

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



---

FACULTAD DE QUIMICA

INCIDENCIA Y AISLAMIENTO DE  
Vibrio parahaemolyticus  
EN OSTIONES QUE SE CONSUMEN EN MEXICO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO

PRESENTA:

Luz María Nava Fernández

1 9 7 9



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.

LAB. TESIS 1979.  
NO. ~~M.T.~~ 255  
MCHA \_\_\_\_\_  
ROC \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



**JURADO ASIGNADO;**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>PROF.</b>	<b>SARA MANRIQUE REGIL</b>
<b>VOCAL</b>	<b>"</b>	<b>NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>"</b>	<b>LILIA VIERNA GARCIA</b>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<b>"</b>	<b>ROSA MARIA RAMIREZ GAMMA</b>
<b>2o. SUPLENTE</b>	<b>"</b>	<b>MERCEDES IRUESTE ALEJANDRE</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**LABORATORIO NACIONAL DE SALUD PUBLICA DE LA SSA.**

**SUSTENTANTE:**

**LUZ MARIA NAVA FERNANDEZ.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**PROF: NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA.**

**ASESOR TECNICO:**

**Q.B.P. CRISTINA PARRILLA CERRILLO.**

'A mis padres con cariño y agradecimiento.

A mi hermano Beto. ,

A mi Directora de Tesis:

Profesora Natalia Salcedo Olavarrieta.

A mi Asesor Técnico:

Q.B.P. Cristina Parrilla Cerrillo.

Por sus valiosos consejos.

Al Depto. de Microbiología de Alimentos  
del Laboratorio Nacional de Salud Pública de la SSA.

A Benjamín con amor.

## I N D I C E

	Págs.
INTRODUCCION .....	1
 <b>CAPITULO I</b>	
LOS OSTIONES EN MEXICO .....	3
 <b>CAPITULO II</b>	
CLASIFICACION DE LOS OSTIONES .....	7
MORFOLOGIA DE LOS OSTIONES .....	8
COMPOSICION QUIMICA DE LOS OSTIONES .....	11
NORMAS DE CALIDAD PARA LOS OSTIONES .....	12
 <b>CAPITULO III</b>	
GENERALIDADES DE <u>V. parahaemolyticus</u> .....	15
HISTORIA TAXONOMICA .....	16
HABITAT .....	21
DISTRIBUCION .....	21
PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS .....	23
TEMPERATURA PARA LA SUPERVIVENCIA .....	28
INACTIVACION POR CALOR .....	31
TOLERANCIA AL NaCl .....	33
REACCIONES DEL SUSTRATO Y SECADO .....	36
PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO .....	37
SEROLOGIA .....	39
PATOGENICIDAD .....	41

CAPITULO IV.

PARTE EXPERIMENTAL .....	48
MUESTREO .....	48
METODO DE AISLAMIENTO PARA	
<u>V. parahaemolyticus</u> .....	49
METODO PARA IDENTIFICACION DE	
ENTEROBACTERIAS PATOGENAS .....	55
METODO PARA CARACTERIZAR	
COLIFORMES .....	60
DETERMINACION DE LA CUENTA .....	61
DE ORGANISMOS MESOFILOS AEROBIOS .....	61

CAPITULO V.

RESULTADOS .....	62
CALCULOS ESTADISTICOS .....	66

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES .....	70
RECOMENDACIONES .....	76
BIBLIOGRAFIA .....	78

## I N T R O D U C C I O N

Dentro de la dieta normal del mexicano es difícil incluir pescados y mariscos, ya que por tradición y costo de estos -- productos no es fácil su adquisición; aún así, podemos decir -- que el ostión es el marisco de mayor consumo, principalmente -- en forma natural, es por eso que si su calidad bacteriológica -- no es adecuada puede ser el causante de intoxicaciones o en-- -- fermedades del tipo gastrointestinal. Los ostiones pueden -- contaminarse por microorganismos que se encuentran en el me-- -- dio acuático donde se cultivan (esteros). Además tienen el -- riesgo de contaminarse durante su cosecha, procesado y envío -- cuando este producto ha sido recolectado en áreas sujetas a -- contaminaciones con desechos peligrosos humanos o animales.

El objeto de esta tesis es el estudio de un microorganis-- -- mo patógeno cuyo habitat es un medio marino y por lo tanto -- puede contaminar a cualquier producto del mar, se trata de -- Vibrio parahaemolyticus, el cual se intentó aislar de ostio-- -- nes desconchados; también se efectuó un estudio sobre la cali -- dad bacteriológica de este alimento para identificar organis-- -- mos fecales (coliformes) y enterobacterias patógenas (Salmone -- lla y Shigella), y de esta manera contribuir a un mejor con-- -- trol sanitario de los ostiones comerciales para disminuir las -- intoxicaciones o enfermedades provocadas por el consumo de -- este alimento.

Vibrio parahaemolyticus se ha aislado en muchas partes - del mundo, siendo más común de lo que se sospecha como causante de intoxicaciones de tipo alimentario; por tal razón es posible que en nuestros esteros se encuentre este microorganismo contaminando los ostiones que posteriormente consumimos.

En el presente trabajo se dará una introducción sobre -- los ostiones en México y generalidades de los mismos, posteriormente se tratará todo lo referente a características y -- propiedades bioquímicas, así como métodos de aislamiento de - Vibrio parahaemolyticus y otros microorganismos enteropatógenos, para finalmente presentar los resultados de la parte --- experimental y conclusiones.

## CAPITULO I.

## LOS OSTIONES EN MEXICO.

La importancia comercial de las ostras deriva de sus excepcionales cualidades alimenticias. Por esta razón aún las civilizaciones más antiguas no se atuvieron exclusivamente a la productividad natural de los bancos, sino que elaboraron los primeros procedimientos de cultivo. El antecedente más antiguo se encuentra en la civilización china, que fué la creadora de las prácticas ostrícolas. Los romanos también desarrollaron dicha disciplina y en cuanto a consumo de este molusco, se sabe con certeza, que además de las culturas mencionadas, los primeros pobladores de las costas americanas utilizaban ampliamente este producto con fines alimenticios. Cabe notar también el temprano desarrollo de las técnicas de cultivo en el Japón, país que sobresale actualmente en esas actividades.

Yonge, prestigiado hidrobiólogo inglés, dice al referirse a la importancia económica de las ostras: "Debe darse lugar de honor a la ostra. Ningún invertebrado marino se colecta en números tan vastos o da empleo a tanta gente en tantos y tan diversos países". (1)

Las características nutritivas de las ostras pueden resumirse como sigue:

1) Alto contenido en proteínas y carbohidratos de primera calidad. Las ostras se consideran como los alimentos proteínicos de más fácil digestión.

2) Elevada proporción de sales minerales indispensables: Fe, Cu, y I, etc. Las ostras, junto con las almejas y langostas, contienen más yodo que cualquier otro alimento marino. - Ostrae virginica en fresco contiene hasta 1.16 mg de yodo por Kg. y en seco hasta 6 mg. Siguen al hígado de res y cerdo en contenido de Fe y son las más altas en Cu. Se calcula que una docena de ostiones proporciona mucho más de las necesidades humanas diarias de Fe y Cu, todo el yodo necesario, 2/10 de la proteína, Ca, Mg y P. Contienen la mitad de Ca, cinco veces el Mg y más P que la leche, sobre las bases de pesos iguales.

3) Apreciable dotación vitamínica: el mismo orden de 12 ostiones proporciona 2/10 de la ración necesaria de vitamina A, tiamina, riboflavina y niacina. (13)

De estas sobresalientes cualidades alimenticias se desprende la gran importancia que reviste incrementar la producción y el consumo de este producto, para un pueblo tan pésimamente alimentado como el de México, considerando entre aquellos cuyo consumo de mariscos es muy bajo, menos de 5 Kg per capita, en comparación con países en que se consumen hasta 70 Kg al año por habitante.

Las costas nacionales disponen de extensas áreas en las que existen bancos naturales de ostras, de donde son extraídas en escala comercial desde hace largo tiempo.

Como los recursos en cuestión no son inagotables y la explotación en muchos casos ha sido intensa y poco cuidadosa, ha aparecido la amenaza del agotamiento de los bancos, agudizado también por factores naturales. Esta situación es afrontada en regiones tales como Guaymas, Son., Tampico, Tamps., Boca del Río y Alvarado, Ver., en donde el agotamiento de los bancos se manifiesta por la predominancia de ostras juveniles en la captura comercial, o bien por la total desaparición de las poblaciones comerciales.

Aunque en diversas ocasiones la ostricultura ha sido propuesta por diferentes personas, esta proposición ha sido inoperante, ante la ignorancia general de los fundamentos biológicos necesarios para iniciar la aplicación de esta disciplina. (13)

Mediante datos recogidos en la Dirección General de Pesca, podemos observar que la producción y consumo de ostión ha aumentado de los años 1975 a 1976, para disminuir después por la explotación inadecuada de los esteros:

## ENERO - DICIEMBRE

AÑO	PRODUCCION NACIONAL (Ton)	CONSUMO NACIONAL (Ton)
1975	26,988	26,988
1976	29,226	29,226
1977	27,455	27,455

En la actualidad existen explotaciones ostioneras en numerosos lugares; a lo largo de ambos litorales mexicanos existen multitud de lugares en que se dan condiciones inmejorables para que prosperen las acumulaciones de ostras.

La posición y potencialidad de México, a ese respecto, es realmente privilegiada. (13)

## CAPITULO II.

CLASIFICACION, MORFOLOGIA Y COMPOSICION  
QUIMICA DE LOS OSTIONES.

Clasificación de las ostras:

Las ostras pertenecen al Phylum Mollusca.

Orden Pelecypoda o Lamelli  
branchiata.

Familia Ostreidae.

La familia incluye tres géneros vivientes a saber:

Género Ostrae Linnaeus, 1758.

Género Crassostrea Saccon, 1897.

Género Pycnodonta Fisher van Waldheim, 1834.

En México existen aproximadamente 16 especies de ostras, según Francisco Contreras (1932). Sin embargo, los últimos -- estudios han reducido este número, las más abundantes son:

(13)

Ostrae crassa

Ostrae virginiana

Ostrae canadensis

Ostrae borealis

Ostrae rostrata

Ostrae frons

Ostrae spathulata

Ostrae lucasiana

Ostrae turturiana

Ostrae prismática

Ostrae margaritácea

Ostrae amara

Ostrae tubulifera

Ostrae serra

Ostrae dalli

Ostrae mexicana

Ostrae angélicaOstrae cumingianaOstrae veatchiOstrae megodonOstrae fisheriOstrae turbinataOstrae turbinataOstrae solidaOstrae jacobeaCrassostrea virginicaCrassostrea corteziensisCrassostrea iridescensCrassostrea palmula

#### Morfología de los ostiones:

El ostión pertenece al grupo de los moluscos, específicamente a los bivalvos (animales que tienen un par de conchas - calcáreas desiguales o simétricas), una izquierda o inferior por medio de la cual se adhiere al fondo y permanece fija al sustrato y otra derecha o superior, sin dientes, plana y que se cierra y abre para permitir el paso del agua que contiene su alimento y el oxígeno necesario para vivir. Ambas valvas se unen en su parte anterior por medio de charnela y ligamento interno: la forma y grosor es variable de acuerdo con diferentes circunstancias, especialmente relacionadas con el medio ambiente y las condiciones de aglomeración o buena distribución. La superficie externa está constituida por la superposición de finas láminas dispuestas concéntricamente; químicamente están compuestas de carbonato de calcio y sustancias orgánicas. (13)

La valva de la derecha muestra en su extremo anterior - un surco ancho en donde se aloja un ligamento que une a esta valva con la otra, constituyendo la charnela. La superficie-interna de la valva derecha presenta, hacia la parte poste--rior, la impresión muscular, cuyo relajamiento abre las valvas y cuya contracción las cierra.

Sin la concha superior se observa el cuerpo como una masa blanquecina, en cuya parte externa hay una membrana que - tapiza la concha, denominada manto. Entre el manto y el cuerpo del animal se encuentran cuatro laminillas como cerdas -- llamadas branquias unidas por una membrana que el ostión usa para filtrar su alimento, y captar el oxígeno disuelto en el agua.

En la porción viva de las ostras se puede distinguir el aparato digestivo, sistema circulatorio, aparato reproduc---tor.

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. Siendo sedentario, no posee movimiento, y por lo tanto permanece fijo a un sustrato, el cual --- puede ser de diferentes materiales. (13)

Las ostras en su mayoría son habitantes típicos de los esteros, desembocaduras de los ríos, lagunas costeras y de -

todas aquellas formaciones litorales en que se mezclan características de las aguas oceánicas con las de los ríos, produciendo las salinidades más adecuadas, y por supuesto, en donde se reuna también el requisito indispensable de un sustrato duro, limpio y adecuado para que se fijen las larvas de los adultos. Esta fusión de aguas es necesario a fin de lograr cierto grado de salinidad en que se propicia la formación de bancos ostrícolas de las especies más aprovechadas en México, como son: C. virginica, C. corteziensis, C. gigas O. lurida. Se tiene el caso de algunas costeras de baja salinidad en las que no existen estas especies, (Tres palos y Coyuca, Gro.).

Sin embargo, hay especies adaptadas a la alta salinidad como C. iridescens explotada potencialmente en entidades del Pacífico como "Costra Brava" de Colima y Guerrero. (13)

En México, existen tres tipos de ostras

En el Pacífico: Crassostrea iridescens o de roca,

Crassostrea cortiziensis o estuarino.

En el Golfo: Crassostrea virginica, que es el más --  
apreciado en sabor y es el de mayor demanda. (13)

CUADRO NUM. I  
COMPOSICION QUIMICA DEL OSTION

La composición química de los moluscos y crustáceos más comunes fue compilada por Atwater y Bryant, la cual se presenta en el cuadro siguiente: (20)

	Muestras de ostión	Agua %	Proteína %	Grasa %	Cenizas %
Mínima	34	81.7	4.2	0.6	1.2
Máxima		91.4	10.0	1.9	2.8
Promedio		86.9	6.2	1.2	2.0
Camarones		78.89	9.68	3.12	3.90
Ostiones		87.97	6.76	1.26	0.57

## NORMAS DE CALIDAD PARA LOS OSTIONES

El problema del establecimiento de un índice seguro y al mismo tiempo razonable para la norma de calidad de los ostiones que se expenden en el mercado ha sido preocupación de muchos años. Este problema indica la selección de índices bacteriológicos adecuados así como límites numéricos que sirvan de base para juzgar si el producto alimenticio ha sido manejado adecuadamente.

En los últimos años se ha incrementado el interés en la determinación de la calidad bacteriológica de los ostiones -- tal como son recibidos en el mercado. Algunas agencias establecieron normas ya sea oficiales o tentativos mediante los -- cuales podían por lo menos clasificar el producto tal como -- era recibido. Posiblemente el más importante es el sistema de clasificación establecido por Canada en 1951, que agrupa los ostiones en tres categorías: Aceptable, aceptable condicionalmente y rechazable, lo que permite juzgar si un producto debería o no estar o ser tolerado en el área de consumo. Debido -- al éxito obtenido en Canada con este sistema, el método fué -- aceptado en principio con algunas modificaciones en la Junta de Saneamiento de Ostiones de EE.UU.

El criterio bacteriológico es como sigue:

Aceptable: Ostiones desconchados, bacterias coliformes -- número más probable (NMP), no mayor de 16,000 en 100 ml. y/o

un recuento de organismos mesófilos aerobios (cuenta estándar en placa) no mayor de 50,000 colonias por g.

Acceptable condicionalmente: Ostras desconchadas con un - MNP mayor de 16,000 por 100 ml pero menor de 160,000 por 100 ml. y un recuento estándar en placa mayor de 50,000 por g --- pero menor de 1,000,000 por g.

Rechazable (inadmisibile): Ostiones desconchados con un - MNP de coliformes de 160,000 o más por 100 ml y un recuento - en placa de 1,000,000 o más por g.

Esta Junta de Saneamiento de Ostiones estaba formada por representantes de las agencias de control estatal, federal y municipal, así como por la Sección de Investigación y Control de Mariscos del Servicio de Salubridad Pública de los EE.UU.- Los resultados para obtener el criterio bacteriológico fueron dados a conocer en una junta en Washington, D.C. el 26 de junio de 1958. (9)

En nuestro país aún no hay una norma oficial para el control de la calidad bacteriológica de los mariscos, con lo único que se cuenta es con un proyecto de norma, el cual se basa en los resultados de la Junta de Saneamiento de los EE.UU., - mencionada anteriormente; y da como índices para decidir si - un marisco es apto para su consumo los siguientes: cuenta de organismos mesófilos aerobios (cuenta estándar) en placa, --- 100.000 colonias por gramo; organismos coliformes, 160 colo--

nias por gramo; una cuenta de E. coli de 10 colonias por gramo, y deben estar exentos de organismos de los géneros Salmonella y Shigella. (17)

## CAPITULO III

Vibrio parahaemolyticus

[Vibrio parahaemolyticus es un microorganismo marino del grupo de bacterias denominadas frecuentemente "halófilas patógenas".]

Es bien conocido en el Japón, donde algunas cepas han sido causantes de una intoxicación alimentaria del tipo disentérico por el consumo de pescados y moluscos crudos. (19)

[Este microorganismo se encuentra en forma natural en muchas especies de la fauna marina.] En los EE.UU. V. parahaemolyticus ha sido aislado de gran variedad de alimentos marinos tales como pescados, moluscos y crustáceos, tanto de las costas del Atlántico como del Golfo y Pacífico. En el verano de 1971 se presentaron cuatro casos de intoxicación por V. parahaemolyticus que ocurrieron en Maryland, después del consumo de cangrejo crudo. Estos incidentes representan la primera -- intoxicación confirmada en EE.UU. por V. parahaemolyticus, en la que el microorganismo causante fué recobrado tanto de los alimentos contaminados como de las heces de los pacientes.

[De acuerdo con estadísticas publicadas en Japón, resulta revelador un estudio sobre cierta cantidad de reportes de infecciones que se comprobó eran causadas por Vibrio parahaemolyticus. El brote original, en 1951, se limitó a 272 pacientes, 20 de los cuales murieron. En 1963 hubo 524 brotes que -

incluyeron más de 12,000 infecciones; en 1964 la evaluación -  
fué de 558 brotes con más de 14,000 infecciones. El promedio-  
de muertes en cada uno de estos años fué de 10. Las estadísti-  
cas demostraron que este microorganismo fué el agente etioló-  
gico en 60 al 70% de los casos de diarrea estival reportados-  
en el Japón. Estas cifras resultan sorprendentes, si se consi-  
dera que en los EE.UU. en menos del 35% de los trastornos --  
gastrointestinales no hay un agente etiológico identificado.  
Además, debido a la costumbre en el Lejano Oriente y en el Su-  
reste de Asia de comer pescados crudos, no hay razón para su-  
poner que este microorganismo no sea en otros países todo lo-  
relevante que lo es en el Japón. (4)

#### HISTORIA TAXONOMICA.

Vibrio parahaemolyticus como ahora es conocido, fué ais-  
lado por primera vez en la Universidad de Osaka por Fujino en  
1950. Este organismo fué clasificado como del género Pasteure-  
lla, porque su tinción bipolar y naturaleza son comunes de es-  
te género en los medios de cultivo empleados. En 1955, se in-  
criminó al "Asazuke" (pepino salado) - en un caso de gastroen-  
teritis de 120 sin que ocurriera ningún deceso. Takikawa cla-  
sificó el agente causante como Pseudomonas enteritis observó-  
que las características de la cepa aislada eran similares al-  
cultivo aislado por Fujino, pero cambio el género a Pseudomo-  
nas basándose en las propiedades bioquímicas y el crecimiento

en el medio que contenía sal. Esta fué la primera indicación de la naturaleza halófila de este organismo. (12)

Miyamoto et al propusieron el nombre genérico de Oceanomonas debido a las diferencias serológicas entre Pseudomonas, efectuaron estudios detallados de las características de los cultivos aislados de alimentos involucrados en intoxicaciones y de aquellos aislados por Fujino et al y Takikawa.

Todos estos cultivos podían fermentar la glucosa con o sin producción de gas. Esto les sugirió que se clasificaran en los géneros Vibrio o Aeromonas. Vibrio no fué considerado como V. chólerae, pues crece a una concentración de sal del 3% en un medio de cultivo ordinario, ya que su hábitat natural es un medio marino. (12)

Tres especies fueron consideradas basándose en el poder de utilizar quitina y alginato, resistencia al desoxicolato, utilización de citrato y fermentación de sacarosa.

Oceanomonas parahaemolyticus (Pasteurella parahaemolyticus, Fujino) fué negativo en todas las pruebas.

Oceanomonas alginolyticus (Pseudomonas enteritis, Takikawa Serotipo II), fué positiva para todas las pruebas.

Oceanomonas enteriditis (Pseudomonas enteritis, Takikawa) fué positiva para quitina, desoxicolato y citrato.

Sakazaki et al descartaron al género Pasteurella en base al halofilismo y a Pseudomonas porque incluiría a muchos orga

nismos heterogéneos que poseen diferentes propiedades. (15)

Para aclarar la posición taxonómica de estos organismos-hicieron extensos estudios en muchos de los organismos halófilos en cuestión; estos organismos estaban íntimamente relacionados con el género Vibrio.

Se reconocieron tres subgrupos basados en diferencias de crecimiento en agua peptonada conteniendo 7-10% de NaCl, reacción de Voges-Proskauer, fermentación de sacarosa, arabinosa y celobiosa.

En el subgrupo 3 fué nombrado V. anquillarum especie tipo, el cual no crece a 7-10% de NaCl. En el subgrupo 1 y el subgrupo 2 fueron designados como V. parahaemolyticus especie tipo. Las cepas del subgrupo 2 crecieron en 7-10% de NaCl, -- mientras que las del grupo 1 crecieron solo a 7% de NaCl. --- (15)

Casi todas las cepas del subgrupo 1 fueron aisladas de heces de pacientes afectados con gastroenteritis, las del grupo dos fueron aisladas de alimentos marinos y del agua de mar. La presencia del subgrupo 2 en pacientes con gastroenteritis no fué tan significativamente elevada como en personas sin enteritis identificable. Por lo que concluyeron que el subgrupo 2 no es patógeno para el hombre. Las cepas del subgrupo 2 crecieron en 10% de NaCl, fermentaron la sacarosa y produjeron acetofina, mientras que las del grupo 1 no. (21)

Por estas diferencias Sakazaki propuso el nombre específico de V. parahaemolyticus para los organismos del biotipo 1 (subgrupo 1); y el nombre de Vibrio alginolyticus a los organismos del biotipo 2 (subgrupo 2)

En Tokio, en 1965, Zen - Yoji y sus colaboradores encontraron que, en base a las evidencias epidemiológicas y etiológicas sólo V. parahaemolyticus es enteropatógeno. (21)

En el cuadro Núm. 2, se muestran las características que diferencian a V. parahaemolyticus de V. alginolyticus. (10)

## CUADRO Núm. 2

CARACTERISTICAS COMPARATIVAS DE Vibrio  
parahaemolyticus y Vibrio alginolyticus (10)

Medio	<u>V. parahaemolyticus</u>	<u>V. alginolyticus</u>
Tinción de Gram	Negativo	Negativo
Pleomorfismo	Positivo	Positivo
Flagelación polar	Positivo	Positivo
Movilidad TSI	Positivo	Positivo
TCBS	Colonias azul-verde, lisas, largas y ligeramente turbias	Colonias amarillas largas y lisas
1% peptona sin NaCl	No hay crecimiento	No hay crecimiento
1% peptona 3% NaCl	Crecimiento	Crecimiento
1% peptona 7% NaCl	Ligero crecimiento	Crecimiento
1% peptona 10% NaCl	Usualmente sin Crecimiento	Ligero Crecimiento
TSI gelosa	Alc/ác	Alc/ác
H <sub>2</sub> S (TSI gelosa)	Negativo	Negativo
Indol	Positivo	Positivo
Voges-Proskauer	Negativo	Positivo
Hemólisis estable al calor	Usualmente positivo	Usualmente negativo

## HABITAT.

Por ser un organismo de naturaleza halofila, no es de -- sorprender que V. parahaemolyticus sea encontrado en esteros- y en aguas salobres. Este organismo ha sido aislado del interior de fuentes de sal. Los sustratos para el crecimiento de V. parahaemolyticus no se limitan a mariscos, pescados y ---- plancton. Se ha demostrado su crecimiento en extractos de pepino, papa, calabaza, rábano, col y lechuga. V. parahaemolyticus parece estar asociado con habitats que poseen un alto contenido en nutrientes orgánicos.

Datos limitados indican que en el medio marino, que contiene animales en gran cantidad, la cantidad total de V. parahaemolyticus es generalmente más alta que en aguas con bajo contenido de material orgánico.

Este organismo ha sido aislado en aguas costeras alrededor del mundo. La distribución geográfica en habitats acuáticos ha sido regida por la temperatura del agua. Su presencia en poblaciones altas está correlacionada con el incremento de la temperatura del agua durante los meses de verano. A las enfermedades estacionales causadas por V. parahaemolyticus se les conoce como "diarrea de verano" (2)

DISTRIBUCION DE V. parahaemolyticus

Por muchos años el aislamiento de V. parahaemolyticus se limitó a Japón, donde es responsable del 70% de las gastroen-

teritis Miyamoto et al, investigaron la distribución estacional de estos organismos en las bahías de Sagami y Tokio. Observaron una distribución del tipo "invierno-verano", una estenchalina (adaptable a ligeros cambios de salinidad) y otra eurihalina (capacidad para vivir en agua en amplios grados de salinidad). La primera predomina en el invierno y la segunda en el verano y en aguas costeras. (12)

V. parahaemolyticus ha sido aislado en Alemania, en el Lejano Oriente, Hong Kong, Taiwan, Singapur, las Filipinas, India, Corea, Ceylán, Hawai, China, Tailandia y en los Países Bajos. Se han estudiado las muestras de excremento de las fuerzas americanas destacadas en el Lejano Oriente y se descubrieron 2 pacientes en Okinawa y 12 en Corea con infecciones de V. parahaemolyticus. (4)

En los años recientes ha sido estudiado más ampliamente en los EE.UU. Fueron aislados de agua y sedimentos del Golfo y costas del Atlántico, organismos parecidos a V. parahaemolyticus.

Baross y Liston aislaron a V. parahaemolyticus de agua de mar, y mariscos del Noreste del Pacífico, y reportaron una distribución estacional similar a la del Japón, Gran número se aísla en el verano, pero pocos al iniciarse el invierno. También ha sido aislado de cangrejos moribundos, ostiones del Golfo de México, ostiones del Pacífico y de carne de mariscos procesada. (12)

## PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

V. parahaemolyticus se caracteriza por ser un organismo - Gram negativo, bacilo corto, que muestra poliformismo: ligeramente curvo, recto o en forma de cocos y pueden observarse más formas, pero generalmente son bacilos cortos curvos. Todas las cepas de V. parahaemolyticus son móviles por su único flagelo-polar. En cajas de gelosa casi todos los cultivos aparecen como colonias lisas, circulares opacas y húmedas con bordes enteros. (12) ] ab

Es un organismo anaerobio facultativo, y para su crecimiento requiere de iones Na, K y Mg. Crecen pobremente en la mayoría de los medios comunes, a menos que se añada 2-3% de NaCl. (19)

V. parahaemolyticus crece a temperaturas de 22 a 42°C pero no crece a 2°C, su temperatura óptima es de 30-37°C. Se ha observado que resiste pH entre 5-11, siendo el óptimo de 7.5-8.8, el pH máximo de crecimiento es 9.4.

La concentración de sal que requiere es de 1-7%. Temmy-notó que V. parahaemolyticus muere por calentamiento a 55°C por 10 min. y 60°C por 5 min. en un medio líquido. (12) (19)

Es corriente la disociación de colonias en los medios gelosados, esta disociación puede ser inhibida añadiendo un detergente del tipo alcohol alifático sulfonado, por ejemplo Teepol, al medio de cultivo. (19)

Kodama ha señalado que la mayoría de las cepas de V. para haemolyticus aisladas de pacientes producen una hemólisis clara en gelosa sangre humana, mientras que las procedentes de -- agua de mar y de pescado, o son débilmente hemolíticas o no -- son hemolíticas; con el fin de evitar confusiones con la actividad hemolítica de V. parahaemolyticus en placas de gelosa -- sangre, dicha hemólisis fué nombrado como el fenómeno de "Kanagawa", después de que éste lo describió. (19)

Sakazaki y sus colaboradores probaron 3,370 cepas de V. parahaemolyticus en gelosa sangre y encontraron que 96.5% de -- las 2,720 cepas obtenidas de pacientes humanos fueron Kanagawa positiva, y el 99% de las 650 cepas derivadas de pescados y -- agua de mar fueron Kanagawa negativas. Miyamoto y colaborado-- res también reportaron que cerca del 90% de cepas aisladas de -- casos de gastroenteritis fueron Kanagawa positiva, y sólo ---- 0.5% de los cultivos de agua de mar y productos de pesca fue-- rón Kanagawa positivos. También se reportó que las cepas Kanagawa positivas son enteropatógenas, comprobándose con voluntarios a los que se les dieron cepas Kanagawa positivas. (8)

Las propiedades bioquímicas que han sido reportadas para Vibrio parahaemolyticus son las siguientes: (12)

1. Hidrólisis de almidón	+	18. Alginato	-
2. Hemólisis	+	19. Luminiscencia	-
3. Producción de acetoina	-	20. Pigmento	-
4. Gelosa TSI	alc/ac, gas-	21. Descarboxilación de la Lisina	+
	H <sub>2</sub> S -	Arginina	-
5. Crecimiento 0% NaCl	-	Ornitina	-
3%	+	22. Sensibilidad a pteridina 0/129	+
7%	+	23. Hidrólisis de quitina	+
10%	-	24. Sensibilidad a la penicilina	-
6. Indol	+	25. NH <sub>3</sub> de arginina	-
7. Rojo de metilo	+		
8. Utilización de citrato	+	Fermentación de:	
9. Desaminasa de la fenilalanina	-	26. Celobiosa	-
10. Reducción de nitratos	+	27. Sacarosa	-
11. Ureasa	-	28. Arabinosa	+
12. Licuefacción de la gelatina	+	29. Maltosa	+
13. Catalasa	+	30. Manitol	+
14. Malonato	-	31. Trehalosa	+
15. Oxidasa	+	32. Lactosa	-
16. Rojo - Chólerae	-		
17. Fermentación de glucosa (Hugh- Leifson)	+		
	gas -		

33. Ramnosa	-	54. Gluconato de pota + sio	+
34. Xilosa	-	55. Arabinosa	variable
35. Adonitol	-	56. Adonitol	-
36. Inositol	-	57. Xilosa	-
37. Sorbitol	-	58. Ramnosa	-
38. Salicina	-	59. Eritritol	-
39. Galactosa	+	60. Glicerol	+
40. Manosa	+	61. Maltosa	+
41. Rafinosa	-	62. Lactosa	-
42. Fructosa	-	63. Sacarosa	-
43. Dulcitol	-	64. Celobiosa	-
44. Inulina	-	65. Melibiosa	-
Utilización como fuente		66. Rafinosa	-
de carbono:		67. Salicina	-
45. Glucosa	+	68. Inositol	-
46. Fructosa	+	69. Trehalosa	+
47. Sorbitol	variable	70. Melecitosa	-
48. Manitol	+	71. Lactato	-
49. Sorbosa	-	72. Gluconato	+
50. Manosa	+	73. Piruvato	+
51. Galactosa	+	74. Acetato	+
52. Dulcitol	-	75. Formato	-
53. Alfa-metil D-glucosidasa	-	76. Citrato	+
		77. Succinato	+

78. Malonato	-
79. Malato	+
80. Oxalato	-
81. DL-fenilalanina.	-
82. L-triptofano	-
83. Benzoato	-
84. Fenol	-

Utilización en medios complejos:

85. Alginato	-
86. Malonato	Variable
87. Tartrato	Variable
88. Citrato	Variable
89. Mucato	Variable

Existen pruebas más sofisticadas para caracterizar a V. parahaemolyticus. Colwell sujetó a varias especies marinas, -- V. chólerae y V. parahaemolyticus y otros organismos relacionados con 200 pruebas diferentes, morfológicas, fisiológicas y biológicas, por tales pruebas fué posible separar a V. parahaemolyticus de otros organismos, sus especies se agrupan en ---  $S \geq 80\%$ . La composición de bases del ADN para todas las especies de Vibrio fué de 40-48% G+C, existiendo una pequeña relación entre V. chólerae y V. parahaemolyticus. (12)

#### TEMPERATURA PARA EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

##### DE Vibrio parahaemolyticus

La temperatura óptima para el crecimiento de V. parahaemolyticus se encuentra en el rango de 35 - 37°C. La temperatura más baja que soporta es de 3 - 13°C, y depende fuertemente del sustrato de crecimiento y el habitat bajo el cual se estudie. Se ha reportado un agudo decremento en V. parahaemolyticus viable en el caparazón de camarón completamente inoculado durante los dos primeros días de almacenamiento a 3,7,10 y --- -18°C; durante los siguientes 6 días no hubo diferencia alguna. También se observó un ligero incremento en la población de --- V. parahaemolyticus en camarón homogeneizado durante las primeras 12 horas de almacenamiento a 3,7,10°C, seguido por una --- disminución a los 4 y 8 días. Poca supervivencia fué observada en muestras almacenadas a 3 y -18°C. (2)

La temperatura más baja reportada para este organismo durante su crecimiento en los medios de laboratorio es de 5°C; a esta temperatura límite para su crecimiento le afecta el pH, - pues de seis géneros estudiados, el pH más bajo permitido a -- 5°C es de 7.3. Se reportó un crecimiento mínimo a temperaturas de 9.5 a 10.5°C en medios de laboratorio mantenidos en posición estática durante la incubación. Agitando un cultivo en -- caldo tripticasa soya con 3% de NaCl, a un pH de 7.2 se observó crecimiento a 7 y 8°C lo cual se relaciona con los reportes que indican que se observa un mínimo de crecimiento de V. para haemolyticus a un pH de 7.1 - 7.7 a 9°C en un medio similar.

(3)

Este organismo puede multiplicarse a niveles peligrosos cuando los ostiones se almacenan a temperaturas mayores de 8°C esta multiplicación ocurre entre 10 y 12°C, disminuyendo cuando las temperaturas de almacenamiento se encuentran entre - 20 0 y 4°C. El organismo puede sobrevivir por largos períodos en la superficie de pescados y mariscos a una temperatura de 5- 8°C. (2)

V. parahaemolyticus en pescados y mariscos es susceptible a efectos letales de congelación y refrigeración.

Disminuye más las formas viables de V. parahaemolyticus en un medio de cultivo a -10°C que a -20°C. La supervivencia de este organismo en un medio de cultivo es mayor a temperatu-

ras de  $-10$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  que a  $0^{\circ}\text{C}$ .

En pescados y mariscos se identificó después de 15 días a  $1^{\circ}\text{C}$  y a los 60 días a  $-15$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ . Se recobraron organismos viables de carne de cangrejo almacenado a  $1$ ,  $-15$  y  $-30^{\circ}\text{C}$  por 30 días. También puede ser evidenciado en ostiones inoculados después de 40 días de almacenamiento a  $1^{\circ}\text{C}$  y a  $-15$  y  $-30^{\circ}\text{C}$  se encontró a los 130 días. Se observaron menos organismos vivos a  $11$ ,  $8$  y  $5^{\circ}\text{C}$ . Se ha demostrado que V. parahaemolyticus puede sobrevivir por lo menos 3 meses a  $4^{\circ}\text{C}$ .

V. parahaemolyticus puede ser aislado fácilmente de ostiones y muestras de sedimento marino cuando éstos se encuentran por debajo de  $10^{\circ}\text{C}$ , aunque puede ser aislado de agua de mar cuando la temperatura cae por debajo de  $13^{\circ}\text{C}$ . También se ha encontrado en zooplancton cuando la temperatura está cerca de  $14^{\circ}\text{C}$ ; de lo que se puede concluir que durante los meses de invierno el organismo sobrevive en el plancton para multiplicarse en el agua durante el verano. De la misma manera en pescados y mariscos comprados en el mercado, ya congelados y que pueden estar contaminados con V. parahaemolyticus, una vez en el hogar pueden crecer y subsecuentemente incrementar potencialmente y producir una infección humana de origen alimenticio.

Estos datos demuestran que, aunque V. parahaemolyticus es sensible a la refrigeración y congelación, tales condiciones podrían no ser letales al organismo.

La temperatura máxima de crecimiento para V. parahaemolyticus se encuentra en el rango de 42 a 44°C, esta temperatura varía de acuerdo al género y es afectada por las condiciones de cultivo. (2) (3)

#### INACTIVACION POR CALOR

Aunque V. parahaemolyticus es sensible al calor, se ha reportado una amplia escala de valores para su inactivación térmica. La susceptibilidad de este organismo a la inactivación por temperaturas elevadas depende de los procedimientos de cultivo usados para su crecimiento y del tipo de disolvente en el cual se coloca durante el tratamiento térmico.

No pudo ser recuperado de un homogeneizado de camarón que tenía inicialmente 500 células /ml, después de que fué calentado durante 15 min. a 60 - 80°C. Aunque, con una población inicial de  $2 \times 10^6$  células/ml, V. parahaemolyticus fué recuperado de muestras calentadas por 15 min a 60 - 80°C.

No sobrevivió en un homogeneizado calentado por 1 a 5 min. a 100°C; otros tiempos de mortalidad reportados son 60°C de 15 a 30 min.

V. parahaemolyticus, puede ser destruido si se calienta en una solución peptonada por 10 min a 55°C o por 5 min a 60°C

También ha sido probada la susceptibilidad del organismo a las condiciones simuladas de calentamiento, las cuales pueden ser similares a las de las plantas procesadoras de pesca--

dos y mariscos, o bien pueden ser encontradas en restaurantes y hogares.

Unos pulpos y jaibas fueron contaminados con V. parahaemolyticus, se cubrieron con harina y se frieron en aceite por 2 min a 180°C, no fueron recuperados organismos vivos. Otros filetes de pescado fueron contaminados y asados en un asador electrónico, sin encontrar ningun V. parahaemolyticus en las muestras tratadas.

Se ha observado que la inactivación a temperaturas elevadas depende del pH y del disolvente en el cual se calienta --- siendo la resistencia más alta al calentamiento a un pH de 7.0 la sensibilidad se incrementa conforme el pH es más ácido o --- más alcalino.

La presencia de NaCl durante el calentamiento tiene un efecto protector contra la inactivación. Un caldo de carne de cangrejo salada que contenía  $1.5 \times 10^6$  cél/ml fué calentado a 48 y 55°C, reduciéndose el número de organismos viables de 2.5 a 4 veces respectivamente; la completa eliminación fué cuando el caldo se calento 10 min. a 65°C.

El NaCl a concentraciones de 12% en caldo tripticasa soya protege contra la inactivación a 48°C.

La temperatura de crecimiento afecta la resistencia al calor de V. parahaemolyticus. Las células que crecen a 21°C son más sensibles al calentamiento a 47°C que las que crecen-

a 29°C, así las células que crecen a 29°C son más sensibles --  
que las que crecen a 37°C. ↑ Tercer

Las células que crecen en caldo tripticasa soya con 3.0-  
a 7.4% de NaCl son más resistentes al calentamiento que aque--  
llas que crecen en un caldo que contiene 0.5% de sal. También-  
se ha reportado una relación entre los ácidos grasos que con--  
tiene V. parahaemolyticus con la temperatura de crecimiento y-  
la sensibilidad al calentamiento del organismo. (2) (3) P. Sal 72

#### TOLERANCIA AL NaCl.

Además de los efectos del NaCl en la supervivencia de --  
V. parahaemolyticus durante el calentamiento, refrigeración y-  
congelación, existen otros efectos ejercidos por esta sal so--  
bre la temperatura normal de crecimiento.

El organismo requiere de un mínimo de 0.5% de sal para -  
su crecimiento y reproducción. El efecto hemolítico va asocia-  
do con la naturaleza infecciosa de este organismo, y se incre-  
menta considerablemente cuando el medio de infusión de corazón  
contiene 0.5% de NaCl. Esto está en contradicción con la obser-  
vación de que el organismo requiere para su crecimiento de 3%  
de sal; el nivel de 3% de sal está generalmente aceptado como-  
la concentración óptima para el crecimiento.

Se nota menos concordancia con la concentración máxima -  
de sal que tolera este organismo. Un criterio para identificar  
a V. parahaemolyticus de V. alginolyticus y algunos otros ----

Vibrio es la incapacidad de V. parahaemolyticus de crecer --- bien en caldo tripticasa al 10% de NaCl.

Algunos autores opinan que la concentración máxima de -- NaCl que tolera V. parahaemolyticus es de 8% otros reportan -- que algunos géneros pueden tolerar hasta 10%. Estas discrepancias están relacionadas con los constituyentes de los medios, -- pH, temperatura de incubación y variabilidad de los tipos de -- V. parahaemolyticus.

Se ha demostrado que la halotolerancia de los Vibrio --- marinos, incluyendo a V. parahaemolyticus, no es homogéna en -- lo que respecta al ión  $\text{Na}^+$  que requieren, o a otro catión mono valente. Los autores sugieren que existen biotipos de Vibrio - los cuales tienen propiedades intermedias entre V. parahaemolyticus y V. alginolyticus.

La tolerancia de V. parahaemolyticus a las altas y bajas concentraciones de NaCl está relacionada tanto con la presión-osmótica como con la sensibilidad iónica. La bacteria se inactiva en agua destilada, el 90% muere en 0.9 a 4.4 min de exposición, dependiendo la sensibilidad de la edad del cultivo. La resistencia a la inactivación se incrementa conforme el organismo pasa a través de la fase estacionaria a la fase de mortalidad.

La inhibición de crecimiento en sustratos que contienen bajos o altos niveles de NaCl resulta en parte de una desfavorable actividad del agua ( $a_w$ ); siendo esta  $a_w$  la cantidad de -

agua que contiene el medio de crecimiento y que favorece el desarrollo de determinados microorganismos, así los hongos y levaduras crecen en medios con  $a_w$  bajos o sea en sustratos con poca agua.

El tiempo máximo de generación de V. parahaemolyticus --- fué observado en caldo tripticasa soya con 2.94% de sal, el -- cual corresponde a un  $a_w$  de 0.992. Los medios con bajo o alto contenido de NaCl resultan en un alto o un bajo  $a_w$  respectivamente, y más bajos tiempos de generación.

Un mínimo  $a_w$  para crecimiento en caldo tripticasa soya -- con adición de NaCl es de 0.948 a 29°C.

Se añadieron otros solutos al caldo tripticasa soya que - contenía 2.9% de sal hasta alcanzar reducciones en  $a_w$  y establecer un  $a_w$  mínimo de crecimiento. El  $a_w$  mínimo para el crecimiento de V. parahaemolyticus es de 0.937 cuando se usó glicerol como soluto, 0.945 para KCl, 0.957 para sacarosa, 0.983 para glucosa y 0.986 para óxido de propileno.

Fué investigada la tolerancia de varios géneros de Vibrio al  $a_w$  como una posible herramienta de diagnóstico. Basándose - en el crecimiento óptimo en agua peptonada al 1% y con 0 a 12% de NaCl, ( $a_w$  0.9988 a 0.9268) se sugiere que el  $a_w$  podría ser usado para identificar a Vibrio y para conocer límites favorables para su crecimiento en alimentos. (2) (3)

## SECADO Y REACCIONES DEL SUSTRATO

V. parahaemolyticus es muy sensible al secado. Ocurre --- una rápida destrucción de la bacteria cuando un filtro de mem--brana se inocula y se coloca en un recipiente con gel de síli--ce (deseCADOR). Asi también, se elimina este microorganismo --- cuando un pedazo de alimento inoculado se seca.

La escala óptima de pH para el crecimiento de V. parahaemolyticus es de 7.6 - 8.6; pero se ha reportado crecimiento en medios con pH de 5.0 a 11.0. Dos de seis géneros estudiados toleran un mínimo de pH a 4.8. Fué reportado como altamente letal para V. parahaemolyticus un pH de 4 o menos en un homogeneizado de camarón. También se ha observado que una gota de células via bles a pH 5.0, no sobrevive después de 15 min. En una población viable de un homogeneizado con un pH entre 6.0 y 10 ocurre lo mismo después de 2 horas. (2) (3)

## PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO PARA

Vibrio parahaemolyticus.

Para aislar a V. parahaemolyticus inicialmente se utilizaban medios tales como Salmonella-Shigella o gelosa nutritiva con 4% de NaCl.

En 1965 Zen-Yoji usó gelosa de bromotimol-teepol, el Food and Drug Administration (FDA) usa una combinación de métodos Japoneses y métodos propuestos por los investigadores americanos Listen y Baross. (12)

Los japoneses emplean dos caldos de enriquecimiento: Caldo glucosado sal teepol (GSTB) y caldo sal colistina (SCB), para luego, por estría, pasar a gelosa tiosulfato citrato-sales-biliares-sacarosa (TCBS). Los métodos americanos son más cuantitativos ya que el recuento es directo en placa. (12)

El microorganismo se cultiva en el medio TCBS, que contiene varios ingredientes inhibidores y selectivos, es fácil de preparar y no requiere esterilización en autoclave. Es verde oscuro cuando no está inoculado y tiene un pH inicial de 8.4. Muy pocos microorganismos que no sean Vibrio patógeno se desarrollan bien en él. Puede ser inoculado copiosamente y directamente con excremento, pero si se desea un preenriquecimiento en caldo, puede emplearse caldo peptonado alcalino, o bien, si se trata de alimentos, se preparan las muestras homogeneizándolas con caldo peptonado al 4% y se siembran por estría en el

lab

medio TCBS y la mayoría de las bacterias entéricas no se desarrollarán en este medio especial. Existen dos posibilidades de desarrollo sobre este medio; las colonias pueden ser de un amarillo brillante o color verde después de 24 horas de incubación a 37°C en ambiente aerobio. Las colonias amarillas son un producto del ataque de la sacarosa y pueden ser Vibrio alginolyticus, Pseudomonas o microorganismos entéricos, así como -- Staphylococcus aureus. Las colonias verdes serán Vibrio parahaemolyticus, otros Vibrio halófilos, Pseudomonas y microorganismos entéricos.

Los entéricos pueden ser eliminados por una prueba de oxidasa (Vibrio es oxidasa positivo). Una tinción de Gram eliminará los estafilococos. Un simple esquema bioquímico consistirá en observar las reacciones en gelosa fierro Kliger (KIA) sacarosa, urea, fenilalanina, descarboxilasa de la lisina y citrato para diferenciar entre Pseudomonas y Vibrio. (4)

Otros medios selectivos para aislamiento son:

a) Gelosa BTP teepol, las colonias de los halófilos patógenos que fermentan la sacarosa son amarillas (reacción ácida), mientras que las que no fermentan este azúcar presentan un color verde oscuro (reacción alcalina), los coliformes no crecen en este medio.

b) En gelosa azul agua alizarina amarilla, las colonias que fermentan la sacarosa son azules (reacción ácida) mientras que las que no la fermentan presentan un color amarillo-

(reacción alcalina).

c) En gelosa sulfito de bismuto rojo fenol, las colonias que fermentan la lactosa son de un color marrón oscuro (reacción ácida) y no presentan ninguna pigmentación las que no fermentan este azúcar.

Las bacterias coliformes no crecen en este medio. (19)

Se pueden utilizar medios nutritivos comunes adicionados de sal y almidón e incubarlos aeróbicamente.

En la identificación de V. parahaemolyticus los japoneses utilizan pruebas diferenciales, tales como la reacción en TSI (Gelosa hierro tres azúcares), Voges-Proskauer, y reducción de nitratos. Los americanos consideran el tipo de hemólisis y pleomorfismo.

Un nuevo medio, desarrollado en placa, es el que contiene 0.2% peptona 0.2% extracto de levadura, 1% almidón de maíz-7% de NaCl, y 1.5% de agar el pH se ajusta a 8. Las placas son incubadas aeróbicamente a 42°C durante 48 h. Las colonias típicas son circulares, blancas, lisas, amilasa positiva. Las colonias sospechosas se pican en el centro con el asa de siembra y se confirma su Gram, la reacción de la oxidasa, el pleomorfismo, y la fermentación de la glucosa. (12)

#### SEROLOGIA DE V. parahaemolyticus

La identificación final de V. parahaemolyticus depende de la serología. Esta prueba consiste en la aglutinación en --

portaobjetos de un antígeno K.

V. parahaemolyticus tiene tres antígenos de grupo O, K y H, pero su clasificación serológica se basa únicamente en los antígenos O y K. El antígeno O es somático, termoestable, y se destruye por el etanol y por el HCl 1N. El antígeno K es de -- origen capsular y se destruye por calentamiento a 100 °C y por el HCl 1 N. La presencia del antígeno K en las bacterias vivas inhibe la reacción de aglutinación por el antígeno O y su anti cuerpo. Un tipo O puede tener más de un tipo K, los tipos individuales K ocurren sólo en un grupo O. En la actualidad se han identificado 11 antígenos O y 58 tipos K. (19)

Se ha observado que los cultivos vivos no son aglutinados por los homólogos del antisuero O. pero si el cultivo se calienta a 100°C 1 ó 2 horas se observa una marcada aglutinación. Esto fué interpretado como una interferencia del antígeno K en la reacción del antígeno O.

El antígeno O es un lipolisacárido, V. parahaemolyticus contiene alfa-1,4-D-glucano. Esta glucana difiere del glucógeno y del almidón en que no es sensible a la alfa ni a la beta amilasa. Una sustancia antigénica común fué aislada y purificada designándole como A, siendo común para los géneros de Vibrio parahaemolyticus pero no para V. cholerae o V. alginolyticus.

Sakazaki notó que el antígeno H puede ser un mejor indi-

cador de relaciones filogénicas. El antígeno O indica la relación entre los géneros Escherichia, Salmonella, Proteus, Citrobacter y Enterobacter.

Comercialmente se dispone del antisuero K, 7 polivalentes y 47 monovalentes. (12)

#### PATOGENICIDAD.

Vibrio parahaemolyticus es el agente que causa un síndrome de enfermedad alimenticia relacionado primordialmente con el consumo de productos del mar.

El proceso comienza por lo general con un dolor epigástrico intenso, acompañado de náuseas, vómito, diarrea, escalofríos, casi siempre hay fiebre hasta 39°C. En los casos graves se observa la presencia de sangre y moco en las heces. Con estos síntomas la enfermedad se diagnostica frecuentemente como disentería. (19)

La investigación ha demostrado que el microorganismo tiene un período de generación extremadamente corto, que fluctúa entre 9 y 11 min. Esto es, dos veces más rápido que el período de generación de 20 min. reportados para E. coli. En un caso experimental la enfermedad fué observada en 3.5 y en una infección accidental en el laboratorio el tiempo fué de 6 horas. La rapidez con la cual los síntomas aparecen sugiere la presencia de una exotoxina, aunque sólo las células vivas han producido el síndrome en una enfermedad infecciosa. El período de incubación

ción antes de que los síntomas aparezcan es de 9 a 25 h.

La actividad hemolítica, "fenómeno de Kanagawa", fué co  
rrelacionado con la patogenicidad hacia el hombre. Esta acti  
vidad hemolítica resulta de una hemólisis directa termolábil.

(7) (11)

La epidemiología de V. parahaemolyticus es oscura y com  
plicada. Aunque los pescados y mariscos son la causa de los-  
envenamientos, casi todos los cultivos de V. parahaemolyti--  
cus aislados de pescados y mariscos son Kanagawa negativos -  
y la mayoría de los cultivos obtenidos de heces humanas son-  
Kanagawa positivos, ¿Cuál es la razón de tal discrepancia? -  
¿Dónde se transforman los cultivos en Kanagawa positivos?.

Existen dos posibilidades: la primera se refiere a que-  
la actividad hemolítica puede ser transformada por el intes-  
tino humano. Sakazaki efectuó experimentos con voluntarios,  
a los cuales les administró cultivos Kanagawa negativos, pe-  
ro no pudo encontrar cepas Kanagawa positiva en las heces de  
los voluntarios. La segunda posibilidad es que los Kanagawa-  
positivos pueden perder su actividad hemolítica en el agua -  
de mar. Se llevaron a cabo experimentos con cepas Kanagawa -  
positivas, las cuales se sembraban en tubos que contenía ---  
agua de mar sintética con 1% de peptona, incubándose los tu-  
bos a 37°C y 20°C, las cepas se pasaron 10 veces por este me-  
dio. Las cepas se probaron con el fenómeno de Kanagawa y se-  
encontró que todas ellas seguían siendo Kanagawa positivas,-

de lo que se concluyó que la producción de hemólisis Kanagawa es un carácter estable en V. parahaemolyticus.

Puede haber otras posibilidades como cambios genéticos - por medio de recombinación, fases de conversión, etc. (8)

Se ha demostrado la patogenicidad para ratones; la muerte de los ratones se debió a una septicemia. Se ha reportado que este microorganismo es patógeno para perros y gatos.

Las especies marinas de Vibrio causan una enfermedad a animales marinos. V. parahaemolyticus ha causado muerte al cangrejo azul (Callinectes sapidus) y camarones del Golfo de México (Penaeus aztecus). (12)

La dosis infectiva para el hombre, según se ha determinado experimentalmente con voluntarios y en accidentes de laboratorio, tiene una escala entre  $10^6$  y  $10^9$  microorganismos, dependiendo de las condiciones del estómago, tipo de comida y cantidad consumida, así como la capacidad amortiguadora de los alimentos ingeridos.

En Japón el microorganismo se le asocia muy a menudo con la ingestión del "Zushi", una albóndiga de arroz glutinoso, con gusto a vinagre, copeteado con un surtido de filetes de diferentes especies de pescado. También se relaciona con productos salados con álcalis, como los arenques y sardinas, así como con las legumbres en escabeche.

Un estudio hecho en Japón, en relación con los cocineros

de zushi, indica que durante los meses de abril a octubre más del 15% estaban infectados asintómicamente y esta cifra de infecciones bajó a cero durante los meses invernales. (4)

El nicho ecológico natural de V. parahaemolyticus es el agua de los esteros más bien que las aguas dulces o el mar -- abierto.

El método de tratamiento es doble: mantenimiento del paciente (reponiendo su pérdida de líquidos, diarrea y vómitos) y administración de terapia antibiótica.

El patrón de resistencia-sensibilidad es el siguiente: - el microorganismo es sensible al cloranfenicol (cloromicetina) eritromicina (eritrocina), nitrofurantoina (furadantina), Kanamicina (Kantrex), cefalotina (keflin), neomicina, estreptomina y tetraciclina. Es resistente al colistimetato (colimicina), cloxacilina sódica, meticilina, penicilina, polimixina B y ampicilina (policilina). (4)

V. parahaemolyticus es el causante de un número considerable de casos de envenenamiento por alimentos en Japón. En 1965 y 1966, fué el responsable de más del 45% de las intoxicaciones de origen bacteriano por la ingestión de alimentos - contaminados. Sakazaki encontró 41 serotipos K específicos de este organismo los cuales han sido aislados de humanos enfermos. De este grupo entero, 13 serotipos, o sea el 32%, no han sido recobrados de alimentos marinos del Japón.

V. parahaemolyticus ha sido aislado del cangrejo azul de la bahía Chesapeake en Maryland; fueron analizadas 60 muestras de cangrejo recuperándose un total de 56 géneros de V. parahaemolyticus. En el cuadro Núm. 3 se muestra la lista de las pruebas bioquímicas efectuadas en los géneros aislados comparando con un cultivo de referencia (S AK 5) de V. parahaemolyticus, obtenido por los japoneses. Los 56 cultivos aislados dan todas las pruebas bioquímicas positivas, pero únicamente 32 cultivos fueron identificados serológicamente, es decir, el 61% de los aislamientos no son tipificables, aunque bioquímicamente son idénticos con los biotipos descritos por los japoneses. Estos resultados indican que hay serotipos de V. parahaemolyticus de fuentes marinas que aún no han sido clasificados. (6)

CUADRO NUM 3

COMPARACION DE 56 AISLAMIENTOS DE CARNE DE CANGREJO AZUL CON UN CULTIVO DE V. parahaemolyticus DE REFERENCIA SAK 5<sup>a</sup> (6)

PRUEBA	V. parahaemolyticus SAK 5 <sup>a</sup>	56 aislamientos --	
		Positivos	Negativos
TSI (alcalino/ácido	+	56	0
Citrocomo oxidasa	+	56	0
Ureasa	-	0	56
Indol	+	56	0
Rojo de metilo	+	55	1
Voges-Proskauer	-	0	56
Utilización de citrato	+	56	0
Licuefacción de la gel	+	55	1
Reducción de nitratos	+	56	0
Utilización de malonato	-	0	56
Catalasa	+	56	0
Desaminasa de la fenilalana	-	0	56
Rojo chéolerae	-	0	56
Movilidad	+	56	0
Gram	-	56	0
Hemólisis	+	28	28
Hidrólisis de almidón	+	56	0
Halofilismo 0%	-	4	52
Halofilismo 6%	+	56	0
Halofilismo 8%	+	56	0
Halofilismo 10%	-	0	56
Adonitol	-	2	54
Celobiosa	-	0	56
Inositol	-	2	54
Glucosa	+	56	0
Lactosa	-	0	56
Maltosa	+	56	0
Manitol	+	56	0
Sacarosa	-	0	56
Rhamnosa	-	2	54
Sorbitol	-	0	56
Trehalosa	+	54	2

PRUEBA

V. parahaemolyticus  
SAK 5<sup>a</sup>56 aislamientos --  
Positivos Negativos

Xilosa	-	54	56
Salicina	-	1	55

## CAPITULO IV

## MUESTREO Y METODOS DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

Las muestras de ostiones se obtubieron en los centros distribuidores, y como punto de recolección se escogió el "Mercado de Pescados y Mariscos", ubicado en la zona postal 8 sobre la Calzada de la Viga, en el D.F.

Cada muestra contaba de 12 ostiones, aproximadamente 200g. Se tomaron con cuchara estéril (una para cada muestra) y se guardaron en bolsas de polietileno limpias e impermeables (también una bolsa por muestra) debidamente marcadas con el número de muestra; éstas se transportaron al "Laboratorio de Alimentos de la Dirección General de Laboratorics de Salud Pública" en un refrigerador portátil con latas de enfriamiento.

Se seleccionaron ostiones con concha y ostiones desconchados. Los ostiones con concha se escogieron con conchas intactas y bien cerradas, las cuales en el laboratorio se rasparon con un cepillo de cerdas gruesas para limpiar la superficie, bajo el chorro del agua, para posteriormente abrir la concha y recibir al ostión con un líquido en un frasco estéril. Los ostiones desconchados se tomaron del recipiente original con cuchara estéril.

Las muestras se refrigeraron inmediatamente después de haber sido colectadas, y se examinaron en un lapso no mayor de

seis horas.

METODO DE AISLAMIENTO PARA Vibrio parahaemolyticus.

En condiciones asépticas se pesan 50 g de muestra en un frasco estéril, y se licúa con 450 ml de agua peptonada con 3% de NaCl en un vaso de licuadora estéril, a 800 rpm por 1 a 2 minutos, y se incuba 35°C durante 24 h.

Por estría se siembra un asa del homogeneizado en la superficie de placas de los siguientes medios; TCBS (tiosulfato-citrato bilis sal) y medio MT (el cual contiene peptona, extracto de levadura, almidón de maíz, NaCl y agar). Se incuban las placas sembradas a 37°C durante 18 a 24 h. (7) (16)

La selección de las colonias en cada medio se hace teniendo en cuenta que la mayoría de las cepas de V. parahaemolyticus no fermenta la sacarosa. El aspecto de las colonias en los medios utilizados es: (7)

Medio

Aspecto de las colonias

TCBS

Colonias redondas, 2-3 mm de diámetro con el centro verde o azul  
V. alginolyticus aparece con colonias más grandes y amarillas.  
Coliformes, Proteus y enterococos aparecen como pequeñas colonias translúcidas. Las colonias

que fermentan la sacarosa son - de un color amarillo (reacción-ácida), mientras que las que no fermentan este azúcar presentan un color azul (reacción alcalina). La elevada concentración - salina y el pH de este medio impiden el crecimiento de organismos que no son halófilos.

MT

Las colonias son blancas a crema, circulares, lisas, amilasa-positiva.

Se examinan las placas para seleccionar las colonias típicas, éstas se transfieren con la aguja a los siguientes medios. (7)

Medio	Incubación		reacción
	temperatura	tiempo	
Gelosa TSI	35°C	24 h	Alcalina en la superficie, <u>áci</u> da en el fondo, no forma gas ni H <sub>2</sub> S
TSA 3% NaCl (Agar soya Trypticasa)	35°C	24 h	Cultivos para - efectuar otras- pruebas como <u>co</u> loración de --- Gram.
Movilidad	35°C	24 h	Crecimiento <u>circ</u> ular desde el punto donde <u>se</u> sembró, es una- prueba +.

Si se trata de un microorganismo móvil, Gram negativo, - en forma de bacilos rectos o encurvados con un flagelo en uno de los polos, que produce ácido en el fondo y es alcalino en la superficie del TSI, y negativo en la producción de gas y - formación de  $H_2S$ , se efectúan las siguientes pruebas bioquímicas a partir del cultivo de TSA, tomándolo con asa de siembra (7).

Prueba	Incubación		
	Temp	tiempo	
HLGB- "Hugh Leifson glucosa"	35°C	48 h	Tubo sin capa de gelosa y tubo con capa de gelosa. Si el organismo cambia el color del medio en ambos tubos de púrpura a amarillo; el organismo fermenta la glucosa; Si el cambio ocurre sólo en el tubo abierto el organismo es oxidante. <u>V. parahaemolyticus</u> fermenta la glucosa sin producción de gas.
Oxidasa del citocromo	35°C	24 h	Se dejan caer 2 ó 3 gotas de alfa-naftol y fenilendiamina sobre las colonias de TSA. Una -- reacción positiva se observa por el desarrollo de un color azul oscuro en unos 2 minutos. <u>V. parahaemolyticus</u> de la reacción positiva.

Descarboxilasa de la arginina	35°C	Se observa cada 24 horas por 4 días.	El medio cambia a amarillo por la producción de ácidos a expensas de la glucosa. Si la descarboxilasa funciona, el medio se mantiene púrpura mientras que el medio que se usa como patrón permanece amarillo o sea ácido <u>V. parahaemolyticus</u> da la prueba negativa.
Descarboxilasa de la lisina	35°C	Se observa cada 24 h por 4 días	La reacción es igual a la descarboxilación de la arginina. <u>V. parahaemolyticus</u> es positivo a la descarboxilación de la lisina, o sea el medio se mantiene púrpura.
Hidrólisis de la gelatina	35°C	1-7 días	Se enfría el medio a -20°C para probar la proteólisis si la gelatina no solidifica, la gelatina fue licuada, <u>V. parahaemolyticus</u> da la prueba +
Halofilismo	35°C	24 h	Se siembran 4 tubos con 0%, 6%, 8% y 10% de NaCl cada uno. <u>V. parahaemolyticus</u> crece a 6 y 8% de NaCl pero no crecerá o poco a 0 y 10%
Medio RM-VP	35°C	48 h	Después de incubar se divide en dos porciones el medio; a una porción se le agrega 0.6 ml de alf-naftol y 0.2 ml de NaOH al 40% se agita y después de 4 h (a más tardar) apá

			rece un color carmín.- A la segunda parte se- le agregan unas gotas- de rojo de metilo, si- la prueba es positiva- se aprecia un color ro- jo intenso en el medio <u>V. parahaemolyticus</u> es VP - RM +
SIM	35°C	24 h	Se agregan 0.5ml del - reactivo de Kovac, se- agita y una reacción - positiva se manifiesta por la aparición de un color rojo intenso en- la superficie. <u>V. para- haemolyticus</u> es móvil, Índol + pero sulfhídri- co negativo.
Fermentación del Manitol	35°C	24 h	<u>V. parahaemolyticus</u> -- fermenta el manitol,-- cambiando el medio del color rosa a amarillo.
Fenómeno de Kanagawa en gelosa Wagatsuma	35°C	24 h	Una prueba positiva se manifiesta por una he- mólisis; zona transpa- rente y clara en los - glóbulos rojos alrede- dor de las colonias.

## CUADRO Núm. 4

Características para la identificación de V. parahaemolyticus  
( 7 )

Prueba	Resultados.
Coloración de Gram	Gram negativo
Forma	Bácilos rectos o curvos
Movilidad	Positiva
Hugh-Leifson glucosa	Fermentación, pero no gas.
Oxidasa del citocromo	Positiva
Descarboxilasa de la lisina	Positiva
Descarboxilasa de la Arginina	Negativa
Gelatina	La licúa
Tolerancia de sal	6% y 8%
Voges-Proskauer	Negativa
Indol	Positiva
Manitol	Lo fermenta

Serología: La identificación serológica de V. parahaemolyticus se efectúa por medio de sueros específicos; estos sueros aún no se encuentran en el mercado de los EE.UU; pero la división de microbiología de la FDA ofrece servicios de investigación serológica e identificación gratis, en casos de aislamientos efectuados en brotes de intoxicación por mariscos u otros alimentos. Por tal razón en el presente estudio no se podrá efectuar la identificación serológica.

Si los resultados de las pruebas bioquímicas son típicos para V. parahaemolyticus se reporta como positiva o negativa en 50 g de alimento. (7) (16)

En el cuadro Núm. 4 se aprecian las características para la identificación de V. parahaemolyticus. (7)

#### METODO PARA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

Se pèsan 30 g de alimento en condiciones asépticas, la mitad se licúa con el medio de Selenito-cistina en un vaso de licuadora estéril por 2 minutos; la otra porción se licúa con el medio Kaufman, que contiene verde brillante y tetracionato y a este medio se le agrega 2 ml de yodo en el momento de utilizarlo. Ambos son de enriquecimiento, en condiciones asépticas se transfieren estos medios a frascos de boca ancha y se incuban -- por 24 h 43°C.

Para el aislamiento se agita nuevamente la muestra ya in-

cubada, y usando una asa se siembra por estría con técnica de aislamiento en los siguientes medios selectivos: XLD (xilosa - salicina y desoxicolato), SB (sulfito bismuto), VB (verde brillante), SS (Salmonella-Shigella):

Se efectúa la misma operación para cada medio. Las placas se incuban por 24 h a 35°C. (18)

El aspecto de las colonias típicas en cada medio es:

Medio  
XLD

Aspecto de las colonias

Salmonella y Shigella aparecen como colonias de color rosa rodeadas por un halo rosado; algunas colonias de Salmonella producen colonias con el centro negro. Los coliformes aparecen de color amarillo.

VB

Las colonias de Salmonella se observan como colonias incolores, rosadas o hasta fucsia, --- translúcidas a opacas, con el medio que las rodea rosado a rojo. Algunas Salmonella aparecen de color verde transparentes, si están rodeadas por organismos que son lactosa o sacarosa positiva, que producen colonias amarillas verdosas o verdes.

Los coliformes producen colonias amarillas.

Gelosa  
SS

Las colonias son incoloras-palidas, opacas, transparentes o translúcidas, algunas variedades producen colonias con el -- centro negro.

Gelosa  
SB

Colonias negras, algunas -- veces con brillo metálico, el -- medio que las rodea es usualmente café al principio, cambiando a negro.

Se seleccionan las colonias típicas, y se transfieren -- con el asa de siembra a los siguientes medios para efectuar las pruebas bioquímicas. (18).

Medio	Incubación		Reacción.
	Temp	Tiempo	
Gelosa TSI	35°C	24 h	Superficie inclinada -- del tubo amarilla, es lactosa +. Fondo del -- tubo amarillo., es glucosa+. Oscurecimiento del medio, producción de H <sub>2</sub> S.
Gelosa LIA Lisina fierro	35°C	24 h	Color púrpura descarboxilación de la lisina. Color amarillo se debe a la fermentación. Oscurecimiento se debe a producción de H <sub>2</sub> S.

SIM	35°C	24 h	Aparición del anillo rojo al agregar el --- reactivo de Kovac, es-indol +. Crecimiento - a lo largo de la picadura y en el seno del-medio es movilidad +. Aparición de un color-negro a lo largo de la picadura que puede ex-tenderse a todo el me-dio, hay producción de H <sub>2</sub> S.
Caldo SURRACO	35°C	24 h	Coloración púrpura del medio urea, positiva. Coloración amarilla -- del medio: sacarosa po-sitiva.
Caldo Manitol	35°C	24 h	Coloración amarilla -- del medio manitol posi-tivo.
Caldo Dulcitol	35°C	24 h	Cambio del coloración-de rojo a amarillo dul-citol positivo.
Caldo Malonato	35°C	24 h	Una prueba negativa se caracteriza porque el-color verde no cambia-Coloración azul, malo-nato positivo.

Dependiendo de los resultados de las pruebas bioquímicas y mediante el cuadro Núm. 5 se puede identificar el organismo aislado.

Si los resultados son característicos de Salmonella, se procede a la identificación serológica.

En un portaobjetos se colocan dos gotas, una de solución salina estéril y la otra de antisuero polivalente somático. Se

toma una asada del cultivo de 24 h de gelosa TSI y se hace una suspensión del cultivo mezclándolo con el asa. De la misma forma se procede con el antisuero somático polivalente.

Se ladea el portaobjetos durante un minuto y se observa la formación de precipitado (aglutinación). Se considera positiva la prueba cuando se presenta aglutinación con la mezcla cultivo-antisuero y no aglutinación con la mezcla cultivo-sol. - salina. Ya que si hay aglutinación con la mezcla cultivo-sol. - salina, se considera como una autoaglutinación, siendo una --- prueba falsa positiva con el suero polivalente.

Se sigue el mismo procedimiento para determinar el grupo somático, empleando para ello los sueros específicos para cada grupo.

Se reporta como Salmonella sp positiva o negativa en 30-g de muestra. (14) (18)

Cuadro Núm. 5.

## DIFERENCIACION DE ENTEROBACTERIACEAS MEDIANTE PRUEBAS BIOQUIMICAS (18)

	TRIBU ESCHERICHIEAE		EDWARTOCHIUM		SALMONELLEAE		KLEBSIELLEAE							PROTEAE				
	Generos		Shigella	Edwardsiella	Salmonella	Arizona	Citrobacter		Klebsiella	Enterobacter			Serratia			Proteus		
	Escherichia	Shigella	Edwardsiella	Salmonella	Arizona	freundli	diversus	pneumoniae	cloacae	aerogenes	hfrিকা	oxylinum	marcescens	lyphocera	rubicola	vulgaris	mirabilis	morganii
INDOL	+	- o' +	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ROJO DE METILO	+	+	+	+	+	+	+	- d +	-	-	- o' +	- o' +	- o' +	+ d -	- o' +	+	+	+
VOGLES-PROSKAVER	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+ o' -	+ o' -	+	- o' +	+	-	+	+
CITRATO DE SIMMONS	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+ o' (+)	d	+ o' (+)	-
TSI	-	-	+	+	+	+	+ o' -	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
UREASA	-	-	-	-	-	-	d <sup>W</sup>	d <sup>W</sup>	+	+ o' -	-	-	d <sup>W</sup>	d <sup>W</sup>	d <sup>W</sup>	d <sup>W</sup>	+	+
CIANURO DE POTASIO EN MOVILIDAD	+ o' -	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	- o' +	+	+	- o' +	+	+
GELATINA (22°)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	- o' (+)	-	d	+ o' (+)	+	+ o' (+)	+	+	+
LEUNA DESCARBOXILASA	d	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+ o' (+)	+ o' (+)	-	-	-
ARGININA HIDROLASA	d	d	-	+ o' (+)	+ o' (+)	d	+ o' (+)	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
ORNITINA DESCARBOXILASA	d	d <sup>(1)</sup>	+	+	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
FEUL ALANINA DESAMINASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- o' +	-	-	+	+	+
MALONATO	-	-	-	-	+	- o' +	+	+	+ o' -	+ o' -	+ o' -	+ o' -	-	-	+ o' -	-	-	-
GAS DE GLUCOSA	+	- <sup>(1)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- o' +	+ d - <sup>(3)</sup>	+ d -	d	+ o' -	+	+
LACTOSA	+	- <sup>(1)</sup>	-	-	d	(+) o' +	d	+	+ o' (+)	+	d	d	-	-	+	-	-	-
SACAROSA	d	- <sup>(1)</sup>	-	-	-	d	- d +	+	+	+	d	d	+	+	+	+	d	-
MANITOL	+	+ o' -	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DULCITOL	d	d	-	-	d <sup>(3)</sup>	-	d	+ o' -	- o' +	- o' +	-	-	- o' +	-	-	-	-	-
SALICINA	d	-	-	-	-	-	d	(+) o' +	+	+ o' (+)	+	d	d	-	+	+	+ o' (+)	d
ADONITOL	-	-	-	-	-	-	+	+ o' -	- o' +	+	-	-	d	d	+ o' (+)	-	-	-
INOSITOL	-	-	-	-	d	-	-	+	d	+	-	d	d	+ o' (+)	d	-	-	-
SORBITOL	d	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ARABINOSA	+	d	- o' +	+ <sup>(1)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
RAFINOSA	d	d	-	-	-	d	-	+	+	+	-	d	-	+	+	-	-	-
RAMNOSA	d	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+ o' (+)	-	d	-	-	-

CLAVE: (1) Ciertos biotipos de *S. flexneri* producen gas; Cultivos de *S. sonnei* fermentan lactosa y sacarosa lentamente, y descarboxilan la ornitina

(2) *S. Typhi*, *S. cholerae-suis*, *S. enteritidis*, bioserotipo Paratyphi-A y Púllorum, y otros pocos no fermentan regularmente el dulcitol reduciendo (-). *S. colerae-suis* no fermenta arabinosa

(3) Los volúmenes de gas producidos por cultivos de *Serratia*, *Proteus* y *Providencia* son pequeños

+, 90% o más positivos en los 2 días. -, 90% o más negativos, d, diferentes tipos bioquímicos (+, +, -, +) positivos tardíos (reacciones de descarboxilasa, 3 ó 4 días), + d -, la mayoría de los cultivos positivos - d +, la mayoría de los cultivos negativos, w-reacción débilmente positiva.

Consultar para porcentajes, pruebas adicionales y referencias: Las publicaciones CD5 "Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reaction" (W.H. Ewin, 1973) y "Biochemical Reactions Given by Enterobacteria in Common Use Test."

## METODO PARA CARACTERIZAR COLIFORMES FECALES.

Diéz gramos de muestra se transfieren asépticamente a un vaso de licuadora estéril con 90 ml. de solución reguladora de fosfatos, se licúa por 2 min. y la mezcla se pasa a un frasco estéril, representando la dilución 1:10 (contiene 1 g. de alimento).

Usando pipetas estériles en cada operación, se prepararon diluciones de 1:100, 1:1000, que contienen 0.1 g y 0.01 g de alimento respectivamente. 0.1 ml de la dilución 1:1000 representa la dilución 1:10,000, o sea 0.001 g de alimento.

Se inoculan tres de sulfato de lauril triptosa LST, con 1 ml de la dilución 1:10; otros tres tubos, con 1 ml de la dilución 1:100 cada uno; y tres tubos también con 1 ml de la dilución 1:1000 cada uno; y finalmente se inoculan con 0.1 ml de la dilución 1:1000 otros tres tubos. Los tubos con caldo LST contienen una campana para observar la producción de gas. Se incuban los tubos por 48 h a 35°C.

Se examinan los tubos, la presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de las primeras 48 horas, es una prueba positiva presuntiva de organismos coliformes.

Prueba confirmativa para coliformes.

Se agitan suavemente los tubos de LST positivos. Con una varilla estéril para cada tubo, se transfiere el inóculo a tu-

bos de verde brillante lactosa bilis (VBLB) al 2% y a tubos de caldo E. coli (EC), para cada uno de los tubos positivos.

Los tubos de VB se incuban 48 h a 35°C, los tubos de caldo EC se incuban en baño maría por 48 h a 45°C.

Los tubos positivos de VB representan la prueba confirmativa para organismos coliformes. Se leen los tubos positivos para determinar el número de organismos de acuerdo con la tabla NMP (número más probable), reportando a los coliformes -- por gramo.

Los tubos positivos de caldo EC, también se leen para -- obtener los coliformes por gramo, mediante la tabla de NMP.

(18).

#### DETERMINACION DE LA CUENTA ESTANDAR, BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS.

Con las diluciones preparadas para la determinación de -- coliformes se inoculan con 1 ml de cada dilución, tres cajas de Petri, marcadas con el número de muestra y las diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10.000. Se agregan a cada caja 12 a 15 ml -- gelosa triptona extracto de levadura fundida. Se incuban 48 h a 35°C.

Se seleccionan para el recuento aquellas placas que tengan entre 30 y 300 colonias. Para determinar el número total de colonias por gramo de alimento, se multiplica el número de colonias de la placa por la inversa de la dilución a que -- corresponda. (18)

## CAPITULO V.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se analizaron 200 muestras de ostiones, las cuales se recogieron del mercado de pescados y mariscos de la Viga; cada muestra contenía de 10 a 12 ostiones y se procesaron siguiendo las técnicas señaladas en el capítulo anterior.

El trabajo experimental, como ya se indicó se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Salud Pública de la SSA, en su departamento de Microbiología de Alimentos; se efectuó en dos épocas diferentes del año, las primeras 90 muestras se realizaron entre los meses de julio a octubre (verano), y las otras 90 muestras se analizaron de enero a marzo (invierno). Se realizó de esta manera para observar cómo influyen las estaciones del año en la incidencia de Vibrio parahaemolyticus.

A las primeras 99 muestras se les efectuó la cuenta en placa de mesófilos aerobios, coliformes fecales, V. parahaemolyticus y Salmonella; a las muestras restantes se les analizó únicamente para V. parahaemolyticus y Salmonella.

Las cuentas obtenidas en las 99 primeras muestras e identificación de los dos microorganismos patógenos aparecen en la Tabla Núm 1.

TABLA Núm. 1

Resultados de los análisis efectuados a las 99 primeras muestras de ostiones:

Muestra	Cuenta de - organismos- mesofílicos aerobios colonias/g	Cuenta de- coliformes fecales  NMP/g	<u>Vibrio</u> <u>paraha</u> <u>molyticus</u>	<u>Salmonella</u>
1	45 000	2 400	-	-
2	<u>390 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
3	<u>520 000</u>	+ de 11 000	-	-
4	<u>650 000</u>	+ de 11 000	-	-
5	<u>3 900 000</u>	+ de 11 000	-	-
6	90 000	<u>230</u>	+	-
7	10 000	0	-	*
8	35 400	150	-	*
9	71 000	<u>2 400</u>	-	-
10	<u>500 000</u>	+ de 11 000	-	-
11	<u>1 100 000</u>	+ de 11 000	-	-
12	48 000	<u>2 100</u>	-	-
13	<u>322 000</u>	+ de 11 000	-	-
14	<u>3 260 000</u>	+ de 11 000	+	-
15	<u>9 500 000</u>	+ de 11 000	-	-
16	+ de 10 000 000	+ de 11 000	-	-
17	<u>6 100 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
18	<u>210 000</u>	<u>1 500</u>	-	-
19	<u>3 900 000</u>	+ de 11 000	-	-
20	<u>570 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
21	<u>704 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
22	21 000	72	-	*
23	41 000	110	-	*
24	<u>2 100 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
25	<u>7 700 000</u>	+ de 11 000	-	-
26	<u>850 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
27	+ de 10 000 000	+ de 11 000	-	-
28	<u>2 600 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
29	<u>800 000</u>	+ de 11 000	+	-
30	<u>1 100 000</u>	<u>2 900</u>	-	-
31	<u>3 200 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
32	<u>3 400 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
33	<u>210 000</u>	<u>430</u>	-	-
34	21 700	91	-	*
35	15 600	36	-	*

Muestras	Cuenta de - organismos- mesofílicos aerobios colonias/g	Cuenta de- coliformes fecales  NMP/g	<u>Vibrio</u> <u>parahaë</u> <u>molyticus</u>	<u>Salmonella</u>
36	22 000	230	-	-
37	<u>3 100 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
38	<u>590 000</u>	<u>2 400</u>	-	-
39	<u>100 000</u>	<u>930</u>	-	-
40	20 500	91	-	*
41	+ de 10 000 000	+ de 11 000	-	-
42	<u>370 000</u>	<u>2 900</u>	+	-
43	41 000	<u>280</u>	+	-
44	<u>5 200 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
45	+ de 10 000 000	+ de 11 000	-	-
46	+ de 10 000 000	+ de 11 000	-	-
47	<u>715 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
48	<u>1 600 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
49	<u>370 000</u>	<u>2 400</u>	-	-
50	+ de 10 000 000	+ de 11 000	-	-
51	<u>1 200 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
52	<u>2 700 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
53	<u>710 000</u>	<u>530</u>	-	-
54	46 000	<u>1 500</u>	-	-
55	15 200	<u>230</u>	-	-
56	14 000	0	-	*
57	100 000	0	+	-
58	<u>240 000</u>	36	-	-
59	33 000	0	-	*
60	9 100 000	+ de 11 000	-	-
61	<u>560 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
62	<u>61 500</u>	<u>2 900</u>	-	-
63	88 000	0	-	*
64	12 000	91	-	*
65	54 000	73	-	*
66	<u>7 150 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
67	<u>8 160 000</u>	+ de 11 000	+	-
68	32 100	91	-	*
69	21 000	36	-	*
70	82 000	150	-	*
71	<u>140 000</u>	<u>2 400</u>	-	-
72	<u>1 080 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
73	<u>7 700 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
74	<u>820 000</u>	<u>2 400</u>	-	-
75	<u>710 000</u>	<u>1 500</u>	-	-
76	<u>629 000</u>	<u>930</u>	-	-
77	<u>310 000</u>	<u>2 100</u>	-	-
78	<u>6 400 000</u>	<u>11 000</u>	-	-

Muestra	Cuenta de - organismos- mesofílicos aerobios colonias/g	Cuenta de- coliformes fecales  NMP/g	<u>Vibrio</u> <u>paraha</u> <u>molyticus</u>	Salmonella
79	810 000	2 400	-	-
80	5 700 000	2 400	-	-
81	32 000	36	-	*
82	<u>5 000 000</u>	<u>230</u>	-	-
83	82 000	930	-	-
84	<u>1 200 000</u>	<u>4 600</u>	-	-
85	<u>9 100 000</u>	<u>+ de 11 000</u>	-	-
86	21 700	<u>280</u>	-	-
87	20 500	150	-	*
88	<u>+ de 10 000 000</u>	<u>+ de 11 000</u>	-	-
89	4 600	<u>1 500</u>	-	-
90	30 000	<u>930</u>	-	-
91	<u>+ de 10 000 000</u>	<u>+ de 11 000</u>	-	-
92	<u>240 000</u>	<u>+ de 11 000</u>	-	-
93	<u>140 000</u>	<u>+ de 11 000</u>	-	-
94	<u>7 700 000</u>	<u>+ de 11 000</u>	-	-
95	<u>1 100 000</u>	<u>11 000</u>	-	-
96	90 000	<u>+ de 11 000</u>	-	-
97	90 000	<u>+ de 11 000</u>	-	-
98	45 000	<u>4 600</u>	-	-
99	88 000	<u>4 600</u>	-	-

## Nota:

- \* Muestra aceptada para su consumo
  - Negativo para la prueba
  - + Positivo para la prueba
- \_\_\_\_\_ La muestra no se acepta por rebasar la norma de calidad.

Tabla Núm. 1. a.

Muestras aceptadas para cada  
prueba efectuada y para su consumo.

	Total de mues tras analizadas	Muestras aceptadas	%
Cta. estándar	99	33	33.3
Coliformes fecales	99	19	19.1
<u>Salmonella</u>	200	3	1.5
<u>V. parahaemoly ticus</u>	200	10	5.0
Muestras acepta das para su --- consumo	99	17	17.7

TABLA Núm. 2.

CALCULO ESTADISTICO PARA LOS RESULTADOS DE CUENTA DE MESOFILOS AEROBIOS

Clase	$X_i$	Frec.	$X_i \times 10^4$	$X_i F$	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$	$F(x - \bar{x})^2$	%
10,000 - 100,000	45,000	36	4.5	162	-237.82	56558.35	2036100.6	36.36
100,001 - 200,000	149,500	2	14.95	29.9	-227.37	51697.11	103394.23	2.02
200,001 - 300,000	249,500	4	24.95	99.8	-217.37	47249.71	188998.86	4.04
300,001 - 400,000	349,500	5	34.95	174.75	-207.36	43002.31	215011.56	5.05
400,001 - 500,000	449,500	1	44.95	44.95	-197.37	38954.91	38954.91	1.01
500,001 - 600,000	549,500	4	54.95	219.80	-187.37	35107.51	140430.06	4.04
600,001 - 700,000	649,500	2	64.95	129.90	-177.37	31460.11	62920.23	2.02
700,001 - 800,000	749,500	5	74.95	374.75	-167.37	28012.71	140063.58	5.05
800,001 - 900,000	849,500	3	84.95	254.85	-157.37	24765.31	74295.94	3.03
900,001 - 1,000,000	949,500	0	94.95	0	0	0	0	0
1,000,001 - 10,000,000	4,999,999	29	499.99	14499.71	257.67	66393.82	192542.1	29.29
+ de 10,000,000	10,000,000	8	1000.00	8000.00	757.68	574078.98	4592631.8	8.08
		99					7785343.5	

$$\bar{X} = \frac{\sum XF}{N} = 242.32 \times 10^4 = 2423200$$

$$T = \bar{X} - M$$

$$= \text{Desviación estándar} = \frac{\sum F(x - \bar{x})^2}{N} = 280.42 \times 10^4 = 2804200 \quad \text{s/ n}$$

$$^2 = \text{Varianza} = \frac{\sum F(x - \bar{x})^2}{N} = 78639.82 \times 10^4 = 786398200$$

$$T = \frac{2423200 - 100\,000}{2804200} = \frac{1323200}{2804200} = 8.24$$

$$M = \text{norma} = 100\,000 \frac{\text{col}}{\text{g}}$$

Si  $T_{\text{teórica}} > T_{\text{práctica}}$  : Los ostiones son aceptables

$$T_{\text{teórica}} = 2.576 \text{ para } 95\% \text{ probabilidad}$$

Si  $T_{\text{teórica}} < T_{\text{práctica}}$  : Los ostiones no son aceptables.

$$T_{\text{práctica}} = 8.24$$

$2.576 < 8.24$  : Los ostiones no son aceptables

TABLA Núm. 3.

CALCULO ESTADISTICO PARA LOS RESULTADOS DE COLIFORMES FECALES.

$X_i$	$X_i \times 10^2$	F	$FX_i$	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$	$F(x-\bar{x})^2$	F acum	%
0	0	5	0	0	0	0	5	0
36	0.36	4	1.44	-54.21	2938.72	11754.88	9	5.05
73	0.73	2	1.46	-53.84	2898.74	5797.48	11	4.04
91	0.91	4	3.64	-53.66	2879.39	11517.56	15	2.02
110	1.10	1	1.10	-53.47	2859.04	2859.04	16	4.04
150	1.50	3	4.50	-53.07	2816.42	8449.26	19	1.01
230	2.30	4	9.20	-52.27	2732.15	10928.60	23	3.03
280	2.80	2	5.60	-51.77	2680.13	5360.26	25	4.04
430	4.30	1	4.30	-50.27	2527.07	2527.07	26	2.02
530	5.30	1	5.30	-49.27	2427.53	2427.53	27	1.01
930	9.30	4	37.20	-45.27	2049.37	8197.48	31	4.04
1500	15.00	4	60.00	-39.57	1565.78	6263.12	35	2.02
2100	21.00	2	84.00	-33.57	1126.94	2253.88	37	8.08
2400	24.00	8	192.00	-30.57	934.52	7476.16	45	3.03
2900	29.00	3	87.00	-25.57	653.82	1961.46	48	11.11
4600	46.00	11	506.00	- 8.57	73.44	807.84	59	13.13
11000	110.00	13	1430.00	-55.43	3072.48	39942.24	72	27.27
+ de 11000	+ de 110.00	27	2970.00	55.43	3072.48	82956.96	99	
<b>M</b>		99	5402.74		3116306	211480.88		

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i f_i}{N} = \frac{5402.74}{99} = 54.57 \times 10^2 = 5457$$

$T_{\text{teórica}} = 2.576$  para 95% probabilidad

$$\text{Desviación estándar} = \frac{(\sum (x_i - \bar{X})^2 f_i)^{1/2}}{N} = \frac{211480.82}{99} = 4621$$

$T_{\text{práctica}} = 11.76$

$$\text{Varianza}^2 = \frac{(\sum (x_i - \bar{X})^2 f_i)}{N} = \frac{211480.82}{99} = 213616$$

Si  $T_{\text{teórica}} > T_{\text{práctica}}$   
Los ostiones son aceptables

$$M = \text{Norma} = 160 \text{ NMP/gr} \quad T = \frac{\bar{X} - M}{s / \sqrt{N}} = \frac{5457 - 160}{4621 / \sqrt{99}}$$

Si  $T_{\text{teórica}} < T_{\text{práctica}}$   
Los ostiones no son aceptables

$$T = 11.72$$

$2.576 < 11.72$  ; Los ostiones no son aceptables

Basándose en los índices sanitarios señalados por el proyecto de norma para mariscos, los cuales son para cuenta de mesófilos aerobios 100 000 col/g y para coliformes fecales -- 160 NMP/g: en la tabla anterior se subrayaron las cuentas que están por encima de los índices sanitarios, así también se -- marcaron con + o - las muestras en las cuales se aisló Vibrio parahaemolyticus y Salmonella. Las muestras que están señaladas con un asterisco, son las muestras aceptables para su consumo, ya que no rebasan los límites sanitarios.

Se efectuaron los calculos estadísticos consultando las tablas de probabilidades de la prueba de Students (5) para -- concluir conforme a los resultados obtenidos experimentalmente, y de esta manera determinar la calidad bacteriológica de los ostiones con respecto a la cuenta de mesófilos aerobios y coliformes fecales. Estos calculos se presentan en la tabla 2 y tabla 3, de donde es fácil concluir que los ostiones se encuentran muy lejos de corresponder a los índices sanitarios -- que los rigen; éstos están excesivamente contaminados con organismos fecales, únicamente 19 muestras de las 99 muestras -- analizadas son aceptables con respecto a los coliformes fecales, lo que nos indica que los ostiones que consumimos están en contacto con desechos humanos, o sea contaminaciones poste-- riores a su cosecha, pudiendo contaminarse durante su trans-- porte, en el desconchado que se realiza en condiciones total-

mente antihigiénicas, pues se utiliza instrumentos sucios para abrir las conchas que se encuentran cubiertas con una gruesa capa de lodo, y de esta manera contaminar los moluscos, -- aumentando más dicha contaminación al caer el ostión en cubetas sucias con agua de donde se llenan los frascos que se venden en tiendas de autoservicio. Aumentando más la cuenta de bacterias si los frascos no se mantienen en refrigeración. -- Ahora bien existe la posibilidad de que además de contaminaciones posteriores, los esteros donde se producen los ostiones se encuentren cerca de salidas de aguas negras contaminados peligrosamente con coliformes fecales y Escherichia coli patógeno.

Con respecto a la cuenta de organismos mesófilos aerobios, sólo 33 muestras están por debajo del límite de aceptación, del resto de las muestras se obtuvieron cuentas altas, lo que indica que han existido condiciones que pudieran haber favorecido el que ciertos organismos patógenos hayan proliferado considerablemente y se encuentren en el alimento en gran número. Como las especies patógenas y las sospechas de serlo son casi todas mesófilas, como V. parahaemolyticus y Salmonella, es importante la cuenta estándar. Además, los recuentos altos indican que el alimento va a alterarse muy pronto, y conforme a nuestros resultados se puede observar que los ostiones que consumimos están a punto de descomponerse y ésto puede notarse con el desagradable olor que de

ellos se desprende y que se enmascara con el limón, cilantro, cebolla y otros ingredientes que les acompañan en su preparación.

De las 200 muestras analizadas para la identificación de V. parahaemolyticus, únicamente en 10 muestras se aisló, correspondiendo 7 muestras a las procesadas durante el verano, y las otras 3 muestras corresponden a las muestras analizadas durante el invierno.

Para asegurar de que las cepas aisladas eran V. parahaemolyticus, además de las pruebas bioquímicas efectuadas, las cuales resultaron típicas para este microorganismo y se presentan en el capítulo IV, cuadro núm 4, fué posible obtener una cepa de V. parahaemolyticus en la Facultad de Medicina en el departamento de Ecología Humana de la División de Estudios Superiores: entonces las cepas caracterizadas como V. parahaemolyticus y la cepa de referencia o patrón se corrieron simultáneamente en todos los medios de cultivo con los que se trabajó, obteniéndose resultados semejantes con todos los cultivos aislados. Puesto que no se contaba con el suero necesario para efectuar la prueba serológica se recurrió a conseguir una cepa patrón.

Siguiendo la técnica señalada, trabajando con los medios de cultivo adecuados, ajustándolos a una concentración de sal del 3%, el pH a 7.0 - 7.2, preparándolos con sumo cuidado, --

así como vigilando los tiempos y temperaturas de incubación, tanto en el aislamiento como en las pruebas bioquímicas para su identificación, se pueden recuperar los cultivos de V. parahaemolyticus de las muestras de ostiones. De la misma manera es esencial para su aislamiento utilizar caldo peptonado al 3% de NaCl como un medio de enriquecimiento antes de utilizar el medio selectivo TCBS, ya que se favorece el desarrollo de este microorganismo en un caldo de enriquecimiento; también es importante la prueba de halofilismo para observar el crecimiento en un caldo peptonado con 6 y 8% de NaCl característico de este microorganismo halófilo.

En realidad los 10 cultivos aislados de un total de 200-muestras nos señalan que nuestros ostiones no están contaminados con este organismo patógeno; ahora bien, aún cuando no se encuentran en grandes proporciones como para provocar una intoxicación, si se puede decir que en los meses de verano pueden aislarse cultivos que pueden reproducirse a niveles altos si el producto (pescado o mariscos) no se almacena en condiciones adecuadas, llegando al consumidor altamente contaminado y siendo un vehículo más de intoxicación alimentaria.

Vibrio parahaemolyticus es un microorganismo patógeno -- cuya identificación no es necesario efectuarla de rutina. Su identificación es importante en casos de intoxicaciones donde esté involucrado algún alimento marino o producto del mar y -

donde los síntomas observados sean similares a los provocados-  
por este microorganismo. En estos casos también sería importan  
te su identificación en las heces de los pacientes.

Se aislaron tres cepas de Salmonella, dos del grupo B y -  
una del grupo C, esto fué posible ya que se cuenta con los ---  
sueros para tipificar cepas de Salmonella. Se identificaron --  
únicamente 3 cepas de esta enterobacteria patógena, ya que el-  
caldo tetracionato utilizado se incubó inicialmente a 35°C por  
24 h, sin aislar ninguna Salmonella, esto se realizó con las -  
99 primeras muestras analizadas, y se puede observar en la ta-  
bla 1 que no se identificó ninguna Salmonella. En las muestras  
restantes analizadas, se incubó el caldo tetracionato a 43°C -  
por 24 h y de esta manera se identificaron las 3 cepas.

Aún así, de 100 muestras procesadas a 43°C, tres muestras  
contaminadas con Salmonella, es un nivel bajo que indica que -  
tal vez por la alta salinidad y composición de los mariscos no  
son tan fácilmente contaminados por esta enterobacteria.

Para la recuperación de Salmonella es recomendable utili-  
zar un medio de preenriquecimiento que puede ser caldo lactosa  
do, un caldo de enriquecimiento como el caldo tetracionato y -  
varios medios selectivos, los cuales se encuentran indicados -  
en el capítulo IV. Es muy importante incubar el caldo tetratio  
nato a 43°C por 24 h en vez de 35°C como esta señalado, para --  
llevar a cabo una identificación completa es esencial realizar

la prueba serológica, ya que con las pruebas bioquímicas pueden confundirse con Citrobacter, pues sus bioquímicas son similares.

De las enterobacterias que más se identificaron y por lo tanto contaminan más a los ostiones son: Proteus; P. morganii P. mirabilis, P. vulgaris. En todas las muestras se aislaron Proteus, siendo P. morganii y P. mirabilis los de más incidencia. También se identificaron cultivos de Enterobacter aerogenes. Igualmente se aislaron cepas de Klebsiella y Citrobacter.

Como se ha observado, los ostiones que se venden en el D. F. no cubren las cualidades que se requieren para ser consumidos. Por las pruebas realizadas se ve que, su calidad bacteriológica es ínfima, lo cual es una lástima, ya que el ostión es un alimento de alto nivel nutritivo, con un elevado contenido de proteína que constituiría un excelente alimento, puesto que con sólo consumir media decena se recibirían los nutrientes necesarios para una buena alimentación; pero todas estas cualidades del ostión no tienen valor alguno si al ingerirlos se provocan enfermedades eliminándose más nutrientes requeridos de los recibidos, por vómito y diarrea causados por una intoxicación.

## RECOMENDACIONES

El manejo de los ostiones antes, durante y después de su cosecha, se realiza sin higiene. De la misma manera el desconchado de los ostiones se efectúa sin lavar previamente las conchas, las cuales se encuentran cubiertas completamente con una capa negra de acumulaciones de tierra y desechos que contaminan al molusco al abrir la concha.

Como no es posible bajar el valor de los índices sanitarios, pues disminuiría aún más la calidad bacteriológica del ostión, es necesario planear una nueva organización en los centros de distribución de pescados y mariscos para manejarlos y transportarlos en condiciones higiénicas. De igual forma, desarrollar nuevas técnicas que sean prácticas y sencillas para evitar contaminaciones al abrir las conchas y por ende obtener cuentas menores a los índices sanitarios señalados.

Pero mientras evoluciona el manejo de los ostiones en el mercado, sería de gran utilidad comprar los ostiones en su concha y en el hogar lavarlos con un cepillo de cerda gruesa tratando de dejar las conchas lo más limpias posibles, abrirla concha y enjuagar nuevamente el molusco, procurando comerlos ostiones cocinados en sopas, gratinados, o bien hervirlos ligeramente cuando se consumen en cocktail, para destruir los microorganismos que pudiesen contaminar el ostión. En el caso

de V. parahemolyticus y Salmonella, así como de coliformes fecales, todos son muy sensibles al calor y se eliminaría el riesgo de una intoxicación o enfermedad al cocinarlos. Así también, la costumbre tan común de comer el pescado y los mariscos bañados con jugo de limón, ayuda a eliminar los microorganismos patógenos presentes aunque no con la eficacia de un calentamiento. El limón disminuye el pH del alimento a niveles tan bajos que no pueden sobrevivir las bacterias.

Mediante esta tesis se desea contribuir a mejorar la calidad bacteriológica de los ostiones y mariscos en general así como a conocer e identificar a un microorganismo patógeno desconocido en nuestro país, para poder aislarlo en caso necesario, ya que puede ser el causante de grandes intoxicaciones como lo ha sido en otros países; y que por no ser conocidas ni estudiadas sus características puede pasar desapercibido y no determinarse la causa real de intoxicaciones.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Abbot, T. 1955. "American Seashells". D. Van. Nostrand, C. Inc. Toronto, Nueva York, Londres.
2. Beuchat, L. R. 1975. Environmental factors affecting -- survival and growth of Vibrio parahaemolyticus. A review Journal Milk Food Technol. Vol. 38 No. 8: 476-480.
3. Beuchat, L. R. 1973. Interacting effects of pH, tempera- ture, and salt concentration on growth and survival of- Vibrio parahaemolyticus. Appl. Microbiol. 27 : 1075-1080
4. Clinical Medicine. Vol. 48. Clinical Medicine Publica-- tions, Inc. Agosto, 1971. Págs 22 - 25.
5. Dixón, W. J., Massey, J. Introducción al Análisis Esta- dístico. Mc Graw Hill Book Compame Inc. Segunda edición 1966.
6. Fishbein, M., Mohlman, J., and Pitcher, J. 1970. Isola- tion of Vibrio parahaemolyticus from the processed meat of Chesapeake Bay blue crabs. Applied Microbiology, --- Vol. 20, No. 2:176-178.
7. Food and Drug Administration. Manual de Bacteriología - Analítica para los alimentos. Division of Microbiology- Washington, D.C. 1970.
8. Iida, Hiroo. Food poisonings due to fish and shellfish, Vibrio parahaemolyticus and Clostridium botulinum -----



type E. Hakkaido University School of Medicine Sapporo, Japan.

9. Kelly, C.B. Criterio Bacteriológico para los ostiones -- comerciales. Junta de Saneamiento de ostiones. Washing-- ton, D.C., 26 de junio 1958.
10. Le Clair, R., Zen-Yoji. H. and Sakai, S. 1970. Isolation and identification of Vibrio parahaemolyticus from clinical specimens. Journal of the conference of Public ----- Health Laboratory Directors. Vol. 28, No. 3, May 1970: - 82-92.
11. Miyamoto, Y., Kato, T., Akiyama, S., Takizawa, K., and - Yamai, S. 1969. In vitro hemolytic characteristic of --- Vibrio parahaemolyticus its close correlation with human pathogenicity. Journal Bacteriology 100: 1147-1149.
12. Nickelson, R. and Vanderzant, C. 1971. Vibrio parahaemo- lyticus. A review. Journal Milk Food Technol., Vol. 34, No. 9:447-451.
13. Ramírez Granados, Rodolfo, Sevilla, Ma. Luisa, Las ----- Ostras en México, datos biológicos y planeación de su -- cultivo. Publicación No. 7. Facultad de Ciencias. UNAM. México, 1965.
14. Saldate Castañeda, Ofelia E. Aislamiento de Salmonella - en Carnes y Productos Derivados. Tesis Profesional. Es-- cuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F. 1976

15. Sakazaki, R., Iwanami, S., and Fukumi, H. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, Vibrio parahaemolyticus. Morphological, cultural -- and biochemical properties and its taxonomical position, Jap. Journal Med. Sci. Biol. 16:161-188.
16. Sakazaki, R. 1971. Vibrio parahaemolyticus, symposium -- July 30. 1971. Food and Drug Administration, Division of Microbiology. Washington, D.C.
17. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Anteproyecto de Normas de Alimentos y Bebidas. 1975. Dirección General de Normas.
18. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Técnicas para el muestreo y análisis microbiológicos de alimentos. Dirección General de Investigación en Salud Pública. 1975.
19. Thatcher, F. S., Clark, D. S. Análisis microbiológico de los alimentos. Editorial Acribia. Primera edición. Zaragoza, España. 1973. Pp 19, 130-138.
20. Winton, L. Andrew. Winton, Kate Baber. The structure and composition of foods. Vol. III. Milk, eggs, meat, fish - John Wiley & Sons. Inc. London Chapman & Hall, 1937. Pp 476-480.
21. Zen-Yoji, H., Sakai, S., T., Terogama, Y., Kudo, T. Ito., Benoki, M. and Nagasaki, M. 1965. Epidemiology. enteropathogenicity, and clasification of Vibrio parahaemolyticus. Journal infec. Dis. 115: 436-444.