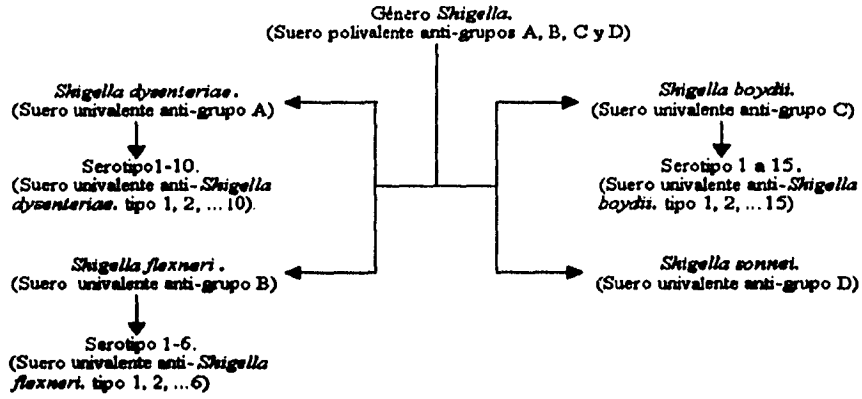
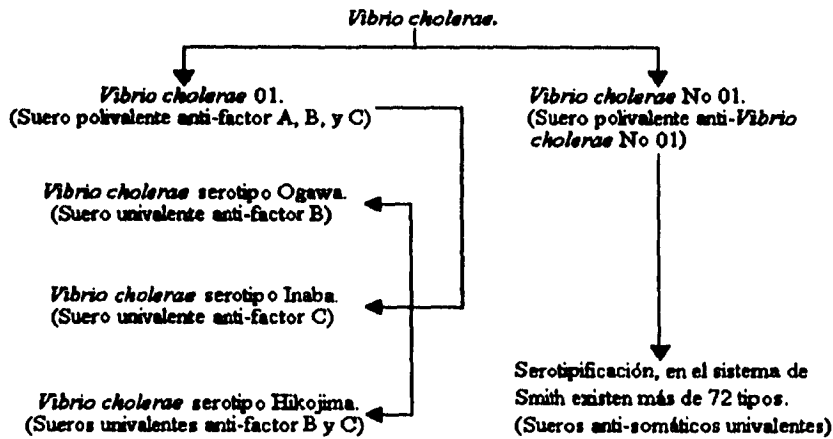


Diagrama 4.

Identificación serológica de *Vibrio*.



III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las tablas 4 y 5, muestran las bacterias aisladas de ostiones, cuya procedencia es Sánchez Magallanes; mientras que en las tablas 6 y 7 se observan aquellas bacterias aisladas de muestras originarias de la laguna de Tamiahua. En cada una de las tablas se presentan los resultados de las diferentes pruebas bioquímicas aplicadas para identificar a las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 4 y 6) y *Vibrionaceae* (Tabla 5 y 7), así como el número y la fecha en que se procesó la muestra de la cual procede el aislamiento.

Al interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas, se identificaron microorganismos de interés médico. Por ejemplo, bacterias de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, y *Vibrio*. Dado que estas bacterias desde el punto de vista de patogenicidad y etiológicamente son importantes, sus aislamientos se confirmaron mediante pruebas de serología que se les practicaron en el Instituto Nacional de Pediatría "INP" y en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "INDRE" (Apéndice A).

Algunas cepas de *V. cholerae* No O1, presentaron beta hemólisis en agar sangre de carnero, esto representa un indicio de la patogenicidad de las cepas, ya que se ha reportado la presencia de hemolisinas en cepas causantes de gastroenteritis las cuales lisan eritrocitos de numerosas especies animales.

Para determinar la especie a la cual pertenece cada cepa bacteriana aislada, se tomó en cuenta el 90% de compatibilidad o más, con respecto a cepas tipo (Tabla 1 y 3) y considerando pruebas claves (Tabla 2). Por tanto, cepas con 90% de compatibilidad o más, con alguna especie del género *Vibrio*, se reportó como *Vibrio sp* si tan solo una de sus pruebas claves no correlacionaba.

Tabla 4.

" Enterobacterias aisladas en muestras de ostiones. "

Periodo de estudio: 24-abril-91 al 27-agosto-91 y del 27-abril-92 al 17-junio-92.																
Procedencia de la muestra: Sánchez Magallanes (Lagunas de El Carmen y Machona), Tabasco, México.																
MEIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LITINA	ORNITINA	ROJO DE METILO	VOCES - PROSKAUER	ONIDASA	CATALASA	Reacción bioquímica. Fecha: Especie:
EMB (D)	-	+	+	+	+/-	-	+	+	-	+	+/-	+	-	-		24/abril/91 al 17/junio/92 <i>Escherichia coli.</i>
EMB (D)	+	+	-	-		+	-	+	-	+	+					24/abril/91 <i>Salmonella enteritidis.*</i>
EMB (D)	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+					30/abril/91 y 15/mayo/91 <i>Enterobacter sp.</i>
McCK (T)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+					15/mayo/91 <i>Shigella flexneri.*</i>
McCK (D)	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+						21/mayo/91 <i>Salmonella typhi.*</i>
SS (D)	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-		21/agosto/91 <i>Salmonella typhimurium.*</i>
EMB (D)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-		25/mayo/92 <i>Citrobacter freundii.</i>
SS (T)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		1/junio/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
EMB (D)	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-		1/junio/92 <i>Citrobacter freundii.</i>
TCBS (D)	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-		3/junio/92 <i>Proteus mirabilis.</i>
TCBS (D)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		10/junio/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>

Tabla 4 (continuación).

MEIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LEUNA	ORNITINA	ROJO DE MEILO	VOCES - FROCKAUER	OXIDASA	CATALASA	Reacción bioquímica. Fecha: Especie:
TCBS (D)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-		10/junio/92 <i>Yersinia kristensenii.</i>
SS (T)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-		10/junio/92 <i>Escherichia coli.</i>
TCBS (D)	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-		17/junio/92 <i>Proteus mirabilis.</i>
SS (T)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		17/junio/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>

Medio= Medio de aislamiento; EMB= Agar eosina azul de metileno; McCK= Agar de Mac Conkey; SS= Agar Salmonella-Shigella; TCBS= Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa; ()= Caldo de enriquecimiento para bacterias enteropatógenas; CP= Caldo peptonado alcalino; D= siembra directa de la muestra; GN= Caldo Gram negativo; T= Caldo tetratonato; *= Identificación serológica; += Prueba positiva; -= Prueba negativa; +/-= Prueba variable; d= Prueba positiva debil.

Tabla 5.

" Vibrios aislados en muestras de ostiones. "

Periodo de estudio		24-abril-91 al 27-agosto-91 y del 27-abril-92 al 17-junio-92.																					
Procedencia de la muestra:		Sánchez Magallanes (Lagunas de El Carmen y Machona), Tabasco, México.																					
MEDIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOLINDAD	UREASA	LITINA	ORNITINA	ROJO DE MEILO	VOCES - PROSKAUER	OXIDASA	CATALASA	GELATINASA	ARGININA	MANITOL	INOSITOL	HEMOLISE	Reacción bioquímica.	Fecha: Especie:	
TCBS	(+) -	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+			+	+		27/abril/92 <i>Vibrio cincinnatiensis.</i>		
TCBS	(P) +	+	-	+	+	-	d	+	-	+	-	+	+	+	+		+	+	-		10/mayo/92 <i>Vibrio vulnificus, 75%.</i> <i>Vibrio sp.</i>		
TCBS	(P) +	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	beta	10/mayo/92 <i>Vibrio cholerae No 01.*</i>		
SS	(-) -	+	-	-	+	-	d	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-		10/mayo/92 <i>Vibrio cincinnatiensis, 85%.</i> <i>Vibrio sp.</i>		
EMB	(-) -	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-			+	+	-		17/mayo/92 <i>Vibrio cincinnatiensis, 87%.</i> <i>Vibrio sp.</i>	
EMB	(-) -	+	-	-	+	-	d	-	-	-	-	+	-	+	-			+	-		17/mayo/92 <i>Vibrio carchariae, 81%.</i> <i>Vibrio sp.</i>		
TCBS	(-) +	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+				+	-		25/mayo/92 <i>Vibrio parahaemolyticus.</i>		
TCBS	(-) -	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+				+	-		25/mayo/92 <i>Vibrio alginolyticus.</i>		
SS	(-) +	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+			+	+	-		25/mayo/92 <i>Vibrio cholerae, 87%.</i> <i>Vibrio sp.</i>		
TCBS	(-) -	+	-	-	+	-	d	+	-	+	-	+	-	+				+	+	-		1/junio/92 <i>Vibrio alginolyticus, 85%.</i> <i>Vibrio sp.</i>	
TCBS	(P) +	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+		+	-	+	-	beta	3/junio/92 <i>Vibrio cholerae No 01.*</i>		

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 5 (continuación).

MEDIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LEIVA	ORNITINA	ROJO DE METILO	VOCES - PROSKAUER	ORFASA	CATALASA	GELATINASA	AMONIA	MANITOL	INOSITOL	HEMOLISIS	Reacción bioquímica	Fecha: Especie:
TCBS (CP)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+		+	-	+	-		3/junio/92 <i>Vibrio mimicus</i>	
EMB (D)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+		+	+	+	-		3/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS (GN)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+		+	+	+	-		3/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+		+	+	+	-		8/junio/92 <i>Vibrio fluvialis.</i>	
TCBS (CP)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+		+	-	+	-		8/junio/92 <i>Vibrio mimicus.</i>	
TCBS (D)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	d	+		+	-	+	-	beta	8/junio/92 <i>Vibrio cholerae No 01*</i>	
EMB (D)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+		+	+	+	-		8/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		+	+	+	-		10/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS (T)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+		+	+	+	+		10/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS (D)	+	+	-	-	+	-	+	d	-	+	-	+	-	+							10/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS (T)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+							17/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	

Medio= Medio de aislamiento; EMB= Agar cosina azul de metileno; McCK= Agar de Mac Conkey; SS= Agar Salmonella-Shigella; TCBS= Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa; ()= Caldo de enriquecimiento para bacterias enteropatógenas; CP= Caldo peptonado alcalino; D= siembra directa de la muestra; GN= Caldo Gram negativo; T= Caldo tetracionato; *= Identificación serológica; += Prueba positiva; -= Prueba negativa; +/- Prueba variable; d= Prueba positiva debil.

Tabla 6.

" Enterobacterias aisladas en muestras de ostiones. "

Periodo de estudio: 3-septiembre-91 al 8-junio-92.																
Procedencia de la muestra: Laguna de Tamiahua, Veracruz, México.																
MEIO	CITRATO	GLUCOSA, ADO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	NDL	MOVILIDAD	UREASA	LENA	ORNITINA	ROD DE NEILO	VOGES - PROSKALER	OXIDASA	CATALASA	Reacción bioquímica. Fecha: Especie:
EMB (D)	-	+	+	+	+/-	-	+	+	-	+	+/-	+	-	-		3/sept/91 al 8/jun/92 <i>Escherichia coli.</i>
SS (GN)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		9/marzo/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
SS (GN)	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-		16/marzo/92 <i>Salmonella, subgrupo 3b.</i>
EMB (D)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		16/marzo/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
SS (CP)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		23/marzo/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
SS (T)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		30/marzo/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
SS (T)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		6/abril/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
SS (D)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		6/abril/92 <i>Klebsiella ozaenae.</i>
TCBS (D)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	6/abril/92 <i>Enterobacter gergoviae.</i>
EMB (D)	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	6/abril/92 <i>Escherichia coli inactiva.</i>
EMB (D)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		10/mayo/92 <i>Klebsiella ozaenae.</i>

Tabla 6 (continuación).

MEDIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LEUINA	ORNITINA	ROJO DE METILO	VOGES - PROKVALER	CONDASA	CATALASA	Reacción bioquímica. Fecha: Especie:
EMB (D)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		17/mayo/92 <i>Klebsiella ozaenae.</i>
SS (D)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-		17/mayo/92 <i>Serratia marcescens</i> , biogrupo I.
SS (D)	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-		25/mayo/92 <i>Escherichia coli</i> inactiva.
EMB (D)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		25/mayo/92 <i>Klebsiella ozaenae.</i>
EMB (D)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-		1/junio/92 <i>Klebsiella planticola.</i>

Medio= Medio de aislamiento; EMB= Agar eosina azul de metileno; McCK= Agar de Mac Conkey; SS= Agar Salmonella-Shigella; TCBS= Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa; ()= Caldo de enriquecimiento para bacterias enteropatógenas; CP= Caldo peptonado alcalino; D= siembra directa de la muestra; GN= Caldo Gram negativo; T= Caldo tetrationato; *= Identificación serológica; += Prueba positiva; -= Prueba negativa; +/-= Prueba variable; d= Prueba positiva debil.

Tabla 7.

" Vibrios aislados en muestras de ostiones. "

Periodo de estudio:		3-septiembre-91 al 8-junio-92.																				
Procedencia de la muestra:		Laguna de Tamiahua, Veracruz, México.																				
MEIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LISINA	ORNITINA	ROD DE MEILO	VOCES - PROKALER	ONIDASA	CATALASA	GELATINASA	ARGININA	MANITOL	NOBITOL	HEMOLISIS	Reacción bioquímica.	Fecha: Especie:
TCBS (D)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+								3/septiembre/91 <i>Vibrio sp.</i>
SS (D)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+								3/septiembre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+								9/septiembre/91 <i>Vibrio fluvialis.</i>
TCBS (CP)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+								9/septiembre/91 <i>Vibrio mimicus.</i>
EMB (D)	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+								9/septiembre/91 <i>Vibrio sp.</i>
SS (D)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+								1/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+								1/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+								1/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
SS (GN)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+								8/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+								8/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
SS (D)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+								8/octubre/91 <i>Vibrio mimicus.</i>

Tabla 7 (continuación).

MEDIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LEUINA	ORNITINA	ROJO DE METILO	VOCES - PROSKAUER	OXIDASA	CATALASA	GELATINASA	ARGENINA	MANTIL	NITRITO	HEMOGLIS	Reacción bioquímica / Fecha: Especie:
TCBS (CP)	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-						16/octubre/91 <i>Vibrio cincinnatiensis</i> .
TCBS (CP)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	beta		16/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
SS (T)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+						16/octubre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	d	-	+	-	+	+						5/noviembre/91 <i>Vibrio cincinnatiensis</i> .
SS (T)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-						19/noviembre/91 <i>Vibrio mimicus</i> .
EMB (D)	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+						26/noviembre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+							26/noviembre/91 <i>Vibrio sp.</i>
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+							26/noviembre/91 <i>Vibrio cholerae</i> No 01.
TCBS (CP)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+							26/noviembre/91 <i>Vibrio hollisae</i> .
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-		15/enero/92 <i>Vibrio cholerae</i> No 01.*
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+		+	-	+	-		22/enero/92 <i>Vibrio cholerae</i> No 01.*
TCBS (D)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+		+	-	+	-		29/enero/92 <i>Vibrio mimicus</i> .
TCBS (CP)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+			29/enero/92 <i>Vibrio sp.</i>

Tabla 7 (continuación).

MEDIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LIBINA	ORNITINA	ROJO DE MEILO	VOGES - PROSKALER	OXIDASA	CATALASA	GELATINASA	ARGININA	MANTIL	NOBITUL	HEMOLES	Reacción bioquímica.	Fecha: Especie:
TCBS (CP)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-		+	+			29/enero/92 <i>Vibrio sp.</i>	
TCBS (CP)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+		-	-			10/febrero/92 <i>Vibrio hollisae</i>	
TCBS (D)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+		+	+	-		17/febrero/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS (D)	+	+	-	-	-	-	+	d	-	+	+	+	-	+	d		-	+	-		17/febrero/92 <i>Vibrio mimicus</i>	
SS (D)	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+		+	+			16/marzo/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS (D)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+							23/marzo/92 <i>Vibrio mimicus.</i>	
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+			+	+	-		23/marzo/92 <i>Vibrio fluvialis.</i>	
TCBS (D)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-						6/abril/92 <i>Vibrio metschnikovii.</i>	
TCBS (D)	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-		+	-			6/abril/92 <i>Vibrio damsela.</i>	
EMB (D)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	d	-	-	+	+		27/abril/92 <i>Vibrio cincinnatiensis.</i>	
TCBS (CP)	-	+	-	-	+	-	d	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-		10/mayo/92 <i>Vibrio sp.</i>	
TCBS (CP)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-		10/mayo/92 <i>Vibrio mimicus.</i>	
SS (GN)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-		+	+	-		10/mayo/92 <i>Vibrio sp.</i>	
	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+		+	+	-		<i>Vibrio cholerae.</i> 93%	

Tabla 7 (continuación).

MEDIO	CITRATO	GLUCOSA, ACIDO	GLUCOSA, GAS	LACTOSA	SACAROSA	H ₂ S	INDOL	MOVILIDAD	UREASA	LEUINA	ORNITINA	ROJO DE METILO	VOCES - PROSKAUER	OXIDASA	CATALASA	GELATINASA	ARGININA	MANITOL	NOBITOL	HEMOLES	Reacción bioquímica. Fecha: Especie:
TCBS (D)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-				+	+	-		17/mayo/92 <i>Vibrio metschnikovii</i> .
TCBS (D)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-			+	+	-		25/mayo/92 <i>Vibrio metschnikovii</i> .
TCBS (D)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	d	-		-	+	+	-		1/junio/92 <i>Vibrio metschnikovii</i> .
TCBS (CP)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+		+	-	+	-	beta	8/junio/92 <i>Vibrio cholerae</i> No 01.*
TCBS (CP)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+		+	-	+	-		8/junio/92 <i>Vibrio mimicus</i> .
TCBS (CP)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , 94%.					8/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	
SS	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Vibrio cholerae</i> , 92%.					8/junio/92 <i>Vibrio sp.</i>	

Medio= Medio de aislamiento; EMB= Agar eosina azul de metileno; McCK= Agar de Mac Conkey; SS= Agar Salmonella-Shigella; TCBS= Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa; ()= Caldo de enriquecimiento para bacterias enteropatógenas; CP= Caldo peptonado alcalino; D= siembra directa de la muestra; GN= Caldo Gram negativo; T= Caldo tetratonato; *= Identificación serológica; += Prueba positiva; -= Prueba negativa; +/- Prueba variable; d= Prueba positiva debil.

Al observar las bacterias aisladas a partir de ostras, que se muestran en las tablas 8 y 9, se puede apreciar la existencia de dos tipos bacterianos, bacterias oportunistas que requieren de alguna alteración en el hospedero, por procesos de deficiencia inmune, antes de que puedan causar enfermedad (como son las bacterias pertenecientes al género *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Vibrio*, (*V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*), y bacterias patógenas, entre éstas últimas se encuentran algunos de los enteropatógenos intestinales más importantes del hombre, tal es el caso de especies del género *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio* (*V. cholerae* No O1, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*). Las bacterias aisladas, a su vez se pueden clasificar de acuerdo al ambiente natural en que desarrollan como bacterias autóctonas (Familia *Vibrionaceae*) o extrínsecas (Familia *Enterobacteriaceae*) a los esteros.

Los ostiones de ambas regiones geográficas presentan *Escherichia coli*, lo cual sugiere contaminación con materia fecal. Esta contaminación se debe a los asentamientos humanos cuando vierten sus aguas negras directamente sobre los esteros o ríos que desembocan en aguas de estuarios. La contaminación fecal a través de aguas de albañal, explica en parte la presencia de bacterias potencialmente patógenas, como *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, aisladas de ostiones procedentes de Sánchez Magallanes (lagunas del Carmen y Machona). Este tipo de contaminación también se puede explicar por la falta de higiene al manipular los ostiones. Desde el momento en que se cosechan las ostras, no se tiene ninguna medida de control sanitario, ya que los ostiones son colocados sobre el piso, donde los desconchan, sin someterlos a un lavado previo con objeto de eliminarles el fango. Después, los ostiones se van depositando en tinajas que contienen agua de la misma laguna, la cual, en poco tiempo, se vuelve materialmente lodosa. Posteriormente los ostiones son colocados en agua y envasados en bolsas de plástico para transportarlos al mercado de "La Viga", en donde nuevamente, sufren contaminación por manipulación al transferirlos a frascos, que es la forma final como los adquiere el público.

Por otra parte, la presencia de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en los ostiones, se

explica porque estas bacterias son autóctonas de medios cálidos y salobres, como los esteros. *Vibrio parahaemolyticus*, que se aisló de ostiones provenientes de la Laguna del Carmen-Machona, se encuentra entre las bacterias de mayor importancia para este género, por su capacidad para ocasionar gastroenteritis aguda e intoxicación alimentaria; esto como resultado de manejos inadecuados en la preparación de alimentos marinos (falta de higiene y mal cocimiento). Otros vibrios capaces de originar infecciones gastrointestinales también se aislaron a partir de ostiones; entre estos se encuentran *Vibrio mimicus* y *Vibrio cholerae* serogrupo no O1. Este último serogrupo comprende una gran variedad de biotipos algunos de los cuales pueden originar gastroenteritis, inclusive muy parecida a la que ocasiona el serogrupo pandémico "O1". *Vibrio fluvialis* y *Vibrio hollisae*, que también se aislaron de las muestras de ostiones, ocasionan con menos frecuencia gastroenteritis. El aislamiento de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio damsela*, y *Vibrio metschnikovii*, es importante puesto que se han reportado en la literatura como agentes etiológicos de infecciones invasivas en heridas y bacteremias, éstas últimas pueden conducir a septicemias y finalmente la muerte, sobre todo a pacientes inmunosuprimidos que tienen mayor riesgo de adquirir infecciones marinas por *Vibrio*, así como de sufrir sus consecuencias más severas.

Tabla 8.

Contenido bacteriano en 20 muestras de ostiones del mercado de "La Viga" cuya procedencia es Sánchez Magallanes (Lagunas de El Carmen y Machona), Tabasco, México, analizadas durante el período del 24-abril-91 al 17-junio-92.

Enterobacterias	No. de aislamientos en 20 muestras.	Vibrios.	No. de aislamientos en 20 muestras.
<i>Citrobacter freundii</i> .	2	<i>Vibrio cholerae</i> , No 01.	3
<i>Enterobacter gergoviae</i> .	3	<i>Vibrio mimicus</i> .	2
<i>Enterobacter sp.</i>	2	<i>Vibrio cincinnatiensis</i> .	1
<i>Escherichia coli</i> .	*	<i>Vibrio fluvialis</i> .	1
<i>Proteus mirabilis</i> .	2	<i>Vibrio alginolyticus</i> .	1
<i>Salmonella enteritidis</i> .	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	1
<i>Salmonella typhi</i> .	1	<i>Vibrio sp.</i>	14
<i>Salmonella typhimurium</i> .	1	Total:	23
<i>Shigella flexneri</i> .	1		
<i>Yersinia kristensenii</i> .	1		
Total:	14		

*= Encontrada en la mayoría de las muestras.

Tabla 9.

Contenido bacteriano en 30 muestras de ostiones del mercado de "La Viga" cuya procedencia es la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México, analizadas durante el período del 3-septiembre-91 al 8-junio-92.

Enterobacterias	No. de aislamientos en 20 muestras.	Vibrios.	No. de aislamientos en 20 muestras.
<i>Enterobacter gergoviae</i> .	6	<i>Vibrio cholerae</i> , No 01.	4
<i>Escherichia coli</i> .	*	<i>Vibrio mimicus</i> .	8
<i>Escherichia coli</i> inactiva.	2	<i>Vibrio metschnikovii</i> .	4
<i>Klebsiella planticola</i> .	1	<i>Vibrio cincinnatiensis</i> .	3
<i>Klebsiella ozaenae</i> .	4	<i>Vibrio hollisae</i>	2
<i>Salmonella</i> subgrupo 3b (Arizona)	1	<i>Vibrio damsela</i> .	1
<i>Serratia marcescens</i> biogrupo 1.	1	<i>Vibrio fluvialis</i> .	2
Total:	15	<i>Vibrio sp.</i>	20
		Total:	44

*= Encontrada en la mayoría de las muestras.

Durante el desarrollo experimental de este trabajo, se presentaron períodos en los cuales el número de aislamientos por muestra aumentaba notoriamente, mientras que en otros era casi nulo. Para correlacionar este fenómeno, que se presenta en ostiones de ambas regiones geográficas, se compararon gráficas de aislamientos por mes con la precipitación y temperatura media mensual.

Las gráficas 1 y 2, muestran respectivamente, la precipitación y temperatura media mensual del extremo oeste de Tabasco, México; estas gráficas se obtuvieron considerando el promedio de los reportes mensuales de estaciones meteorológicas¹⁶ situadas cerca de la laguna del Carmen-Machona (Comalcalco, El Paraíso, Campo EW75, Vicente Guerrero, La Venta). Las gráficas 3 y 4 se obtuvieron de la misma manera que las anteriores, solo que en este caso se tomaron en cuenta estaciones meteorológicas de la porción norte del estado de Veracruz, México (Ozuluama, Tuxpan, Pánuco, Villa Cuauhtémoc, Tamos, Tampico); que es la región donde se localiza la laguna de Tamiahua.

Al comparar las gráficas de vibrios y enterobacterias aislados en ostiones de Tamiahua, Veracruz, México; (Gráfica 7 y 8) se logra apreciar que las bacterias de la familia *Vibrionaceae* persisten en los ostiones de manera constante a lo largo de todo el año, presentándose algunos períodos donde aumenta el número de aislamientos por mes. El incremento en los aislamientos, va acompañado de aumento de la precipitación y temperatura, comienza de mayo a junio (al terminar la primavera), y alcanza un máximo al finalizar el verano, cuando el mayor número de aislamientos por mes correlaciona con la mayor precipitación y temperatura mensual del año.

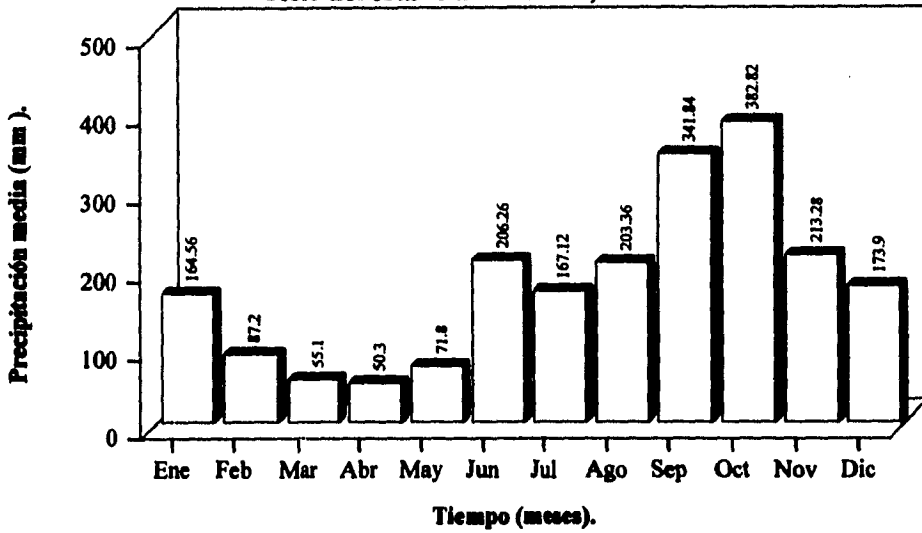
El constante aislamiento de vibrios en las muestras analizadas confirma que esta familia bacteriana es autóctona de medios acuáticos salobres (esteros) y el aumento de los aislamientos en verano se debe al incremento en la temperatura que acelera la proliferación de vibrios.

Con respecto a las enterobacterias, se observa que éstas se presentan en el mes de marzo (al principio de la primavera) y aumenta gradualmente el número de aislamientos junto con el incremento de la precipitación y temperatura media mensual. La presencia de enterobacterias en un período específico durante el año, indica que esta contaminación se debe a factores externos

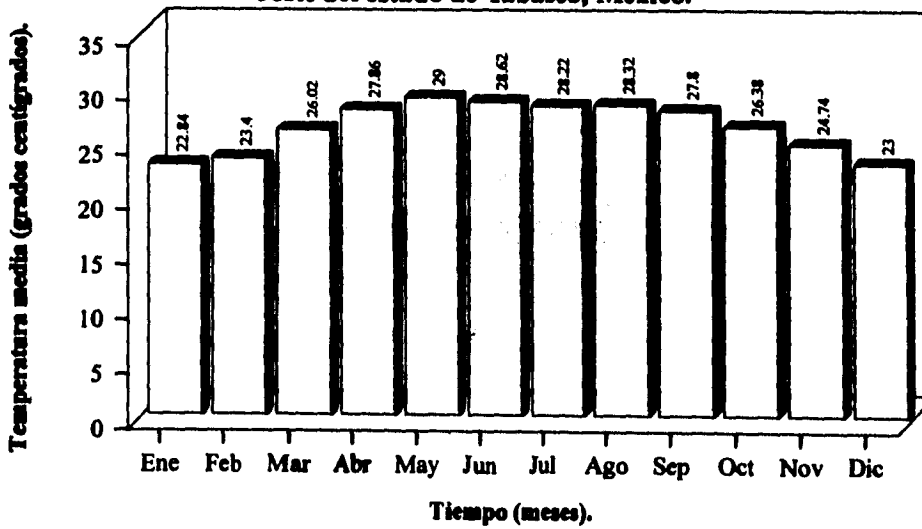
como son, el incremento de aguas negras, escurrimientos de zonas cercanas a los esteros, agitación de las aguas estéricas y disminución de la salinidad, que junto al incremento de la temperatura, crea condiciones favorables para el desarrollo y contaminación de moluscos bivalvos por parte de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Las gráficas 5 y 6 que muestran las bacterias aisladas en ostiones procedentes de Sánchez Magallanes (laguna del Carmen-Machona), Tabasco, México; también presentan un comportamiento similar a los aislamientos de la laguna de Tamiahua, aún cuando el número de muestras es menor y comprende un período más corto de estudio.

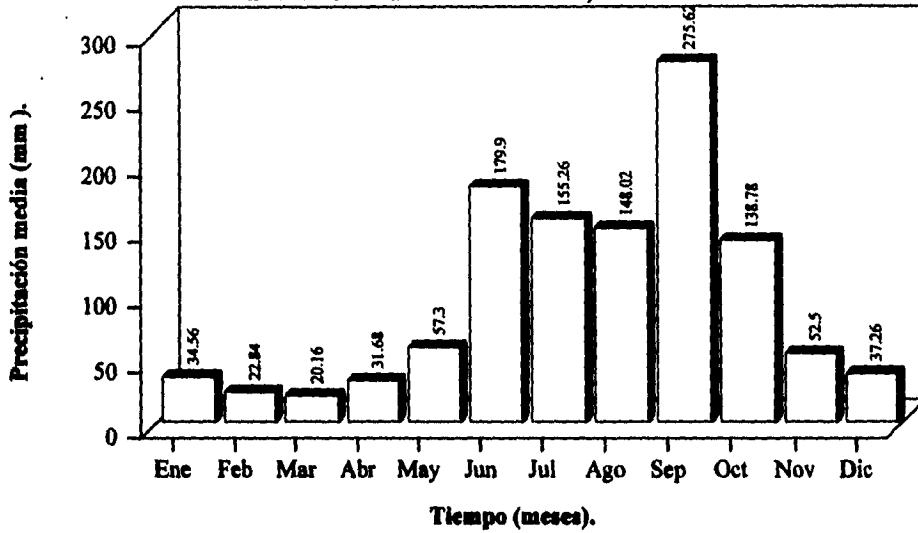
Gráfica # 1.
Precipitación media mensual del extremo
oeste del estado de Tabasco, México.



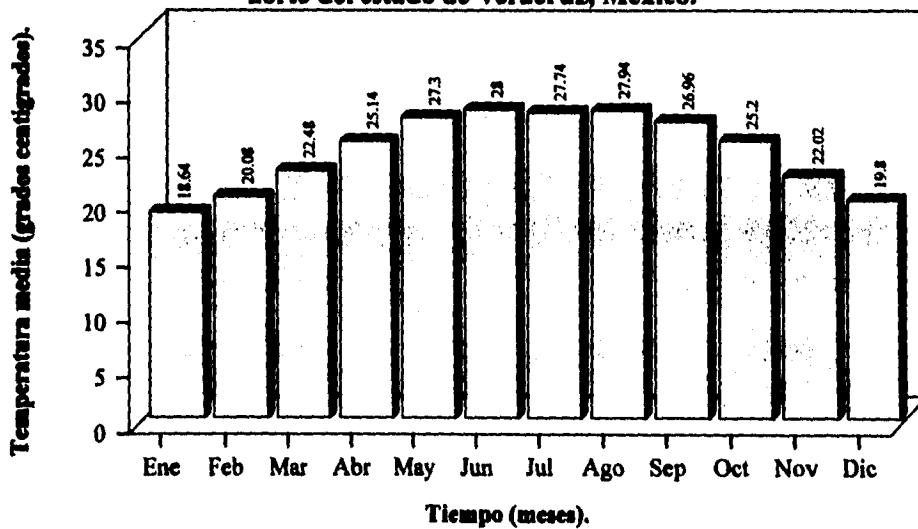
Gráfica # 2.
Temperatura media mensual del extremo
oeste del estado de Tabasco, México.



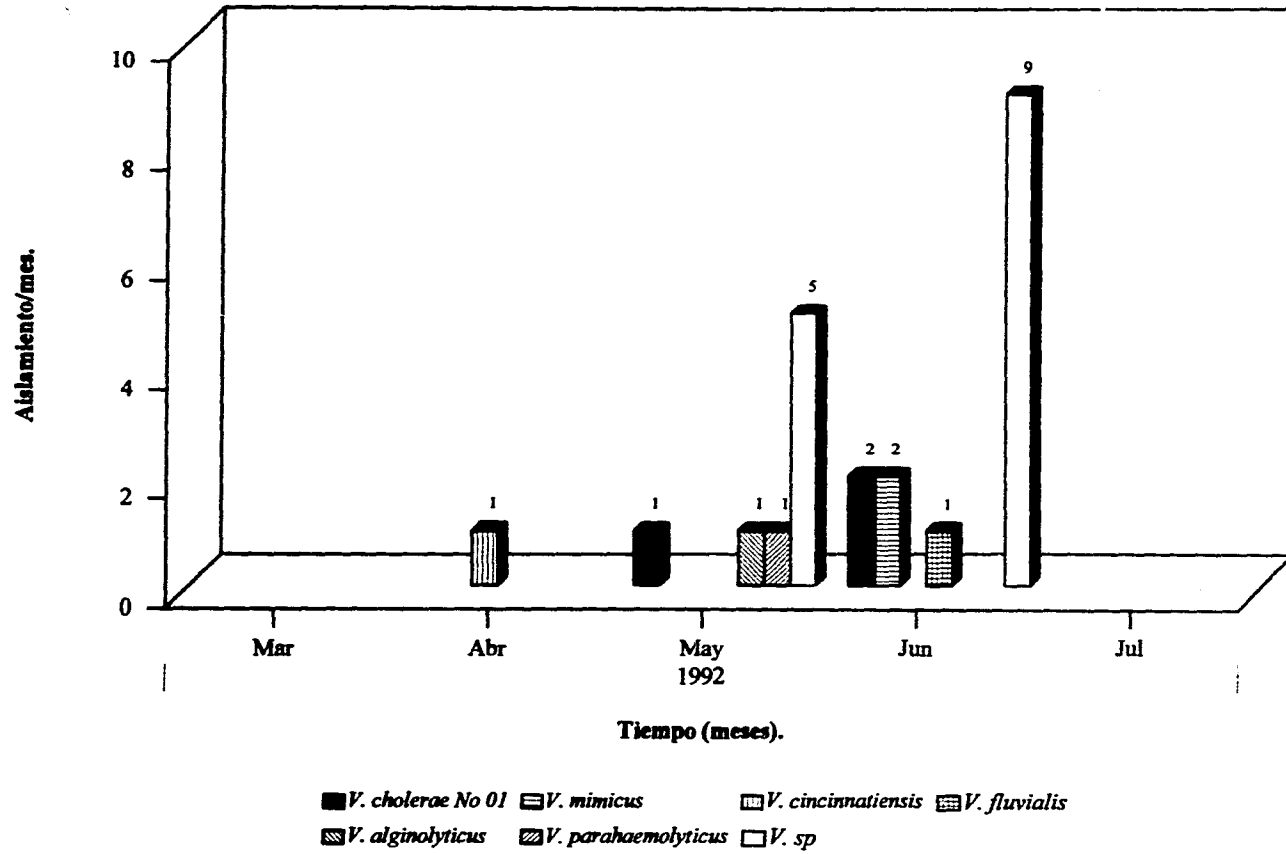
Gráfica # 3.
Precipitación media mensual de la porción
norte del estado de Veracruz, México.



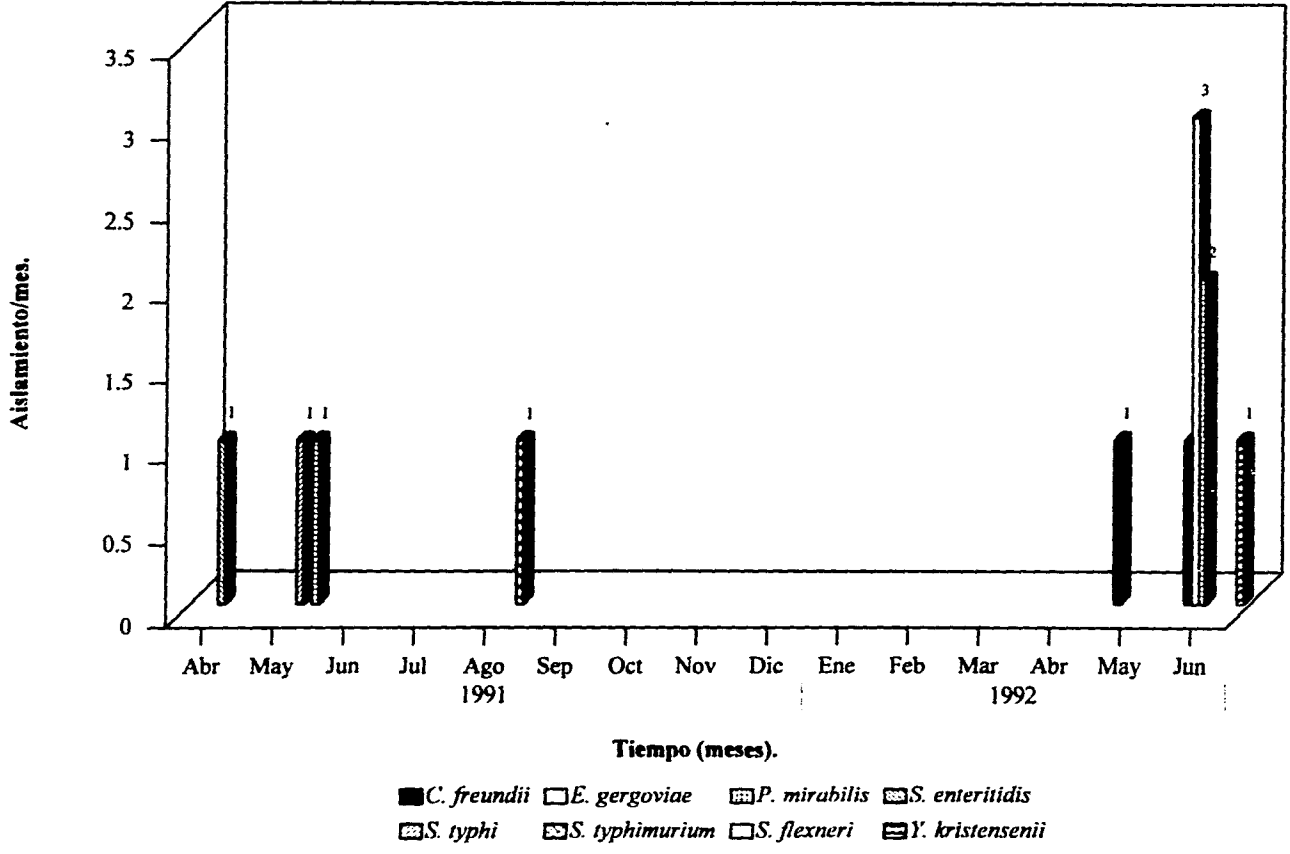
Gráfica # 4.
Temperatura media mensual de la porción
norte del estado de Veracruz, México.



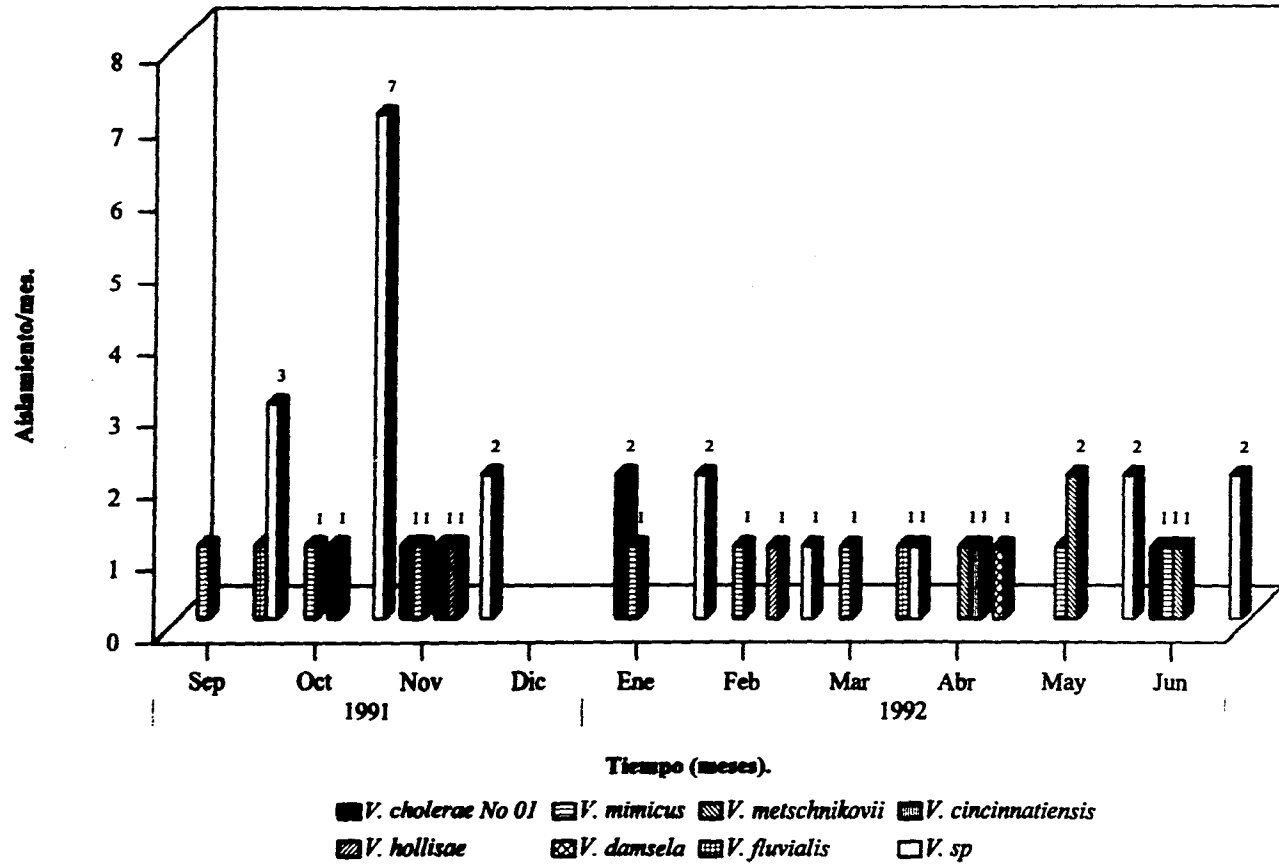
Gráfica # 5.
Vibrios aislados en ostiones de Tabasco, México.



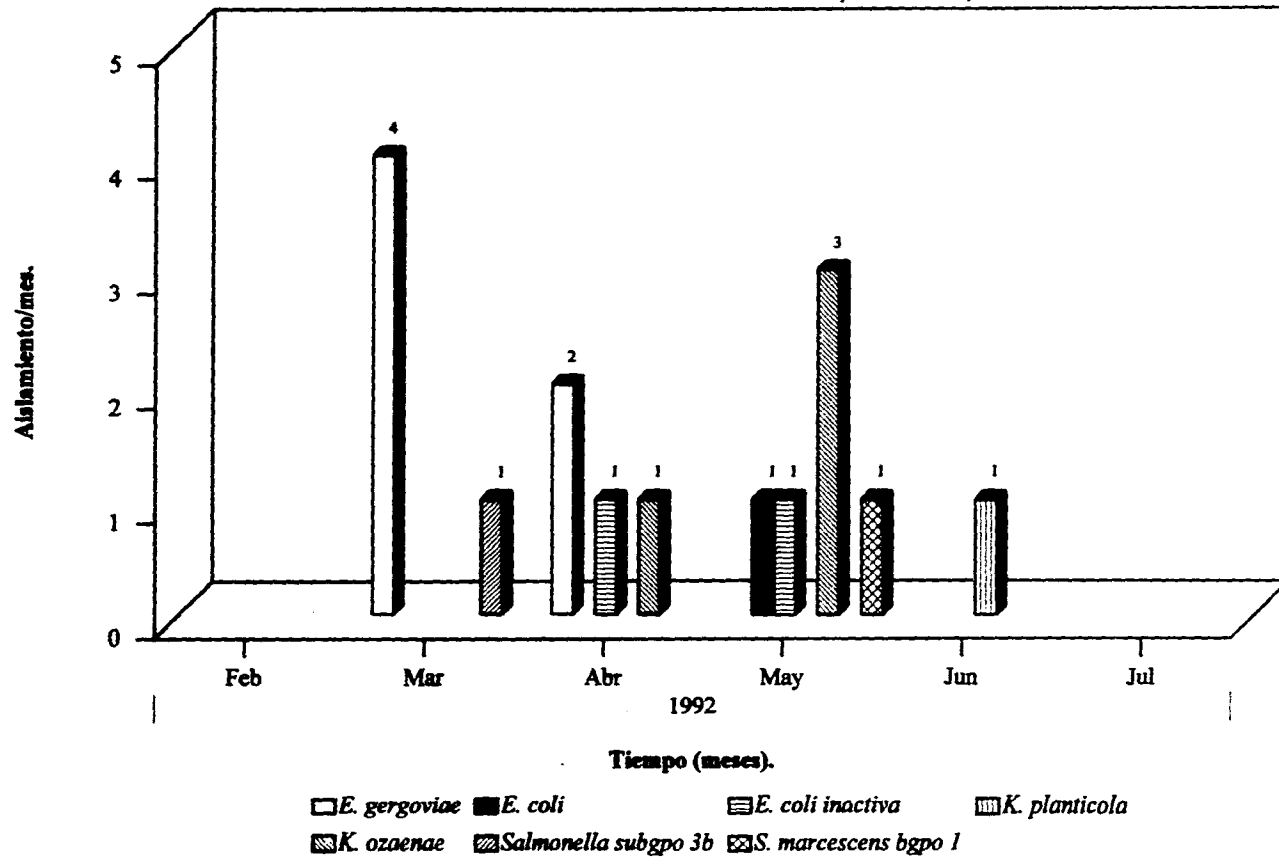
Gráfica # 6.
Enterobacterias aisladas en ostiones de Tabasco, México.



Gráfica # 7.
Vibrios aislados en ostiones de Tamiahua Veracruz, México.



Gráfica # 8.
Enterobacterias aisladas en ostiones de Tamishua, Veracruz, México.



CONCLUSIONES

Los moluscos bivalvos, en particular los ostiones, se clasifican de acuerdo a su tipo nutricional como suspensivos filtradores. De la misma manera que los nutrientes, bacterias contaminantes de los esteros se filtran y concentran dentro del ostión convirtiéndolo en un vehículo transmisor de enfermedades gastrointestinales.

Los ostiones cosechados del sistema lagunar de El Carmen y Machona, Tabasco, así como el de Tamiahua, Veracruz, se encuentran contaminados por microorganismos pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Sin embargo, sólo ostiones procedentes de Sánchez Magallanes (Laguna del Carmen-Machona) están contaminados con bacterias patógenas como *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri* y *Vibrio parahaemolyticus*.

También se aislaron bacterias oportunistas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, al igual que algunas especies de *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio cincinnatiensis* y *Vibrio metschnikovii*); éstos últimos tienen importancia médica ya que con frecuencia son agentes etiológicos de infecciones extraintestinales, como septicemias e infecciones en heridas, adquiridas al manipular o ingerir productos marinos crudos.

El aislamiento de *Vibrio cholerae* serogrupo no O1 en ostras, así como de *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio hollisae*, cuya patogenicidad se ha demostrado recientemente, explica en parte el origen de infecciones intestinales provocadas por el consumo de moluscos bivalvos (ostiones, almejas, etc.).

La contaminación de los ostiones se debe, a: (i) presencia de bacterias pertenecientes al género *Vibrio* que comparten el mismo nicho ecológico (esteros), (ii) a la contaminación de su hábitat al recibir descarga de aguas negras y, (iii) por manipulación al ser desconchados, lavados y envasados para su venta.

El aumento de las bacterias presentes en los ostiones sigue un comportamiento que correlaciona con el incremento en la temperatura media mensual y disminución de la salinidad por elevación de la precipitación media mensual, esto crea condiciones ambientales favorables para el aumento y desarrollo bacteriano en los esteros al finalizar la Primavera y a lo largo del Verano.

El aislamiento de enterobacterias patógenas en los ostiones, refleja el alto índice de contaminación

presente en los esteros de la costa del Golfo de México. Esta contaminación se asocia a malas condiciones sanitarias, crecimiento y pobreza económica de la región, como lo demuestran parámetros geoeconómicos del país.

Los esteros constituyen un hábitat natural del género *Vibrio*. Considerando la actual epidemia en México de *Vibrio cholerae* serogrupo O1, biotipo El Tor, es de esperarse que las aguas de estuarios lleguen a contaminarse y se conviertan en importantes fuentes de transmisión del cólera, al grado de transformar la zona en endémica de esta infección gastrointestinal.

Se requieren estrategias para prevenir la transmisión de enfermedades gastrointestinales originadas, en general, por el consumo de alimentos marinos. Algunas de ellas serían, por ejemplo, normar las prácticas de manipulación de alimentos, consumir productos marinos bien cocidos y, sobre todo, evitar las descargas de aguas negras a medios acuáticos como los esteros, sin que antes se sometan a tratamiento.

APÉNDICE

A. Medios de cultivo y reactivos.

1. Caldo de enriquecimiento.

Los caldos de enriquecimiento se usan para favorecer el desarrollo de ciertas especies bacterianas, inhibiendo el de los microorganismos superfluos. Los caldos de enriquecimiento actúan sobre la base del principio de que la flora entérica normal se mantiene en la fase de retardo del desarrollo, mientras que las especies patógenas (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*) son desinhibidas y entran en la fase logarítmica normal de crecimiento. Por lo tanto, se recomienda el subcultivo del desarrollo obtenido en el caldo de enriquecimiento en uno de los medios selectivos dentro de las 6 a 12 horas.

a. Caldo Gram negativo (GN).

- i. **Composición:** Peptona polipeptona, 20 g; Glucosa, 1 g; D-manitol, 2 g; Citrato de sodio, 5 g; Desoxicolato de sodio, 0.5 g; K_2HPO_4 , 4 g; KH_2PO_4 , 1.5 g; NaCl, 5 g; Agua destilada, 1 L; pH final = 7.0 .
- ii. **Propósito:** Debido a la concentración relativamente baja de desoxicolato, el caldo es menos inhibitorio para *E. coli* y otros coliformes. La mayoría de las cepas de *Shigella* desarrollan bien. El desoxicolato y el citrato inhiben a las bacterias Gram positivas.
La mayor concentración de manitol respecto a la de glucosa, limita el desarrollo de especies de *Proteus*, promoviendo el de *Salmonella* y *Shigella*, géneros ambos capaces de fermentar manitol.
- iii. **Interpretación:** Sirve para aislar especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras fecales en donde se hallan en cantidad escasa.
El caldo se enturbia 1 o 2 horas después de la inoculación y se recomienda el subcultivo en agar entérico Hektoen (HE) o agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) luego de 4 a 6 horas.

b. Caldo tetracionato.

- i. **Composición:** Peptona polipeptona, 18 g; Extracto de levadura, 2 g; NaCl, 5 g; D-manitol,

0.5 g; Desoxicolato de sodio, 0.5 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 38 g; CaCO_3 , 25 g; Verde brillante, 0.01 g; Agua destilada 1 L; pH = 7.0 .

- ii. Propósito: Se usa para el aislamiento primario de salmonelas en las heces. La acción inhibitoria del medio, se logra al añadir por cada litro de caldo base, 20 ml. de una solución que contiene 6 g. de I_2 y 5 g. de KI; el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ reduce fácilmente el I_2 y forma tetrionato ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$). La inclusión del verde brillante es opcional y hace al caldo más inhibitorio para el desarrollo de coliformes.
- iii. Interpretación: Para el óptimo aislamiento de salmonelas se recomienda el subcultivo en agar SS o en agar sulfito de bismuto luego de 12 a 18 horas. El caldo tetrionato no se puede calentar luego de añadir la solución de yodo. El medio se debe utilizar inmediatamente después de añadir la solución yodada.

c. Caldo peptona alcalino (NaCl 1 %).

- i. Composición: Peptona, 10 g; NaCl, 10 g; Agua destilada, 1 L; pH = 9.0 .
- ii. Propósito: Se usa para el aislamiento de vibrios ya que este género es moderadamente tolerante a condiciones alcalinas y puede crecer a pH = 9.0 . La adición de 1% de NaCl permite el desarrollo de vibrios halófilos y halotolerantes.
- iii. Interpretación: A las pocas horas de inocular el caldo éste se enturbia y se recomienda el subcultivo en agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (TCBS) luego de 6 a 8 horas para una óptima recuperación de vibrios. Después de una incubación prolongada comienzan a desarrollar otros microorganismos.

2. Medios de aislamiento.

Medios de aislamiento primario.

Los medios de aislamiento primario son sólo moderadamente inhibidores y están concebidos para recuperar muchas especies diferentes de bacterias dentro de un grupo amplio. Estos medios inhiben el desarrollo de casi todas las especies de microorganismos Gram negativos exigentes; no obstante, permite el

desarrollo de todas las enterobacterias y otros bacilos Gram negativos.

a. Agar eosina azul de metileno (EMB).

- i. Composición: Peptona, 10 g; Lactosa, 5 g; K_2HPO_4 , 2 g; Agar, 13.5 g; Eosina, 0.4 g; Azul de metileno, 0.065 g; Agua destilada, 1 L; pH = 7.2 .
- ii. Propósito: Es un medio utilizable en lugar del agar de MacConkey para aislar y detectar enterobacterias o bacilos coliformes relacionados, en muestras con bacterias mixtas.
Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben a las bacterias Gram positivas y a las Gram negativas exigentes. También se combinan precipitando a pH ácido, actuando como indicadores de producción de ácidos.
- iii. Interpretación: Los típicos fermentadores fuertes de lactosa, sobre todo *Escherichia coli*, producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico.
Los productores más débiles de ácidos, incluyendo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Hafnia*, forman colonias violeta en 24 a 48 horas.
Los no fermentadores de lactosa, incluyendo *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella* forman colonias transparentes sin vire del indicador.

Medios de aislamiento selectivos.

Los medios se hacen selectivos añadiendo a sus fórmulas una variedad de inhibidores, generalmente en mayor concentración que la hallada en los medios de aislamiento primario. Mediante el uso de estos medios se inhibe el desarrollo de ciertas bacterias superfluas, permitiendo el de especies de significado médico potencial. Por ejemplo, los medios selectivos usados para el aislamiento de enterobacterias a partir de cultivos mixtos, están concebidos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y retardar en grado variable el desarrollo de *Escherichia coli* y otros bacilos coliformes. Esto permite la recuperación de salmonelas y shigelas a partir de muestras donde se hallan en escaso número, en comparación con la concentración masiva de otros microorganismos entéricos.

a. Agar *Salmonella-Shigella* (SS).

- i. Composición: Extracto de carne, 5 g; Peptona, 5 g; Lactosa, 10 g; Sales biliares, 8.5 g; Citrato de sodio, 8.5 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 8.5 g; Citrato férrico, 1 g; Agar, 13.5 g; Rojo neutro, 0.025 g; Verde brillante, 0.033 g; Agua destilada, 1 L; pH = 7.4 .
- ii. Propósito: Es un medio altamente selectivo, que inhibe el desarrollo de la mayoría de los coliformes y permite el de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras ambientales y clínicas.

La alta concentración de sales biliares y citrato de sodio inhibe a todas las bacterias Gram positivas y a muchas Gram negativas, incluyendo las coliformes.

La lactosa es el único hidrato de carbono y el rojo neutro detecta la producción de ácido. El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ es una fuente de azufre, por lo cual, las bacterias que producen H_2S se detectan por el precipitado negro formado con el citrato férrico.

- iii. Interpretación: Las colonias fermentadoras de lactosa se colorean de rojo por el rojo neutro. Raras cepas de *Salmonella* (cepas de *Arizona*), fermentadoras de lactosa, pueden semejarse a *E. coli*.

Hay desarrollo de especies de *Salmonella* y las colonias son incoloras con centro negro debido a la producción de gas H_2S . Las especies de *Shigella* muestran inhibición variable y sus colonias incoloras no presentan ennegrecimiento.

b. Agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (TCBS).

- i. Composición: Extracto de levadura, 5 g; Peptona, 10 g; Citrato de sodio, 10 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 10 g; Bilis de buey, 8 g; Sacarosa, 20 g; NaCl, 10 g; Citrato férrico, 1 g; Azul de bromotimol, 0.04 g; Azul de timol, 0.04 g; Agar, 15 g; Agua destilada, 1 L; pH = 8.6 .
- ii. Propósito: Es un medio altamente selectivo para microorganismos halotolerantes o halófilos que además soportan condiciones alcalinas, como las especies de *Vibrio* de muestras ambientales y clínicas.

La alta concentración de sales biliares y citrato de sodio inhibe a todas las bacterias Gram positivas y a la mayoría de las Gram negativas incluyendo a las coliformes.

El $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ es una fuente de azufre y el gas H_2S se detecta mediante el citrato férrico (relativamente insensible).

La sacarosa es el único hidrato de carbono y el azul de bromotimol junto con el azul de timol, detectan la producción de ácido.

- iii. Interpretación: Las colonias fermentadoras de sacarosa como *Vibrio cholerae* son amarillas por el virre del indicador de pH debido a las condiciones ácidas producto del metabolismo bacteriano. *Vibrio parahaemolyticus* que no utiliza el carbohidrato del medio, da colonias verdes.²⁶

3. Medios para pruebas bioquímicas.

a. Medio de citrato de Simmons.

- i. Composición: MgSO_4 , 0.2 g; $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 g; K_2HPO_4 , 1 g; Citrato de sodio, 2 g; NaCl, 5 g; Agar, 15 a 20 g; Azul de bromotimol (solución alcohólica al 1.5%), 0.08 g; Agua destilada, 1 L; pH = 6.9 .
- ii. Objetivo del medio: Realizar la prueba del citrato.
- iii. Principio de la prueba bacteriana: Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.
- iv. Bases bioquímicas:
- $$\text{Citrato} \xrightarrow{\text{Citritasa} + \text{Mg}^{++}} \text{Oxalacetato} + \text{Acetato}.$$
- $$\text{Oxalacetato} \longrightarrow \text{Piruvato} + \text{CO}_2.$$
- pH alcalino: $\text{Piruvato} \longrightarrow \text{Acetato} + \text{Formato}.$
- pH ácido: $2 \text{ Piruvato} \longrightarrow \text{Acetato} + \text{CO}_2 + \text{Lactato}.$
- $$2 \text{ Piruvato} \longrightarrow \text{Acetoína} + 2 \text{ CO}_2.$$
- v. Interpretación: Si un microorganismo utiliza citrato como única fuente de carbono también puede extraer nitrógeno de la sal de amonio con producción de amoníaco (NH_3), llevando a

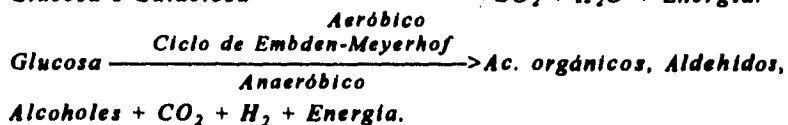
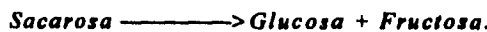
la alcalinización del medio por conversión de NH_3 en NH_4OH , provocando el vire del indicador de pH, de un verde a un azul indicando que la prueba es positiva.

b. Medio de agar hierro de Kligler (KIA) y agar hierro triple azúcar (TSI).

- i. Composición: Extracto de carne, 3 g; Extracto de levadura, 3 g; Peptona, 15 g; Proteasa peptona, 5 g; Lactosa, 10 g; *Sacarosa, 10 g; (sólo para agar hierro triple azúcar); Dextrosa, 1 g; FeSO_4 , 0.2 g; NaCl, 5 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.3 g; Rojo de fenol 0.024 g; Agar, 12 g; Agua destilada, 1 L; pH = 7.4.
- ii. Objetivo del medio: Realizar la prueba de fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa (éste último en el caso de TSI) con o sin producción de gas, así como la detección de H_2S .
- iii. Principio de la prueba bacteriana (utilización de carbohidratos): La fermentación del hidrato de carbono puede producirse en condiciones aeróbicas (pico de flauta) o anaeróbicas (capa inferior del cultivo), ésta se detecta por un indicador de pH (rojo de fenol) el cual vira el medio a amarillo bajo condiciones ácidas por productos del metabolismo microbiano (ácido pirúvico y productos terminales ácidos).

Del metabolismo de los carbohidratos también se pueden liberar gases como $\text{CO}_2 + \text{H}_2$.

iv. Bases bioquímicas:



- v. Interpretación: Pico alcalino/fondo ácido; en este caso sólo se fermenta glucosa cuya concentración es de 0.1%. La fermentación anaerobia de la glucosa, provoca acidez en el fondo por la formación de productos terminales ácidos y alcalinidad en el pico, al

catabolizar las peptonas, una vez que se consumió la glucosa del medio. La prueba se interpreta después de 18 a 24 h. de incubación.

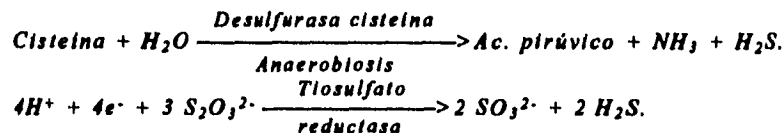
Pico ácido/fondo ácido; estas bacterias fermentan tanto la glucosa como el disacárido (lactosa y/o sacarosa). El disacárido se encuentra en concentración del 1 %, es decir, diez veces más que la glucosa. En un período de 18 a 24 h. aún no se ha consumido completamente el disacárido y todavía existe una condición ácida.

Pico alcalino/fondo alcalino; no hay fermentación de azúcares. Por tanto, el microorganismo obtiene sus nutrientes degradando aeróbica o anaeróbicamente las peptonas. Cuando las peptonas se degradan se produce un pH alcalino por liberación de NH_3 que imparte al medio un color rojo intenso.

Los gases se observan en la picadura del medio por la presencia de burbujas o desplazamiento del medio.

vi. Principio de la prueba bacteriana (producción de H_2S): Observar la capacidad de ciertas bacterias para liberar azufre por acción enzimática de aminoácidos y otros compuestos ($Na_2S_2O_3$) que lo contienen, en forma de H_2S .

vii. Bases bioquímicas:



Identificación de H_2S :



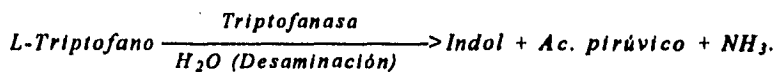
viii. Interpretación: El gas incoloro H_2S reacciona con Fe^{3+} para producir un precipitado negro insoluble (FeS) que significa que la prueba es positiva.

El medio de SIM es más sensible que el KIA para detectarlo debido a su consistencia semisólida y ausencia de hidratos de carbono que inhiban su formación. KIA es más sensible que TSI porque se piensa que la sacarosa inhibe los mecanismos enzimáticos responsables de la producción de H_2S .

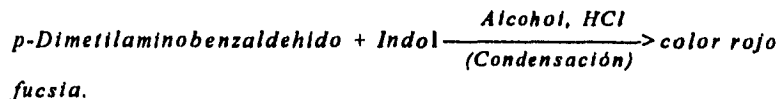
c. Medio de sulfuro-indol-movilidad (SIM).

- i. Composición: Peptona, 26.1 g; Sulfato ferroso de amonio, 0.2 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.2 g; Agar, 3.5 g; Agua destilada, 1 L; pH = 7.3 .
- ii. Objetivo del medio: Observar la prueba de identificación de indol, producción de H_2S (igual que en KIA y TSI), y movilidad.
- iii. Principio de la prueba bacteriana: El principio de la prueba de indol es determinar la capacidad de un microorganismo para producir indol como producto del metabolismo del aminoácido triptofano. Esta prueba se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Kovacs).

iv. Bases bioquímicas:



Identificación del indol:



- v. Interpretación: El desarrollo de color rojo fucsia segundos después de añadir el reactivo de Kovacs indica la presencia de indol. Por tanto, la prueba es positiva.
- vi. Principio de la prueba bacteriana: La prueba de movilidad se utiliza para determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias muestran movilidad gracias a la presencia de flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos.
- vii. Interpretación: La prueba de movilidad se lee realizando un examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difusa que parte de la línea de inoculación, en caso de existir, la prueba es positiva y se interpreta como presencia de movilidad.

d. Medio de agar urea de Christensen.

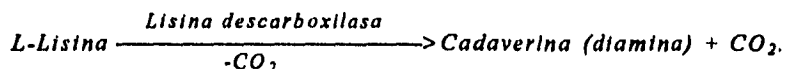
- i. Composición: Peptona, 1 g; NaCl, 5 g; KH_2PO_4 , 2 g; Glucosa, 1 g; Urea, 20 g; Rojo de fenol, 0.012 g; Agar, 15 g; Agua destilada, 1 L; pH = 6.8 .

- ii. Objetivo del medio: Efectuar la reacción de la ureasa.
- iii. Principio de la prueba bacteriana: La hidrólisis de la urea la cataboliza una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. Esta enzima está vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos, es una enzima constitutiva y se clasifica como una amidasa, catalizando la hidrólisis de las amidas.
- iv. Bases bioquímicas:

$$\text{Urea} + 2 \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ureasa}} \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NH}_3 \rightleftharpoons (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3.$$
- v. Interpretación: Por la acción de la enzima sobre la urea se forma amoníaco, que reacciona en solución originando carbonato de amonio, produciéndose alcalinización en el medio y vire del indicador de pH a un color rojo.

e. Medio agar lisina hierro (LIA).

- i. Composición: Peptona, 5 g; Extracto de levadura, 3 g; Glucosa, 1 g; L-Lisina, 5 g; Púrpura de bromocresol, 0.02 g; Citrato amónico férrico, (Citrato férrico, 0.25 g; Citrato de amonio, 0.25 g.); Na₂S₂O₃, 0.08 g; Agar, 12 g; Agua destilada, 1 L; pH = 6.8 .
- ii. Objetivo del medio: Llevar a cabo la prueba de lisina descarboxilasa y producción de H₂S (igual que en KIA y TSI).
- iii. Principio de la prueba bacteriana: La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas, atacan a los aminoácidos en su grupo carboxilo, dando una amina o una diamina y CO₂; estas enzimas son adaptativas o inducidas, las forman los microorganismos solamente cuando se cultivan en medios ácidos y en presencia de sustratos específicos. Los productos de la descarboxilación provocan desviación del pH hacia la alcalinidad. La descarboxilación de los aminoácidos se produce anaeróbicamente, es irreversible, no oxidativa, y requiere de una coenzima común, el fosfato de piridoxal.
- iv. Bases bioquímicas:



- v. Interpretación: El desarrollo de color amarillo en el tubo indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido como para activar la descarboxilasa. El retorno al color azul púrpura en el fondo del tubo indica una reacción positiva debido a la liberación de cadaverina por descarboxilación (puede ocurrir de 24 a 96 horas). En el LIA las especies de *Proteus* y *Providencia* que desaminan más bien que descarboxilan los aminoácidos, se puede ver la presencia de un color rojo en el pico del medio.

f. Medio movilidad-indol-ornitina (MIO).

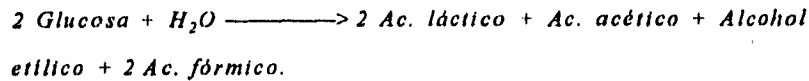
- i. Composición: Extracto de levadura, 3 g; Peptona de gelatina, 10 g; Peptona de caseína, 10 g; L-Ornitina, 5 g; Glucosa, 1 g; Agar, 2 g; Púrpura de bromocresol, 0.02 g; pH = 6.8 .
- ii. Objetivo del medio: Realizar la prueba de ornitina descarboxilasa, identificación de indol (como en SIM) y movilidad (como en SIM).
- iii. Principio de la prueba bacteriana: Medir la capacidad enzimática de un microorganismo para descarboxilar ornitina y formar una amina, con la consiguiente alcalinidad. Se cultiva la bacteria en anaerobiosis cubriendo la superficie del medio con aceite mineral.
- iv. Bases bioquímicas:

$$L\text{-Ornitina} \xrightarrow[\text{-CO}_2]{\text{Ornitina descarboxilasa}} \text{Putrescina (diamina)}.$$
- v. Interpretación: El desarrollo de color amarillo seguido de un retorno al color inicial del medio (color púrpura), indica una reacción positiva debido a la liberación de putrescina.

g. Medio de Clark y Lubs (Caldo Rojo de Metilo/Voges-Proskauer).

- i. Composición: Polipeptona, 7 g; Glucosa, 5 g; K₂HPO₄ (amortiguador), 5 g; Agua destilada, 1 L; pH = 6.9 .
- ii. Objetivo del medio: Efectuar las pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer.
- iii. Principio de la prueba bacteriana: La prueba del rojo de metilo es cualitativa para la producción de ácido y requiere microorganismos positivos que produzcan ácidos fuertes (Ac. láctico, acético, fórmico) a partir de la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta.

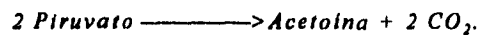
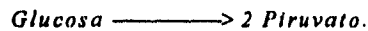
iv. Bases bioquímicas:



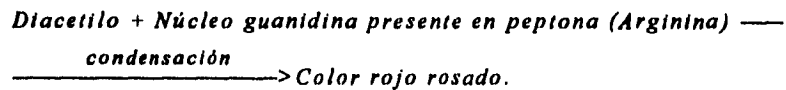
v. Interpretación: Al tomar una alícuota del cultivo de 48 horas de incubación, el desarrollo de color rojo estable en la superficie del medio al agregar rojo de metilo, indica que la producción de ácidos es suficiente como para bajar el pH a 4.4 y vencer la capacidad amortiguadora del sistema dando una prueba positiva.

vi. Principio de la prueba bacteriana: La reacción de Voges-Proskauer se basa en determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoina) a partir de la fermentación de la glucosa.

vii. Bases bioquímicas:



Identificación de la acetoina (reacción de Voges-Proskauer).



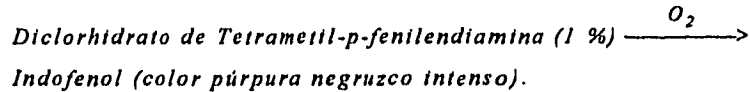
viii. Interpretación: Con la otra alícuota del medio, después de 18 a 24 horas de incubación, una prueba positiva está indicada por el desarrollo de color rojo a los 15 minutos de añadir los reactivos [alfa-naftol (5 %); KOH (40 %)], revelando la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoina.

h. Medio de agar nutritivo (para realizar la prueba de oxidasa por el método de placa directa).

i. Principio de la prueba bacteriana: La prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción se debe a la presencia de un sistema

citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el O₂, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

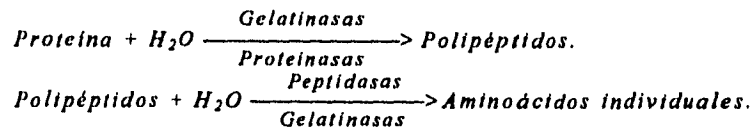
- ii. Identificación de la presencia de la enzima oxidasa:



- iii. Interpretación: La citocromo oxidasa, en presencia de O₂, oxida el reactivo de fenilendiamina para formar un compuesto coloreado, el indofenol.^{26,29.}

i. Medio de gelatina nutritiva para punción.

- i. Composición: Extracto de carne, 3 g; Peptona, 5 g; Gelatina, 120 g; Agua destilada, 1 L; pH = 6.8 .
- ii. Objetivo del medio: Efectuar la prueba de licuefacción de la gelatina.
- iii. Principio de la prueba: Determinar la capacidad de un microorganismo para producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan la gelatina.
- iv. Bases bioquímicas:



- v. Interpretación: La presencia de enzimas de tipo proteolítico se detecta por la digestión o licuefacción de la gelatina presente en el medio.²⁹

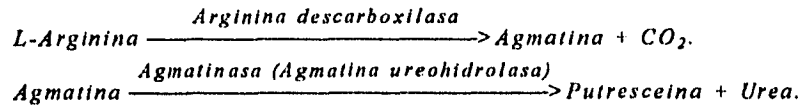
j. Medio de caldo base descarboxilasa de Moeller.

- i. Composición: Peptona, 5 g; Extracto de carne, 5 g; Púrpura de bromocresol, 0.01 g; Rojo de cresol, 0.005 g; Piridoxal, 0.005 g; Glucosa, 0.5 g; Aminoácido deseado [Monoclorhidrato de L(+)-Arginina], 10 g; pH = 6.0 .
- ii. Objetivo del medio: Llevar a cabo las pruebas de las descarboxilasas [lisina (ver LIA), ornitina (ver MIO), y arginina].
- iii. Principio de la prueba: El aminoácido L-Arginina es catabolizado a través de dos sistemas

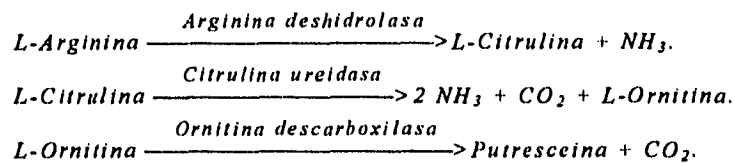
que pueden ocurrir simultánea o separadamente, el sistema de la arginina-deshidrolasa y el sistema de la arginina-descarboxilasa.

iv. Bases bioquímicas:

Sistema de la arginina-descarboxilasa.



Sistema de la arginina-deshidrolasa.



v. Interpretación: El desarrollo de un color amarillo en el tubo control indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido lo suficiente para activar la descarboxilasa. El retorno al color azul púrpura del tubo que contiene el aminoácido indica una reacción positiva debido a la liberación de aminas por descarboxilación.

Cuando el desvío del indicador de pH hacia la alcalinidad es rápido y enérgico, ello indica que el catabolismo de la L-Arginina se debió al sistema arginina-deshidrolasa.

Un desvío del pH más lento y más débil sin formación de amoníaco, se produce cuando la L-Arginina es degradada solamente por el sistema arginina-descarboxilasa.^{26, 29.}

k. Medio caldo base rojo de fenol.

- i. Composición: Peptona, 10 g; Extracto de carne, 1 g; NaCl, 5 g; Rojo de fenol, 0.018 g; Carbohidrato específico (inositol, manitol), 10 g; Agua destilada, 1 L; pH = 7.4 .
- ii. Objetivo del medio: Realizar pruebas de utilización de los hidratos de carbono.
- iii. Principio de la prueba: Determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio base, produciendo ácido o ácido con gas visible.
- iv. Bases bioquímicas:

Hidrato de carbono (disacáridos, trisacáridos, polisacáridos) —

—————> Glucosa.

Glucosa —————> Ac. pirúvico.

Ac. pirúvico —————> Ac. láctico; Ac. acético; Ac. fórmico;

Etanol; Acetolna; Ac. succínico; Ac. propiónico; Ac. butírico;

Butanol; CO₂ etc.

- v. Interpretación: El rojo de fenol es el indicador de pH que hace virar el medio al amarillo, si la producción de ácidos hace que el pH descienda por debajo de 6.8, esto como consecuencia de la fermentación.

4. Reactivos.

a. Reactivo de Kovacs.

- i. Composición: Alcohol amílico o isoamílico, 150 ml; p-Dimetilamino benzaldehído, 10 g; HCl, 50 ml.
- ii. Método de preparación: Disolver el aldehído en el alcohol.
Agregar lentamente el ácido a la mezcla aldehído-alcohol.
- iii. Método de utilización: Agregar 5 gotas de reactivo de Kovacs directamente a un tubo incubado 24 a 48 horas y agitar suavemente.

b. Reactivo rojo de metilo.

- i. Composición: Rojo de metilo, 0.1 g; Etanol (95%), 300 ml; Agua destilada, 200 ml.
- ii. Método de preparación: Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico.
Agregar el agua destilada a la mezcla alcohol-indicador.
- iii. Método de utilización: Retirar 2.5 ml del medio de Clark y Lubs para la determinación de la prueba.
Agregar 5 gotas del indicador rojo de metilo e interpretar el resultado de color inmediatamente.

c. Reactivo de Voges-Proskauer.

- i. **Composición:**
Reactivo A: Alfa-naftol, 5 g; Alcohol etílico (absoluto), 100 ml.
Reactivo B: KOH, 40 g; Agua destilada, 100 ml.
- ii. **Método de preparación:**
Reactivo A; disolver el alfa-naftol en menos de 100 ml de alcohol y aforar con el mismo diluyente a 100 ml.
Reactivo B; pesar rápidamente el KOH y disolverlo en menos de 100 ml de agua.
Una vez frío, aforar a 100 ml con agua.
- iii. **Método de utilización:** Retirar 2.5 ml del medio de Clark y Lubs y agregar primero 0.6 ml de alfa-naftol (5 %) seguido de 0.2 ml de KOH al 40 %. Agitar suavemente para exponer el medio al O₂ atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener una reacción colorida. La prueba se lee 10 a 15 minutos después, por el cambio de color.

d. Reactivo de Kovacs para prueba de oxidasa.

- i. **Composición:** Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina, 1 g; Agua destilada, 100 ml.
- ii. **Método de preparación:** Disolver 1 g de reactivo en menos de 100 ml de agua, y aforar a 100 ml.
- iii. **Método de utilización:** Agregar una gota del reactivo a las colonias sospechosas que desarrollan en el medio en placa, esperar 10 a 15 segundos para interpretar la prueba.
El reactivo imparte un color rosado a las colonias oxidasa positivas que gradualmente viran del marrón a negro intenso.²⁹

B. Resultados de pruebas serológicas

SECRETARIA DE SALUD
SUBSECRETARIA DE COORDINACION Y DESARROLLO
INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y
REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS

México, D. F., 24 de Febrero de 1992.

DR. PABLO MENDOZA
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Y PARASITOLOGIA DE LA UNAM
P R E S E N T E:

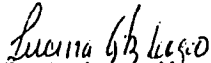
Por medio del presente me permito notificar a usted el resultado de la(s)
cepa(s) enviada(s) al Laboratorio de Enterobacterias de este Instituto,
para identificación de *V. cholerae*:

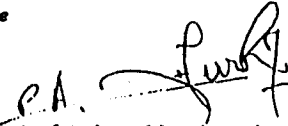
UNA MUESTRA DE OSTIONES DE LA VIGA

Vibrio cholerae NO 01

Sin otro particular, me despido de usted.

A t e n t a m e n t e


C.B.P. Lucina Gutiérrez Gogco
Jefe del Laboratorio de
Enterobacterias


Dr. José Luis Valdespino Gómez
Director del I.N.D.R.E.

SECRETARIA DE SALUD
SUBSECRETARIA DE COORDINACION Y DESARROLLO
INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y
REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS

México, D. F., 3 de Julio de 1992.

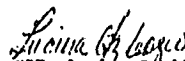
DR. PABLO MENDOZA
Jefe del Departamento de
Microbiología y Parasitología
de la Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

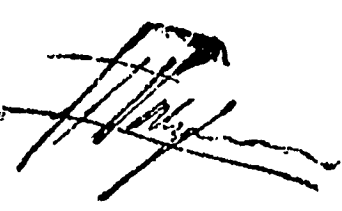
Por medio del presente me permito notificar a usted el resultado de la(s)
cepa(s) enviada(s) al Laboratorio de Enterobacterias de este Instituto,
para identificación de *V. cholerae*:

En alimentos de anexa relación

Sin otro particular, me despido de usted.

A t e n t a m e n t e


QBP. Lucina Gutiérrez Gogco
Jefe del Laboratorio de
Enterobacterias


Dr. José Luis Valdespino Gómez
Director del I.N.D.R.F.

RESULTADOS ALIENÉGENOS						
NO. DE LAB.	NO. DE CAMPO	TIPO MUESTRA	SITIO DE RECOLECCION	LOC.	FECHA DE REC.	RESULTADO
1866	2	XY	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. ch. NO 01
1867	1	XIX	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. Vulnificus
1868	1	XXII	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. ch. NO 01
1859	1	XXIII	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. ch. NO 01
1870	2	XXIII	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. ch. NO 01
1871	3	XXIII	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. ch. NO 01
1872	4	XXIV	CEPA (OSTION)	FECULTAD DE MEDICINA UNAM (MERCADO LA VIGA)	DF.	V. ch. NO 01

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbott, L. S., C. Powers. & Y. Takeda.** Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the west coast of the United States and México. *Journal of Clinical Microbiology.* 27/12/2891-2893 (1989)
2. **Aguayo, C. e I. Pérez.**
ZOOLOGÍA DEL OSTIÓN
Historia Natural de la Sociedad "Felipe Poey"
(1951)
3. **Ahsan, N., R. L. Conter.** Postoperative wound infection associated with *Vibrio parahaemolyticus* in a patient without exposure to seawater. *Journal of Clinical Microbiology.* 26/6/1214-1215 (1988)
4. **Alm, A. R. & P. A. Manning.** Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. *Journal of Clinical Microbiology.* 28/4/823-824 (1990)
5. **Antolí, F. V. y A. García-Cubas.** Sistemática y ecología de moluscos en las lagunas costeras Carmen y Machona, Tabasco, México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 12/1/145-198 (1985)
6. **Bartowsky, J. E., S. R. Attridge. & C. J. Thomas.** Role of the P plasmid in attenuation of *Vibrio cholerae* O1. *Infection and Immunity.* 58/9/3129-3134 (1990)
7. **Blaser, J. M.** *Vibrio cholerae* wound infection acquired in Colorado. *Journal of Infectious Diseases.* 160/6/1083 (1989)
8. **Brock, D. T., D. W. Smith, y M. T. Madigan.**
MICROBIOLOGÍA
4a. edición
Prentice-Hall Hispanoamericana
México (1987)

9. **Castillo, R. Z. G. y A. García-Cubas.** Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 13/2/294-314 (1986)
10. **Chowdhury, R. M. A., K. M. S. Aziz. & B. A. Kay.** Toxin production by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology.* 25/11/2200-2203 (1987)
11. **Dhar, R., M. A. Ghafoor.** Unusual non-serogroup O1 *Vibrio cholerae* bacteremia associated with liver disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 27/12/2853-2855 (1989)
12. **Dumler, S. J., G. J. Osterhout. & J. G. Spangler.** *Vibrio cholerae* non-serogroup O1 cystitis. *Journal of Clinical Microbiology.* 27/8/1898-1899 (1989)
13. **Farmer, J. J. III., F. W. Hickman-Brenner., et al.** Shuck your oyster with care. *The Lancet.* 336 /8709/215-216 (1990)
14. **Fishman. P. H. In: Mos's, J; M. Vanhan; eds.**
ADP RYBOSYLATIN TOXINS AND G PROTEINS
 American Society for Microbiology
 Washington, DC (1990)
15. **French, L. G.** Antibiotics for marine vibrios. *The Lancet.* 336/568-569 (1990)
16. **García, E.**
MODIFICACIONES AL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN CLIMÁTICA DE KÖPPEN
 Talleres de Offset Larios
 México (1988)
17. **Glass, I. R., Claeson, M. & P. A. Blake.** Cholera in Africa: Lessons on transmission and control for Latin America. *The Lancet.* 338/721-795 (1991)
18. **Hoge, W. Ch., O. Sethabutr., L. Bodhidatta. & P. Echeverria.** Use of a synthetic oligonucleotide probe to detect strain of non-serovar O1 *Vibrio cholerae* carrying the gene for heat-stable enterotoxin (NAG-ST). *Journal of Clinical Microbiology* 28/6/1473-1476 (1990)

19. **Honda, T.** Production and partial characterization of pili on non-O1 *Vibrio cholerae*. *Journal of Infectious Diseases*. 157/1/217-218 (1988)
20. **Honda, T., Yuxin Ni. & T. Miwatani.** Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*. 56/4/961-965 (1988)
21. **Howard, J. R. & MD. S. Lieb.** Soft-tissue infection caused by halophilic marine vibrios. *Archives of Surgery*. 123/245-249 (1988)
22. **Jawetz, E. y J. Melnick.**
MICROBIOLOGÍA MÉDICA
 13a. edición
 El manual moderno
 México (1989)
23. **Jonson, G., A. M. Svennerholm. & J. Holmgren.** *Vibrio cholerae* expresses cell surface antigens during intestinal infection which are not expressed during in vitro culture. *Infection and Immunity*. 57/6/1809-1815 (1989)
24. **Kelly, T. M. & E. M. D. Stroh.** Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *Journal of Clinical Microbiology*. 27/12/2820-2822 (1989)
25. **Keusch, T. Gerald; & Michael L. Bennish.** Shigellosis: Recent progress, persisting problems and research issues. *Journal of Infectious Diseases Pediatrics*. 8/10/713-719 (1989)
26. **Koneman, W. E., S. D. Stephen; V. R. Dowell; y H. M. Sommers.**
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
 Editorial Médica Panamericana
 México (1989)
27. **Krieg, R. N. & J. G. Holt.**
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY
 The Williams & Wilkins

- Baltimore/Londos (1984)
28. **Lenette, E. H., A. Balows; W. J. Jr. Hauster; & J. H. Shadomy.**
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
Fifth Edition
American Society for Microbiology
Washington, DC (1991)
29. **Mac Faddin, F. J.**
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA
Editorial Médica Panamericana
México (1990)
30. **Miranda, O. R.** Simposium "América: Cólera a fin de siglo." Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M. (1991)
31. **Miyake, M., T. Honda., & T. Miwatani.** Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. *Infection and Immunity*. 56/4/954-960 (1988)
32. **Morales, C. A. Ma.** Simposium "America: Cólera a fin de siglo". Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M. (1991)
33. **Mossel, A. A. y B. M. García.**
MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
Acribia
Zaragoza, España (1982)
34. **Nakasone, N. & M. Iwanaga.** Pili of *Vibrio cholerae* non-O1. *Infection and Immunity*. 58 /6/ 1640-1646 (1990)
35. **Nakasone, N. & M. Iwanaga.** Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a posible colonization factor. *Infection and Immunity*. 58/1/61-69 (1990)
36. **Nickerson, T. J. y A. J. Sinskey.**
MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS Y SUS PROCESOS DE ELABORACIÓN
Acribia

Zaragoza, España (1972)

37. **Ogawa, A., J. I. Kato, & T. Takeda.** Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveler's diarrhea. *Infection and Immunity*. 58/10/3325-3329 (1990)
38. **Panigrahi, P., B. D. Tall, R. G. Russell, & J. G. Morris.** Development of an In vitro model for study of non-O1 *Vibrio cholerae* virulence using Caco-2 cells. *Infection and Immunity*. 58/10/3415-3424 (1990)
39. **Piersimoni, C., V. Morbiducci, & G. Scalise.** Non-O1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis and bacteraemia. *The Lancet*. 337/791-792 (1991)
40. **Pitrak, L. D. & J. D. Gindorf.** Bacteremic cellulitis caused by non-serogroup O1 *Vibrio cholerae* acquired in a freshwater inland lake. *Journal of Clinical Microbiology*. 27/12/2874-2876 (1989)
41. **Plotkin, J. B.** Polyvibrio infections: *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* dual wound and multiple site infections. *Journal of Infectious Diseases*. 161/364-365 (1990)
42. **Ramírez, G. R. y Ma. L. Sevilla.** Las ostras en México, datos biológicos y planeación de su cultivo. *Facultad de Ciencias*. 7 (1965)
43. **Rank, L. E., I. B. Smith, & M. Langer.** Bacteremia caused by *Vibrio holllisae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 26/2/375-376 (1988)
44. **Reséndez, M. A.** Estudio de los peces de la Laguna de Tamiahua Veracruz, México. *Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 1/79-146 (1970)
45. **Richardson, K., J. B. Kaper, & M. M. Levine.** Human immune response to *Vibrio cholerae* O1 whole cells and isolated outer membrane antigens. *Infection and Immunity*. 57/2/495-501 (1989)
46. **Rodríguez, S. H.** Bacterias coliformes en el procesamiento de ostiones (*Crassostrea virginica*) en Tabasco, México. *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 13/1/445-448 (1986)
47. **Romero, J. J. y H. S. Rodríguez.** Niveles actuales de contaminación coliforme en el sistema lagunar del Carmen-Machona, Tabasco. *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 9/1/121-126 (1982)

48. **Sengupta, D., K. Banerjee. & A. C. Ghose.** Identification of some antigenically related outer-membrane proteins of strains of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 serovars involved in intestinal adhesion and the protective role of antibodies to them. *Journal of Medical Microbiology.* 29/33-39 (1989)
49. **Spriggs, R. D. & R. B. Sack.** Summary of the 25th United States-Japan joint conference on cholera and related diarrheal diseases. *Journal of Infectious Diseases.* 162/548-590 (1990)
50. **Stoebner, A. J. & S. M. Payne.** Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity.* 56/11/2891-2895 (1988)
51. **Takeda, T., G. B. Nair., K. Suzuki. & Y. Shimonishi.** Production of a monoclonal antibody to *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin (ST) which is cross-reactive with *Yersinia enterocolitica* ST. *Infection and Immunity.* 58/9/2755-2759 (1990)
52. **van Heyningen, W. E. & J. R. Seal.** Cholera. The american scientific experience, 1947-1980. Boulder. Westview Press (1983)
53. **Wiström, J.** A case of non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia from Northern Europe. *Journal of Infectious Diseases.* 160/4/732 (1989)
54. **Wolfgang, J., H. Willett., A. Bernard.**
MICROBIOLOGÍA DE ZINSSER
 18a. edición
 Editorial Médica Panamericana
 Argentina (1984)
55. **Yamamoto, T., T. Kamano., M. Uchimura., M. Iwanaga. & T. Yokota.** *Vibrio cholerae* O1 adherence to villi and lymphoid follicle epithelium. *Infection and Immunity.* 56/12/3241-3250 (1988)
56. **Yamamoto, T., & T. Yokota.** Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestines. *Infection and Immunity.* 57/8/2410-2419 (1989)