

300627
5
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

RECUPERACION DE Plesiomonas shigelloides A PARTIR
DE OSTIONES INOCULADOS PREVIAMENTE, UTILIZANDO
UN MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO Y DOS MEDIOS
SELECTIVOS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a
FRANCISCO JAVIER BARBERENA QUESADA

Director de Tesis:
GUADALUPE MORALES MEZA



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 está 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.

I N D I C E

OBJETIVOS	1
RESUMEN	2

CAPITULO I GENERALIDADES DEL OSTION

I.1 INTRODUCCION	4
I.2 TAXONOMIA DEL OSTION	6
I.3 GENEROS DE OSTIONES	7
I.4 DIFERENCIAS GENERICAS ENTRE OSTREA Y CRASSOSTREA	8
I.5 DIFERENCIAS BIO-ECOLOGICAS	8
I.7 PROPIEDADES ALIMENTICIAS DEL OSTION	12

CAPITULO II GENERALIDADES DE Plesiomonas shigelloides

II.1 INTRODUCCION	16
II.2 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS	19
II.3 MORFOLOGIA COLONIAL	23
II.4 MORFOLOGIA MICROSCOPICA	25
II.5 CONDICIONES DE CRECIMIENTO	26

CAPITULO III MATERIALES Y TECNICAS

III.1 MATERIALES	31
III.2 METODOS DE PREPARACION PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO	34
III.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS	36
III.4 MEDIOS ADICIONALES	58

CAPITULO IV MANEJO DE MUESTRAS Y METODOLOGIA

IV.1 MANEJO DE MUESTRAS	66
IV.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO	67
IV.3 TRATAMIENTO DE LA CEPA	69
IV.4 OBTENCION DE LOS NIVELES DE INOCULACION	69
IV.5 PROCEDIMIENTOS PARA LA INOCULACION Y RECUPERACION	73

CAPITULO V RESULTADOS

V.1 CARACTERIZACION DE LA CEPA ATCC 14029	77
V.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO	77
V.3 MORFOLOGIA MICROSCOPICA Y COLONIAL	81
V.5 PRUEBAS DE IDENTIFICACION	82
V.6 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACION DEL INOCULO	83
V.7 RESULTADOS DE LA INOCULACION Y RECUPERACION	86

CAPITULO VI DISCUSION DE RESULTADOS

I	CARACTERIZACION DE LA CEPA	92
II	CONDICIONES DE CRECIMIENTO	92
III	MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA	95
IV	ESTANDARIZACION DEL INOCULO	96
V	CONTAMINACION DE LAS MUESTRAS	98
A)	FLORA MICROBIANA	98
B)	RECUPERACION CON MEDIO IBB	104
C)	RECUPERACION CON MEDIO DFS	106

CAPITULO VII CONCLUSIONES 110

SUGERENCIAS	113
BIBLIOGRAFIA	115

INDICE DE FIGURAS

FIGURA I	DISTRIBUCION DE <i>C. virginica</i> y <i>O. lurida</i> EN EL CONTINENTE AMERICANO...	11
TABLA 1	CONTENIDO DE AMINO-ACIDOS PRESENTE EN LAS PROTEINAS DE LAS PORCIONES COMESTIBLES DE ALGUNAS ESPECIES MARINAS	12
TABLA 2	CONTENIDO DE IODO DE DIVERSOS ALIMENTOS MARINOS	13
TABLA 3	CONTENIDO DE MINERALES EN MOLUSCOS Y CRUSTACEOS	14
CUADRO I	PROCIENTO DE DIGESTIBILIDAD DE DIVERSAS ESPECIES MARINAS EN RELACION A SUS PROTEINAS	15
TABLA 4	DIFERENTES NOMBRES APLICADOS A <u><i>Plesiomonas shigelloides</i></u> A TRAVES DEL TIEMPO	17

TABLA 5	REACCIONES DE <u>Plesiomonas shigelloides</u> A DIFERENTES PRUEBAS BIOQUIMICAS	20
TABLA 6	DIFERENCIAS ENTRE CEPAS INDIVIDUALES DE <u>Plesiomonas shigelloides</u> EN PRUEBAS BIOQUIMICAS	23
TABLA 7	MORFOLOGIA COLONIAL DE <u>Plesiomonas</u> <u>shigelloides</u> EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	24
TABLA 8	ESTABILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS DE <u>Plesiomonas shigelloides</u> EN VARIOS VALORES DE pH	27
TABLA 9	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FLORA ENTERICA ACTIVA EN CONTRA DE <u>Plesiomonas shigelloides</u>	28
TABLA 10	SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE CINCO CEPAS DE <u>Aeromonas shigelloides</u>	29
FIGURA 2	MANEJO DE MUESTRAS	68
FIGURA 3	ESTANDARIZACION DEL INOCULO	72
FIGURA 4	MEDICION DE FLORA MICROBIANA	75

FIGURA 5	INOCULACION DE LOS OSTIONES	76
TABLA 11	CONDICIONES DE CRECIMIENTO	78
GRAFICA 1	CONDICIONES DE CRECIMIENTO (AEROFILICA)	79
GRAFICA 2	CONDICIONES DE CRECIMIENTO (MICRO-AEROFILICA)	80
TABLA 12	RESULTADOS DE LA MORFOLOGIA COLONIAL	81
TABLA 13	RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS (CEPA TIPO)	82
TABLA 14	RESULTADOS 1er. LOTE	87
TABLA 15	RESULTADOS 2do. LOTE	88
TABLA 16	RESULTADOS 3er. LOTE	89
TABLA 17	RESULTADOS 4to. LOTE	90
GRAFICA 3	RECUPERACION SIN TESTIGO POSITIVO	90
GRAFICA 4	RECUPERACION CON TESTIGO POSITIVO	91
GRAFICA 5	ALTERACION EN LA RECUPERACION POR LA CUENTA COLIFORMES TOTALES	101
GRAFICA 6	ALTERACION EN LA RECUPERACION POR LA CUENTA DE MESOFILICOS AEROBIOS	102

OBJETIVO

Implementar la técnica de aislamiento más adecuada para Plesiomonas shigelloides utilizando muestras de ostiones, las cuales serán previamente inoculadas con el microorganismo.

Determinar la sensibilidad de cada uno de los medios a partir de muestras contaminadas previamente.

RESUMEN

Plesiomonas shigelloides es un típico patógeno oportunista. Se ha encontrado como causa de diarrea en hombres, especialmente en individuos débiles. También se le considera como agente de enfermedades extraintestinales. Ha sido aislado a partir de muestras de heces fecales de niños y adultos con diarrea de la cual no se había explicado su origen.

Está implicado como agente de gastroenteritis humana desde hace 40 años, y los reportes de esta enfermedad asociados con Plesiomonas shigelloides han aumentado en los últimos años.

La información existente indica que este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en ambientes tanto terrestres como acuáticos, principalmente en este último. Existen brotes recientes de gastroenteritis asociados con el consumo de ostiones contaminados con Plesiomonas shigelloides.

En México este microorganismo ha empezado a tomar importancia debido al alto número de enfermedades gastrointestinales, en las cuales no se ha podido explicar su origen, y también al elevado consumo de ostiones per cápita.

Después de una investigación bibliográfica se observó que no existía ninguna metodología aplicada a la recuperación de *Plesiomonas shigelloides* cuando ésta se encontraba presente en alimentos de origen acuático. Se decidió probar dos medios los cuales habían funcionado con éxito en la recuperación de este microorganismo utilizando muestras de heces fecales; estos medios fueron el **Agar inositol bilis verde brillante**, y el **Agar dextrina fucsina sulfito de sodio**, utilizando **Agua peptonada alcalina** como caldo de enriquecimiento.

A la cepa de trabajo se le aplicaron diversas pruebas para observar sus características principales, así como para obtener las condiciones óptimas de crecimiento.

En la siguiente etapa se estandarizó la cantidad de inóculo adicionado a las muestras de ostiones conociendo la cantidad real de células viables inoculadas. Una vez estandarizado el inóculo se procedió a las pruebas de recuperación para comparar ambos medios de cultivo.

En los resultados obtenidos se observó que utilizando el agar dextrina fucsina sulfito de sodio se pueden obtener mejores resultados, ya que en el agar inositol bilis verde brillante el crecimiento fué nulo. Esto último pudo deberse a una probable mutación del microorganismo.

capítulo I

**generalidades del
ostión**

I.1 INTRODUCCION.

A lo largo de la industria pesquera mundial, la del ostión ocupa un lugar único. Es la pesca más antigua y fué practicada desde los inicios de la civilización por el hombre primitivo antes de conocer el arte de la pesca y de la caza. Numerosos montones de conchas que cubren las costas de Europa, América, Australia y Africa nos revelan la importancia que, el ostión y otros moluscos, tenían para los primeros habitantes de estos continentes.

En el presente, la industria del ostión ha avanzado de tal forma que ya no depende de la demanda de los ostiones salvajes que crecen en rocas y arrecifes. A través de métodos elaborados de cultivo, el pescador de ostiones se ha convertido en un granjero, quién, a base de esfuerzo y dedicación convierte varios miles de acres esteriles del fondo del mar en tierra productiva bajo el agua.

En comparación con la gran pesca del mundo, como es la del arenque, sardina, bacalao y otros, la industria del ostión contribuye de una manera modesta a la enorme cantidad de alimento que se obtiene del mar. Sin embargo, la importancia económica para las comunidades que se empeñan en su cultivo, es muy grande, debido a que las ganancias que produce el cultivo del ostión, siempre ascienden a las obtenidas por el cultivo de la tierra.

Las estadísticas mundiales de la pesca del ostión son incompletas y no siempre confiables. No existe uniformidad en los datos reportados por los diferentes países, y además, es difícil comparar la producción, debido a que cada país reporta de manera diferente el volumen de pesca; por ejemplo, Japón, reporta en toneladas métricas, mientras que El Reino Unido y Francia los hacen en sacos. (45)

Sin embargo, el cultivo del ostión tiene gran importancia para muchos países en el mundo. El ostión es uno de los organismos marinos más valiosos cultivados en Canada. Se producen tanto en la costa Pacífica como en la Atlántica, cuya producción asciende a las 4000 toneladas métricas, de las cuales 2600 se obtienen de las aguas del Pacífico.(41)

China fué uno de los países en desarrollar la acuicultura. Antes de la Dinastía Ming (hace 500-600 años), los pescadores Chinos habían empezado el cultivo del ostión, así como de otras especies. En la actualidad, el cultivo del ostión (Ostrea sp.) representa el 20 % de los productos acuacultivados.(34)

Pero no solo en países que tradicionalmente se dedican a su cultivo se le ha dado importancia. Existe un renovado interés en el cultivo del ostión en Irlanda, lo que ha provocado un incremento en la demanda de larvas (también conocidas como semillas). En 1981 se estimó un consumo de semillas Europeas de ostión de seis millones.(39)

El cultivo del ostión también tiene gran importancia en Australia. En Nueva Gales del Sur (el principal productor de ostión en Australia), ha desarrollado una industria de \$ 10 millones, y no solo cubren las necesidades locales y del Mercado Australiano, sino que también exportan al Japón, Hong Kong, Singapore, Fiji, etc.(46)

I.2 TAXONOMIA DEL OSTION.

El ostión está clasificado de la siguiente manera:

CLASE BIVALVIA.-

Moluscos simétricamente bilaterales con cabeza rudimentaria, no tienen rádula. Se alimentan por medio de cilios usando papilas labiales y ctenidios largos y grandes. La Hinge esta compuesta de dos lóbulos en forma de manta que encierran al cuerpo compacto y secretan una concha individual consistente de dos valvas calcificadas y un ligamento dorsal usualmente unido con dientes formados a partir de las valvas. Tienen un pié compacto adaptado para escavar, sin superficie plana. Fertilización externa; usualmente con larga vida larvaria.(38)

CLASE LAMELLIBRANCHIA.-

Ctenidia más larga en relación al palpo que forma los órganos de alimentación; filamentos prolongados y contraídos formando láminas de dos lados usualmente unidos por juntas laminares. Filamentos adyacentes unidos por juntas ciliares o bien por tejido.(38)

ORDEN ANISOMYARIA.-

Agallas pegadas mediante uniones ciliares con juntas vasculares interlaminares. Arreglo bi-axial que lleva a disminución del aductor anterior, dando, eventualmente, un rearrreglo radical de la simetría lo cual provoca una cimentación. (38)

I.3 GENEROS DE OSTIONES.

La familia Ostridae, como se conoce hasta hoy, está compuesta de 3 géneros, Ostrea linnaeus, Crassostrea sacco y Pycnodonte. Esta, por supuesto, es la observación de biólogos en ostiones y zoologistas (neontologistas) y difiere de la clasificación propuesta por el paleólogo Stenzel (1947) quién reconoce 12 nombres genéricos válidos.

Gunter (1950) reconoce 3 nombres genéricos, Ostrea, Crassostrea y Picnodonte y otros tres de dudosa validez, Dendostrea, Alectryonia y Striostrea. Ranson (1941) basandose en sus estudios sobre la concha de los ostiones, añadió al género Ostrea los tres géneros dudosos de la clasificación anterior y reconoció el género Crassostrea y Pycnodonte.

Thomson (1954) realizó un estudio taxonómico sobre el ostión Australiano y también reconoció a los géneros Ostrea, Crassostrea y Pycnodonte.

La pregunta acerca de la clasificación genérica de los ostiones parece haber sido resuelta. Sin embargo, estudios recientes sobre hibridación y citogenética, sugieren que el género Crassostrea pudo haber sufrido cambios evolucionarios desarrollando especies heterogéneas, las cuales probablemente pudieran pertenecer a diferentes géneros.

Es necesario restringir la variedad de ostiones únicamente a los géneros Ostrea y Crassostrea. Las especies pertenecientes a estos dos grupos son considerablemente mejor conocidas que las otras pertenecientes a los demás géneros. Estos dos, incluyen alrededor de 100 especies comestibles y no comestibles distribuidas a lo largo del mundo. (38)

I.4 DIFERENCIAS GENERICAS ENTRE Ostrea Y Crassostrea.

Orton, en 1928, fué el primero en darse cuenta de la existencia de 2 grupos naturales dentro del género Ostrea, donde todos los ostiones estaban incluidos. El enumeró algunas diferencias morfológicas y biológicas entre estos dos grupos. Esta separación genérica tuvo que esperar hasta que Stenzen (1947) y Gunter (1950), indicaron que el nombre genérico del ostión Americano era Crassostrea virginica.

I.5 DIFERENCIAS BIO-ECOLOGICAS.

Como adultos, todos los ostiones son sedentarios y permanecen confinados al lugar donde se fijaron cuando eran jóvenes. Las

modificaciones de las formas resultan de acuerdo con la naturaleza del sustrato y de la posible salinidad del medio. La dispersión ocurre durante una fase larvaria planctónica, la cual es más corta en duración en la Ostrea que en la Crassostrea.

Los ostiones en general tienen un buen rango de dispersión y de migración geológica. La máxima distancia de una dispersión exitosa en la fase larvaria planctónica en el océano es de alrededor de 1,300 Km.

Este alto rango de migración puede explicar la amplia distribución geográfica en ostiones tales como Crassostrea virginica, Ostrea edulis y Ostrea lurida.

La preferencia por la salinidad de las formas larvarias puede ser un factor limitante en la dispersión como posiblemente ocurre en Crassostrea virginica cuya posibilidad de migración desde Norte-América hasta Sud-América puede ser frenada debido a la ausencia de condiciones de sal en el mar del Caribe y de sus islas. Las especies de Crassostrea viven en aguas protegidas y cerradas de las bahías, en condiciones de turbidez elevada de los remansos y caletas. Por otro lado, las especies de Ostrea, viven en aguas más limpias y con menos turbidez.

La presencia de una cámara promial probablemente permite la extensión de Crassostrea dentro de condiciones más saladas y turbias de los estuarios. La cámara promial, que permite mayor flujo de agua a través de la cavidad del manto, ciertamente se considera como una condición especializada asociada con la prolongación del cuerpo y de la cavidad del manto.

El género Crassostrea generalmente tiene sus sexos separados, pero, una vez al año, cierto porcentaje de sus miembros cambian de sexo. La Ostrea es hermafrodita, en donde la cantidad relativa de células sexuales de uno u otro tipo se alternan periódicamente de macho a hembra y viceversa. Ambos géneros desovan millones de huevos pero Crassostrea es más prolífica. Este género descarga espermatozoides individuales mientras que Ostrea produce bolas de esperma. Los huevos que no se han fertilizado (ocitos) o bien, los embriones jóvenes de la Crassostrea, son pequeños en tamaño, midiendo aproximadamente 35-55 micras, pero los de Ostrea son largos y duplican este tamaño, esto es, 100-150 micras. Los huevos de la Ostrea chilensis, que se encuentra en la costa Pacífica de Chile, son excepcionalmente largos (323 x 264 micras).

Los huevos de Crassostrea no necesitan incubación, esto es, que sus gametos son liberados en el agua y la fertilización y el desarrollo larval completo ocurren en el mar, mientras que los de Ostrea si necesitan incubación. Muchos bivalvos son de sexo separado y no-incubatorios, características que representan la condición original de los bivalvos. El hermafroditismo y la incubación de la larva son modos especializados de vida. Basándose en lo anterior, el género Ostrea se considera especializado y el Crassostrea primitivo.

Las diferencias genéricas se pueden ver en el tamaño y morfología de la concha, la cual es más prolongada y con dimensiones enormes en Crassostrea. El aductor muscular puede ser pigmentado o no en Crassostrea, mientras que en Ostrea nunca está pigmentado. Ambos géneros también se diferencian en la presencia o ausencia de tubérculos en el margen lateral interno de las valvas. Estos están presentes en Ostrea y ausentes en la mayoría de las especies de Crassostrea. (21)

**FIGURA I:
DISTRIBUCION DE C. virginica Y O. lurida
EN EL CONTINENTE AMERICANO**



Distribución de C. virginica y O. lurida
en la costa este y oeste de America
del norte.

I.7 PROPIEDADES ALIMENTICIAS DEL OSTION.

En la Tabla I se muestra el porcentaje de Arginina, Histidina, Lisina, Triptofano y Cistina en las proteínas de las porciones comestibles tanto del ostión como de otras especies de moluscos y algunos pescados. (45)

TABLA I **CONTENIDO DE AMINO-ACIDOS PRESENTE EN LAS PROTEINAS DE LAS PORCIONES COMESTIBLES DE ALGUNAS ESPECIES MARINAS.**
(PORCIENTO EN PESO)

ESPECIE	ARGININA	HISTIDINA	LISINA	TRIPTOFANO	CISTINA
BACALAO	----	----	----	0.97	----
MERLUZA	5.70	1.17	6.41	0.85	1.16
MERO	6.00	1.66	6.16	1.64	1.45
TRUCHA	5.73	1.40	7.15	1.17	----
SARDINA	5.60	1.23	6.78	1.30	----
MOLUSCOS Y CRUSTACEOS					
CANGREJO	7.61	1.51	6.38	1.11	----
OSTION	5.71	1.79	5.24	1.67	----
CAMARON	7.50	1.61	7.35	0.96	1.25

(45)

En la Tabla II se muestra el contenido de Iodo de diversos alimentos marinos, incluyendo ostiones.

TABLA II CONTENIDO DE IODO DE DIVERSOS ALIMENTOS MARINOS.

TIPO DE ALIMENTO MARINO	SUSTANCIA FRESCA		SUSTANCIA LIBRE DE AGUA	
	Mg I por Kilogramo	Partes por millón	Mg I por Kilogramo	Partes por millón
MOLUSCOS				
Venus mercenaria	1.37	1,370	6.20	6,200
Ostrea elongata	1.16	1,160	6.00	6,000
Pecten grandis	0.15	150	0.81	810
CRUSTACEOS				
Callinectes sapidus	0.09	90	0.49	490
Peneus setiferus	0.45	450	2.25	2,290

(45)

En la Tabla III se muestra el contenido de mineral tanto de moluscos como de crustáceos. (Por ciento en peso de la Porción Comestible Fresca)

Tabla III CONTENIDO DE MINERALES EN MOLUSCOS Y CRUSTACEOS (PORCIENTO EN PESO).

ESPECIE	No. de mues- tras	Materia seca	Cal- cio	Mag- nesio	Fos- foro	Hierro	Cobre	Iodo
OSTION								
Crassostrea virginica	4	15.0	0.0579	0.0320	0.1121	0.006100	0.003730	0.000049
Ostrea lurida	2	17.9	0.0632	0.0242	0.1540	0.004940	0.001240	0.000030
Ostrea gigas	2	21.4	0.6280	0.0460	0.1922	0.007510	0.001230	0.000036
CAMARON								
Peneus brasiliensis	4	20.0	0.0542	0.0421	0.2285	0.002188	0.002188	0.000023
CANGREJO								
Callinectes sapidus	4	21.1	0.1028	0.0336	0.2052	0.002262	0.001582	0.000042

(45)

En esta tabla se puede observar que los ostiones, camarones y cangrejos contienen aproximadamente la misma proporción de calcio, cinco veces más de magnesio y más fósforo que una cantidad similar de leche. Además, estos moluscos y crustáceos son buenas fuentes de hierro, iodo y cobre.

En cuanto a su digestibilidad, las proteínas de diversas especies marinas se pueden dividir en los siguientes grupos dependiendo de su valor como promotores del crecimiento:

Cuadro I. PORCIENTO DE DIGESTIBILIDAD DE DIVERSAS ESPECIES MARINAS EN RELACION A SUS PROTEINAS.

100%	90%	80%
OSTIONES	SARDINA	SALMON
	MACARELA	BACALAO
	CAMARON	

(45)

capítulo II

generalidades de
Plesiomonas shigelloides

II.1 INTRODUCCION.

Plesiomonas shigelloides son típicos patógenos oportunistas. Se han encontrado como causa de diarrea en hombres, especialmente en individuos débiles. También se le considera como agente de enfermedades extraintestinales. (1) Ha sido aislada a partir de muestras de heces fecales de niños y adultos con diarrea, la cual no se había explicado su origen. (20)

Este microorganismo ha estado implicado como agente de gastroenteritis humana por casi 40 años; y los reportes de esta enfermedad asociados con Plesiomonas shigelloides han aumentado en los últimos años.

La información existente indica que este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en ambientes tanto terrestres como acuáticos, principalmente en este último. Existen brotes recientes de gastroenteritis asociados con el consumo de ostiones contaminados con Plesiomonas shigelloides. (20)

Como se puede observar, Plesiomonas shigelloides comienza a tener importancia dentro de los microorganismos causantes de enfermedades, así como dentro de los institutos encargados de la prevención de las mismas.

Plesiomonas shigelloides es un microorganismo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas. Está implicado en enfermedades gastrointestinales y tiene importancia clínica por ser un agente etiológico de muchas infecciones oportunistas. Es miembro de la familia Vibrionaceae que fácilmente se puede confundir como integrante de la familia Enterobacteriaceae si no se realiza una prueba de oxidasa; esto suele suceder en muchos laboratorios cuando

se aísla este microorganismo. Aunque todavía se conoce como Aeromonas shigelloides, a este microorganismo se le conoció primero como C27 (1947) y recibió su nombre aprobado en 1962. En la tabla 4 se muestra una revisión histórica de su nomenclatura:

Tabla 4 DIFERENTES NOMBRES APLICADOS A Plesiomonas shigelloides A TRAVES DEL TIEMPO.

AUTORES	AÑO	NOMBRE
FERGUSON Y HENDERSON	1947	<u>C 27</u>
COWAN	1956	<u>Escherichia</u>
BADER	1954	<u>Pseudomonas shigelloides</u>
SAKAZAKI et al.	1959	<u>Pseudomonas michigani</u>
EWING Y JOHNSON	1960	<u>Aeromonas shigelloides</u>
HABS Y SCHUBERT	1962	<u>Plesiomonas shigelloides</u>
SEBALD Y VERON	1963	<u>Fergusonia</u>
HENDRIE et al.	1971	<u>Vibrio shigelloides</u>
MANUAL BERGEY'S	1985	<u>Plesiomonas shigelloides</u>

(2)

Los síntomas asociados con el malestar gastrointestinal provocado por Plesiomonas shigelloides son los siguientes: Diarrea (94 %), dolor abdominal (74 %), náuseas (72 %), fiebre (37 %), dolor de cabeza (34%), escalofrío (49 %) y vómito (33 %). Los períodos de incubación van de 24 a 30 horas y los síntomas aparecen de 1 a 9 días. Además de gastroenteritis, Plesiomonas shigelloides está asociado con bacteremia y septicemia neo-natal, así como meningitis. (2)

Aunque se considera de origen acuático, se le ha aislado a partir de numerosos mamíferos, aves y reptiles. Durante la primavera de 1983 se reportó en Florida casos de gastroenteritis ligada con el

consumo de ostiones contaminados con Plesiomonas shigelloides. (Outbreak of shellfish associated gastroenteritis. Dpt. of Health and Rehabilitative Services, Tallahassee, Fl.).

Está ampliamente distribuido en la naturaleza y se ha aislado de países tales como Ceylán, Congo-Belga, Japón, Inglaterra, Cuba, Australia, U.S., Brasil, Canada, Turquía, México, Alemania e Italia. (2) En 1984, Arai T. y colaboradores publicaron un trabajo acerca de la distribución de Plesiomonas shigelloides, en donde muestran los resultados de muestreos realizados en aguas de río (Río Tama), peces de agua fresca, perros, gatos y humanos. El 8.9 % de las muestras del río fueron positivas para Plesiomonas shigelloides; así también, el 10.5 % de las muestras de pescado fresco fueron positivas. Observaron que los perros y gatos son portadores de este microorganismo (3.8 % y 10.3 % de las muestras provenientes de perros y gatos respectivamente fueron positivas).

Zakhariev, en 1971 reporta aislamientos de Plesiomonas shigelloides a partir de muestras de agua de mar, mientras que Schubert R.H. obtuvo aislamientos positivos en muestras del río Main en Frankfurt.

Miller M, hizo una recopilación bibliográfica de las diferentes fuentes de donde se han aislado Plesiomonas shigelloides, misma que se presenta a continuación:

HUMANOS:

- Bilis
- Fluido Cerebro-espinal
- Heces
- Orina
- Sangre

ANIMALES:	Gato	Cerdo	Ostión
	Vaca	Oveja	Cangrejo
	Pez	Serpiente	
	Perro	Pavo	
	Cabra	Tortuga	
	Mono	Rana	

Medio Ambiente: Sedimentos
Agua

Se ha encontrado que Plesiomonas shigelloides tiene una incidencia mayor durante las estaciones más calurosas con rangos de aislamientos menores o bien ninguna recuperación durante los meses fríos.

II.2 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.

En 1985, Miller M. L. y Koburger J. hacen una recopilación bibliográfica de Plesiomonas shigelloides en donde presenta la siguiente tabla (tabla 5) adaptada del Manual of Clinical Microbiology, en donde se muestran las reacciones de Plesiomonas shigelloides a las diferentes pruebas bioquímicas.

Tabla 5. REACCIONES DE Plesiomonas shigelloides A DIFERENTES PRUBEAS BIOQUIMICAS.

UREASA	- (0)
INDOL	+ (100)
VOGES PROSKAUER 37°C	- (0)
26°C	- (0)
ROJO DE METILO 37°C	+ (100)
26°C	+ (100)
CITRATO (SIMMONS)	- (0)
CRECIMIENTO EN MEDIO KCN	- (2)
MOVILIDAD	d (85)
GELATINA 22°C	- (0)
LISINA DESCARBOXILASA	+ (96/4)
ARGININA DIHIDROLASA	+ (93/2)
ORNITINA DESCARBOXILASA	+ (100)
FENILALANINA DEAMINASA	d (41W)
GLUCOSA ACIDO	+ (100)
GAS	- (0)
LACTOSA	+ (65/26)
SUCROSA	- (0/6)
ARABINOSA	- (0)
SALICINA	d (32)
ADONITOL	- (0)
DULCITOL	- (0)
INOSITOL	+ (100)
SORBITOL	- (0)
MANITOL	- (0)
RAFINOSA	- (0)
RAMNOSA	- (0)
ARABINOSA	- (0)
MALTOSA	d (55)

Tabla 5 (continuación)

XILOSA	- (0)
TREHALOSA	+ (92/2)
CELOBIOSA	- (0)
GLICEROL	d (15/68)
ESCULINA	- (0)
MELEZITOSA	- (0)
MELIBIOSA	d (49/9)
MANOSA	d (14/3)
MALONATO	- (0)
MUCATO	- (0)
CITRATO (CHRISTENSEN)	- (0)
ACETATO DE SODIO	d (2/33)
LIPASA (ACEITE DE MAIZ)	- (0)
NITRATO: A NITRITO	+ (100)
A GAS	- (0)
OXIDASA	+ (98)
CATALASA	+ (100)
DESOXIRIBONUCLEASA	- (0/4)
CASEINASA	- (0)

Simbolos: + positivo, - negativo, d reacciones diferentes. Números en paréntesis muestra el porcentaje de cepas positivas en 1 a 2 porcentos de cepas positivas en 3 o más días. (2)

Existen algunas diferencias en esta tabla y lo reportado en los estudios realizados por Chatterjee B. D. y Neogy K. N., y otro realizado por Penn R. G. y colaboradores, en las apreciaciones de las fermentaciones de los azúcares manosa y lactosa, así como en la prueba de rojo de metilo.

Algunas pruebas importantes para el diagnóstico de este microorganismo incluyen oxidasa (+), inositol (+), manitol (-), lisina y ornitina descarboxilasa (+), arginina dehidrolasa (+) y gelatinasa.

En 1972, Zajc-Satler J., Dragas A.Z., y Kumelj M. trabajaron con 6 cepas de Plesiomonas shigelloides aisladas provenientes tanto de heces fecales de pacientes con diarrea como de muestras de orina. Encontraron que todas las cepas degradaron la glucosa fermentativamente. Acidifican en 24 a 48 horas el inositol, maltosa, ribosa y trehalosa sin producir cantidades detectables de gas. Se detectó en todas las cepas actividad de oxidasa, indofenoloxidasa y catalasa. Producen indol, dan pruebas de rojo de metilo positivas y reducen nitratos a nitritos. Todas las cepas tienen arginina dehidrolasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.

No hubo producción de acetoina y 2,3 mesobutanediol; no utilizan citrato de sodio ni malonato para su crecimiento. La prueba de fenilalanina es negativa. Consideraron negativas las pruebas de esculina, adonitol, arabinosa, celobiosa, dextrina, dulcitol, eritritol, glicerol, glicógeno, inulina, manitol, melecitosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, sorbitol, sorbosa, almidón y xilosa.

Las cepas mostraron diferencias individuales en la fermentación de lactosa, fructosa, galactosa, manosa, melobiosa y salicina. Dos de las cepas produjeron una zona de hemólisis en Agar sangre del tipo beta.

En la tabla 6 se muestran las diferencias de características entre cepas individuales de Plesiomonas shigelloides.

Tabla 6. DIFERENCIAS ENTRE CEPAS INDIVIDUALES DE Plesiomonas shigelloides EN PRUEBAS BIOQUIMICAS.

PRUEBA	CEPA N°					
	42971	58109	12036	13520	15822	13538
Beta-hemólisis	-	-	-	+	-	+
LACTOSA	-	-	A 4d	A 6d	-	A 4d
FRUCTOSA	A	-	-	-	A	A
GALACTOSA	A	-	A	A	-	A
MANOSA	-	-	A	-	A	A
MELOBIOSA	A 4d	-	A 6d	-	-	A 4d
SALICINA	A 8d	A 8d	A 18d	-	-	-

- = ningún cambio después de 30 días a 37°C.

A = acidificación en 1-3 días.

d = días de incubación para obtener reacción positiva.

II.3 MORFOLOGIA COLONIAL.

En 1983 A.von Graevenitz y Candid Buchner probaron 9 medios para aislar este microorganismo a partir de heces fecales. Los 9 medios sólidos fueron: Agar inositol bilis verde brillante, Agar dextrina fucsina sulfito de sodio, Agar xilosa sodio desoxicolato citrato, Agar pril xilosa ampicilina, Agar Rimler-Shotts, Agar Rippey-Cabelli, Agar peptona glicógeno extracto de carne, Agar DNasa ampicilina azul de toluidina, Agar almidón sal xilosa lisina desoxicolato de sodio y

los caldos de enriquecimiento: agua peptonada alcalina y caldo soya tripticasa con ampicilina. En este estudio se recomienda el uso de Agua peptonada alcalina como medio de enriquecimiento y el Agar inositol bilis verde brillante como medio selectivo. Se observa también un buen funcionamiento del Agar dextrina fucsina sulfito de sodio cuando se usa agua peptonada alcalina como enriquecimiento.

En la tabla 7 se muestran las morfologías coloniales reportadas por estos autores para Plesiomonas shigelloides.

Tabla 7. MORFOLOGIA COLONIAL DE Plesiomonas shigelloides EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO	CEPAS DE <u>Plesiomonas</u>
DFS	Pequeñas, rojo brillante, halo muy claro
DNTA	Sin halo
IBB	Blancas rosadas
PBG	Amarillas, atípicas
PXA	Sin color
RS	Amarillo verdoso
RC	Amarillas
SSXLD	Amarillas
XDC	Sin color
DFS	Agar dextrina fucsina sulfito de sodio
DNTA	Agar DNasa azul de toluidina ampicilina
IBB	Inositol bilis verde brillante
PBG	Agar glicógeno peptona extracto de carne
PXA	Agar Pril xilosa ampicilina
RS	Agar Rimler-Shotts
RC	Agar Rippey-Cabelli
SSXLD	Agar sal almidón xilosa lisina desoxicolato de sodio
XDC	Agar xilosa citrato desoxicolato de sodio

Otros estudios de morfología colonial , muestran que Plesiomonas shigelloides producen colonias poco convexas, de 1 a 2 mm de diámetro después de 18 horas de incubación a 37 °C, (Agar SS, Mac Conkey, Agar XLD y Agar Drigalski modificado). Penn R. reporta también que Plesiomonas shigelloides presentan colonias sin color en Agar Mac Conkey, azul claro a decoloradas en Agar Hektoen-entérico y rojas en Agar XLD. Winton F.W. realizó un estudio sobre Plesiomonas shigelloides donde reporta colonias convexas, de 1-2 mm de diámetro, grises, húmedas y con consistencia butirosa en Agar sangre. No reporta fermentación de glucosa en Agar Mac Conkey y su tamaño es similar a las del Agar sangre.

Plesiomonas shigelloides presenta un buen crecimiento en Agar Salmonella shigella y en Agar Mac Conkey, y por el contrario no lo hace de la misma forma en Agar sucrosa tiosulfato citrato sales biliares, el cual se usa en el aislamiento de Vibrio.

II.4 MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

Son células alargadas con bordes redondeados, de 0.9 a 1.0 por 3.0 u . Crecen formando cadenas cortas, aunque también se encuentran solas o en pares. Su movilidad es debida a flagelos polares. Son negativas a la tinción de Gram.

Winton F.W. considera a este microorganismo como bacilo capsulado Gram-negativo que mide 2.1 X 0.7 u. La mayoría de las células poseen un flagelo polar sencillo, pero ocasionalmente algunas células contienen 3 flagelos polares. Se han escrito varios

artículos con respecto a los flagelos; Zajc-Satler J. reporta que las células tienen flagelación lofótrica y de uno a cinco flagelos por células. Geizer E. realizó un estudio utilizando el microscopio electrónico donde concluyó que los flagelos se encuentran presentes durante todo el ciclo de crecimiento. Las células de cultivo más jóvenes usualmente tienen numerosos flagelos laterales. Se encontraron células con únicamente flagelos laterales, pero estas últimas fueron tan pocas que se considera que perdieron sus flagelos polares durante los procedimientos de purificación para el microscopio electrónico. Los flagelos cortos usualmente son laterales, mientras que los largos y ondulados crecen en los polos. Se encontraron flagelos singulares del tipo corto que crecen en el polo, pero no se asegura que fueran realmente flagelos polares.

II.5 CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Las Plesiomonas shigelloides son aerobios facultativos, que crecen a 30 °C, tienen un buen crecimiento a 37 y su máximo crecimiento en un rango de 39 a 41°C . No crecen en caldo nutritivo con 7.5 % de NaCl.

Con respecto a la temperatura, Miller M. reporta un estudio realizado por otros autores en donde estudiaron los rangos de crecimiento con respecto a la temperatura en 10 cepas de Plesiomonas shigelloides. Una cepa se clasificó como psicrófila pues era capaz de crecer a 0°C. Las demás cepas fueron consideradas como mesófilas; la mayoría con una temperatura mínima de crecimiento de 10°C. El máximo de 40 a 55°C con temperaturas de crecimiento óptimas de 25 a 50°C.

Winton F.W. señala que no hubo crecimiento a 4°C en Agar nutritivo, Agar sangre o Agar Mac Conkey, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Este microorganismo creció en los tres

medios a 21 y 37°C, más rápidamente con la última temperatura; las colonias fueron dos veces más largas en diámetro después de 18 horas a 37°C que a 21°C. El microorganismo era anaerobio facultativo, pero las colonias en Agar nutritivo eran más largas (2 mm diam.) cuando la incubación era aeróbica.

Janda M. estudió 19 cepas de Plesiomonas shigelloides evaluando su estabilidad bajo pHs ácidos y ligeramente alcalinos. También observó su comportamiento con agentes antimicrobianos. Durante 30 minutos, no se pudo detectar bacterias viables cuando la cepa tipo (ATCC 14029) se expuso a soluciones amortiguadoras con pH de 2 y 4 (>99.99 % de inactivación). Sin embargo, la cepa tipo era estable en pH neutros, ligeramente ácidos (pH 6) y alcalinos (pH 8). A todas las cepas se les observó su viabilidad después de haberse incubado a varios valores de pH. Solo un aislamiento expuesto a un pH de 2 por cinco minutos y a pH de cuatro por un período no mayor de 15 minutos sobrevivieron. En la tabla 8 se muestran los resultados:

Tabla 8. Estabilidad de los aislamientos de Plesiomonas shigelloides en varios valores de pH(a)

TIEMPO (MIN)	NUMERO DE AISLAMIENTOS VIABLES (b) A pH DE:				
	2	4	6	7	8
5	1	1	19	19	19
15	0	1	19	19	19
60	0	0	19	19	19
120	0	0	19	19	19

a Plesiomonas shigelloides, n° de muestras = 19.

b Viabilidad considerada como $\geq 0.001\%$ de sobrevivientes.

Los resultados de probar 79 aislamientos entéricos para observar la actividad antimicrobiana contra Plesiomonas shigelloides se muestran en la tabla 9. Únicamente las cepas de Pseudomonas aeruginosa produjeron una actividad antimicrobiana lo suficientemente fuerte para inhibir el crecimiento de las 3 cepas de Plesiomonas shigelloides probadas. Después de probar varias especies solo Streptococcus (Enterococcus) faecium produjo una actividad antimicrobiana débil.

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de flora entérica activa en contra de Plesiomonas shigelloides.

ORGANISMO PROBADO	Nº PROBADOS	Nº DE AISLAMIENTOS BACTEROCIN POSITIVOS
<u>Escherichia coli</u>	15	0
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	15	14
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	6	0
<u>Klebsiella ozaenae</u>	1	0
<u>Proteus mirabilis</u>	1	0
<u>Proteus vulgaris</u>	4	0
<u>Enterobacter aerogenes</u>	2	0
<u>Serratia marcescens</u>	4	0
<u>Providencia rettgeri</u>	3	0
<u>Providencia stuartii</u>	3	0
<u>Citrobacter diversus</u>	2	0
<u>Citrobacter freundii</u>	1	0
<u>Morganella morganii</u>	2	0
<u>Hafnia alvei</u>	1	0
<u>Plesiomonas shigelloides</u>	2	0
<u>Aeromonas spp.</u>	2	0
<u>Pseudomonas maltophilia</u>	1	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	4	0
<u>Streptococcus (Enterococcus) faecalis</u>	4	0
<u>Streptococcus faecium</u>	3	3a

a Actividad débil.

En otro estudio realizado por Nord, E. se utilizó un método de dilución en Agar para determinar la sensibilidad in vitro de diferentes especies de Pseudomonas y Aeromonas (incluyendo Aeromonas shigelloides) a sulfonamida, tetraciclina, colicistina, gentamicina, tobramicina, ampicilina, carbenicilina y cefalotina. En sus resultados, reportan que Aeromonas shigelloides (Plesiomonas shigelloides) se mostró muy sensible a todos los antibióticos probados. En contraste con Aeromonas hydrophila y las Pseudomonas, todas las cepas probadas fueron sensibles a la sulfonamida y cefalotina. En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 10. Sensibilidad a antibióticos de cinco cepas de Aeromonas shigelloides

	Concentración mínima inhibitoria ug/ml					
	=<0.25	0.5	1	2	4	5
Sulfonamida	0	0	0	2	5	
Ampicilina	0	4	5			
Carbenicilina	0	0	0	0	1	5
Cefalotina	0	0	2	5		
Gentamicina	0	0	5			
Tetraciclina	3	3	3	3	3	5
Colicistina	5					

Observaron que todas las especies investigadas excepto Aeromonas shigelloides fueron resistentes a la cefalotina y sulfonamida. La ampicilina actuó efectivamente en contra de este microorganismo.

Winton F.W., reporta que Plesiomonas shigelloides demostró sensibilidad al cloramfenicol (25 µg. en disco), colomicina (200 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), oxitetraciclina (10 µg), paromomicina (30 µg) y sulfatiazol (250 µg); y resistente a la ampicilina (10 µg), cefaloridina (5 µg), eritromicina (10 µg), meticilina (10 µg), neomicina (10 µg), penicilina (10 unidades), polimixina (100 unidades) y estreptomycin (10 µg).

capítulo III

**materiales y
técnicas**

III.1 MATERIALES.

Para el presente estudio se utilizó material propio para análisis microbiológicos, constando de:

a) LICUADORA.-

Se puede utilizar una licuadora normal, controlando únicamente el tiempo de molienda del ostión.

b) VASOS DE LICUADORA ESTERILES.-

Se utilizan vasos de licuadora normales los cuales se envuelven en papel de estraza y son esterilizados en autoclaves a una temperatura de 115 °C durante 15 minutos.

c) UTENSILIOS.-

Para el manejo de las muestras se utilizan cucharas, pinzas, tijeras y espátulas las cuales siguen un proceso de esterilización semejante al de los vasos de licuadora. Es importante que antes de colocar estos utensilios directamente sobre las muestras se flaméen en el mechero Bunsen y dejarlos enfriar cerca de la boca del frasco para evitar contaminaciones externas, así como para evitar la reducción de la flora propia de las muestras.

d) ASA BACTERIOLOGICA

e) FRASCOS DE 500 ml

Estos frascos son necesarios para contener el caldo de enriquecimiento y posteriormente esterilizarlo. En éstos, se pesa directamente la cantidad necesaria de muestra de ostiones.

f) PAPEL FILTRO.-

Papel filtro Whatman Nº 1.

g) MECHERO BUNSEN

h) BALANZA ANALITICA

I) BALANZA GRANATARIA

J) MICROSCOPIO OPTICO

K) CUENTA COLONIAS

L) AUTOCLAVES

M) INCUBADORAS

A temperaturas de 22, 37 y 45°C.

N) TRIPIE

MATERIAL DE VIDRIO

a) CAJAS PETRI DESECHABLES

b) PIPETAS.-

Se utilizan pipetas graduadas de 0.1 hasta 10.0 ml.

c) PIPETAS PASTEUR

d) MATRACES ERLLENMEYER

Se utilizan matraces de 100 hasta 5000 ml.

e) VASOS DE PRECIPITADO

Se utilizan vasos de precipitado con capacidad de 100 hasta 5000 ml.

f) PROBETAS

Se utilizan probetas con capacidad de 5 hasta 1000 ml.

g) MATRACES AFORADOS

Con capacidad de 100 hasta 1000 ml.

h) GOTEROS

j) FRASCOS DE 100 ml PARA BUFFER

k) PORTA-OBJETOS Y CUBRE-OBJETOS

III.2 METODOS DE PREPARACION PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO.

a) AGAR DEXTRINA FUCSINA SULFITO DE SODIO

El grupo de bacterias de Aeromonas y Plesiomonas se puede diferenciar de las Pseudomonas de la mayoría de las enterobacterias gracias a la capacidad de descomposición de la dextrina. Esta descomposición se detecta por medio de la comprobación del aldehído formado con fucsina reducida por sulfitos.(18)

a.1) COMPOSICION.

	(g/l)
PEPTONA CASEINICA	10.0
EXTRACTO CARNICO	3.0
CLORURO DE SODIO	5.0
DEXTRINA	15.0
SULFITO SODICO	1.6
FUCSINA	0.025
FOSFATO ACIDO DISODICO	7.75
AGAR-AGAR	13.0

a.2) PREPARACION

Disolver 56 g/l; para mejorar la dilución de la fucsina se recomienda embarrar previamente por adición de alrededor de 50 ml de DIOXAN en solución al 5 % (Dioxan Merck Art. Num. 9671). Autoclavear 15 minutos a 121 °C . Vaciar en placas estériles pH:7.5± 0.2. Si después de su solidificación el medio de cultivo muestra una coloración roja demasiado intensa, este problema puede suprimirse por el aporte de algunas gotas (máximo 1 ml) de solución de sulfito sódico 10 % recientemente preparado seguido de ebullición.(18)

Incubación: 24 hr/ 30 - 37 °C .

b) **AGAR INOSITOL BILIS VERDE BRILLANTE.**

Por medio del aporte de inositol, los cultivos de Plesiomonas se estimulan indiscriminadamente, dado que esta fuente de carbono solo es aprovechada por un escaso número de bacterias concurrentes. El indicador rojo neutro produce, por medio de la formación de un ácido a partir de la inosita, una coloración rojiza de las colonias.(18)

b.1) **COMPOSICION.**

	(g/l)
POLVO DE PROTEINAS	7.5
EXTRACTO DE CARNE	7.5
CLORURO DE SODIO	5
MEZCLA DE SALES BILIARES	8.5
VERDE BRILLANTE	0.00033
ROJO NEUTRO	0.025
MESO-INOSITA	10.0
AGAR-AGAR	13.5

b.2) PREPARACION.

Disolver 52.0 g/l; autoclavar a 121 °C por 15 minutos y vaciar sobre las placas. pH:7.2±0.1. Inocular las placas e incubar a 37 °C por 48 horas.(18)

c) AGUA PEPTONADA ALCALINA.

c.1) PREPARACION.

Pesar 10 g de Peptona de Gelatina disueltos en 1 litro de agua destilada. Ajustar pH a 8.6. Autoclavar 121 °C / 15 minutos.

El enriquecimiento previo en este medio de cultivo permite obtener rendimientos más elevados de enterobacterias patógenas, especialmente si se trata de gérmenes dañados subletalmente.(18)

III.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS.

a) PRUEBA DE AMINOACIDOS.

a.1) PRINCIPIO.

Para medir la habilidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido para dar una amina con aumento de la alcalinidad.

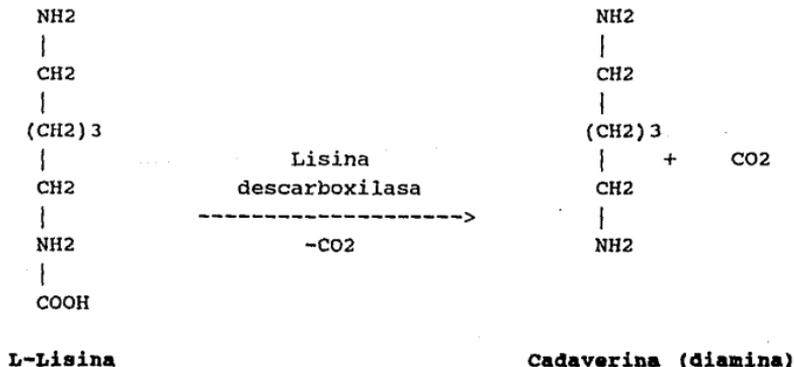
a.2) BIOQUIMICA.

La descarboxilación es un proceso donde la bacteria que posee las enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en la parte carboxilica (-COOH), produciendo una amina o diamina y dióxido de carbono.

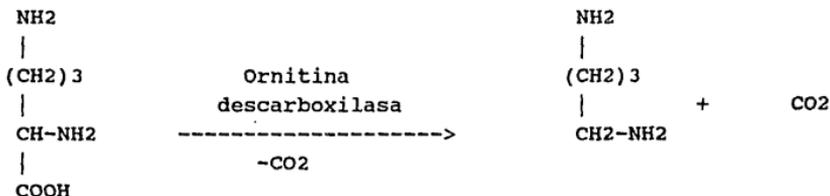


Las enzimas descarboxilasas son numerosas y cada una es específica para cada sustrato. Tres importantes enzimas descarboxilasas son usadas para la identificación bacteriana: lisina, ornitina y arginina. La descarboxilación está restringida a aquellos aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo aparte de la amina (-NH₂) o un grupo carboxilo (-COOH). El proceso de descarboxilación es irreversible, no-oxidativo y requiere una co-enzima común, fosfato de piridoxal.

El aminoácido L-lisina cuando es descarboxilada produce cadaverina (una diamina) y dióxido de carbono mediante la acción de la enzima específica lisina descarboxilasa.



El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina descarboxilasa para obtener putrescina y dióxido de carbono.

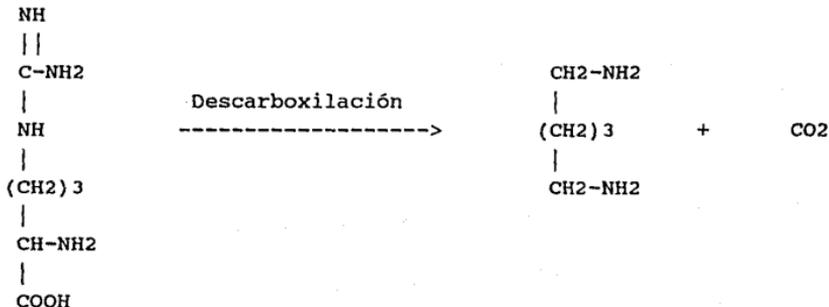


L-Ornitina

Putrescina (diamina)

El aminoácido L-arginina es catabolizado mediante dos sistemas los cuales ocurren tanto simultáneamente como separadamente. Estas vías son el sistema arginina dihidrolasa y el sistema arginina descarboxilasa.

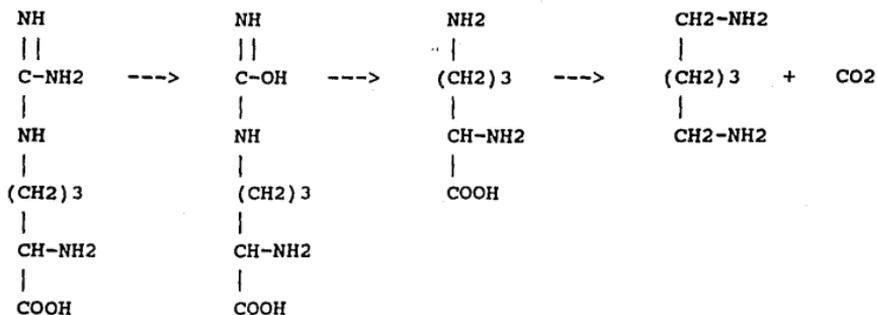
Sistema Arginina Descarboxilasa



L-Arginina

Putrescina (diamina)

Sistema Arginina Dihidrolasa



L-Arginina

L-Citrulina

L-Ornitina

Putrescina (diamina)

a.3) COMPOSICION.

Caldo base para el ensayo de aminoácidos:

(g/l)

PEPTONA DE GELATINA	5.0
EXTRACTO DE CARNE	3.0
PURPURA DE BROMOCRESOL	0.02
GLUCOSA	0.5

Agregar de cada aminoácido 10.0 g/100 ml de caldo base.

- TUBOS DE 16 X 125 mm: Llenar con aproximadamente 4.0 ó 5.0 ml de caldo.
- Ajustar pH a 6.8
- Esterilizar a 121°C, 10 min.
- Inocular levemente.
- Es necesario inocular un tubo control, el cual no contiene ningún aminoácido.

a.4) INTERPRETACION.

Cualquier aminoácido da el mismo color en los resultados.

- A. Prueba Pósitiva: Color púrpura turbio o amarillo púrpura (producción de cadaverina/putrescina).
- B. Prueba Negativa: Color amarillo claro, brillante (solo glucosa fermentada).
- C. Tubo Control (sin aminoácido como sustrato): Permanece amarillo (solo glucosa fermentada).

a.5) PRECAUCIONES.

- a. Después de la incubación esta prueba puede mostrar dos capas de colores diferentes, amarillo y púrpura. Es necesario agitar el tubo suavemente antes de hacer cualquier interpretación.

- b. Es importante marcar los tubos antes de la inoculación. La mezcla de varios tubos de aminoácidos puede dar resultados inválidos para cualquier identificación bacteriana.

- c. El tubo control, que no contiene ningún aminoácido debe permanecer amarillo después de 18 a 24 horas, denotando que únicamente la glucosa es fermentada. Un tubo control positivo (púrpura) invalida cualquier prueba de aminoácido y ninguna interpretación se puede hacer.

- d. El indicador Púrpura de Bromocresol, cuando se incorpora en el medio, da mejores distinciones en los cambios de pH, pero el cambio de pH en los controles aparece antes que en los tubos que contienen los aminoácidos.

(18)

b) PRUEBA DE LICUEFACCION DE GELATINA.

b.1) PRINCIPIO.

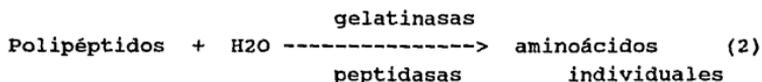
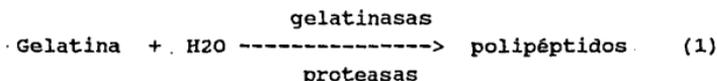
Para determinar la habilidad de un organismo para producir enzimas proteolíticas (gelatinasas) que licúan la gelatina.

b.2) BIOQUIMICA.

La gelatina se incorpora a varios medios de cultivo para determinar la habilidad de un organismo para producir enzimas proteolíticas mismas que se detectan mediante la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Estas enzimas capaces de producir una gelatinólisis son llamadas gelatinasas.

La forma natural de las proteínas son demasiado largas para introducirse dentro de una célula bacteriana, deben ser catabolizadas en componentes más pequeños. Las enzimas proteolíticas gelatinasas son extracelulares y ciertas bacterias las secretan para romper las proteínas; esta habilidad es aprovechada para la identificación de las mismas.

El catabolismo de las proteínas se lleva a cabo en dos etapas, y el resultado final es una mezcla de aminoácidos individuales.



PREPARACION.-

	(g/l)
EXTRACTO DE CARNE	3.0
PEPTONA	5.0
GELATINA NUTRITIVA	120.0

- Esterilizar con cuidado al autoclave 10 min, a 115 °C. Ajustar a pH de 6.0.
 - Refrigerar en posición vertical (4-10°C).
 - Inóculo:
- a) Mantener los tubos en refrigeración hasta el momento de la inoculación. El medio debe de estar sólido.
 - b) Inocular por picadura.
 - c) Agregar bastante inóculo.
 - e) Introducir hasta $\frac{1}{2}$ pulg. dentro del medio.
 - Incubar a 22-25°C de 24 horas a 14 días.
 - Incluir un tubo control sin inóculo.
 - Observar crecimiento (turbidez) y licuefacción.
 - Al final del período de incubación colocar tanto los tubos inoculados como los controles en refrigeración por aproximadamente 2 horas, para determinar la licuefacción. Es importante no agitar los tubos en el momento de pasarlos a refrigeración.

b.3) INTERPRETACION.

A. Prueba Positiva.

- Tubos Inoculados: Presentan licuefacción del medio.
- Tubos Control: El medio permanece sólido.

B. Prueba Negativa.

- Tubos Inoculados: El medio permanece sólido.
- Reincubar por períodos adicionales.
- Tubos Control: El medio permanece sólido.

b.4) PRECAUCIONES.

- a. Es conveniente correr un tubo control (no inoculado) en paralelo con los organismos a identificar. Un solo control para un lote de microorganismos que se corren simultáneamente será suficiente.
- b. Se recomienda antes de hacer cualquier interpretación sobre la licuefacción de la gelatina, colocar los tubos en refrigeración o baño de hielo para evitar falsos positivos.
- c. Es importante no agitar los tubos en el momento de colocarlos en refrigeración pues en ocasiones la licuefacción ocurre en la superficie, y si se mezcla con el resto de la gelatina, probablemente se pierda y se reporten falsos negativos.
- d. El rango de licuefacción depende de la edad de la gelatina; la viscosidad de la gelatina esterilizada aumenta durante su almacenamiento a temperaturas de 22 °C.

(18)

c) PRUEBA DE MOVILIDAD.

c.1) PRINCIPIO.

- Para determinar si un organismo posee movilidad o no.
- La movilidad de una bacteria depende de los flagelos. Los bacilos principalmente poseen estos flagelos aunque algunos cocos también tienen movilidad. Las bacterias móviles pueden tener uno o varios flagelos y su localización depende de la especie y condiciones de

cultivo. Ocasionalmente bacterias móviles pueden producir variantes no móviles. Las bacterias no móviles no poseen flagelos.

c.2) **PREPARACION.**

	(g/l)
EXTRACTO DE CARNE	3.0
PEPTONA	10.0
CLOLURO DE SODIO	5.0
AGAR BACTERIOLOGICO	4.0

- Ajustar pH a 7.3
- Esterilizar a 121°C, 15 lb por 15 minutos.
- Transferir a refrigeración en posición vertical y almacenar (4-10°C).
- Inoculación por picadura en el centro del medio con $\frac{1}{2}$ pulgada de fondo.
- Incubar a 22°C por 48 horas. De ser necesario incubar por 5 días.

c.3) INTERPRETACION.

- A. Prueba Positiva: Los microorganismos móviles migran desde la línea de la picadura hacia el medio difundiéndose y provocando turbidez.
- B. Prueba Negativa: El crecimiento bacteriano se acentúa a lo largo de la línea de la picadura; el medio alrededor permanece claro.

C. Tubo Control (sin inóculo): No hay crecimiento y el medio permanece claro y sin color.

c.4) PRECAUCIONES.

a. El flagelo es de naturaleza protéica susceptible a la desnaturalización por un calor excesivo.

b. Los flagelos pueden destruirse o romperse por una agitación violenta del tubo de cultivo bacteriano dando lugar a falsos negativos.

c. Los cultivos que se mantienen por largos períodos tienden a perder su movilidad.

d. Si la lectura de la prueba de movilidad es difícil de interpretar es conveniente utilizar un tubo control sin inóculo.
(18)

d) PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER.

d.1) PRINCIPIO.

Para determinar la habilidad de ciertos organismos para producir acetilmetilcarbinol (acetoína) a partir de la fermentación de la glucosa.

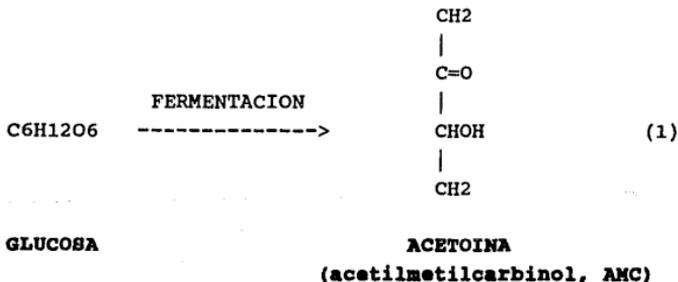
d.2) BIOQUIMICA.

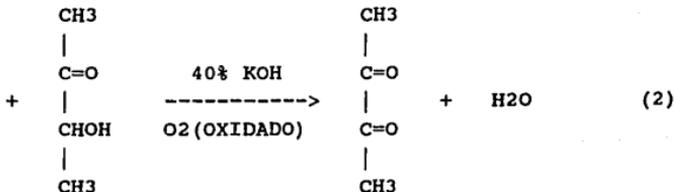
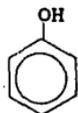
La prueba de Voges-Proskauer (VP) está basada en la detección de acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. La glucosa es metabolizada a ácido pirúvico, el cual es el intermediario en la glicólisis. A partir del ácido pirúvico una bacteria tiene muchos caminos a seguir. La producción de acetoína es uno de ellos para llegar a la degradación final de la glucosa.

Una molécula de acetoína se forma mediante la descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico. La acetoína es un paso intermedio en la conversión de 2,3-butanediol. Ambos, acetoína y 2,3-butanediol son productos neutros de la fermentación de la glucosa.

d.3) QUIMICA DE LA REACCION.

Los reactivos para la identificación en la prueba de Voges-Proskauer (alfa-naftol y KOH) actúan en un proceso de 3 pasos:

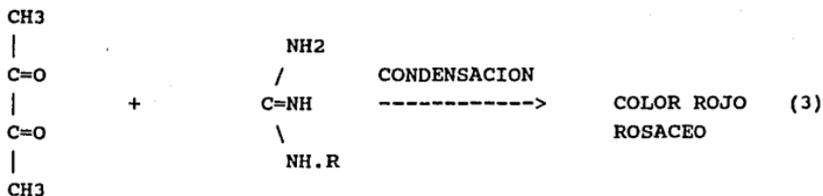




alfa-naftol
(catalizador)

Acetoína

Diacetilo



Diacetil
(sustrato)

Núcleo de Guanidina
presente en peptona

Los tres ingredientes principales en la prueba de VP son alfa-naftol, un sustrato nitrogenado presente en peptona y el diacetilo.

El primer reactivo añadido a una alícuota incubada es el catalizador alfa-naftol. Una solución alcohólica de alfa-naftol es esencial pues actúa como intensificador de color, el cual incrementa la sensibilidad de la reacción no perdiendo su especificidad. El alfa-naftol se combina con el producto de reacción entre el diacetilo y la guanidina presente en la peptona en la reacción primaria, por eso es importante añadirlo primero.

El segundo reactivo es KOH al 40% el cual añadido al medio VP, ayuda en la absorción del CO₂. No hay que excederse de la cantidad exacta (0.2 ml). Es extremadamente importante el agregar estos dos reactivos (alfa-naftol y KOH 40%) en el orden correcto. El hidróxido de potasio puede reaccionar con la peptona originando un color rosa salmón, y con la adición subsecuente del alfa-naftol no existirá ninguna alteración del color.

Después de la adición del alfa-naftol y KOH, el tubo se debe de agitar suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico con lo cual provocará la oxidación de la acetoina a diacetilo. El KOH actúa como agente oxidante para asegurar la oxidación de la acetoina. El diacetilo es el reactivo esencial que da la reacción de color con el KOH y la peptona.

d.4) PREPARACION.

	(g/l)
PROTEOSA PEPTONA	5.0
GLUCOSA	5.0
FOSFATO DE POTASIO	5.0

Ajustar el pH a 6.9 ± 0.2

Reactivos para la lectura.-

+ ALFA-NAFTOL:

ALFA-NAFTOL	5 g
ALCOHOL ETILICO ABSOLUTO	100 ml

Añadir 0.6 ml de alfa-naftol y después 0.2 ml de solución acuosa al 40 % de Hidróxido de sodio a 1 ml de cultivo.

d.5) INTERPRETACION.

- A. Prueba Positiva: Color rojo rosáceo en la superficie del medio.
(acetoína presente)
- B. Prueba Negativa: Color amarillo en la superficie del medio.
(igual al color del reactivo). Un color cobre puede formarse,
pero sigue siendo una prueba negativa (debido a la mala adición de
los reactivos).
(18)

●) PRUEBA DE ROJO DE METILO.

e.1) PRINCIPIO.

- A. Para medir la habilidad de un microorganismo para producir y mantener estable los productos ácidos finales a partir de la fermentación de la glucosa y romper la capacidad amortiguadora del sistema.

B. Esta es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación de pH); algunos microorganismos producen más ácidos que otros.

e.2) BIOQUIMICA.

La prueba de rojo de metilo (RM) está basada en el uso de un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno (pH) presentes cuando un organismo fermenta la glucosa. La concentración de iones hidrógeno depende del rango de gas (CO_2 y H_2) los cuales son indicadores de los diferentes caminos que exhiben varios microorganismos para el metabolismo de la glucosa. Los diferentes patrones de fermentación se deben a las variaciones de las enzimas en el metabolismo del ácido pirúvico presentes en un microorganismo.

Un microorganismo fermentador de la glucosa produce ácidos como resultado del metabolismo, por lo que inicialmente serán RM positivos. Sin embargo, después de una incubación posterior, estos microorganismos producen más ácidos, provocando un decremento del pH final, rompiendo la capacidad amortiguadora del sistema y mantiene ácido el medio.

Los microorganismos RM negativos metabolizan los productos de la fermentación inicial mediante descarboxilación, produciendo acetilmetilcarbinol neutro (acetoína), provocando un incremento del pH final cerca de la neutralidad (pH=6.0 o mayor).

e.3) PREPARACION.

Preparación de reactivos para la lectura:

+ Rojo de Metilo:

ROJO DE METILO	0.1 g
ALCOHOL ETILICO	300 ml
AGUA DESTILADA	200 ml

- Utilizar medio para VP inoculado. La determinación se hará a las 48 horas de incubación.
- Con pipeta estéril obtener una alícuota de 2.5 ml para la determinación.
- Añadir 5 gotas del indicador rojo de metilo a la alícuota.
- Interpretar el color inmediatamente.

e.4) INTERPRETACION.

- A. Prueba RM positiva: El medio es lo suficientemente ácido para mantener el color rojo (pH 4.4) en la superficie del mismo.
- B. Prueba RM negativa: Color amarillo (pH 6.0) en la superficie del medio.
- C. Reacción retardada: Color naranja. Continuar la incubación por 4 días y repetir la prueba.

e.5) PRECAUCIONES.

- a. La reacción RM puede acelerarse incrementando la concentración de glucosa en el medio.
- b. No se puede intentar hacer una interpretación de esta prueba antes de 48 horas de incubación. Si se hace antes, los resultados pueden ser equivocados o falsos positivos pues los microorganismos no han tenido el tiempo suficiente para metabolizar por completo los productos ácidos iniciales. Después de 18 a 24 horas de incubación, todas las pruebas son positivas.
- c. No probar tubos extremadamente turbios; el crecimiento bacteriano se ve inhibido si el inóculo excede la máxima concentración de células, aproximadamente 10⁹ células viables por ml.
(18)

f) PRUEBA DE OXIDASA.

f.1) PRINCIPIO.

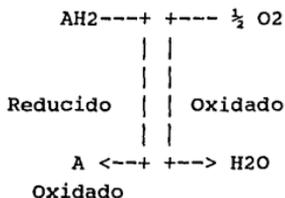
Para determinar la presencia de enzimas oxidasas.

f.2) BIOQUIMICA.

La prueba de oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. Esta reacción se debe a la presencia del sistema citocromo oxidasa, el cual activa la oxidación

del citocromo reducido mediante oxígeno molecular, mismo que actua como aceptor de electrones en la última fase del sistema de transferencia del electrón.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía mediante respiración, proceso responsable de la oxidación de varios sustratos. La cadena respiratoria es una secuencia de enzimas y acarreadores responsables de la transportación de equivalentes reducidos de sustratos a oxígeno molecular. El oxígeno molecular oxida un sustrato mediante la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor final de hidrógeno, produciendo agua o peróxido de hidrógeno, dependiendo de la especie de bacteria y del sistema de enzimas. La oxidasa, cataliza el retiro de hidrogeno del sustrato pero usa solo oxígeno como aceptor de hidrógeno.



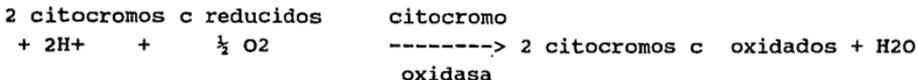
El sistema citocromo por lo regular se encuentra presente en organismos aerobios, el cual los hace capaces de utilizar el oxígeno como aceptor final de hidrógeno para reducir el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno, último eslabón en la cadena de la respiración aeróbica. La enzima catalasa degrada el peróxido de hidrógeno, pues su acumulación es tóxica.

Se conoce muy poco sobre la función de varios citocromos bacterianos, pues el sistema citocromo oxidasa varía dependiendo de las especies bacterianas; algunos organismos poseen solo una oxidasa, mientras que otros pueden producir dos o tres. Los citocromos aparte del citocromo oxidasa son: b---->c1 ---->c. Sin embargo, se sabe que su función en la respiración aeróbica es importante.

Todas las Pseudomonas y Neisseria spp. producen una enzima oxidasa, la cual, en presencia de oxígeno, el citocromo c y el reactivo oxidasa, oxidan el reactivo para formar un compuesto colorido, el indofenol.

Los electrones del citocromo c son tomados mediante la citocromo oxidasa oxidada; la citocromo oxidasa pasa electrones al oxígeno molecular. El oxígeno libre es necesario para la regeneración indirecta del citocromo c oxidado.

La prueba realmente determina la presencia de citocromo c y es positiva solo en bacterias que contienen citocromo c como enzima respiratoria.



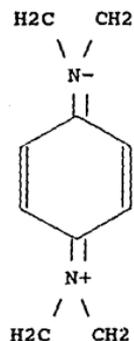
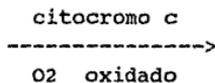
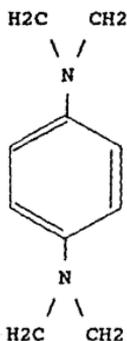
f.3) PREPARACION.

N,N,N',N'-TETRAMETIL-p-FENILEN DIAMINA.2 HCl	1 g
AGUA DESTILADA	100 ml

- Colocar un pedazo de 6 cm² de papel filtro Whatman N^o 1 en una caja de Petri.
- Agregar dos o tres gotas del reactivo en el centro del papel.
- Con un asa de platino expandir el inóculo de la colonia sospechosa en el papel con el reactivo en una línea de 3 a 6 cm de largo.

f.4) QUIMICA DE LA REACCION.

La reacción se muestra a continuación.-



N,N,N,N-tetrametil-p-fenilen diamina

Compuesto colorido

f.5) INTERPRETACION.

- A. Colonias oxidasa positivas: Las colonias se vuelven rosas, luego marrón (rojo oscuro) y finalmente negras (negro-púrpura).
- B. Colonias oxidasa negativas: No hay cambio de color en las colonias, o bien formación tenue de color rosa debido al reactivo.

f.6) PRECAUCIONES.

- a. No intentar correr la prueba en colonias que crecieron en medios que contienen glucosa, pues su fermentación inhibe la actividad enzimática de la oxidasa, provocando falsos negativos. La prueba en bacilos gram-negativos debe hacerse en colonias que provienen de medios no-selectivos o no-diferenciales: Agar soya tripticasa, Agar nutritivo, etc.
- b. Se recomienda usar varilla de platino para remover el inóculo durante la prueba en lugar de acero, pues cualquier traza de hierro puede catalizar la oxidación del reactivo, obteniendo falsos positivos.
- c. El reactivo de oxidasa se puede oxidar fácilmente y perder su sensibilidad. No debe de usarse si presenta precipitados. Es importante no exponerlo a la luz.

(18)

III.4 MEDIOS ADICIONALES.

a) AGAR NUTRITIVO.

a.1) PREPARACION.

(g/l)

EXTRACTO DE CARNE	3.0
PEPETONA	5.0
GELATINA	6.9

Llenar 3 ml por tubo y esterilizar a 121 °C.
(18)

b) AGAR BASE SANGRE.

b.1) PREPARACION.

(g/l)

INFUSION DE MUSCULO CARDIACO	375.0
PEPTONA DE CARNE	10.0
AGAR	15.0
NaCl	5.0

Ajustar a pH de 7.3 ± 0.2 y esterilizar a 121 °C por 15 min.
Enfriar a 54-50 °C y añadir 5-10 % de sangre desfibrinada estéril.
Homogenizar y vaciar en tubos o cajas.(18)

c) CUENTA BACTERIANA TOTAL.

c.1) DEFINICION.

Este método determina el nivel de contaminación de la muestra por microorganismos varios; debido a que el medio de cultivo que se utiliza es favorable al crecimiento de gran cantidad de microorganismos contaminantes posibles.

c.2) CAMPO.

Aplicable a todo tipo de muestras de grado alimenticio.

c.3) REACTIVOS.

Medio de cultivo: Agar nutritivo, preparar como indica el proveedor.

Solución Buffer diluyente:

Disolver 34 g de Fosfato monopotásico con 500 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1N, conservar en refrigeración. Tomar 1.25 ml con agua destilada. Esta es la solución diluyente a usar.

c.4) MATERIAL.

Autoclave - Todo el material a usar, que de una forma u otra estará en contacto con la muestra, deberá estar esterilizado en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.

c.5) PROCEDIMIENTO.

- 1) Preparación y esterilización de medio de cultivo y material.
- 2) Identificación de las cajas de Petri a utilizar en la inoculación, colocarlas de tal modo que facilite toda la operación.
- 3) Esterilizar el cuarto de siembra, mediante lámparas de luz ultravioleta, evitar permanecer en él mientras la lámpara esté encendida.
- 4) Pesar de manera aséptica 11 g de muestra en un frasco de dilución conteniendo 99ml de solución Buffer diluyente . Se agita hasta completa disolución.
- 5) Transferir 1ml de muestra y ponerse en la caja de Petri si es que no se van a hacer diluciones, si hay la necesidad de hacerlas se procede de la siguiente manera: la muestra del inciso 4 se encuentra a una dilución de 10⁻¹, 1 ml de esta disolución pasada a un tubo conteniendo 9 ml de solución buffer diluyente, dará una dilución de 10⁻², un ml de ésta en otro tubo con 9ml de solución buffer dará la dilución 10⁻³ y así sucesivamente, hasta obtener la dilución deseada.
- 6) Se agrega el medio de cultivo de manera aséptica a las cajas inoculadas con la muestra, aproximadamente 10 ml y a una temperatura de 45-48°C.
- 7) Con el fin de que se homogenice la muestra con el medio, se gira oscilatoriamente cada caja de Petri 6 veces en el sentido del giro de las manecillas del reloj, 6 veces en sentido contrario y 6 más formando un 8; cuidar que el medio no moje las cubiertas de las cajas, dejar solidificar.
- 8) Incubar las cajas en posición invertida a 32°C durante 48 horas.
- 9) Contar todas las colonias desarrolladas en las placas, tener cuidado de distinguir las de las pequeñas partículas de alimento.

- 10) Si el número de colonias se estima mayor de 300, contar la mitad o en un cuarto representativo de ella y multiplicar por 2 o por 4 respectivamente.
- 11) Multiplicar el número de colonias leído en la caja, por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias por ml o gramo de muestra.

d) CUENTA DE COLIFORMES TOTALES

d.1) DEFINICION.

Este método determina el nivel de contaminación por bacterias del grupo coliforme.

d.2) CAMPO.

Aplicable a todo tipo de muestras de grado alimenticio.

d.3) REACTIVOS.

Medio de Cultivo: Agar cristal violeta rojo neutro bilis. Prepare como indica el proveedor.

Solución buffer diluyente: preparar como en la sección de cuenta bacteriana total.

d.4) PROCEDIMIENTO.

El procedimiento a seguir es similar al enunciado en la sección de cuenta bacteriana total con las consideraciones siguientes:

1. Se incuba durante 24 horas a 32°C.
2. Reconocer acertadamente cada una de las colonias coliformes, si es que las hay, éstas poseen características muy específicas como: forman colonias redondeadas de color rojo oscuro con una zona alrededor de bÍlis precipitada de apariencia incolora, además de que las colonias crecen de manera casi diagonal al medio.
3. El número de colonias leído en la placa multiplicarlo por la inversa de la dilución a la que se inoculó la muestra y se obtendrá el número de colonias coliformes por gramo o por ml. (19)

e) AGAR CRISTAL VIOLETA ROJO NEUTRO BILIS.

e.1) FINALIDAD DEL EMPLEO.

Para la demostración y para la determinación del número de gérmenes de bacterias coliformes, especialmente del grupo Coli - Aerogenes, en agua, leche, carne, helados y otros alimentos.

e.2) MODO DE ACTUAR.

El cristal violeta y las sales biliaris inhiben el crecimiento de toda la flora gram-positiva acompañante. La degradación de lactosa a ácido se demuestra por el viraje a rojo del indicador de pH rojo neutro y por la precipitación de ácidos biliaris.

e.3) PREPARACION.

	(g/l)
Peptona especial	7.000
Extracto de levadura	3.000
Lactosa	10.000
Cloruro sódico	5.000
Mezcla de sales biliares	1.500
Rojo neutro	0.030
Cristal violeta	0.002
Agar-agar	13.000

40 g del producto se suspenden en 1 litro de agua recién destilada o desmineralizada, se dejan remojar 15 minutos y se hierven hasta solución total. En el caso de que se haga la siembra inmediatamente puede prescindirse de la esterilización en autoclave, lo cual es ventajoso para la actividad del medio de cultivo. Sin embargo, si se prevé un almacenamiento del medio preparado, deberá ser autoclaveado primero durante 15 minutos a 121°C.

Valor del pH del medio de cultivo listo para el uso, a 37°C: 7.4 ± 0.1

e.4) EMPLEO.

El material de análisis se mezcla homogéneamente en placas de Petri con el medio de cultivo enfriado a unos 50°C hasta 45°C, pero todavía fluido. Después de su solidificación se recomienda cubrir la superficie de cada placa con 3-4 ml de medio de cultivo estéril. Luego, se incuba durante 20 a 24 horas a 37°C. (19)

f) NEFELOMETRO DE Mc FARLAND.

Propósito: medición de turbidez.

1. Para medir la densidad bacteriana en cultivos líquidos.
2. Para producir un cultivo con una densidad deseada.

Preparación de estándares: sulfato de bario.

1. Reactivos:

- a. Cloruro de bario (BaCl_2), 1 % en solución acuosa.
- b. Acido sulfúrico (H_2SO_4), químicamente puro, 1 % en solución acuosa.
- c. $\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ ----> BaSO}_4 + 2 \text{HCl}$.

2. Tubos de prueba.

- a. 10 tubos de rosca nuevos (ó ampolletas) del mismo tamaño, completamente limpios y secos.
- b. Tubos del mismo diámetro (tamaño) similares a los tubos a comparar.

3. Añadir los reactivos a los tubos debidamente etiquetados (1 a 10) en las cantidades indicadas en la siguiente página:

ESTANDARES DE SULFATO DE BARIO

Nº DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl ₂ (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1% H ₂ SO ₄ (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
DENSIDAD CE- LULAR APROX. (X 10 ⁸ /ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
DENSIDAD CE- LULAR APROX. (EN MILLO- NES/ml)	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000

4. Cerrar y etiquetar los tubos.

5. El precipitado de sulfato de bario es aproximadamente igual a la densidad homogénea de Escherichia coli por ml.

c. Método.

1. Agitar suavemente los tubos estándar.
2. Añadir asépticamente una alícuota medida del caldo de cultivo a probar dentro de un tubo estéril del mismo diámetro (tamaño) de los tubos estándar.
3. Añadir asépticamente una cantidad media de solución salina estéril (NaCl) hasta que la turbidez iguale al tubo estándar con la densidad deseada.

(17)

capítulo IV

**manejo de muestras
y metodología**

IV.1 MANEJO DE MUESTRAS.

Para el presente estudio se utilizaron ostiones principalmente de dos géneros:

Crassostrea virginica

Ostrea edulis

Se utilizaron ostiones desconchados provenientes de tiendas de autoservicio, principalmente en cadenas de la zona metropolitana del Distrito Federal.

Los ostiones se adquirieron en su presentación comercial, es decir, envasados en dos diferentes tipos de contenedores:

a) Contenedores de vidrio con tapa giratoria de plástico.

b) Contenedores de plástico con tapa giratoria del mismo material.

En el momento de la adquisición, se deben tomar ciertas precauciones para no alterar la flora bacteriana dentro de los contenedores.

- 1.- Una vez que el contenedor sale del refrigerador es necesario comprobar el cierre de la tapa para evitar escurrimientos y evitar contaminaciones.

- 2.- A continuación se coloca la muestra en bolsas de plástico (1 por frasco). y se sellan con cinta adhesiva.
- 3.- Por último es necesario colocar las bolsas que contienen las muestras en hieleras y mantenerlas a una temperatura menor a 5 °C mientras se continúa con el muestreo. Es importante evitar la entrada de agua del hielo hacia el interior de las bolsas para evitar contaminaciones.

IV.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO.

Ya en el laboratorio los contenedores se extraen de las bolsas y son limpiados perfectamente, sobre todo alrededor del cierre. Esta operación se puede realizar preferentemente con un algodón y alcohol para asegurar la limpieza del mismo.

Una vez que los contenedores están perfectamente limpios, son etiquetados para evitar confusiones y están listos para abrirse.

Frente a un mechero Bunsen, el contenedor se abre. Los ostiones con todo y el agua que los acompaña se vierten en vasos de licuadora estériles. Los vasos de licuadora son tapados y los ostiones se licúan durante 1 minuto. Es necesario dar este tiempo de molienda para lograr una homogenización adecuada.

Del "pull" formado se tomarán posteriormente las cantidades indicadas para comenzar el proceso de inoculación.

En la figura 2 se explica sistemáticamente el manejo de las muestras hasta antes de iniciar el proceso de inoculación.

FIGURA 2: MANEJO DE MUESTRAS



IV.3 TRATAMIENTO DE LA CEPA.

Durante el presente estudio se trabajó con una cepa de Plesiomonas shigelloides con la clave:

ATCC 14029

Esta cepa se adquirió en Argentina por medio de los Laboratorios de la Secretaría de Salud.

La cepa se recuperó utilizando el medio Skim-Milk (leche descremada) y se resembró en Agar Nutritivo hasta lograr un cultivo masivo. Posteriormente se liofilizó para incorporarla al cepario de los Laboratorios de la Secretaría de Salud.

Una vez que se obtuvieron células sanas y fuertes, se realizaron pruebas de tipificación, donde se observó su crecimiento en diferentes medios. Se le realizaron pruebas bioquímicas para determinar su comportamiento. Se sometió a diferentes condiciones de crecimiento para determinar las óptimas; y por último se realizaron pruebas de resistencia a la ampicilina.

IV.4 OBTENCION DE LOS NIVELES DE INOCULACION.

Uno de los aspectos importantes que se requiere para saber si el método propuesto funciona, es conocer que cantidad de cepa se inocular a las muestras de ostiones para saber si se recupera o no. Para esto es necesario realizar ciertas operaciones para estandarizar los niveles de inoculación.

Antes de iniciar la estandarización es necesario que la cepa haya sido resembrada 24 horas antes, lo anterior, con la finalidad de obtener células jóvenes y fuertes que soporten las condiciones a las que van a ser sometidas. La resiembra se realiza en Agar Base Sangre en tubo inclinado. Pasadas las 24 horas, se agrega solución salina al tubo de Agar Base Sangre 2ml de solución salina estéril y con el Asa de Platino se remueven las células para formar una suspensión uniforme. procurando que todas las células se integren en la solución. La suspensión formada se transfiere a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm estéril, al cual se le agrega poco a poco más solución salina. Se va añadiendo alrededor de 1 ml, se agita suavemente y se compara con el Tubo N° 8 del Nefelómetro de Mac Farland (2400x10+6 cel/ml). Se deja de agregar la solución salina cuando la turbidez de ambos tubos sea igual.

De la solución se toma 1 ml y se diluye en 9 ml de Buffer (Dilución 1×10^{-1}); El frasco se agita 30 veces en un angulo 60° para lograr la perfecta integración de la dilución. De esta dilución se toma 1 ml y se diluye con 9 ml de Buffer (Dilución 1×10^{-2}) y el frasco se agita de la misma manera. Esta operación se repite hasta llegar a la dilución 1×10^{-8} .

Del frasco con la dilución 1×10^{-8} se toma 0.1 ml y se transfiere a la caja Petri que contiene el agar dextrina fucsina sulfito de sodio (DFS). Con una varilla de vidrio doblada (similar a la usada en el Agar Baird-Parker) se expande el inóculo para hacer que éste cubra toda la superficie de la caja. Esta operación se repite para las cajas de agar inositol bilis verde brillante (IBB). Al tomar 0.1 ml de la dilución 1×10^{-8} y agregarlo a la caja se logra una dilución de 1×10^{-9} , por lo que la caja se marcará con este número de dilución. La misma operación se repite para todas las diluciones.

Las cajas de los agares IBB y DFS se incuban a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo, se cuentan las colonias en cada uno de los agares y se separan las que tengan entre 30 y 300 colonias.

Después se hacen los cálculos necesarios para obtener los niveles de inoculación de 1,000, 10,000 y 1,000,000 de células por gramo de ostión.

En la figura 3 se explica el procedimiento de estandarización del inóculo.

FIGURA 3: ESTANDARIZACION DEL INOCULO



IV.5 PROCEDIMIENTOS PARA LA INOCULACION Y RECUPERACION.

De la muestra de ostiones ya licuada, se pesan 25 g directamente en los frascos que contienen 225 ml del caldo de enriquecimiento (Agua Peptonada Alcalina). Se agita vigorosamente para lograr una perfecta integración entre los ostiones y el caldo de enriquecimiento.

Ya estandarizado el inóculo (ver sección IV.4) se toma 1 ml de las diluciones (escogidas previamente y que contienen los tres niveles de inoculación) y se agrega a los frascos de enriquecimiento. Se tapa y se agita suavemente para evitar rompimiento de células. Los frascos se incuban a 37°C por 24 horas.

El desarrollo de las Plesiomonas shigelloides puede verse afectado por la flora asociada del ostión por lo que es necesario saber la cantidad de bacterias totales y de coliformes presentes.

Al momento de ir pesando los 25 gramos para la inoculación, se van pesando 10 g de ostión, los cuales se diluyen en 90 ml de buffer (dilución 1×10^{-1}). El frasco se cierra y se agita vigorosamente (30 veces en un ángulo de 60°). De la dilución formada, se toman 10 ml y se diluyen en otros 90 ml de buffer. Esta operación se repite hasta llegar a la dilución 1×10^{-4} .

Con una pipeta de 1 ml, se toman 0.1 ml de cada dilución y se coloca en cajas de Petri estériles. Esta operación se hace por duplicado: 1 caja para la cuenta de mesofílicos aerobios y otra para la cuenta de coliformes totales.

A las cajas de cuenta de mesofílicos aerobios se les agrega aproximadamente 15 ml de agar para cuenta estandar. Inmediatamente después de agregarlo se agitan las cajas con movimientos circulares,

horizontales y verticales para homogenizar el inóculo. Las cajas se ponen a incubar a 37°C por 24 horas. A las cajas para la determinación de coliformes totales, se les agrega aproximadamente 15 ml de agar violeta cristal rojo neutro bilis. Se espera a que solidifique y se cubre con una segunda capa. Esto, con el fin de evitar la ruptura del agar si existiera producción de gas por parte de algún microorganismo. Las cajas se ponen a incubar a 37°C por 24 a 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación de los frascos de enriquecimiento, se agitan para la incorporación de células en el mismo. Se toma una asada y se siembra por estría en los medios diferenciales IBB y DFS. Éstos se ponen a incubar a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo a las colonias sospechosas se les hace la prueba de oxidasa y frotis. Las colonias características se resiembran en agar base sangre para ayudar a su crecimiento y reponerlas del stress sufrido al crecer en los medios diferenciales. El agar base sangre se incuba a 37°C por 24 horas para obtener un cultivo masivo. A las colonias recuperadas se les aplican las pruebas bioquímicas para su identificación, constando de Oxidasa (nuevamente para evitar falsos positivos), Voges-Proskauer, Rojo de Metilo, Movilidad, Hidrólisis de Gelatina, Lisinia, Ornitina y Arginina, también se analiza la morfología colonial y morfología microscópica. La síntesis del proceso que se sigue se muestra en las figuras 4 y 5.

FIGURA 4: MEDICION DE FLORA MICROBIANA

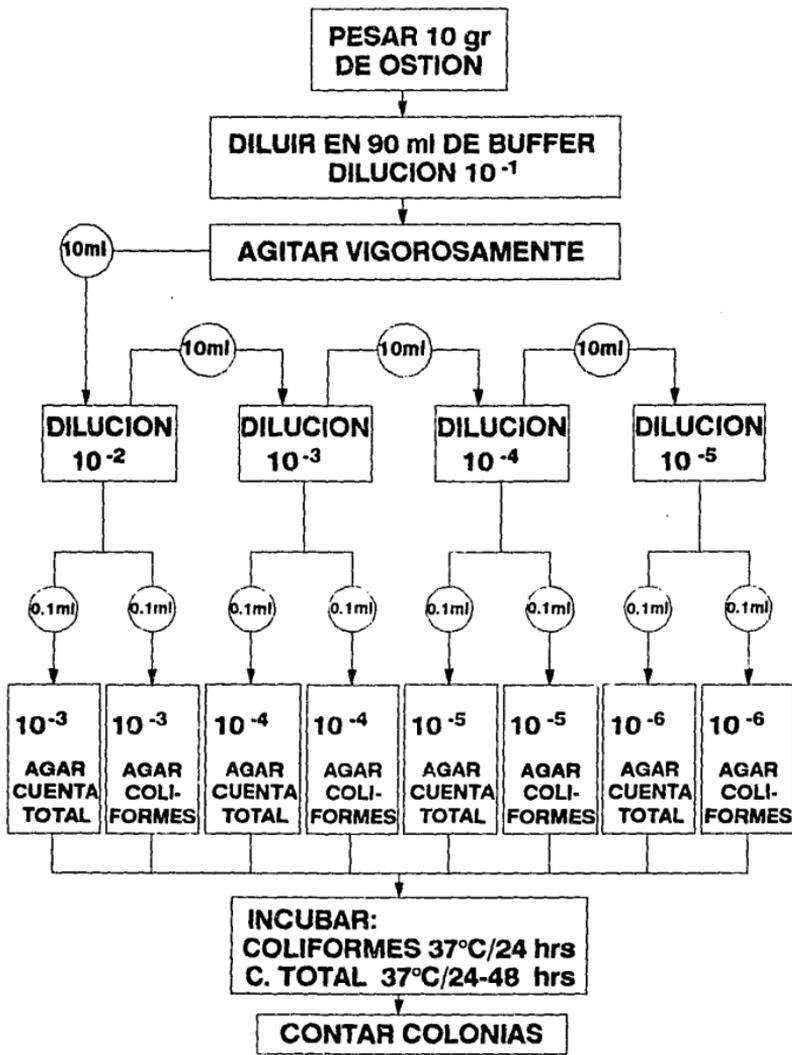
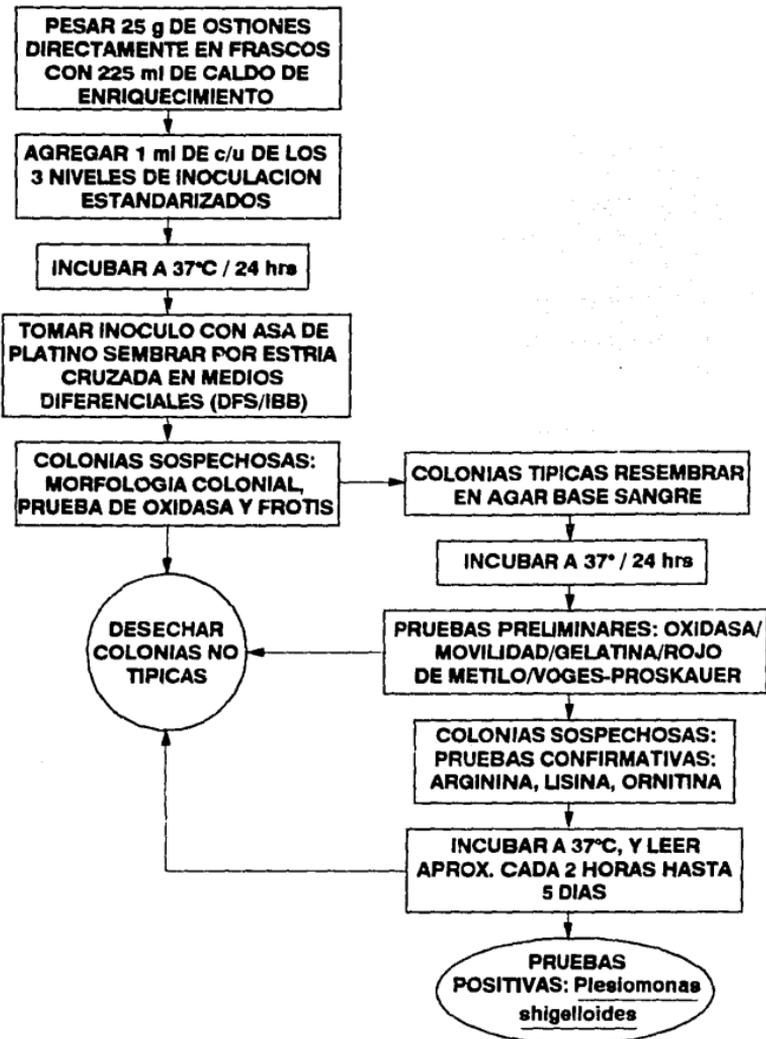


FIGURA 5: INOCULACION DE LOS OSTIONES



capítulo V

resultados

V.1 CARACTERIZACION DE LA CEPA ATCC 14029.

A la cepa de Plesiomonas shigelloides con la clave ATCC 14029, una vez que se resembró en agar nutritivo para obtener un cultivo sano, se le realizaron varias pruebas tanto de caracterización como de condiciones de crecimiento, para observar su comportamiento y fijar los parámetros de trabajo.

V.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

La cepa se sometió a diferentes condiciones de crecimiento en tubos de caldo nutritivo, para observar su comportamiento y poder fijar estas condiciones cuando se inoculen en las muestras de ostiones. Se incubaron bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de sal bajo condiciones de aerobiosis y microaerobiosis. La microaerobiosis, se logró añadiendo aceite mineral en la parte superior de los tubos.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos. Las gráficas 1 y 2 muestran la comparación del crecimiento variando las condiciones arriba mencionadas. Este crecimiento se clasificó visualmente tomando una escala arbitraria donde el N° 4 se considera como crecimiento óptimo, hasta el N° 0 donde el crecimiento es nulo.

TABLA 11
CONDICIONES DE CRECIMIENTO

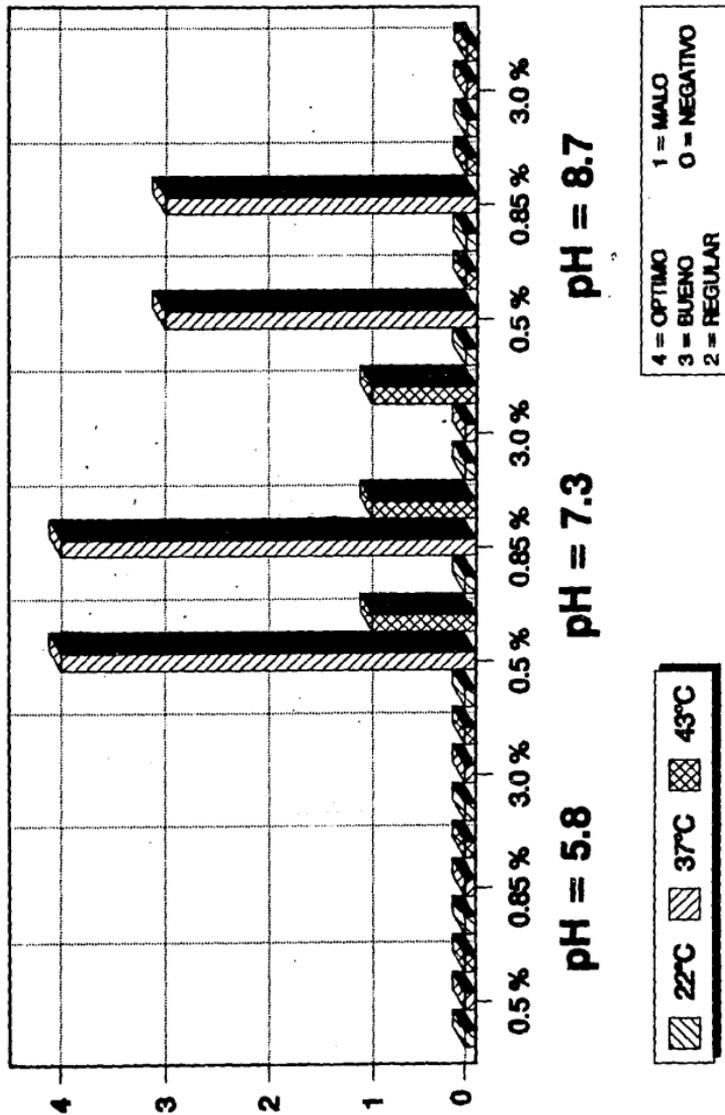
pH	5.8								
[NaCl] (%)	0.5			0.85			3.0		
TEMPERATURA (°C)	22	37	43	22	37	43	22	37	43
AEROBIOSIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MICROAEROBIOSIS	-	+	-	-	-	-	-	-	-

pH	7.3								
[NaCl] (%)	0.5			0.85			3.0		
TEMPERATURA (°C)	22	37	43	22	37	43	22	37	43
AEROBIOSIS	-	+	+L	-	+	+L	-	-	+L
MICROAEROBIOSIS	-	+	+	-	+	+	-	-	+

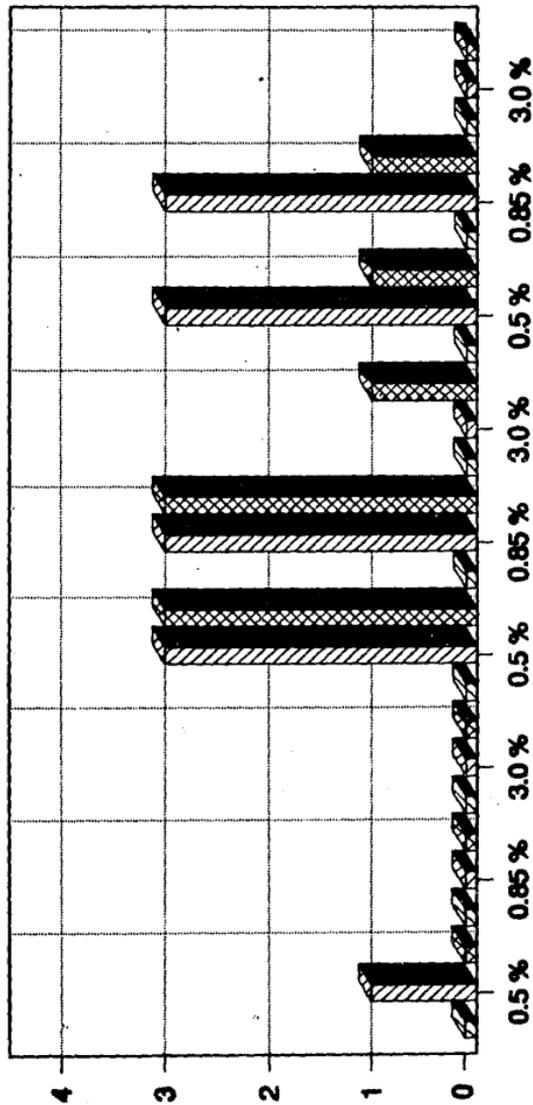
pH	8.7								
[NaCl] (%)	0.5			0.85			3.0		
TEMPERATURA (°C)	22	37	43	22	37	43	22	37	43
AEROBIOSIS	-	+	-	-	+	-	-	-	-
MICROAEROBIOSIS	-	+	+L	-	+	+L	-	-	-

TIEMPO DE INCUBACION: 48 hrs.
MEDIO DE CRECIMIENTO: CALDO NUTRITIVO
L= CRECIMIENTO LEVE

GRAFICA Nº 1
CONDICIONES DE CRECIMIENTO
AEROFILICA



GRAFICA N° 2
CONDICIONES DE CRECIMIENTO
MICRO-AEROFILICA



pH = 5.8

pH = 7.3

pH = 8.7



4= OPTIMO
3= BUENO
2= REGULAR

1= MALO
0= NEGATIVO

V.3 MORFOLOGIA MICROSCOPICA Y COLONIAL.

Con las condiciones de crecimiento ya fijadas, se procedió a sembrar la cepa en varios medios de cultivo para observar su morfología colonial. Los medios utilizados fueron: Agar inositol bilis verde brillante (IBB), Agar dextrina fucsina sulfito de sodio (DFS) y Agar Mac Conkey. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

A las colonias típicas se les realizó tinción de Gram para observar la morfología microscópica. Se encontraron células redondas Gram negativas, formando cadenas cortas. Algunas células se encontraban solas o en pares.

TABLA 12
RESULTADOS DE LA MORFOLOGIA COLONIAL

CARACTERISTICA	MEDIO DE CULTIVO		
	IBB	DFS	Mac CONKEY
TAMAÑO	1 mm	PUNTIFORME	1.5 mm
FORMA	REDONDA	REDONDA	REDONDA
ELEVACION	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA
BORDE	ENTERO	ENTERO	ASERRADO
LUZ REFLEJADA	BRILLANTE	BRILLANTE	BRILLANTE
LUZ TRANSMITIDA	OPACA	OPACA	TRANSLUCIDA
CONSISTENCIA	BLANDA	BLANDA	BLANDA
COLOR	ROSA CLARO	ROSA	ROSA
SUPERFICIE	UMBONADA	LISA	RUGOSA
ASPECTO	HUMEDO	HUMEDO	HUMEDO

V.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACION

Antes de comenzar con la inoculación de los ostiones, se practicaron pruebas bioquímicas a la cepa tipo para observar su comportamiento. Estas pruebas fueron: Gelatina, Movilidad, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Oxidasa, Lisina descarboxilasa, Ornitina dihidrolasa, y Arginina descarboxilasa.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 13

TABLA 13
RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS
CEPA TIPO

PRUEBA BIOQUIMICA	CEPA TIPO
OXIDASA	+
GELATINASA	-
MOVILIDAD	+
VOGES-PROSKAUER	-
ROJO DE METILO	-
ARGININA	+
LISINA	+
ORNITINA	+
TESTIGO DE AMINO-ACIDOS	-

Como se puede ver, el tubo N° 8 de Mac. Farland contiene 127,000,000 cel/ml, entonces, al agregar 1 ml de esta suspensión y diluirla en 225 ml de caldo de enriquecimiento (Agua Peptonada Alcalina) se obtendrán:

564,444 células/ml de APA.

Por otro lado, se tienen 25 g de ostión los cuales se agregan al caldo de enriquecimiento (APA), lo que significa que se tienen:

0.11 g de Ostión/ml de APA

Al inocular se tienen 564,444 células en 0.11 g de ostión, por lo tanto el inóculo será de:

5,131,309 células/g de Ostión

Las diluciones a tomar para ajustar los niveles de inoculación por gramo de ostión son las siguientes:

Cuando se usa la dilución 10-1 se inoculan	513,131 células/g ostión
Cuando se usa la dilución 10-2 se inoculan	51,313 células/g ostión
Cuando se usa la dilución 10-3 se inoculan	5,131 células/g ostión
Cuando se usa la dilución 10-4 se inoculan	513 células/g ostión
Cuando se usa la dilución 10-5 se inoculan	51 células/g ostión
Cuando se usa la dilución 10-6 se inoculan	5 células/g ostión

Para el presente estudio, se tomaron 3 niveles de inoculación:

Nivel 1.- Niveles de 1,000,000 células/g de ostión
Nivel 2.- Niveles de 100, 000 células/g de ostión
Nivel 3.- Niveles de 1,000 células/g de ostión

Por lo tanto, para la inoculación de estos niveles se tomaron:

- a) Tubo Nº 8 Mac.Farland para el Nivel 1
- b) Dilución 10-1 para el Nivel 2
- c) Dilución 10-3 para el Nivel 3

La estandarización del inóculo es un proceso difícil de reproducir pues depende de las condiciones de las células, de las variaciones en la temperatura de incubación, y otros factores. Por eso, cada vez que se realizó la inoculación, fué necesario hacer, como testigo, un proceso de estandarización y calcular nuevamente la cantidad de células agregadas.

V.6 RESULTADOS DE LA INOCULACION Y RECUPERACION

Se trabajaron 25 muestras de ostiones divididas en 3 niveles de inoculación, dando un total de 75 corridas diferentes. Aparte, por cada muestra se corrió un testigo, para asegurar que no interfirieran posibles contaminaciones con Plesiomonas shigelloides en los niveles ajustados de inoculación. En total se manejaron 100 corridas diferentes.

Las 100 corridas se dividieron por lotes de la siguiente manera:

M U E S T R A S		
1er lote	20 corridas	1 - 5
2do lote	24 corridas	6 - 11
3er lote	28 corridas	12 - 18
4to lote	28 corridas	19 - 25

TOTAL	100 corridas	25 muestras

En las tablas 14, 15, 16 y 17, se muestran los resultados de la recuperación divididos por el N° de lote.

En la gráfica N° 3, se muestra el porcentaje de recuperaciones logradas sin tomar en cuenta las muestras que dieron testigo positivo. En la gráfica N° 4, si se consideran las muestras con testigo positivo.

TABLA 14
RESULTADOS 1er. LOTE

MUESTRA	RESULTADOS C.M.A. (cél/gr oestión)	NIVEL DE INOCULACION (cél/gr oestión)	IDENTIFICACION DE <i>Plesiomonas shigelloides</i>	
			AGAR DFS	AGAR IBB
1	17,250	10E5	NEGATIVO	NEGATIVO
		10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
		10E2	POSITIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	92,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
		10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	245,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	POSITIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	462,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	POSITIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	189,000	10E5	NEGATIVO	NEGATIVO
		10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
		10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 15
RESULTADOS 2do. LOTE

MUESTRA	RESULTADOS C.M.A. (cél/gr algodón)	NIVEL DE INOCULACION (cél/gr algodón)	IDENTIFICACION DE <i>Plesiomonas shigelloides</i>	
			AGAR DFS	AGAR IBB
6	1,900,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	POSITIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	POSITIVO	NEGATIVO
7	6,700,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	POSITIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
8	2,600,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
		10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	9,100	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	POSITIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	6,000,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	3,400,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
		10E4	POSITIVO	NEGATIVO
		10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
		TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA 16
RESULTADOS 3er. LOTE

MUESTRA	RESULTADOS C.M.A. (cél/gr ostión)	RESULTADOS COL.TOTALES (cél/gr ostión)	NIVEL DE INOCULACION (cél/gr ostión)	IDENTIFICACION DE <i>Pleiomonas shigelloides</i>	
				AGAR DFS	AGAR IBB
12	320,000	1,700	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	POSITIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	13,000,000	970,000	10E5	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	POSITIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	620,000	200	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	POSITIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
15	3,100,000	270,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	POSITIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	300,000	1,400	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	POSITIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	POSITIVO	NEGATIVO
17	40,000,000	5,600	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	POSITIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
18	46,000,000	1,300	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO

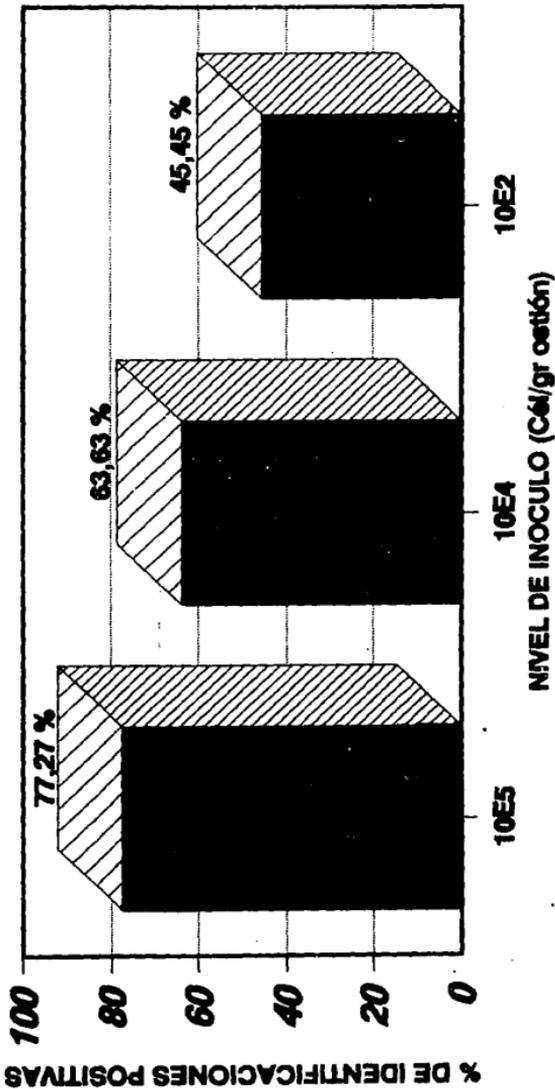
TABLA 17

RESULTADOS 4to. LOTE

MUESTRA	RESULTADOS C.M.A. (cél/gr oestón)	RESULTADOS COL.TOTALES (cél/gr oestón)	NIVEL DE INOCULACION (cél/gr oestón)	IDENTIFICACION DE <i>Plasmodium ahiigeloides</i>	
				AGAR DFS	AGAR IBB
19	22,000,000	300,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
20	13,000,000	220,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
21	19,000,000	780,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	POSITIVO	NEGATIVO
22	26,000,000	760,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	26,000,000	610,000	10E5	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	34,000,000	290,000	10E5	POSITIVO	NEGATIVO
			10E4	POSITIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	23,000,000	370,000	10E5	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E4	NEGATIVO	NEGATIVO
			10E2	NEGATIVO	NEGATIVO
			TESTIGO	NEGATIVO	NEGATIVO

GRAFICA N° 3

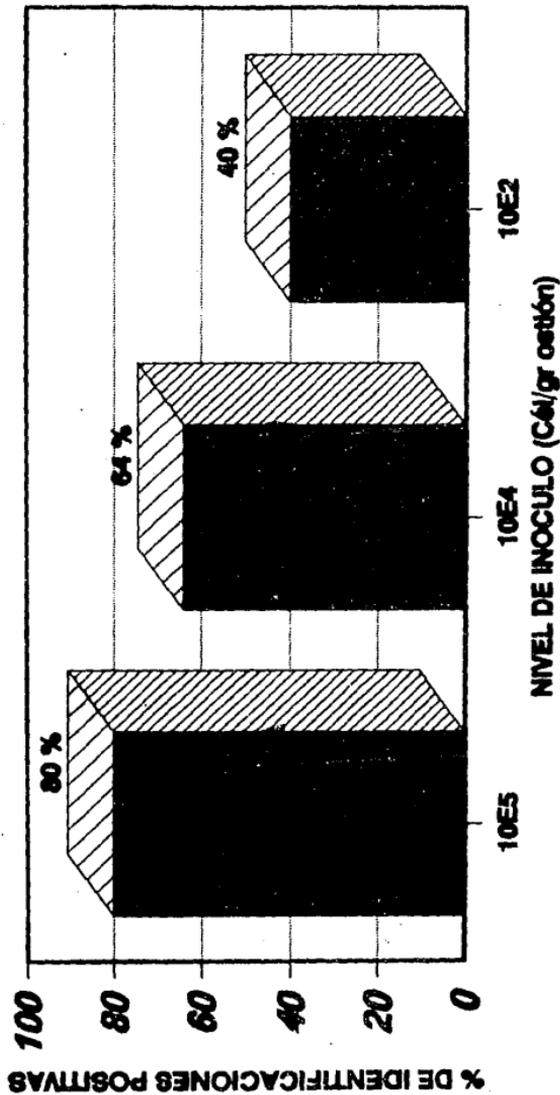
RECUPERACION SIN TESTIGO POSITIVO
% DE IDENTIFICACIONES POSITIVAS VS NIVEL DE INOCULO



N° DE MUESTRAS TOTALES: 25
N° DE MUESTRAS ELIMINADAS: 3
N° DE MUESTRAS REALES: 22

GRAFICA Nº 4

RECUPERACION CON TESTIGO POSITIVO % DE IDENTIFICACIONES POSITIVAS VS NIVEL DE INOCULO



Nº DE MUESTRAS TOTALES: 25
Nº DE MUESTRAS ELIMINADAS: 0
Nº DE MUESTRAS REALES: 25

capítulo VI

**discusión de
resultados**

I. CARACTERIZACION DE LA CEPA.

Para la caracterización de la cepa se utilizaron las pruebas bioquímicas más representativas para Plesiomonas shigelloides. Estas pruebas se aplicaron una vez que la cepa se repuso del stress causado por el proceso de liofilización.

Los resultados de las pruebas de oxidasa, gelatinasa, movilidad, Voges Proskauer y rojo de metilo fueron similares a los reportados en bibliografía (1, 6 y 9). Se presentaron algunos problemas para obtener los resultados de las pruebas de Arginina dihidrolasa, Lisina descarboxilasa y Ornitina descarboxilasa, pues la reacción que se obtenía no coincidía con lo reportado en bibliografía. Después de varias corridas se llegó a la conclusión de que se estaba utilizando una técnica errónea para la detección de estas enzimas. Al utilizar la técnica reportada (Ver sección III.3) se obtuvieron los resultados deseados. Al hacer este tipo de determinaciones es importante estar observando los tubos continuamente pues las reacciones se llevan a cabo en muy poco tiempo y en ocasiones no se puede detectar el vire de los indicadores.

II. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

A) pH.

En las gráficas 1 y 2 se puede observar que el pH es un factor determinante para el crecimiento de Plesiomonas shigelloides. Con la cepa de trabajo se observó que a un pH de 5.8 se obtuvieron crecimientos escasos, aún variando las condiciones de temperatura, concentración de sal y de oxígeno.

Estas observaciones coinciden con el estudio elaborado por Janda M. en donde reporta crecimientos escasos (casi nulos) a valores de pH menores de 6. Al utilizar un pH más alcalino (pH=8.7) se obtuvieron mejores resultados, sin embargo, aunque la cepa tuvo un mejor crecimiento que a pH=5.8, no se llegó al óptimo. Este último se alcanzó al usar un pH=7.3 en donde la cepa alcanzó su máximo desarrollo. Es importante aclarar que las pruebas se hicieron simultaneas variando otras condiciones como temperatura, oxígeno y concentración de sal.

B) TEMPERATURA.

La cepa de trabajo se probó a diferentes temperaturas: 22, 37 y 43°C. Se observó que a 22°C el crecimiento era casi nulo a diferentes pH y concentraciones de oxígeno y de sal. A 43°C se observaron crecimientos casi nulos a pH de 5.8 y regulares a pH de 8.7 y 7.3. El crecimiento óptimo se alcanzó a una temperatura de 37°C a un pH de 7.3. Utilizando un pH de 8.7 y 37°C se obtuvieron resultados buenos pero no óptimos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Miller M. en donde reporta el mejor crecimiento de diferentes cepas en un rango de 25 a 50°C.

C) CONCENTRACION DE SAL.

Se utilizaron diferentes concentraciones de 0.5, 0.85 y 3% para observar el crecimiento. Se concluyó que a 3 % de sal a las diferentes temperaturas, pH's y concentraciones de oxígeno el crecimiento se inhibió. Los mejores resultados se observaron al 0.5 y 0.85 %.

D) CONCENTRACION DE OXIGENO.

La cepa de trabajo se probó bajo dos ambientes: aerobiosis y microaerobiosis; la anaerobiosis no fué probada pues Plesiomonas shigelloides está reportada como aeróbio facultativo. La microaerobiosis se logró añadiendo aceite mineral en la parte superior del tubo de ensaye.

No se observaron cambios notables en el crecimiento de Plesiomonas shigelloides al cambiar las condiciones de concentración de oxígeno, aunque se notó ligeramente menor el crecimiento en condiciones microaerofílicas. Esta evaluación, al igual que las demás se realizó simultáneamente con las variaciones de temperatura, concentración de sal y pH.

Todos los crecimientos se evaluaron visualmente utilizando una escala arbitraria para la obtención de resultados:

4	Crecimiento abundante (máximo)
3	Crecimiento bueno
2	Crecimiento medio
1	Crecimiento escaso
0	Crecimiento nulo

Una vez evaluados los resultados se tomaron las condiciones de crecimiento en donde fueron observados los crecimientos abundantes para tomarlas como condiciones de crecimiento y aplicarlas tanto para la preparación de medios como para la incubación. Estas condiciones son las siguientes:

TEMPERATURA DE INCUBACION : 37°C.
CAPTACION DE OXIGENO : AEROBICA
pH OPTIMO DE CRECIMIENTO : 7.3
CONCENTRACION DE SAL : 0.85 % MAXIMO

Cabe señalar que no todos los medios se formularon utilizando el pH y la concentración de sal señalados, sino que se respetó la formulación marcada por el fabricante, por ejemplo, el caldo-base de aminoácidos y los medios selectivos.

III. MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA

Ya estandarizadas las condiciones de crecimiento se procedió a observar la morfología colonial en los diferentes medios selectivos, para que, en el momento de la inoculación y posterior selección, se pudiera distinguir las Plesiomonas shigelloides del resto de la flora microbiana.

La cepa se probó en los medios IBB, DFS y Mac Conkey. Estos medios fueron incubados a 37°C por 24 horas después de las cuales se procedió a leer la morfología colonial. Existen algunas desviaciones en los resultados obtenidos y lo reportado por algunos autores; por ejemplo, A. von Graevenitz reporta colonias pequeñas y de color rojo brillante para el crecimiento de Plesiomonas shigelloides en el agar DFS, sin embargo en los resultados se reportan colonias de 1.5 mm de diámetro con un color rosa intenso. Otros autores (37) reportan colonias sin

color en agar Mac Conkey, mientras que en este estudio las colonias se presentan de color rosa. Estas variaciones se pueden deber al tipo de cepa usada, las condiciones del agar, pequeñas variaciones en la temperatura de incubación, etc.

Para la morfología microscópica se utilizó la tinción de Gram, la cual se aplicó después de la incubación en los medios selectivos. Los resultados obtenidos si concuerdan con lo reportado en la bibliografía: células alargadas, gram negativas, formando cadenas cortas.

IV. ESTANDARIZACION DEL INOCULO

La principal problemática de la estandarización del inóculo es poder encontrar la dilución en la que se van a contar entre 30 y 300 colonias, es por eso que es necesario llegar a la dilución 1×10^{-9} , después de ajustar el tubo que contiene la cepa con el tubo N° 8 del nefelómetro de Mac Farland. Esta operación se realizó una sola vez, en esta ocasión se pudo constatar que en las diluciones 1×10^{-8} y 1×10^{-9} ya no aparecían colonias en los medios selectivos. También se observó que en la dilución 1×10^{-6} se encontraban aproximadamente 127 células. Haciendo los cálculos pertinentes se llegó a la conclusión de que al ajustar el inóculo con el Tubo N° 8 del nefelómetro se obtenían 127,000,000 de células viables en 1 ml de solución salina. Esta cantidad se divide entre 225 ml (que es la cantidad de caldo de enriquecimiento en la cual se diluye el inóculo) para obtener la cantidad de células viables en 1 ml de caldo de enriquecimiento. Por último es necesario saber cuantas células viables se encuentran en 1 g de ostión, para esto se necesita conocer cual es concentración de ostión licuado

en 1 ml de caldo de enriquecimiento (0.11 g ostión / ml de APA). Una vez obtenida la cantidad de células viables por gramo de ostión, se calculan las diluciones en las que se espera encontrar los niveles de inoculación deseados.

En esta parte del estudio es importante definir algunas acciones:

- a) Se utilizó la técnica del nefelómetro de Mac Farland por ser un procedimiento rápido y sencillo. Existen otras técnicas de estandarización de turbidez como podría ser la espectrofotometría, pero esta última, aunque es más exacta, no todos los laboratorios cuentan con el equipo necesario.
- b) Se eligió el tubo N° 8 de la escala de Mac Farland para asegurar que se pudieran encontrar el nivel máximo de inoculación (1,000,000 cel/g de ostión), pues el microorganismo en estudio demostró ser sumamente delicado.
- c) Se tomó la relación: 25 g de ostión diluidos en 225 g de caldo de enriquecimiento, por ser ésta una de las relaciones más utilizadas para el enriquecimiento de otros microorganismos.
- d) Se propusieron los niveles de 1,000, 100,000 y 1,000,000 de células/g de ostión para abarcar una mayor cantidad, pues es difícil definir que cantidad de Plesiomonas shigelloides se encuentran en la flora microbiana de los ostiones.

Ya conocidas las diluciones que promueven los niveles de inoculación deseados, se procedió a hacer la contaminación de los ostiones. Es importante señalar que este procedimiento se repitió cada vez que se inoculaban los ostiones. La cantidad de células viable no era la misma cada vez que se repetía la metodología, pero siempre, las mismas diluciones daban los niveles deseados de inóculo, es decir, se tomó el tubo N° 8 de Mac. Farland para obtener 1,000,000 de células viables por g de ostión, la dilución 1 x 10⁻¹ para obtener 100,000 células por g de ostión y por último la dilución 1 x 10⁻³ para obtener 1,000 células viables por gramo de ostión.

V. CONTAMINACION DE LAS MUESTRAS

A) FLORA MICROBIANA.

Para la contaminación de las muestras, se decidió dividir por lotes las 25 muestras de ostiones a trabajar; lo anterior con la finalidad de dividir la carga de trabajo. Se procuró cuidar al máximo las condiciones de incubación y preparación de los medios para evitar desviaciones entre los lotes que pudieran afectar los resultados de la recuperación.

A cada frasco de medio de enriquecimiento APA se le agregaba 1 ml de la dilución para obtener los niveles de inoculación deseados. Esto quiere decir que de cada muestra de ostiones se toman 3 porciones de 25 g c/u para inocular 1 ml de cada una de las diluciones escogidas. También se toma una

porción más de 25 g para correr un testigo, esto, en caso de que en la flora microbiana de la muestra de ostión ya estuviera contaminada con Plesiomonas shigelloides alterando los niveles de inoculación.

Al inicio del diseño del experimento se decidió observar si la cuenta de mesofílicos aerobios afectaban a la recuperación de Plesiomonas shigelloides, esto es, se esperaba obtener recuperaciones negativas con niveles altos de mesofílicos y recuperaciones positivas con niveles bajos. Pero los resultados no fueron los esperados, pues no se observó una relación lógica entre la cantidad de mesofílicos y la recuperación, por lo tanto se concluyó que los mesofílicos no afectaban al crecimiento de las Plesiomonas shigelloides.

En base a lo anterior se decidió agregar a los análisis de rutina la cuenta de coliformes totales para observar si su concentración afectaba al crecimiento del microorganismo en estudio. Estos dos análisis se hicieron de rutina durante el resto de las muestras en estudio. A partir de la muestra N° 12 se comenzó a aplicar conjuntamente las técnicas de cuenta de mesofílicos aerobios y cuenta de coliformes totales.

Al término de las corridas, se evaluó si realmente la flora microbiana afectó a la recuperación de las Plesiomonas shigelloides.

La tabla siguiente muestra el comportamiento de las recuperaciones en relación con los niveles de mesofílicos aerobios y coliformes presentes: En las Gráficas 5 y 6 muestran como se alteró la recuperación con respecto a la cantidad de mesofílicos aerobios y coliformes totales.

COMPORTAMIENTO DE LA RECUPERACION (A)																	
Nº DE MUES-TRA	10E5 (+)			10E5 (+)			Nº DE MUES-TRA			10E5 (+)			Nº DE MUES-TRA				
	10E4	10E2	10E2 (-)	10E4	10E2	10E2 (-)	MUES-TRA	10E4	10E2	10E2 (-)	MUES-TRA	10E4	10E2	10E2 (-)			
CUENTA DE MESOFILICOS	3	245,000	10	6,000,000	2	92,000	5	2,600,000	23	26,000,000	189,000	5	26,000,000	13	13,000,000	17,250	
AEROBIOS (células/g de ostión)	4	462,000	11	3,400,000	8	2,600,000	2	13,000,000	20	26,000,000	23,000,000	25	26,000,000	25	26,000,000	13	13,000,000
	7	6,700,000	18	46,000,000	20	13,000,000	22	26,000,000	22	26,000,000							
	9	9,100	19	22,000,000	24	34,000,000											
	12	320,000	24	620,000													
	14	620,000		270,000													
	15	270,000															
	17	40,000,000															
PROMEDIO	/	6,078,263	/	22,280,000	/	10,423,000	/	16,396,333	/	6,508,625							

COMPORTAMIENTO DE LA RECUPERACION (B)															
Nº DE MUES-TRA	10E5 (+)			10E5 (+)			Nº DE MUES-TRA			10E5 (+)			Nº DE MUES-TRA		
	10E4	10E2	10E2 (-)	10E4	10E2	10E2 (-)	MUES-TRA	10E4	10E2	10E2 (-)	MUES-TRA	10E4	10E2	10E2 (-)	
CUENTA DE COLILIFORMES	12	1,700	18	1,300	20	220,000	23	610,000	23	610,000	13	970,000	13	970,000	
TOTALES (células/g de ostión)	14	200	19	300,000	22	760,000	25	370,000	25	370,000					
	15	270,000	24	290,000											
	17	5,600													

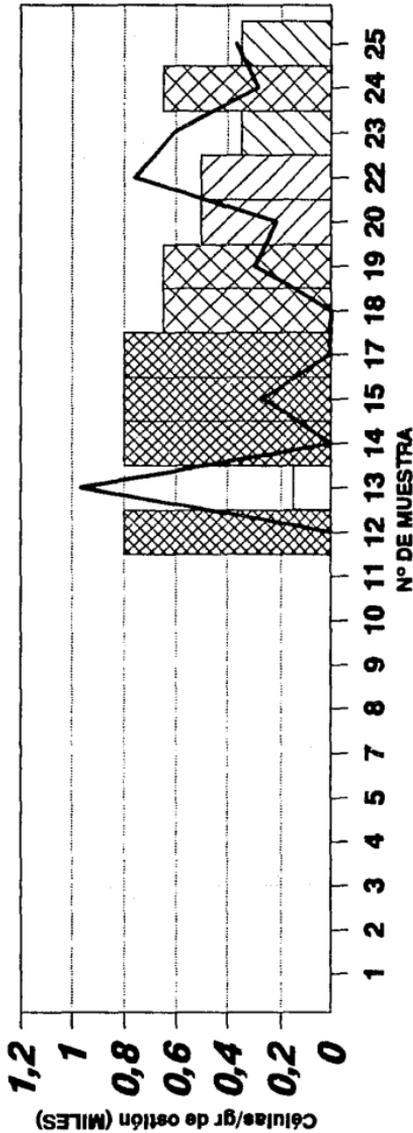
(A) No se tomaron en cuenta las muestras que dieron testigos positivos.

(B) Muestras con resultados positivos a niveles bajos de inoculación y negativos a niveles altos.

NOTA: No se obtuvieron promedios de la Cuenta de Coliformes Totales pues los valores no son uniformes.

GRAFICA N° 6

ALTERACION EN LA RECUPERACION POR LA CUENTA DE COLIFORMES TOTALES



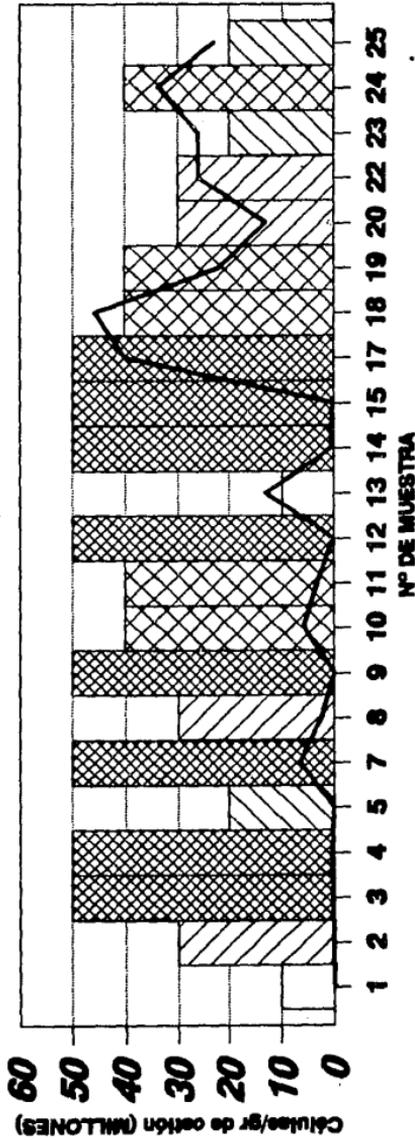
COLIFORMES TOTALES 10E5 = +, 10E4 = +, 10E2 = + 10E5 = +, 10E4 = +, 10E2 = -
 10E5 = +, 10E4 = -, 10E2 = - 10E5 = -, 10E4 = -, 10E2 = - INTERFERENCIAS

INTERFERENCIAS: Se refiere a las muestras en donde se logró recuperar a niveles bajos pero no a niveles altos como se esperaba.

MUESTRAS 6, 16 Y 21 SE SUPRIMIERON POR OBTENERSE TESTIGOS POSITIVOS MUESTRAS 1 A 11 NO HAY RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES

GRAFICA Nº 5

ALTERACION EN LA RECUPERACION POR LA CUENTA DE MESOFILICOS AEROBIOS



MESOFILICOS AEROBIOS 10E5 = +, 10E4 = +, 10E2 = + 10E5 = +, 10E4 = +, 10E2 = -

10E5 = +, 10E4 = -, 10E2 = - 10E5 = -, 10E4 = -, 10E2 = - INTERFERENCIAS

INTERFERENCIAS: Se refiere a las muestras en donde se logró recuperar a niveles bajos pero no a niveles altos como se esperaba.

MUESTRAS 6, 16 Y 21 SE SUPRIMIERON POR OBTENERSE TESTIGOS POSITIVOS

Se puede ver en la tabla que si realmente los mesofílicos aerobios hubieran afectado el crecimiento de Plesiomonas shigelloides, el promedio de las células/g de ostión de los mismos debiera de ser más bajo en el primer comportamiento (todos los niveles positivos) y más alto en el comportamiento donde todos los niveles dan negativos.

Por otro lado, la muestra N° 17, aunque tiene un nivel sumamente alto de mesofílicos (40,000,000 células/g de ostión), si se logró recuperar a todos los niveles, mientras que la muestra N° 5 con solo 189,000 células/g de ostión no hubo recuperación en los tres niveles. Es por esto que se llega a la conclusión de que el número de mesofílicos aerobios no afectó a la recuperación.

Con respecto a los coliformes totales se puede observar en la tabla, que no guardan una relación uniforme pues los valores obtenidos son muy desiguales entre si. Es por esta razón que no es valido obtener promedios de las mediciones efectuadas.

Sin embargo, se puede observar, que al igual que con los resultados obtenidos en la cuenta de mesofílicos aerobios, no existe relacion entre comportamiento de la recuperación y la cantidad de coliformes presentes en la muestra. Por ejemplo, la N° 15, aunque tiene un nivel elevado de coliformes (270,000 células/g de ostión) la recuperación se logró en todos los niveles, mientras que la muestra 18, con solo 1,300 células/g de ostión no se pudo recuperar en el último nivel.

Una consideración importante de hacer, es que las cantidades de coliformes y mesofílicos eran medidas a la muestra de ostiones antes del enriquecimiento con el agua peptonada alcalina. Al haber diversas clases de microorganismos en la

flora asociada, éstos reaccionan de diferente manera al inhibidor (pH alcalino), por lo que algunas veces su efecto fué más inhibitor que en otro. No se pudo hacer el conteo después del enriquecimiento por no contar con tanta cantidad de medio y tiempo para hacerlo.

B) RECUPERACION CON MEDIO IBB.

Como se puede ver en las tablas de resultados es claro que el medio IBB no funcionó, a ningún nivel de inóculo en todas las muestras. Este fenómeno es aún más raro puesto que al inicio del estudio, la cepa crecía perfectamente en este medio. Se hicieron numerosas pruebas para explicar el por que de la inhibición de la cepa en medio IBB. Para iniciar, se cambiaron todos los ingredientes con que se prepara el medio, se insistió principalmente en la fuente de carbono, en este caso Meso-inosita, de la cual se utilizaron diferentes lotes provenientes de diferentes proveedores, pero aún así, la cepa no creció. También se probaron diferentes condiciones de incubación, pero esto tampoco funcionó.

No se pudieron probar otras cepas de Plesiomonas shigelloides por la falta de disponibilidad de la misma. Se intentó sembrar otros tubos de liofilizado que se tenían en el instituto, lo cual tampoco dió resultado. La única explicación que se puede dar es que, durante las pruebas de identificación se trabajó con la cepa recuperada a partir del liofilizado original, una vez que ésta presentaba un crecimiento abundante, se decidió separar una parte de ella para los estudios de identificación y el resto se volvió a liofilizar. Terminados

los estudios de identificación se observó que la cepa de trabajo, después de tantos pases y resiembras, se encontraba sumamente gastada y deteriorada, por lo que se decidió abrir una nueva ampollita de liofilizado. En esta última se empezó a notar la falta de crecimiento en IBB. Lo anterior hace pensar que durante el liofilizado, la cepa perdió su capacidad de asimilación de alguno de los ingredientes de este medio por lo que no se logró su crecimiento.

Por otro lado, como se puede ver en los resultados, si se logró recuperar Plesiomonas shigelloides a partir de los testigos de las muestras de ostiones sin inocular en el medio DFS. Si las siembras en los medios IBB y DFS se corrieron en paralelo, por que entonces no se recuperó Plesiomonas shigelloides en las cajas de medio IBB. Cabe señalar que las cajas mostraban una gran cantidad de flora microbiana, lo cual hacía sumamente difícil la distinción de las colonias sospechosas de Plesiomonas shigelloides; esto indica una poca inhibición de flora microbiana por parte del medio IBB (se observó menos crecimiento de flora microbiana en las cajas de DFS). Por lo anterior, es probable que la falta de crecimiento en el medio IBB a partir de los testigos positivos se debiera:

- Falta de selectividad del medio IBB cuando existe una elevada concentración de flora microbiana en los ostiones, provocando un difícil aislamiento de la cepa en estudio.
- Probable formación de algún compuesto tóxico durante la preparación de los medios inhibiendo el crecimiento de Plesiomonas shigelloides, tanto de la cepa tipo, como de las presentes en las muestras de ostión.

Un aspecto importante, el cual no se realizó en el presente estudio, sería el sembrar las cepas aisladas de los testigos positivos utilizando el medio DFS, en las cajas de medio IBB para

observar si la inhibición fué unicamente en la cepa tipo por una posible mutación, o bien por la formación de compuestos tóxicos durante la preparación de este medio.

B) RECUPERACION CON MEDIO DFS

En este medio, a diferencia del anterior, si se pudo evaluar la recuperación de Plesiomonas shigelloides a diferentes concentraciones de inóculo. En los resultados se muestran dos gráficas diferentes, en la Gráfica N° 1 se está considerando el porciento de recuperaciones positivas a los tres niveles de concentración eliminando las muestras de ostiones que dieron positivo el testigo. Se decidió eliminar estas muestras debido a que la concentración de Plesiomonas shigelloides era diferente a la inoculada. Se puede observar que a una concentración de $10E5$ utilizando este medio, se pudo recuperar el 68 % del total de las muestras evaluadas. A una concentración de $10E4$, el porciento de recuperación es menor (56 %), y a una concentración de $10E2$ se recuperó el 36 % del total de muestras evaluadas. Como se puede ver, a medida que se baja el nivel de concentración, también baja el porciento de recuperaciones, lo cual indica que al tener mayor concentración del microorganismo, se aumentan las probabilidades de recuperarlo.

En la Gráfica N° 2 se muestra el número de recuperaciones positivas incluyendo las muestras de ostión en donde el testigo si contenía Plesiomonas shigelloides. Esto quiere decir que la cantidad de este microorganismo era mayor al número de células agregadas al ostión. Por lo anterior se observa en la gráfica que lógicamente aumentó también el porciento de recuperaciones positivas de este microorganismo.

Es importante mencionar, que cada caja de medio DFS fué sembrada siguiendo la técnica de estría cruzada, y después de la incubación, se tomaban mínimo 3 colonias sospechosas a las cuales se les aplicaban las pruebas de identificación, esto con el fin de reducir al máximo las probabilidades de dejar sin identificar alguna cepa de Plesiomonas shigelloides presente en la caja.

Otro aspecto importante es que la identificación que se hizo fué cualitativa y no cuantitativa, pero en la mayoría de las muestras en las que se logró una indentificación positiva en los tres niveles de inoculación, era claro que había una mayor cantidad de colonias de Plesiomonas shigelloides presentes en la caja de 10E5, que en las de 10E2.

Como se discutió anteriormente, el 65 % de las 25 muestras se pudo lograr una recuperación positiva con una concentración de 10E5 células por gramo de ostión. Esto indica una baja sensibilidad del método, pues la concentración mencionada es sumamente elevada y aún así se logró una recuperación baja. Lo anterior pudo suceder por diversos motivos:

- A) Es posible que debido a la elevada cantidad de microorganismos presentes en los ostiones pudieran competir por el alimento tanto en el medio de enriquecimiento como en el medio selectivo y evitaran el desarrollo de las Plesiomonas shigelloides.
- B) Durante la agitación de los frascos con caldo de enriquecimiento es posible que algunas células pudieran romperse, provocando una disminución de células de Plesiomonas shigelloides.

- C) Aunque la bibliografía recomienda el agua peptonada alcalina para la inhibición de la flora microbiana así como el desarrollo de Plesiomonas shigelloides a partir de muestras de heces fecales, durante este estudio se percibió que, aún después del enriquecimiento, muchos microorganismos crecieron en las cajas de agar DFS, por lo que en algunas ocasiones, la identificación y resiembra de las colonias sospechosas era difícil de realizar. En muchas ocasiones se presentó un crecimiento poco usual el cual cubría en su totalidad las cajas, lo cual provocó una contaminación de las colonias sospechosas en el momento de aislarlas.
- D) Es necesario tener mucha experiencia para poder identificar las colonias sospechosas de Plesiomonas shigelloides pues es fácil confundirlas con otras sumamente parecidas.

Sin embargo, es necesario determinar si los porcentajes de las muestras en donde se logró la recuperación son significativos o no.

	Nº DE REPETICIONES	Nº DE MUESTRAS ELIMINADAS POR TESTIGO POSITIVO	Nº DE MUESTRAS REALES	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS
10E5	25	3	22	17
10E4	25	3	22	14
10E2	25	3	22	10

	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	Nº MINIMO DE MUESTRAS POSITIVAS PARA ESTABLECER SIGNIFICANCIA A VARIOS NIVELES DE PROBABILIDAD PARA UN TAMAÑO DE MUESTRA DE 22						
		0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001
10E5	17	17	17	17	17	18	18	19
10E4	14	17	17	17	17	17	18	19
10E2	10	17	17	17	17	17	18	19

(25-38)

Como se puede ver, cuando se inoculan concentraciones de $10E4$ y $10E2$ la recuperación no fué significativa, pues el número mínimo para tener un 95 % de probabilidad de que el método es confiable es menor al indicado en la tabla.

Por otro lado, cuando se inoculan concentraciones de $10E5$, la recuperación sí fué significativa. La tabla muestra que se puede tener un 98 % de probabilidad de que el método es confiable cuando se tiene esta concentración.

capítulo VII

**conclusiones y
sugerencias**

CONCLUSIONES

I. CON RESPECTO A LA CEPA.-

Con respecto a la cepa , después de haber realizado los análisis de caracterización y pruebas bioquímicas se puede concluir que durante el presente estudio sí se trabajó con una cepa pura de Plesiomonas shigelloides. Se puede dar el caso de que otra cepa de este mismo microorganismo pueda dar algunas variaciones en las pruebas de caracterización como se menciona en el capítulo N° II del presente trabajo.

II. CON RESPECTO A LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO.-

Es sumamente importante revisar las condiciones óptimas de crecimiento para Plesiomonas shigelloides, pues inclusive en la bibliografía, algunos autores reportan diferentes condiciones para la preparación de medios e incubación de este microorganismo. Si no se hace un estudio antes de iniciar la inoculación de los ostiones, es probable que las condiciones de crecimiento sea una variable que afecte al desarrollo del microorganismo en estudio.

III. CON RESPECTO A LA ESTANDARIZACION DEL INOCULO

De acuerdo a los resultados, se puede concluir que durante el presente estudio, sí se logró mantener siempre la misma concentración de células por gramo de ostión cada vez que las muestras de ostiones fueron inoculadas.

Es sumamente importante repetir el proceso de estandarización, siempre que se prepara una nueva corrida, respetando las mismas condiciones de incubación (tiempo y temperatura), así como para la preparación de los medios, para que la estandarización sea confiable y reproducible.

La comparación de la turbidez con el nefelómetro de Mac Farland se realiza visualmente, lo cual puede producir desviaciones en la concentración. Estas variaciones se pueden reducir utilizando equipos más sofisticados para la medición de concentraciones.

IV. CON RESPECTO A LA UTILIZACION DEL AGAR IBB

Como se ve en las tablas de resultados, no se pudo lograr recuperar en ninguna de las muestras las Plesiomonas shigelloides. En la discusión de resultados se dan algunas de las causas por las que probablemente la cepa patrón no mostrara crecimiento alguno.

Es difícil llegar a concluir cual fué la causa directa, pues hay muchas variables que pudieron haber inhibido el crecimiento. Por otro lado, no se puede concluir que el medio IBB sea inadecuado para la recuperación del microorganismo en este estudio, pues la cepa pura sí mostro crecimiento durante el estudio de la morfología colonial, e inclusive durante la estandarización del inóculo.

Como se mencionó en la discusión de resultados, no se logró recuperar Plesiomonas shigelloides a partir de las muestras de ostiones con testigo positivo. Se dieron algunas posibles causas para explicar este fenómeno, aunque ninguna de ellas se podría considerar definitiva.

V. CON RESPECTO A LA UTILIZACION DEL AGAR DFS

Después de hacer la discusión de resultados, se puede llegar a la conclusión de que cuando se utiliza agar DFS en combinación con agua peptonada alcalina (como caldo de enriquecimiento) sí se puede lograr recuperar la cepa inoculada.

La recuperación de la cepa no fué significativa a todos los niveles de inoculación, sobre todo en los niveles de $10E4$ y $10E2$ células/g de ostión debido probablemente a las causas enumeradas en la discusión de resultados. Por otro lado, cuando se tienen en los ostiones niveles de $10E5$ células/g de ostión, el medio es efectivo hasta un 98 % de probabilidades, lo cual es muy significativo. Esto quiere decir que la sensibilidad del método únicamente es confiable cuando se tienen $10E5$ células de Plesiomonas shigelloides por gramo de ostión.

Por otro lado, utiizando este método, sí se logró recuperar Plesiomonas shigelloides de muestras sin inoculación, pues en tres testigos, la recuperación fué positiva, por lo que se podría hacer un estudio utilizando un numero grande de muestras de ostión sin inocular para observar la efectividad del método.

SUGERENCIAS

- Como se observa en el presente estudio, el Agua peptonada alcalina muestra buena efectividad como medio de enriquecimiento para Plesiomonas shigelloides. Se sugiere añadir a este caldo de enriquecimiento algún inhibidor (a parte del pH alcalino), para evitar el desarrollo de la elevada cantidad de flora microbiana presente en el ostión. Estos inhibidores podrían ser, **AMPICILINA**, ya que a ciertas concentraciones, Plesiomonas shigelloides muestran resistencia. También se podría elevar la concentración de **NaCl** en el medio de enriquecimiento para aprovechar la resistencia que muestra este microorganismo a los medios salinos. Es importante correr pruebas con cepas tipo para observar su comportamiento.
- Si se va a utilizar inhibidores, ya sea pH alcalino o alguno de los arriba mencionado, se recomienda hacer la cuenta de la flora microbiana (coliformes totales y mesofílicos aerobios) antes y después de la incubación. Esto con el fin de observar si realmente existe inhibición o no de la flora microbiana.
- Otra recomendación es hacer pruebas inoculando los ostiones con Plesiomonas shigelloides haciendo la recuperación directamente (sin caldo de enriquecimiento) utilizando el medio DFS, para observar si la flora microbiana puede alterar el crecimiento de este microorganismo. Aunque esto podría ser relativo por la elevada cantidad de flora microbiana presente en los ostiones, como lo muestra el presente estudio.

Plesiomonas shigelloides es un microorganismo prácticamente desconocido en México. Existen muy pocos estudios, sino es que ninguno, con respecto a su comportamiento dentro de los alimentos y sus repercusiones y consecuencias sanitarias. La bibliografía en México es escasa y casi toda proviene del extranjero. Por otro lado las cepas tipo que se pueden conseguir en México son muy pocas y se tiene la duda de que sean Plesiomonas shigelloides puras.

Durante el presente estudio se tuvo que enfrentar a muchos problemas precisamente por la falta de conocimiento del comportamiento de este microorganismo cuando está presente en los alimentos. Pero se espera que el presente estudio sea un primer paso para la continuación de múltiples análisis, estudios y ensayos para considerar la importancia que merece este microorganismo dentro del ambiente clínico y microbiológico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adlova, E. Experiences with Serology of Plesiomonas shigelloides 2.H- Antigenic Structure. J Hyg Epidemiol Immunol (Prague). 31.(1).75-81.1987.
- 2.- Arai, T. A survey of Plesiomonas shigelloides from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. J Hyg Camb. 84.203-211.1980.
- 3.- Breed, R.S. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. Edition. Williams and Wilkins Company, Baltimore. 1975.
- 4.- Code of Federal Regulations. Food and Drugs. April 1.1985. National Archives of the U.S.
- 5.- Cowan, S. T. Taxonomic rank of Enterobacteriaceae "groups". J Gen Microbiol. 15.345-358.1956.
- 6.- Chatterjee, B.D. Studies on Aeromonas and Plesiomonas species isolated from cases of choleraic diarrhoea. Ind J Med Res. 60.520-524.1972
- 7.- Eddy. B. P. Further studies on Aeromonas. II. Taxonomy of Aeromonas and C27 strains. J Appl Bacteriol 27.(1).96-109.1964.
- 8.- Elliot, B. D. Food Poisoning. Leonard Hill Limited. London 1950 210-217.

- 9.- Ellner, P.D. Aeromonas shigelloides bacteremia: a case report. Am J Clin Pathol. 59.216-218.1973.
- 10.- Frazier, W.C. Food Microbiology. Mc.Graw-Hill Book Company .2nd.Editon,1958.
- 11.- Geizer, E. A contribution to the morphology of Aeromonas shigelloides. Zentralbl Bakteriol (Orig). 207.41-47.1968.
- 12.- Havellaar, A. False-negative oxidase reaction as a result of medium acidification. J Microbiol Serol. 46.301-312.1980.
- 13.- Holmberg, S.B. Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides as causes of intestinal infections. Reviews of infections diseases. 6.(5). 633-639.1984.
- 14.- Hood, M.A. Effect of processing and storing oyster meats on concentration of indicator bacterias Vibrios and Aeromonas hydrophila. J food prot. 47.(8).598-601.1984.
- 15.- Janda, J.M. Effect of acidity and antimicrobiol agent-like compounds on viability of Plesiomonas shigelloides. J clinical microbiological. 25.(7).1213-1215.1987.
- 16.- Kaper, J.B. Aeromonas hydrophila: ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. J Appl Bacteriol. 50.359-77.1981.
- 17.- Mac Faddin J. F. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd. edition. Ed. Williams & Wilkins. Baltimor/London.
- 18.- Merck. Manual de medios de cultivo.

- 19.- Merck. Manual de Microbiologia.
- 20.- Miller, M. L. Plesiomonas shigelloides: An opportunistic food and waterborne pathogen. J of food prot. 48.(5).449-457.1985.
- 21.- Muzammil, A. Speciation in living oysters. Adv mar biol. 13.357-397.1975.
- 22.- Nord, C. E. Antibiotic sensitivity of two Aeromonas and nine Pseudomonas species. Med Microbiol Immunol. 161.89-97.1975.
- 23.- O'Sullivan, B.W. Development of an experimental oyster hatchery. Fish farming international. 12-15.May.1978.
- 24.- Pastian M. R. Inclusion bodies in Plesiomonas shigelloides. Appl Environ Microbiol. 47.(1).216-218.1984.
- 25.- Pedrero D.L. Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos Analíticos. Ed. Alhambra. México D.F.
- 26.- Penn, R.G. Plesiomonas shigelloides overgrowth in the small intestine. J Clin Microbiol. 15.869-872.1982.
- 27.- Pitarangsi, C. Enteropathogenicity of Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides. Prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. Infect Immun. 35.(2).666-673.1982
- 28.- Potter, N.N. La Ciencia de los Alimentos. Edutex S.A. 1a. Edición México, 1973.

- 29.- Rogol, M. Pril-Xilose-Ampicillin Agar, a new selective medium for de isolation of Aeromonas hydrophila. J med microbiol. 12.829-837.1979.
- 30.- Russel P.M. Inclusion Bodies in Plesiomonas shigelloides. Appl. and Environ. Microbiol. 47.(1).216-218.1984.
- 31.- Sanyal, S.C. Enteropathogenicity of Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides. J med microbiol. 8.195-198.1975.
- 32.- Secretan P. A. D. Oyster and the dangers of unguarded imports. Fish farming international. 21.March 1981.
- 33.- Shimada, T. On the serology of Plesiomonas shigelloides. Japan J Med Sci Biol. 31.135-142.1978.
- 34.- Schubert, R. H. On the ecology of Plesiomonas shigelloides. Zentralbl Bacteriol Hyg. I. Abt. Orig. B 172:528-533.1981.
- 35.- Thian, B. Marine farming in China. Fish farming international. 20-22. September 1980.
- 36.- Tsukamoto, T. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by Plesiomonas shigelloides. J Hyg. 80:275-280.1978
- 37.- Von Graevenitz, A. Evaluation of differential and selective media for isolation of Aeromonas and Plesiomonas spp. from human feces. J Clin micriobiol. 17.16-21.1983.1
- 38.- Walpole R. E., Probalilidad y estadística para ingenieros. Ed. MacGraw-Hill Interamericana de México. 3ª Edición. México, D.F., 1990.

- 39.- Wilbur T.F. The microbiology of foods. Genrard Press
2nd.Edition Champaign Illinois. E.U.A. 810-825.
- 40.- Wilbur, K.M. Physiology of Mollusca. Vol. I-II. Academic
Press-New York and London. 1966.
- 41.- Wilson, J. A greenhouse oyster hatchery in Ireland.
20-23.June1981.
- 42.- Winton, F. W. Plesiomonas shigelloides: An unusual isolate
from faeces. J Pathol Bacteriol. 95.562-567.1968.
- 43.- Wray, T. Growing oysters in British Columbia. 42-43.September
1978.
- 44.- Yelf, J. D. An oyster for all seasons. Fish farming
international. 28-30.March 1978.
- 45.- Zajc-Satler, J. Morphological and biochemical studies of 6
strains of Plesiomonas shigelloides isolated from clinical
sources. Zentralbl Bacteriol Hyg. I. Abt. Orig. A
219.514-521.1972.
- 46.- Zakhariiev, Z. A. Plesiomonas shigelloides isolated from sea
water. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 15.402-404.1971.
- 47.- Z. Galstuff. The oyster industry of the world.
- 48.- Z. Busisness booms for the rock oyster growers.