



11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO 10

FACULTAD DE MEDICINA 275

INVESTIGACION DE ENTEROBACTERIAS
DE ORIGEN HUMANO EN AGUAS
MARINAS.

T E S I S

que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS,
EN EL AREA DE MICROBIOLOGIA

p r e s e n t a :

Q.F.B. JOSE JESUS MUÑOZ ESCOBEDO

CD. UNIVERSITARIA MEXICO, 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

ASESOR DE TESIS

Doctor Alejandro Cravioto Q.

COASESOR

Doctor Carlos Eslava Campos

JURADO

Doctor Ruben Darío Martínez

Doctora Cecilia Ximenez García

Doctor Alejandro Cravioto Quintana

Doctora Emma Isabel Melendro

Doctor Carlos Eslava Campos

DEDICATORIA

A MI FAMILIA: EN PARTICULAR A MIS HIJAS YERSINIA ALEJANDRA Y CLAUDIA YADIRA QUE AL NO TENERLAS CERCA DE MÍ ERA MOTTIVO PARA CONTINUAR EN LA PENDIENTE.

A TI ALEJANDRA, POR DARME ESE IMPULSO QUE ME FALTABA, POR LAS VERDADERAS MUESTRAS DE CARIÑO Y POR HACER DE NUESTRAS METAS UN LOGRO.

A MI MAMA Y HERMANOS POR SUS CONSEJOS PARA SUPERARME Y SER HOMBRE DE BIEN.

AGRADECIMIENTOS

AL INIVO, FACULTAD DE ODONTOLOGIA, DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION Y DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS ACADEMICOS DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE ZACATECAS POR TODO EL APOYO Y BECA RECIBIDOS: LES DOY LAS GRACIAS.

AL DOCTOR ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA POR HABERME BRINDADO SU APOYO Y ASESORIA CUANDO MAS LA REQUERIA YA QUE SIN ELLA NO HUBIERA LOGRADO ESTA TESIS.

AL DOCTOR CARLOS ESLAVA CAMPOS QUE POR ENCIMA DE SU COASESORIA ME PROPORCIONO INTERES, DEDICACION Y APOYO PARA GUIARME DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO Y CON ELLO JUNTOS LLEVARLO A SU TERMINO.

A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO Y DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM POR SU INCONDICIONAL APOYO EN LA ELABORACION DE ESTA TESIS ESPECIALMENTE A:

**JOSE LUIS MEDEZ SANCHEZ
MARITONA RAMIREZ PEREZ
DELIA LICONA MORENO
PRIMO SANDOVAL AGUILAR
SANTA GONZALEZ ZUÑIGA
GABRIEL PEREZ SOTO**

**AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA Y MICROBIOLOGIA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA UNAM YA QUE FUI BIEN ACEPTADO DURANTE MI
ESTANCIA EN PARTICULAR:**

**AL DOCTOR PABLO MENDOZA HERNANDEZ
AL DOCTOR RAFAEL GARCIA GONZALEZ
AL M. EN C. ALEJANDRO LOPEZ CORTEZ**

**QUE DE UNA U OTRA MANERA COLABORARON EN EL TRABAJO
EXPERIMENTAL.**

**A LA UNIDAD DE INFORMACION PARA LA INVESTIGACION Y EL
POSGRADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM POR EL APOYO
OTORGADO., ESPECIALMENTE A:**

**ERIKA ALAMILLA SANTOS
JAVIER FLORES MACIAS
DAVID FLORES MACIAS
JOSE MARTIN GALVAN**

**A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUIENES DIRECTA O INDIRECTAMENTE
COLABORARON EN LA ELABORACION DE LA TESIS.**

A TODOS, GRACIAS.

INDICE

PAGINAS

CAPITULO I

INTRODUCCION	1
IMPORTANCIA DE LA DIARREA EN LA REPUBLICA MEXICANA	3
ETIOLOGIA	5
PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA	6
MARCO TEORICO	10
PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	12

CAPITULO II

OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS	14

CAPITULO III

HIPOTESIS	15
------------------	-----------

CAPITULO IV

MATERIAL Y METODOS	16
EFECTO DE SALES Y TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD BACTERIANA	17
ESTUDIO DE CAMPO: SELECCION DE AREA DE TRABAJO	18
TOMA DE MUESTRA	18
DETECCION DEL NUMERO DE BACTERIAS COLIFORMES POR MILILITRO DE AGUA MEDIANTE LA TECNICA DE DILUCION EN TUBO Y VACIADO EN PLACA	19
CUENTA BACTERIANA	19
AISLAMIENTO	19
ESTUDIO DE VIRULENCIA	20

CAPITULO V

RESULTADOS	22
TABAJO DE CAMPO	23

CAPITULO VI

DISCUSION Y CONCLUSIONES	26
---------------------------------	-----------

CAPITULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
-----------------------------------	-----------

CAPITULO V

RESULTADOS	22
TABAJO DE CAMPO	23

CAPITULO VI

DISCUSION Y CONCLUSIONES	26
---------------------------------	-----------

CAPITULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
-----------------------------------	-----------

ABREVIATURAS

SDI	Síndrome diarréico infeccioso
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ETEC	Cepa enterotoxigénica de <u>Escherichia coli</u>
EPEC	Cepa enteropatógena de <u>Escherichia coli</u>
Km	Kilómetros
SARH	Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
No.	Número
NMP	Número mas probable
ml	Mililitros
gr	Gramos
hrs	Horas
Lts	Litros
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
CDC	Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas
Des.	Desionizada
AMA	Agua de mar artificial

AMAR	Agua de mar natural
TRIS	Tris-hidroxi-amino-metano
SSIE	Solución salina isotónica estéril
Agar SS	Agar Salmonella-Shigella
BHI	Infusión cerebro corazón
EMB	Eosina azul de metileno
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
pH	Potencial de hidrógeno
sp.	Sin especie
NaCl	Cloruro de sodio
KCl	Cloruro de potasio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
CaCl₂	Cloruro de calcio
V.P.	Voges Proskauer
H₂S	Acido sulfhídrico
μl	Microlitros

RESUMEN

Las aguas costeras contaminadas constituyen un importante problema en virtud de que pueden participar en la transmisión de patógenos relacionados con la diarrea. En este trabajo se analizó la capacidad de enterobacterias para sobrevivir en ambientes salinos y como influye esto en su capacidad de virulencia. El trabajo se realizó en tres fases, en la primera se determinó in vitro para conocer el efecto de factores físico-químicos (temperatura y diversas concentraciones de sales del agua de mar) sobre diferentes especies de la familia Enterobacteriaceae. En la segunda se realizó el trabajo de campo y la cuantificación microbiana. La última fase incluyó el aislamiento e identificación de microorganismos, así como ensayos in vitro para evaluar el efecto del agua de mar sobre la viabilidad y virulencia de diferentes enterobacterias. En el estudio de virulencia se utilizó una cepa de S. typhimurium, empleando el modelo del ratón inoculado intragastrica e intraperitonealmente. En todas las enterobacterias estudiadas en agar nutritivo-agua de mar artificial (AN-AMA), expuestas durante 24-48 hrs no se inhibió el crecimiento, observándose un crecimiento óptimo de los 27 °C en adelante. Respecto al efecto de las sales del mar sobre las enterobacterias, se observó que las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl) tuvieron un efecto inversamente proporcional sobre el crecimiento bacteriano. Un efecto diferente se observó cuando la concentración del sulfato de magnesio ($MgSO_4$) fue la que se varió. Con respecto al cloruro de calcio ($CaCl_2$) se encontró que éste influye de manera directa sobre algunas especies bacterianas. En el trabajo de campo se detectó falta de control sanitario en las áreas de muestre. Las cuentas bacterianas en todos los sitios variaron desde 1×10^3 hasta 2×10^4 , observando que la hora en que se presentó el mayor índice de contaminación era entre

10:30 y 11:30 A.M. Las especies identificadas correspondieron a las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Micrococaceae. En el ensayo de virulencia en ratón se encontró que el tiempo de incubación de S. typhimurium en AMAR, no influye sobre la virulencia ya que el número de ratones muertos inoculados tanto por vía oral como intraperitoneal fue variable, no obstante se observó mortalidad mayor al 50 % de los animales retados.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Las grandes epidemias de cólera, disenteria bacilar y de otros padecimientos diarreicos constituyen a través de la historia los mayores azotes de la humanidad. Poblaciones y grandes ejércitos fueron diezmados en el pasado bajo los efectos de tales calamidades(1). El origen de estas enfermedades (Edad Media, Europa Siglo XIV), se desconocía ya que se carecía del desarrollo científico y tecnológico adecuado. La epidemia de cólera en Londres y otras regiones (Yorskhire, Loncashire, Minland, Inglaterra de 1866 a 1872), y posteriormente en Hamburgo, Alemania en 1892, fueron los primeros antecedentes que dieron lugar a que se iniciaran estudios científicos para tratar de esclarecer la etiología de estas enfermedades (2).

Estos padecimientos son provocados generalmente por la ingesta de alimentos y agua en condiciones no aptas para consumo.

En 1966 Weibel y cols. reportan un estudio bibliográfico referente a las infecciones intestinales que ocurrieron en los Estados Unidos de Norteamérica en el período de 1946 a 1964, identificaron 142 epidemias de gastroenteritis, 39 brotes de tifoidea, 23 de infecciones hepáticas y 11 brotes epidémicos de disenteria. La conclusión a la que llegaron fue que en todos los casos la

transmisión de los agentes infecciosos responsables de tales padecimientos fue a través de aguas costeras contaminadas con aguas negras que contenían diferentes agentes patógenos (bacterias, virus y parásitos) (2).

Hasta finales del siglo XIX la morbilidad y mortalidad originada por las infecciones intestinales se mantenía elevada en todo el mundo; en el transcurso de los primeros quince años del presente siglo el problema se fué resolviendo en los países industrializados debido entre otras cosas por la introducción de agua potable, pasteurización de la leche e implementación de servicios sanitarios. En contraste en los países en vías de desarrollo las enfermedades diarreicas continúan siendo uno de los principales problemas de salud pública, disputándose el primer lugar en morbilidad y mortalidad casi siempre con las infecciones respiratorias agudas (1).

La diarrea se define como la presencia de heces líquidas o acuosas generalmente en número mayor de tres en 24 horas, casi siempre de etiología infecciosa pero de carácter autolimitado, afectan con mayor frecuencia a niños y a adultos mayores de 60 años, también se presenta en turistas jóvenes o adultos que visitan países poco industrializados del tercer mundo (3).

IMPORTANCIA DE LA DIARREA EN LA REPUBLICA MEXICANA

En nuestro país el Síndrome Diarréico Infeccioso (SDI) constituye uno de los problemas mas importantes de salud pública. Para entender su magnitud, basta mencionar que son responsables del 30 al 35 % de las defunciones en el primer año de vida y que la tasa de mortalidad por esta enfermedad en la población en general es de 89 por 100,000 habitantes (4).

Hasta 1976 las diarreas ocupaban el primer lugar como causa de morbilidad, a partir de 1977 y hasta la actualidad se encuentran en segundo lugar, superadas solo por las infecciones respiratorias agudas. Ambos padecimientos constituyen el 80 % de la consulta médica de lactantes y preescolares (5).

Durante los años de 1985 a 1990 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en su atlas epidemiológico (6) reporta que las enfermedades infecciosas intestinales representan el 21 % del total de enfermedades transmisibles comunicadas. No obstante las tasas de incidencia anual disminuyeron paulatinamente de 9,536 en 1985 hasta 7,101 por 100,000 derechohabientes en 1990. Analizando porcentualmente cada una de éstas enfermedades se puede apreciar que las infecciones intestinales bacterianas y las amibiasis representan el 93 % de todas ellas.

Los estados con cifras de morbilidad promedio más altas por infecciones intestinales, fueron Yucatán, Morelos, Tlaxcala, Campeche, Coahuila y Guerrero, apreciándose que el 31 % de los casos se concentró en niños menores de 5 años. Con respecto a la mortalidad por estos padecimientos, se observó que las tasas variaron de 14.6 por 100,000 derechohabientes en 1985, a 7.4 en 1990 es decir se redujeron 50.6 % durante ese lapso de tiempo. En este mismo período se observó que la mortalidad en menores de 1 año fue de 58.5 % y de 11.7 % en el grupo de 1 a 4 años es decir 70 % de las defunciones en el período fue en niños menores de 5 años (6).

De acuerdo a los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y las tres encuestas sobre diarrea realizadas en México entre 1985 a 1991 (7), se estima que al año se presentan de 100 a 110 millones de eventos diarreicos de los cuales la incidencia anual en menores de 5 años es de cuatro episodios por año. La encuesta reveló que la tasa de mortalidad asociada al padecimiento es cuatro veces mas elevada en los estados del sur del País, también refiere que las enfermedades diarreicas en México muestran variación estacional con incremento en el número de casos en primavera-verano y descenso en los meses de invierno.

ETIOLOGIA

El esclarecimiento de la etiología de las diarreas infecciosas ha sido un proceso lento. Hace poco más de un siglo se descubrió la etiología de la disentería amibiana (Entamoeba histolítica), del cólera (Vibrio cholerae) y de ciertas formas de enteritis aguda del hombre y de los animales (Salmonella cholerae suis). A fines del siglo pasado y principios del presente se identificaron las tres especies principales de Shigella (S. dysenteriae, S. flexneri y S. sonnei). Transcurrió cerca de medio siglo más para lograr demostrar que ciertos serotipos de Escherichia coli eran capaces de producir diarreas, principalmente en niños recién nacidos y en infantes (7).

En 1973 se identificaron los rotavirus, el agente viral más importante en la etiología de las diarreas de los niños. En el transcurso de los últimos 10 años se ha enriquecido la lista de nuevos microorganismos productores de diarreas entre los que se encuentran; Campylobacter jejuni, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica, Bacillus cereus, Clostridium difficile y Cryptosporidium (8). Existen otros agentes como son E. coli enterotoxigénica, el virus Norwalk y Adenovirus que también ocasionan diarreas así como otros microorganismos de menor importancia.

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA

El conocimiento en relación a la virulencia de los microorganismos responsables de las enfermedades gastrointestinales ha ido avanzando paulatinamente. Esto se ha logrado a través de entender que la acción del parásito no es una actividad unilateral y que ésta no está dirigida a dañar al huésped. El entendimiento actual que se tiene es el de una relación huésped parásito en la cual el agente infeccioso solo pretende mantenerse en la naturaleza y la respuesta del huésped es secundaria ante el estímulo de un agente extraño. Tanto las células del huésped como el agente infeccioso van a responder a señales que dan lugar a que la bacteria exprese una serie de genes que en condiciones de reposo están reprimidos, esto como consecuencia, da lugar a que el microorganismo reconozca receptores celulares a través de estructuras de superficie por medio de las cuales colonice los tejidos del huésped (9).

Las bacterias se adhieren a casi cualquier tipo de superficie, esto evita que los microorganismos sean desalojados de los sitios que requieren colonizar, por tal motivo se considera a la adherencia como un evento trascendente en la patogénesis de la bacteria (10).

La especificidad de la interacción entre una bacteria y ciertos tejidos del huésped se ha demostrado en diferentes padecimientos, así tenemos como ejemplo que en las infecciones por cepas enterotoxigénicas de E. coli (ETEC),

expresan factores de colonización específicos para las especies animales que infectan (11, 12).

El proceso patogénico de la bacteria consta de tres fases:

La primera implica la ingestión del germen en cantidad suficiente para que resista las defensas naturales del huésped, sin embargo, la dosis infecciosa mínima varía con las distintas bacterias y ésta puede ser de tan sólo 10^1 - 10^2 bacterias en el caso de Shigella hasta dosis de 10^8 a 10^{10} microorganismos en el caso de Vibrio cholerae (1).

La segunda fase contempla la colonización de los epitelios para que finalmente el microorganismo se multiplique.

La última fase se relaciona con la expresión de algunos mecanismos de patogenicidad específicos para cada bacteria como es la elaboración de enterotoxinas, citotoxinas, la invasión de la mucosa intestinal, los cuales pueden ser únicos o combinados (1).

Cada bacteria tiene un mecanismo específico de virulencia por ejemplo V. cholerae y E. coli enterotoxigénica elaboran enterotoxinas activadoras de la adenilciclasa, Shigella y Salmonella son microorganismos invasores aunque sin embargo con ciertas diferencias entre el mecanismo específico ya que mientras Shigella penetra la mucosa intestinal y se multiplica en el epitelio dando

lugar a fenómenos inflamatorios y alteraciones histológicas importantes, Salmonella da lugar a infecciones sistémicas.

E. coli enteropatógena (EPEC) por su parte tiene la propiedad de adherirse íntimamente al epitelio intestinal causando alteraciones de las microvellosidades sin invadir el epitelio (10). Otras cepas de E. coli producen citotoxinas dando origen a los síndromes conocidos como "colitis hemorrágica" y Síndrome urémico hemolítico (9). Las cepas virulentas de Campylobacter jejuni, por su parte, son capaces de penetrar la pared intestinal al mismo tiempo que producen diversas toxinas (citotónicas o citotóxicas), sin que se haya precisado aún cual de estas características es esencial en su virulencia o si los dos mecanismos son necesarios (1).

Es importante señalar que la adherencia específica en las bacterias está mediada por fimbrias, flagelos o proteínas de membrana externa conocidas estas estructuras como adhesinas (9, 12, 13, 14, 15, 16.). En algunos casos la producción de estas adhesinas está relacionada con la presencia de plásmidos o transposones. Hay estudios que señalan que para que algunos de éstos genes se expresen se requiere de estímulos externos provenientes generalmente de la célula huésped (17, 18.). Cuando las adhesinas localizan su receptor específico se realiza una interacción de tipo covalente difícil de romper con lo que se favorece la permanencia de la bacteria.

Los materiales de deshecho y las aguas residuales al transportar gérmenes patógenos ejercen efectos diversos sobre la microflora de los ambientes acuáticos. Aunque las aguas residuales domésticas son portadoras de microorganismos patógenos tienen un limitado tiempo de vida en este ambiente (19, 20).

Valdespino y cols (21) refieren que Vibrio cholerae puede mantenerse viable en el agua unas cuantas horas, sin embargo, si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica y tiene las condiciones de alcalinidad adecuadas puede sobrevivir por varias semanas. Otros microorganismos como es el caso de Shigella sin embargo, solo pueden vivir un tiempo muy limitado en ambientes extremos.

En nuestro país se han realizado diversos estudios en relación a la contaminación bacteriana del agua, incluida la contaminación del mar. En Los Puertos de Veracruz, Coatzacoalcos, Lagunas costeras de Veracruz y Tabasco, y en la Isla del Carmen, se ha demostrado la presencia en el agua, en sedimentos y en organismos bivalvos, niveles altos de bacterias coliformes totales y fecales, identificándose bacterias patógenas como Vibrio parahaemolyticus, E. coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter sp., Shigella sp y Salmonella sp. De igual manera, análisis conducidos en los reservorios de agua potable de ciudades del suroeste mexicano, mostraron bacterias fecales en niveles no permisibles, lo cual representa un gran riesgo para la salud del hombre que habita estos sitios (22).

Al igual que el agua, la contaminación de los alimentos constituye un problema de salud pública. Existe una serie de condiciones que son propicias para la contaminación de los alimentos marinos siendo las principales, la eliminación de aguas negras no tratadas al ambiente marino, malos hábitos higiénicos de quien prepara y/o consume los alimentos.

MARCO TEORICO

A través del tiempo el hombre ha buscado la cercanía de ríos y mares para el establecimiento de sus pueblos. Al ir creciendo éstos fue necesario crear infraestructura incluidas obras de drenaje y alcantarillado cuyas descargas se realizaban hacia los ríos y finalmente al mar.

En la década de los 80's en varios países del mundo y en particular en la costa del Mediterráneo, la ingestión de moluscos y especies relacionadas contaminados con microorganismos se constituyó en un problema de salud importante, por lo cual la Organización Mundial para la Salud propuso se ejecutaran varios proyectos tendientes a determinar la situación sanitaria con respecto al mar Mediterráneo (2).

Nuestro país cuenta con aproximadamente 10,000 Km de litorales marinos lo cual lo hace un lugar importante desde el punto de vista económico,

esto nos obliga a cuidar esta riqueza incluyendo problemas de contaminación (23).

En estudios realizados por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) en la década de los 70's en varios puertos de interés turístico (Mazatlán, Sinaloa; Acapulco, Guerrero; Veracruz, Veracruz; Manzanillo, Colima y Bahía de Banderas, Jalisco) (24, 25, 26) se demostró la presencia de contaminación en las costas a consecuencia de la eliminación de desechos domésticos.

En el puerto de Acapulco se han realizado varios estudios relacionados con la contaminación bacteriana de la Bahía (24, 26, 27, 28, 31, 35). En éstos existen divergencias en los resultados, así tenemos que en los datos presentados por la SARH, se encontró que el número de coliformes/100 ml estaba en niveles inferiores a los permisibles (27), sin embargo en un trabajo previo (agosto-diciembre de 1976) (28), los investigadores señalaron que la concentración de coliformes determinada por el número más probable (NMP), variaba de 1000 a 5000/ml. rebasando el número de microorganismos permitidos para muestras de agua de éste tipo.

La expansión de la mancha urbana y el desarrollo industrial en zonas costeras ha traído como consecuencia un incremento en la contaminación del agua marina debido al aumento en las descargas de aguas negras y otros residuos como el combustóleo, desechos industriales y domésticos. Asociado a lo

expuesto, los asentamientos irregulares no provistos de servicios sanitarios adecuados agravan la situación.

La determinación del número de organismos coliformes se emplea como parámetro para conocer la calidad del agua, incluida la de origen marino; así mismo, la presencia de coliformes en el líquido constituye un indicador de contaminación directa con materia fecal.

Los límites de bacterias considerados como permisibles en aguas costeras, es de 200 coliformes fecales y de 1000 coliformes totales por 100 ml (29 - 33).

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Las infecciones gastrointestinales (diarreas) constituyen un grave problema de salud en nuestro país. Su existencia tiene graves repercusiones tanto sociales como económicas debido a sus elevadas tasas de morbilidad principalmente en niños menores de 5 años.

De acuerdo al Anuario Estadístico de la SSA 1984-1985 en su informe de Enfermedades Transmisibles, una de las entidades federativas con mayor mortalidad por diarreas fué el estado de Guerrero (34). Por su parte el atlas de epidemiología del Instituto Mexicano del Seguro Social también señala que de

1985 a 1990, Guerrero es uno de los estados con cifras de morbilidad más altas para dichos padecimientos (6).

Desde los años 70's se han realizado diversos estudios sobre contaminación del agua de lagunas y del mar pertenecientes al Estado de Guerrero en particular de la Bahía de Acapulco (2, 24, 26, 27, 28, 31, 35, 36). En casi todos se ha encontrado que el agua no es aceptable para fines recreativos o de pesca por los niveles bacterianos tan altos encontrados. Estos estudios han demostrado además, que la contaminación microbiana de la bahía se incrementa por los escurrimientos en la época de lluvias y durante los períodos vacacionales.

El haber aislado e identificado bacterias coliformes en estas aguas no permite asegurar su participación en la etiopatogenia de la diarrea, ya que no se ha establecido su capacidad de virulencia. Para probar lo anterior es necesario evaluar el poder patogénico de los microorganismos, así como determinar la influencia que pueden tener diversos factores ambientales en la regulación de la expresión de dichas propiedades de virulencia.

CAPITULO II

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de diferentes especies de enterobacterias para vivir en el agua de mar, a la vez de mantener sus propiedades de virulencia para poder determinar la importancia del ambiente marino en la transmisión de patógenos responsables de infecciones intestinales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Establecer por ensayos de laboratorio el efecto de la temperatura y de las principales sales del agua de mar, sobre la viabilidad de enterobacterias asociadas con enfermedades gastrointestinales.
- 2.- Evaluar la influencia del agua de mar en relación a la virulencia de Salmonella typhimurium, analizada ésta mediante un modelo animal.

CAPITULO III

HIPOTESIS

Las enterobacterias pueden vivir por largo tiempo en un ambiente marino a pesar de no ser su habitat específico sin disminuir su viabilidad ni su capacidad patogénica.

CAPITULO IV

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se realizó en tres fases, de éstas en la primera se realizó un estudio *in vitro* para conocer el efecto de diversos factores fisicoquímicos (temperatura y diversas concentraciones de sales del agua de mar) sobre diferentes especies de la familia Enterobacteriaceae. En la segunda se realizó trabajo de campo para la colecta de muestras y los ensayos en laboratorio que permitieron realizar las cuentas bacterianas. La última fase incluyó el aislamiento e identificación de microorganismos, así como la realización de ensayos *in vitro* para evaluar el efecto del agua de mar sobre la viabilidad y virulencia de diferentes bacterias. Para el estudio de virulencia se utilizó una cepa de S. typhimurium empleando el modelo del ratón.

Las cepas utilizadas en la primera fase (Cuadros 1-6) fueron proporcionadas por el Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas (CDC) de Atlanta, Georgia, USA. Los microorganismos se identificaron de acuerdo al procedimiento descrito por Treagan y Pulliam (37). Para determinar el efecto del agua de mar y diferentes factores fisicoquímicos sobre las bacterias se preparó agua de mar artificial (AMA) utilizando para ello las cuatro sales principales componentes del AMAR (Cuadros 3 - 6) (38).

EFECTO DE SALES Y TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD BACTERIANA

Tomando una asada de un cultivo puro, cada cepa bacteriana se inoculó en 9.9 ml de solución salina isotónica estéril, (SSIE) posteriormente se realizaron diluciones 1:10, hasta 1×10^{-4} , de la última dilución, se tomaron 100 μ l y se inocularon en 5 ml. de caldo infusión cerebro corazón (BHI); se incubó durante 18 hrs a 37 °C. De cada cultivo se realizaron nuevamente diluciones hasta 1×10^{-4} , de cada una de éstas se sembró 100 μ l en agar nutritivo preparado con AMA en cultivo confluyente. Diferentes cajas de cada cultivo se incubaron a diferentes temperaturas (12, 17, 22, 27, 28 y 32 °C) incubando los cultivos de 24 a 48 hrs, cada uno de éstos se revisó a las 24 y 48 hrs. Para evaluar el efecto de la temperatura y sales sobre los microorganismos en un medio químicamente definido, se preparó AMA solidificado con agar agar. A cada cepa se le realizó el mismo procedimiento descrito en el ensayo anterior, pero modificando la temperatura y el tiempo de incubación (12, 15, 17, 21, 26, 27, 28 y 30 °C, de 24 a 48 hrs), este mismo ensayo se repitió pero incubando a 26, 27, 28, 30 y 37 °C. Cada uno de los ensayos se realizó por quintuplicado.

También se ensayó utilizando medios con diferentes concentraciones de cada una de las sales (cuadros 3 - 6). El tiempo y temperatura de incubación para éstos últimos fué de 24 a 48 hrs a 37 °C revisando los cultivos a las 24 hrs.

ESTUDIO DE CAMPO: SELECCION DEL AREA DE TRABAJO

Los sitios de muestreo fueron seleccionados por ser los lugares de mayor afluencia humana y por estar relacionados con descargas de aguas negras provenientes de hoteles, arroyos y de la ciudad en general (Figs 1 y 2).

TOMA DE MUESTRAS

Estas se efectuaron utilizando frascos de vidrio estériles de boca ancha de 250 ml se tomaron a contracorriente aproximadamente 160 ml de agua introduciendo éstos hasta unos 15 a 20 cm de profundidad sosteniendo el frasco con un cordón. Se realizaron además otras tomas de muestras utilizando los isopos de Moore (39), para coleccionar muestras superficiales, éstas fueron depositadas en frascos estériles los cuales se cerraron de inmediato y después de marcar en cada uno su clave correspondiente se colocaron dentro de una hielera para su traslado y análisis.

En los sitios de muestreo se determinó la temperatura y el pH del agua utilizando un termómetro con escala de 20 a 100 °C para la temperatura, y papel medidor de pH (Merck Neutralit) con un intervalo de pH de 5.5 a 9.0.

DETERMINACION DEL NUMERO DE BACTERIAS COLIFORMES POR MILILITRO DE AGUA MEDIANTE LA TECNICA DE DILUCION EN TUBO Y VACIADO EN PLACA

CUENTA BACTERIANA.

Esta se realizó por dilución seriada en placa produciendo diluciones seriadas 1:10, en solución salina. Las muestras se sembraron en agar MacConkey y agar Nutritivo. Las cuentas de agar nutritivo se consideraron como las cuentas totales y las de agar MacConkey como cuentas de coliformes (Diagrama 1).

Con el fin de aumentar el aislamiento e identificación de especies de la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae, con ayuda de un replicador rudimentario se transfirieron las colonias del agar nutritivo a placas con agar MacConkey.

AISLAMIENTO

Las colonias obtenidas en agar MacConkey se seleccionaron y se conservaron en agar Liu (40) para su identificación definitiva. Para el aislamiento de Salmonella y Shigella (Diagrama 1) se utilizó el medio de enriquecimiento de

tetracionato. Las muestras se incubaron durante 18 horas a 37 °C y se realizó el aislamiento de microorganismos sembrando en placas de agar Salmonella Shigella, las placas se incubaron hasta por 48 hrs a 37 °C. Las colonias obtenidas se identificaron mediante pruebas bioquímicas según lo previamente descrito. Las cepas aisladas se conservaron a 6 °C en medio Liu (40).

Para el aislamiento de Streptococcus faecalis y Staphylococcus sp. se inocularon tubos con 10 ml de caldo Rothe doblemente concentrado con 1 ml de muestra, se incubó 48 hrs a 37 °C, o hasta observar fermentación del medio. Se tomó una alícuota para tinción de Gram para observar al microscopio. De estos tubos se tomaron además muestras para sembrar en agar sal manitol y agar sangre (eritrocitos de camero al 5 %), se incubó a 37 °C para la identificación de morfología colonial, hemólisis y crecimiento en agar sal manitol.

ESTUDIO DE VIRULENCIA

La metodología empleada se realizó tomando en cuenta lo propuesto por Homann W. y cols., y Carter y Collins (41, 42), se usó una cepa de S. typhimurium, empleando el modelo del ratón. La inoculación se realizó con ayuda de una sonda de plástico del No 18 y jeringa de 1 ml. Se inocularon 3 ratones Taconi de 2 meses de edad por vía oral y a otros 3 por vía intraperitoneal aproximadamente 10^8 y 10^5 bacterias respectivamente; se usaron 3 ratones control a los cuales se les inoculó SSIE (Diagrama 2). Después de inoculados, los ratones

se conservaron y alimentaron. La observación de los animales fue permanente durante el día dejándolos únicamente durante la noche.

Cuando se identificaba algún ratón muerto (**Diagrama 3**), en condiciones de asepsia y en ambiente estéril se realizaba la necropsia, obteniendo hígado, vesícula biliar y bazo. Los órganos eran depositados de manera separada en morteros estériles a los cuales se les agregaba a cada uno 3 ml de SSIE. El tejido se maceraba hasta obtener un homogenado. De cada tejido se tomaron muestras que se inocularon en agar S. S., para aislamiento e identificación bacteriana.

CAPITULO V

RESULTADOS

Efecto de factores físicos y concentración de sales sobre microorganismos de la familia Enterobacteriaceae.

En todos los cultivos se observó crecimiento de las diferentes enterobacterias estudiadas. El crecimiento de éstas fue proporcional al incremento de la temperatura observándose un desarrollo óptimo a 32 °C (Cuadros 1 y 2). En el cuadro 3 se puede observar el efecto de la concentración del cloruro de sodio (NaCl) sobre el crecimiento bacteriano, en éste se puede apreciar que la concentración de sales ejerce un efecto inversamente proporcional sobre el desarrollo bacteriano. La única excepción al respecto se observó con la cepa de Klebsiella pneumoniae, la cual creció óptimamente en todas las concentraciones de NaCl utilizadas. Por otro lado, el incremento en la concentración de KCl con concentración de las demás sales constantes, mostró que las cepas de Serratia rubidae y Serratia marcescens presentaban un crecimiento directamente proporcional a la concentración de ésta (Cuadro 4).

Un efecto diferente se presentó cuando la concentración de $MgSO_4$ fué la que se varió. En este caso se observó que las cepas de Enterobacter agglomerans crecían pobremente, mientras que las de Klebsiella pneumoniae y

Serratia marcescens se desarrollaban más que el resto (**Cuadro 5**). Finalmente la concentración de CaCl_2 tuvo un efecto directamente proporcional al desarrollo bacteriano de diferentes géneros, con excepción de Escherichia coli, Citrobacter amalonaticus y Klebsiella pneumoniae que crecieron sin presentar dependencia de la concentración de la sal (**Cuadro 6**).

TRABAJO DE CAMPO

En esta fase del trabajo se pudo establecer la falta de control sanitario en la eliminación de aguas y basura en casi toda la Bahía.

Las principales fuentes de contaminación de la Bahía la constituyen basureros y estancamientos de aguas ubicadas en el denominado anfiteatro del puerto, localizado en la parte alta de Acapulco. Esto da lugar a una mayor contaminación durante la época de lluvias. Otro tipo de descargas con aguas contaminadas la constituye la de hoteles, barcos, arroyos, cárcamos de bombeo, filtración de aguas residuales, fallas en la red de alcantarillado, entre otros.

La temperatura en la Bahía variaba entre 28 y 32 °C relacionada ésta con la hora del día en que se determinaba. Respecto al pH no se encontró variación en sus niveles permaneciendo en un intervalo entre 6.0 y 7.0 (**Cuadro 7**).

Las cuentas bacterianas y de coliformes totales por 100 ml fue variable en toda la Bahía encontrándose un solo sitio que no dió cuentas bacterianas, sin embargo en la mayoría se encontraron cuentas desde 1×10^3 (Caletilla, Club de Yates), a 1×10^4 (Quebec, Hotel Continental, Gigante, Tlacopanocha, Parque Papagayo y Super-Super) e incluso hasta 2×10^4 en sitios cercanos a los Hoteles Ritz y Paraíso Marriot (Figura 3).

Se encontró además, que entre 10:30 y 11:30 A.M. era la hora del día en que se presentó un mayor índice de contaminación bacteriana (Figura 4).

Los géneros y especies identificados mas frecuentemente correspondieron a las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Micrococaceae (Cuadro 8).

Finalmente el ensayo referente al efecto de la inoculación de S. typhimurium en agua de mar natural (AMAR) durante diferente tiempo de incubación y temperatura constante de 30°C se comprobó que la cepa de S. typhimurium inoculada a los ratones en estudio fue la que causó las muertes de dichos animales, probado lo anterior por medio del aislamiento e identificación bioquímica y serológica de la bacteria encontrada en cada uno de los órganos descritos. En el ensayo de virulencia en ratón se encontró que el tiempo de incubación de S. typhimurium en AMAR no influyó en los periodos analizados sobre la virulencia de la bacteria ya que el número de ratones muertos por las dos vías de inoculación (oral e intraperitoneal) no fue constante, variando de ningún

animal muerto, hasta todos ellos. Sin existir tampoco correlación en ambos kits de administración (Cuadro 9).

CAPITULO VI

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La grandes epidemias de cólera, disentería (probablemente bacilar) y de diarreas en general han constituido a través de la historia azotes de enorme magnitud para la humanidad. La morbilidad y mortalidad originada por este grupo de padecimientos, denominados en la actualidad "enfermedades diarreicas", fue sumamente elevada en todo el mundo hasta finales del siglo XIX.

En el transcurso de los primeros 15 años del presente siglo en los países industrializados, el problema se fue resolviendo principalmente gracias a que se elevaron los niveles generales de vida, a la introducción del agua potable, la pasteurización de la leche y la refrigeración e industrialización de los alimentos, además de haberse mejorado los sistemas de disposición de excretas e implementar extensos programas de educación higiénica, tanto en el orden personal como en el referente al manejo y conservación de alimentos (1). En contraste en los países en desarrollo las enfermedades diarreicas aún representan uno de los principales problemas de salud pública, en particular en niños menores de 5 años. Las diarreas en México se sitúan en el segundo lugar en incidencia y mortalidad después del grupo de enfermedades respiratorias agudas (6). La pobreza, la ignorancia y la mala nutrición han sido factores determinantes de esta situación.

Nuestro país y principalmente en este momento debe reforzar la industria llamada sin chimenea, el turismo principalmente del extranjero ha empezado a alejarse por problemas relacionados con las enfermedades diarreicas, por lo cual es menester abordar el problema y tratar de resolverlo. Es necesario por lo tanto conocer que factores pueden estar involucrados en la conservación de los microorganismos patógenos en la naturaleza y de esta manera ser responsables de la etiopatogenia de las enfermedades diarreicas.

Mattila L y cols. (43) mencionan que las enfermedades diarreicas pudieran afectar mínimamente a 6 millones de personas cada año, y que se encuentran en alto riesgo de 12 a 20 millones que van de paseo a ciudades sin servicios sanitarios adecuados localizadas en zonas tropicales o subtropicales, donde la incidencia de diarrea varía de 20 a 56%. Las áreas de alto riesgo, incluyen el sur de Asia, Norte, Este y Oeste de Africa, América Latina (México entre ellas) y las Islas Caribeñas en las cuales están situadas la República Dominicana y Haití. Puesto que la diarrea del viajero ocasiona preocupación ésta da lugar a que algunos viajeros se rehusen a visitar áreas subdesarrolladas, resultando en pérdidas financieras substanciales para la industria del turismo y otras profesiones relacionadas con esta actividad(44).

Ericsson D. Ch y Dupont L.H., (44) mencionan que las personas de menor edad son el grupo con mas alto riesgo, debido entre otras cosas a una mayor posibilidad de contaminación fecal/oral y a una menor eficiencia inmune.

Las personas entre 15 y 19 años de edad, también son consideradas relativamente de alto riesgo, posiblemente debido a la ingestión de grandes volúmenes de alimento potencialmente contaminado y un estilo de vida del viajero (44, 45). Por otro lado, el grupo de la tercera edad (60 a 80 años) por sus características inmunológicas vuelve a ocupar al igual que los niños los primeros lugares en la morbi-mortalidad por diarrea. Dicha enfermedad tiende a aumentar entre mayo y octubre, temporada en que llueve con mayor frecuencia y que coincide con la época de vacaciones largas, de mayor afluencia y consecuentemente aumento de la contaminación de ríos, playas, albercas, bahías, etc.

Por lo que se refiere a nuestro País, en el transcurso de los últimos 55 años, la mortalidad por diarreas ha disminuido en forma sostenida, sin embargo, las tasas observadas continúan siendo muy elevadas si las comparamos con lo que ocurre en los países desarrollados (tasas de mortalidad inferiores a 1 X 100,000 habitantes), correspondiendo la mayor parte a niños menores de 1 año y al grupo de 1 a 4 años de edad (4, 6, 7).

Existen estudios referentes a la capacidad de sobrevivencia de algunos microorganismos en medios acuáticos (Dawson 1981, Jones y Rhodes 1981, Novitsky y Morita 1976-78 y Xu y Col. 1982) (46). En uno de éstos (47) se señala que las bacterias son capaces de regular la respiración en respuesta a condiciones de nutrientes bajos y que sobreviven por largos períodos de tiempo.

Baker y cols. 1983 (48), llevaron a cabo estudios con cepas de Vibrio cholerae mantenidas por grandes períodos de tiempo en solución marina suplementada observando una gran correlación entre la reducción de nutrientes y cambios en la morfología.

Roszak y cols (46) al estudiar Salmonella enteritidis en un medio de cultivo acuático, observaron que al añadir diferentes nutrientes a los cultivos bacterianos mantenidos en agua de río estéril, 4 días después de que había cesado el crecimiento bacteriano dió lugar a la aparición de colonias atípicas rugosas, aproximadamente 52 hrs después de haber adicionado los nutrientes. Al continuar la observación las bacterias fueron revirtiendo a colonias normales, mostrando incluso las mismas características bioquímicas que el cultivo original. Es un hecho que todo ser vivo se desarrolla bajo condiciones físico-químicas y de nutrientes óptimos de acuerdo a su habitat normal. En el caso de las Enterobacterias motivo de este estudio, no es la excepción; sin embargo, en este trabajo, se presentan datos referentes a la capacidad de este grupo de bacterias para sobrevivir e incluso conservar sus propiedades de patogenicidad aún en condiciones que se pueden considerar no adecuadas para la sobrevivencia de estos microorganismos.

Se estudió el efecto de diversas temperaturas en presencia o ausencia de nutrientes utilizando como diluyente agua de mar artificial para evaluar la capacidad de los microorganismos para sobrevivir e incluso reproducirse en dichas condiciones. El objetivo era demostrar que las aguas

costeras participan en la transmisión de patógenos entéricos cuyo hábitat natural no son aguas hipersalinas. En el estudio se observó que en concentraciones elevadas de sales como las contenidas en el AMA pero en presencia de nutrientes, el desarrollo bacteriano se presentó a partir de los 17 °C a las 24 hrs de incubación. Sin embargo cuando el crecimiento se realizó utilizando únicamente agar agar-AMA las bacterias solo se desarrollaron a temperaturas superiores a los 27 °C y durante un período de incubación en algunas especies superior a las 40 hrs. Estos resultados permiten plantear que las temperaturas prevalecientes en las aguas de la Bahía de Acapulco (28 a 32 °C) son un factor que favorece el desarrollo de las bacterias identificadas.

En relación al efecto de la concentración de sales del AMAR sobre la viabilidad de enterobacterias, se observó una relación inversa entre el crecimiento y el incremento en la concentración de NaCl y KCl. Por el contrario con el CaCl₂ al disminuir la concentración del mismo se disminuía también el desarrollo bacteriano. La otra sal que se analizó fue el MgSO₄, su concentración no influyó sobre el crecimiento bacteriano. Dichas observaciones resultan importantes ya que se podría plantear que la disminución en la concentración de algunas de estas sales en la época de lluvias, favorecerían el desarrollo de bacterias, las cuales a su vez se pueden encontrar en mayores concentraciones por las descargas consecuentes al incremento de la precipitación pluvial. Todo esto en conjunto influye negativamente en la salud tanto de la población residente como de los turistas que visitan estas áreas.

Previo a este trabajo se han realizado estudios referentes a la capacidad de sobrevivencia en ambientes adversos de microorganismos de la familia Vibrionaceae (46); en éstos se mencionan que dichas bacterias regulan su respiración en respuesta a situaciones de stress como es el hecho de modificar los nutrientes.

En toda la Bahía de Acapulco no se encontraron cambios significativos en la temperatura y el pH prevalecientes de acuerdo a la hora del día. Lo observado mostró que ambos parámetros eran favorables para el desarrollo de enterobacterias. Los lugares en los cuales se encontró el mayor número de bacterias, coincidieron con los sitios cercanos a cárcamos de bombeo, descargas de arroyos y descargas de hoteles. Al analizar la hora del día con mayor incremento en las cuentas microbianas se observó que de 10:30 a 11:30 A. M. era el período de mayor contaminación bacteriana, se observó también que ésto coincidía con la hora en que se realiza el mayor número de actividades antropogénicas, tal y como fue reportado por la Dirección General de Oceanografía, dependencia que determinó que la hora de máxima de descarga de aguas a la Bahía era entre 10 y 11 de la mañana (31).

Durante el estudio en la Bahía (exceptuando Caleta, Caletilla y Club de yates), el número de coliformes totales se encontró muy por encima de lo establecido por las normas internacionales, que señalan como límite máximo entre 200 y 1000 bacterias coliformes fecales y totales respectivamente por 100 ml de agua de mar (2, 31, 49). Estudios realizados previamente en la bahía de Acapulco

son contradictorios, ya que mientras que unos refieren concentraciones bacterianas de menos de 1000/100 ml (26) y entre 1000 y 5000 coliformes totales/100 ml (27), otros manifiestan cifras muy por arriba de lo permisible (53 X 10³ por 100 ml) (2, 31).

La identificación de diferentes especies de la familia Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Micrococaceae en el mar, hace suponer que los integrantes de estas familias son capaces de tolerar ambientes marinos, de la misma manera que algunos microorganismos de la familia Vibrionaceae cuyo habitat natural es este. Colwell R.R., Grimes y Colwell, Lessard y Sieburth (19, 50, 51) han observado que E. coli y Salmonella enteritidis toleran periodos de tiempo prolongados en aguas saladas sin perder su patogenicidad inicial.

Haber aislado bacterias enteropatógenas de diferentes géneros (E. coli, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella Sp etc.), sugiere la posibilidad de un elevado riesgo de contraer de manera directa o indirecta enfermedades diarreicas.

Al respecto el haber identificado en la totalidad de las muestras analizadas cepas de E. coli, sugiere la posible participación de este patógeno en muchos de los casos de diarrea del viajero tal como lo han reportado DuPont y Ericsson (52), quienes señalan que cuando menos el 80 % de las diarreas del viajero son causadas por bacterias enteropatógenas encontrándose en mayor proporción a E. coli enterotoxigénica (ETEC).

La capacidad de los microorganismos para mantener su virulencia aún en habitats no propios es interesante de estudiar por la relevancia que éstos pueden tener en la transmisión de patógenos intestinales causantes de enfermedad.

Hasta la fecha se han efectuado diversos estudios relacionados con la habilidad de diversas bacterias entéricas (46, 51, 53 - 55), para sobrevivir en el microcosmos acuático bajo condiciones severas de privación de nutrientes y en ambiente de hipersalinidad (50, 51 y 54). Sin embargo, existen escasos estudios referentes al efecto de estos ambientes sobre la patogenicidad bacteriana. Colwell R y cols. (56) han realizado trabajos referentes a la viabilidad y virulencia de V. cholerae en microcosmos de agua salada, por su parte Grimes y Colwell (50) observaron que después de someter a la cepa E. coli H10407 en ambiente severo de salinidad por 4 días a 25°C estas cepas conservaban su capacidad para producir enterotoxinas, probando lo anterior al inocular bacterias en asas ligadas de conejo y observando el efecto sobre las mismas.

El estudio de virulencia realizado con S. typhimurium utilizando AMAR en diferentes condiciones se hizo con el propósito de reproducir in vitro, las condiciones que podrían presentarse en la Bahía de Acapulco. No obstante que se apreció que mas del 50% de los ratones retados por ambas vías murieron, no existió relación con el tiempo de incubación de la bacteria en agua de mar por lo que no se puede concluir que ésta influya de alguna manera sobre la virulencia de S. typhimurium. Por otro lado cabe mencionar que aunque no todos los ratones

murieron, la mayoría de ellos a partir de las 24 hrs de haber sido retados se mostraron con alteraciones físicas tales como: pelo erizado, anoréxicos y temblorosos, este último signo de la aparición de fiebre y finalmente a las 72 hrs aproximadamente el 50 % de los ratones totales inoculados murió.

Aunque en el estudio no se pudo demostrar que la virulencia se conservaba después de someter a las bacterias a condiciones adversas de crecimiento, apoyamos lo señalado por Grimes y cols. (50) quienes concluyen que lo más importante es que las bacterias se mantengan viables, ya que al infectar y colonizar al huésped, sus propiedades de virulencia se expresan induciendo el daño característico de cada microorganismo.

Black y cols (57) mencionan que al igual que Vibrio cholerae, diferentes especies de Salmonella pueden estar infectando peces u otros productos marinos; por lo que se convierten en una fuente potencial de contaminación ya que algunos de estos peces de aguas tropicales son capturados y vendidos para ornato pudiéndose constituir en un peligro potencial de diseminación de microorganismos patógenos y consecuentemente representar un riesgo para la salud pública.

Colwell R.R. (19), menciona que la ocurrencia y distribución de patógenos humanos en el medio ambiente esta actualmente determinado por el empleo de indicadores para microorganismos. Se considera que la presencia de organismos específicos como puede ser E. coli se interpretan como indicativos del

riesgo potencial de la presencia de patógenos entéricos incluyendo Salmonella y Shigella sp. Colwell menciona además que muchas bacterias patógenas para humanos y animales se presentan en aguas saladas y estuarinas y que la contaminación es llevada por agua flotante (aguas negras).

Homann W.A. y cols (41), señalan que un paso esencial en la patogénesis de la fiebre tifoidea en ratones o humanos es el establecimiento de una infección sistémica posterior a la infección oral; también describen que después de 24 a 48 hrs de inoculados los ratones hay un incremento de la población bacteriana en las placas de Peyer's y que 2 a 3 días después los microorganismos pueden aparecer en pulmones, hígado y bazo pudiendo ocurrir la muerte del ratón a partir de ese tiempo o durante los siguientes trece días.

Por lo tanto se puede considerar que además de la dosis, la vía de administración del inóculo y la patogenicidad bacteriana, en el daño al huésped pueden intervenir otros factores como es el estado inmunológico y aspectos relacionados con el mismo en cada individuo.

Considerando que dependiendo de la época de año pudieran existir cambios en los ambientes acuáticos salados, variando de manera estacional la concentración de sus principales sales (NaCl, KCl, MgSO₄ y CaCl₂) se probó cada una de ellas a diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos en relación al efecto de sales, mostraron que el incremento en la concentración del NaCl y KCl, afecta la viabilidad bacteriana. Por su parte el incremento del MgSO₄ no tiene efecto sobre el desarrollo microbiano. Por otro lado la disminución de los niveles de Ca²⁺ da lugar al decremento en el crecimiento de las bacterias. La explicación al respecto podría estar apoyada por el efecto de los iones Na⁺, Cl⁻ y K⁺, sobre la integridad de algunas estructuras bacterianas (pared y membrana celular), los cuales en condiciones de hipertonicidad favorecen el movimiento de líquidos dando como consecuencia la lisis bacteriana (58).

En lo que respecta al calcio en un estudio realizado por Esguerra y cols (59), señalaron que los niveles de este ion son dependientes de canales modulados por una asociación con la funcionalidad de proteincinasas. Alteraciones en los niveles de Ca²⁺ intervienen en la concentración de la actina de la membrana celular y en la integridad de la misma.

Por lo que se refiere los SO₄²⁻ no existen datos relacionados con el efecto de los mismos sobre la actividad y funcionalidad de la célula.

Los resultados obtenidos sugieren que aunque las condiciones ambientales afectan la sobrevivencia bacteriana, los microorganismos son capaces de persistir por amplio periodo de tiempo en dicho ambiente y posiblemente conservar sus propiedades de virulencia mientras se conserven viables. Por lo tanto, se puede considerar que mientras siga existiendo contaminación de la Bahía de Acapulco, el riesgo de contraer enfermedades diarreicas en ese lugar seguirá

latente, lo cual de manera definitiva representa un efecto negativo sobre una de nuestras principales industrias que es el turismo.

CAPITULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Olarte J: El problema de las diarreas infecciosas. Epidemiología (Sector Salud), Bol. Men. Epidemiol. Mex. Mayo 1986. 1:61-65.
- 2.- Domínguez PS: Monitoreo bacteriológico en la Bahía de Acapulco Guerrero y proximidades (creditos de investigación). Inst. Cienc. Marit. Limnol. UNAM. Mex. 1981. 1-16.
- 3.- Mota HF: Enemigo solapado a vencer en tiempos de cólera. Rev. Fac. Med. UNAM. Mex. 1992. 35:188-195.
- 4.- Chávez PA, Mejía CF: Síndrome diarreico infeccioso en pediatría. Rev. Fac. Med. UNAM. Mex. 1984. XXVII:277-286.
- 5.- Dirección General de Epidemiología (Sector Salud): Estadísticas vitales de los Estados Unidos Mexicanos. Bol. Men. Epidemiol. Mex. enero 1988. 1:1-36.

- 6.- Atlas Epidemiológico del Instituto Mexicano del Seguro Social (1985-1990). 1ª edición Mex. 1992. 60-144.
- 7.- Magallanes FL: El agua como factor de riesgo en la transmisión de infecciones entéricas. Tesis profesional Fac. Cien. Quim. Inds. UAEM., Cuernavaca, Mor. 1993. 1-7.
- 8.- Olarte J: Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. Bol. Med. Hosp. Mex. 1992. 49:143-150.
- 9.- Cravioto A, Eslava C: Vacunas contra Escherichia coli causante de diarrea en humanos. Vacunas Ciencia y Salud. SSA. Subsec. Coord. Des. 1ª Impresión 1992. 493-501.
- 10.- Robins-Browne RM, Bennett W: Quantitative assessment of the ability of Escherichia coli to invade cultured animal cell. Microb. Pathog. 1992. 12:159-164.
- 11.- Thomas LV, Cravioto A, Scotland SM, Rowe B: New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans. Infect. Immun. 1982. 35:1119-1124.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 12.- Cravioto A, Scotland SM, Rowe B: Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of Escherichia coli isolated from humans. *Infect. Immun.* 1982. 36:189-197.
- 13.- Beachey EH: Bacterial adherence: adhesin-receptor interaction mediating the attachment of bacterial to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 1981. 143:325-344.
- 14.- Scotland SM, Richmond JE, Rowe B: Adhesion of enteropathogenic of Escherichia coli (EPEC) to Hep-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. *FEMS Microb. Lett.* 1983. 20:191-195.
- 15.- Cohen PS, Arruda JC, Williams TJ, Laux DC: Adhesion of a human fecal Escherichia coli strains to mouse colonic mucus. *Infect. Immun.* 1985. 48:139-145.
- 16.- Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine MM: Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. *J. Infect. Dis.* 1985. 152:560-565.

- 17.- Saunders JR: Modulating bacterial virulence. *Nature*. 1989. 338:622-623.
- 18.- Julius A: The sensing of chemical by bacteria. *Sci. Amer*. 1976. 239:40-47.
- 19.- Colwell RR: Human pathogens in the aquatic environment. *Aquat. Microb. Ecol*. 1980. 377-379.
- 20.- Rheinheimer G: Microbiología de las aguas. 4ª edición. Ed. Acirbia S.A. Zaragoza (España) 1987. 101-122.
- 21.- Valdespino LJ: García ML, Hinojosa M, Serti E, Sepúlveda J: Epidemia de cólera en América. *Cienc. Desarr*. 1991. XVII:55-64.
- 22.- Botello VA, Ponce VG, Toledo A, Díaz GG, Villanueva S: Ecología recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. *Cienc. Desarr*. 1992. XVII:28-48.
- 23.- Neri R: La contaminación y sus consecuencias para la salud. *Sal. Pub. Mex*. 1978. XX:287-295.

- 24.- Subsecretaría de Planeación: Estudio para el control de la calidad del agua en la Bahía de Acapulco, Gro. 1ª etapa. Manual de procedimientos SARH. 1972.
- 25.- Subsecretaría de Planeación. Dirección de usos del agua y prevención de la contaminación: Estudio de la calidad del agua en la Bahía de Banderas, Jal. Manual de procedimientos SARH. 1975.
- 26.- Subsecretaría de Planeación: Estudio de la calidad del agua de la Bahía de Acapulco, Gro. Manual de procedimientos SARH. 1977.
- 27.- Centro de Estudios Ecológicos de Acapulco Guerrero: Estudio de la calidad del agua de la Bahía de Acapulco, Gro. Manual de procedimientos SARH. 1979.
- 28.- Dirección General de usos del agua y prevención de la contaminación: Estudio de la calidad del agua de la Bahía de Acapulco, Gro.(informe de los trabajos realizados en la sexta etapa de estudio) Manual de procedimientos SARH. 1976.

- 29.- American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater. 15ava. edition.Ed. APHA, New York 1980. 913-967.
- 30.- Avilés RD, Cortez GA, Eusebio HG, Florez VM: Manual de laboratorio de microbiología sanitaria. IPN. Mex. 1983. 1:28-84.
- 31.- Dirección General de Oceanografía de Marina: Análisis bacteriológico en aguas y organismos de la Bahía de Acapulco. Prev. Cont. Acap. Mex. 1980. 4-79.
- 32.- Programa Nacional de Capacitación Ambiental: Control de la contaminación del agua. SEDUE. Dir. Gral. Prev. Contr.Contam. Amb. 1988,3:24-133.
- 33.- Salas HJ: Calidad del agua en el medio marino. Historia y aplicación de normas microbiológicas. Bol. San. Panam. 1989. 107:226-238.
- 34.- Anuario Estadístico 1985: Informe mensual y anual de casos de enfermedades notificadas. SSA. Subsecretaría de planeación. Dir. Gral. Inf. Estad. 1987. 40-42, 96-98, 145-148, 172-173.

- 35.- Centro de Estudios Ecológicos de Acapulco Guerrero:
Estudio de la calidad del agua de la Bahía de Acapulco.
Manual de procedimientos SARH. 1987.
- 36.- Domínguez PS: Evaluación de la calidad ambiental del
sistema lagunar Coyuca-Tres Palos Guerrero en base a las
condiciones hidrológicas, actividades antropogénicas y por el
uso de índices e indicadores biológicos. INPescas. Memorias
del IX Congr. Nal. Ocean. Veracruz Ver. 1992. 303.
- 37.- Treagan, Pulliam: Medical microbiology laboratory
procedures 1ª edition. Ed. W.B. Saunders Company 1982. 5-
37.
- 38.- James W, Nybakken: An ecological approach. 3ª Edition. Ed.
Harper Collins Marine Biology. 1993. 2-9.
- 39.- Barret TJ, Blake PA, Morris GK, Puhr NO, Bradfor HB, Well
JG: Use of moore swabs for isolating Vibrio cholerae from
sewage. Clin. Microb. 1980. 11:385-388.
- 40.- Liu VP: Bacterial longevity in salt. free medium FEMS
Microb. Lett. 1984. 50:471.

- 41.- Homann WA, Schmidt G, Rowley D: Intestinal colonization and virulence of Salmonella in mice. *Infect. Immun.* 1978. 22:763-770.
- 42.- Carter BP, Collins MF: The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* 1974. 139:1189-1203.
- 43.- Mattila L, Siitonen A, Kyönseppä H, Simula I, Oksanen P, Stenvik M, Salo P, Peltola H: Seasonal variation in etiology of travelers' diarrhea. *J. Infect. Dis.* 1992. 165:385-388.
- 44.- Ericsson DH, Dupont LH: Travelers' diarrhea approaches to preventions and treatment. *J. Clin. Infect. Dis.* 1993. 16:616-626.
- 45.- Williams & Wilkins: Microbiología: Mecanismos de las enfermedades infecciosas, enfoque mediante resolución de problemas. 2ª edición. Ed. Panamericana. 1994. 271-301.
- 46.- Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR: Viable but non recoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems. *Can. J. Microb.* 1984. 30:334-338.
- 47.- Torella F, Morita R: Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by

heterotrophic bacteria in seawater. Appl. Environ. Microb. 1981. 41:518-527.

- 48.- Baker RM, Singleton FL, Hood MA: The effects of nutrient deprivation on Vibrio cholerae. Appl. Environ. Microb. 1983. 46:930-941.
- 49.- Carrada BT: El brote de cólera en la República Mexicana en 1991. Infectología. 1992. 10:645-662.
- 50.- Grimes DJ, Colwell RR: Viability and virulence of Escherichia coli suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. FEMS Microb. Lett. 1986. 34:161-165.
- 51.- Lessard JE, Sieburth McN J: Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion on batch chambers in the marine environment. Appl. Environ. Microb. 1983. 3:950-959.
- 52.- DuPont LH, Ericsson DCh: Prevention and treatment of traveler's diarrhea. The New England J. Med. 1993. 328:1821-1827.

- 53.- Palmer LM, Baya AM, Grimes DJ, Colwell R.R. Molecular genetic and phenotypic alteration of Escherichia coli in natural water microcosms containing toxic chemicals. FEMS Microb. Lett. 1984. 21:169-173.
- 54.- Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, and Colwell RR: Survival and viability of Nonculturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. 1982. 8:313-323.
- 55.- Rollins DM, Colwell RR: Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microb. 1986. 52:531-538.
- 56.- Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM: Viable but nonculturable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. Biol. Technol. 1985. 3:817-820.
- 57.- Black DA, Hay J, Mead CA: Salmonella in tropical Freshwater Fish Carriage Water. The Society of Public Health. 1992. 106:413-415.

- 58.- Lehninger AL: Bioquímica 2ª edición. Ed. Omega Barcelona España 1978. 787-816.
- 59.- Esguerra M, Wang J, Foster Ch, Adelman J, North & Levitan I: Cloned Ca^{2+} -dependent K^+ channel modulated by a functionally associated protein kinase. Nature. 1994. 369:563-565.

**CUADRO No.1 EFECTO DEL AGAR NUTRITIVO - AMA Y TEMP.
SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES ENTEROBACTERIAS**

ESPECIES	12°C	17°C	22°C	27°C	28°C	32°C
<u>Citrobacter amalonáticus</u>	-	+	+	+	+	+
<u>Klebsiella pneuminiae</u>	-	++	++	++	++	++
<u>Serratia rubidae</u>	-	*+	*+	*+	+*	*+
<u>Serratia marcescens</u>	-	++	++	++	++	++
<u>Salmonella typhimurium</u>	-	+	+	+	+	+
<u>Escherichia coli</u>	-	+	+	+	+	+
<u>Enterobacter agglomerans</u>	-	+	+	+	+	+

AMA: AGUA DE MAR ARTIFICIAL

***+ DESARROLLO BACTERIANO INCIPIENTE**

+ DESARROLLO NORMAL

++ DESARROLLO ABUNDANTE

**CUADRO No.2 EFECTO DEL AGAR - AGAR - AMA Y TEMP.
SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES ENTEROBACTERIAS**

ESPECIES	11°C	15°C	17°C	21°C	26°C	27°C	28°C	30°C
<u>Citrobacter amalonaticus</u>	-	-	-	-	-	+	+	+
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	-	-	-	-	+	+	+	+
<u>Serratia rubidae</u>	-	-	-	-	-	+	+	+
<u>Serratia marcescens</u>	-	-	-	-	+	+	+	+
<u>Salmonella typhimurium</u>	-	-	-	-	-	+	+	+
<u>Escherichia coli</u>	-	-	-	-	-	+	+	+
<u>Enterobacter agglomerans</u>	-	-	-	-	-	+	+	+

AMA: AGUA DE MAR ARTIFICIAL

- +* DESARROLLO BACTERIANO VISIBLE HASTA LAS 40 HORAS**
- NO HUBO DESARROLLO**
- + DESARROLLO NORMAL**

CUADRO No. 3 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL CLORURO DE SODIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES ENTEROBACTERIAS

ESPECIES	**	gr/Lt				
	CaCl²	1. 45	1. 45	1. 45	1. 45	1. 45
	MgSO⁴	12. 35	12. 35	12. 35	12. 35	12. 35
	KCl	0. 75	0. 75	0. 75	0. 75	0. 75
	NaCl	17. 55	13. 15	8. 77	4. 38	0. 00
<u>Citrobacter amalonaticus</u>	+	+	+	++	++	++
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	++	++	++	++	++	++
<u>Serratia rubidae</u>	+*	+	+	+++	++	++
<u>Serratia marcescens</u>	++	+	+	++	++	++
<u>Salmonella typhimurium</u>	+	+	+	++	+++	+++
<u>Escherichia coli</u>	+	+	+	++	++	++
<u>Enterobacter agglomerans</u>	+	+	+	++	++	++

** CONCENTRACION NORMAL DE SALES POR Lt/ DE AMA

+* DESARROLLO BACTERIANO INCIPIENTE A 37°C/24-48HS.

++ DESARROLLO ABUNDANTE

+ DESARROLLO NORMAL

+++ DESARROLLO EN EXCESO

CUADRO No.4 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL CLORURO DE POTASIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES ENTEROBACTERIAS

ESPECIES	**	gr/Lt				
	CaCl ₂	1. 45	1. 45	1. 45	1. 45	1. 45
	MgSO ₄	12. 35	12. 35	12. 35	12. 35	12. 35
	KCl	0. 75	0. 56	0. 37	0. 19	0. 00
	NaCl	17. 55	17. 55	17. 55	17. 55	17. 55
<u>Citrobacter amalonáticus</u>	+	+	+	++	++	++
<u>Klebsiella pneuminiae</u>	++	++	++	++	++	++
<u>Serratia rubidae</u>	+*	+	+	+	+	+*
<u>Serratia marcescens</u>	++	+	+	+	+	+*
<u>Salmonella typhimurium</u>	+	+	++	++	++	+++
<u>Escherichia coli</u>	+	+	+	++	++	++
<u>Enterobacter agglomerans</u>	+	+	++	++	++	+++

** CONCENTRACION NORMAL DE SALES POR Lt/ DE AMA

+* DESARROLLO BACTERIANO INCIPIENTE A 37°C/24-48HS.

++ DESARROLLO ABUNDANTE

+ DESARROLLO NORMAL
+++ DESARROLLO EN EXCESO

**CUADRO No.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SULFATO DE MAGNESIO
SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES ENTEROBACTERIAS**

ESPECIES	**	gr/Lt				
	CaCl ²	1. 45	1. 45	1. 45	1. 45	1. 45
	MgSO ⁴	12. 35	9. 26	6. 12	3. 08	0. 00
	KCl	0. 75	0. 75	0. 75	0. 75	0. 75
	NaCl	17. 55	17. 55	17. 55	1755	17. 55
<u>Citrobacter amalonaticus</u>		+	+	+	+	+
<u>Klebsiella pneumoniae</u>		++	++	++	++	++
<u>Serratia rubidae</u>		+*	+	+	+	+
<u>Serratia marcescens</u>		++	++	++	++	++
<u>Salmonella typhimurium</u>		+	+	+	+	+
<u>Escherichia coli</u>		+	+	+	+	+
<u>Enterobacter agglomerans</u>		+	+	-	-	-

** CONCENTRACION NORMAL DE SALES POR Lt/ DE AMA

+* DESARROLLO BACTERIANO INCIPIENTE A 37°C/24-48HS.

++ DESARROLLO ABUNDANTE

+ DESARROLLO NORMAL

+++ DESARROLLO EN EXCESO

CUADRO No. 6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL CLORURO DE CALCIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES ENTEROBACTERIAS

ESPECIES	**	gr/Lt				
	CaCl₂	1. 45	1. 08	0. 72	0. 36	0. 00
	MgSO₄	12. 35	12. 35	12. 35	12. 35	12. 35
	KCl	0. 75	0. 75	0. 75	0. 75	0. 75
	NaCl	17. 55	17. 55	17. 55	1755	17. 55
<u>Citrobacter amalonaticus</u>	+	+	+	+	+	+
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	++	++	++	++	++	++
<u>Serratia rubidae</u>	+*	-	-	-	-	-
<u>Serratia marcescens</u>	++	-	-	-	-	-
<u>Salmonella typhimurium</u>	+	-	-	-	-	-
<u>Escherichia coli</u>	+	+	+	+	+	+
<u>Enterobacter agglomerans</u>	+	-	-	-	-	-

** CONCENTRACION NORMAL DE SALES POR Lt/ DE AMA

+* DESARROLLO BACTERIANO INCIPIENTE A 37°C/24-48HS.

++ DESARROLLO ABUNDANTE

+ DESARROLLO NORMAL

+++ DESARROLLO EN EXCESO

CUADRO No.7 CARACTERISTICAS DEL AGUA DE LA BAHIA DE ACAPULCO

CLAVE DE MUESTREO	HORA	TEMPERATURA	pH
H. CONTINENTAL	15:35	32	6
H. RITZ	16:00	30	6
H. P. MARRIOT	16:05	30	6
PAPAGAYO	16:15	32	6
GIGANTE	16:30	32	6
SUPER SUPER	16:45	32	6
QUEBEC	17:00	30	6
CALETA	20:40	28	7
CALETILLA	20:45	28	7
CLUB DE YATES	21:00	28	7
TLACOPANOCHA	21:15	28	6

H: HOTEL

CUADRO No.7 CARACTERISTICAS DEL AGUA DE LA BAHIA DE ACAPULCO

CLAVE DE MUESTREO	HORA	TEMPERATURA	pH
H. CONTINENTAL	15:35	32	6
H. RITZ	16:00	30	6
H. P. MARRIOT	16:05	30	6
PAPAGAYO	16:15	32	6
GIGANTE	16:30	32	6
SUPER SUPER	16:45	32	6
QUEBEC	17:00	30	6
CALETA	20:40	28	7
CALETILLA	20:45	28	7
CLUB DE YATES	21:00	28	7
TLACOPANOCHA	21:15	28	6

H: HOTEL

**CUADRO No.8 ESPECIES BACTERIANAS IDENTIFICADAS
DEL AGUA DE LA BAHIA DE ACAPULCO
A PARTIR DE 11 MUESTRAS**

Escherichia coli

Citrobacter freundii

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella ozaenae

Providencia rettgeri

Enterobacter agglomerans

Proteus vulgaris

Enterobacter cloacae

Enterobacter aerogenes

Serratia marcescens

Serratia liquefaciens

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas putida

Pseudomona cepacia

Staphylococcus aureusa

Staphylococcus epidermidis

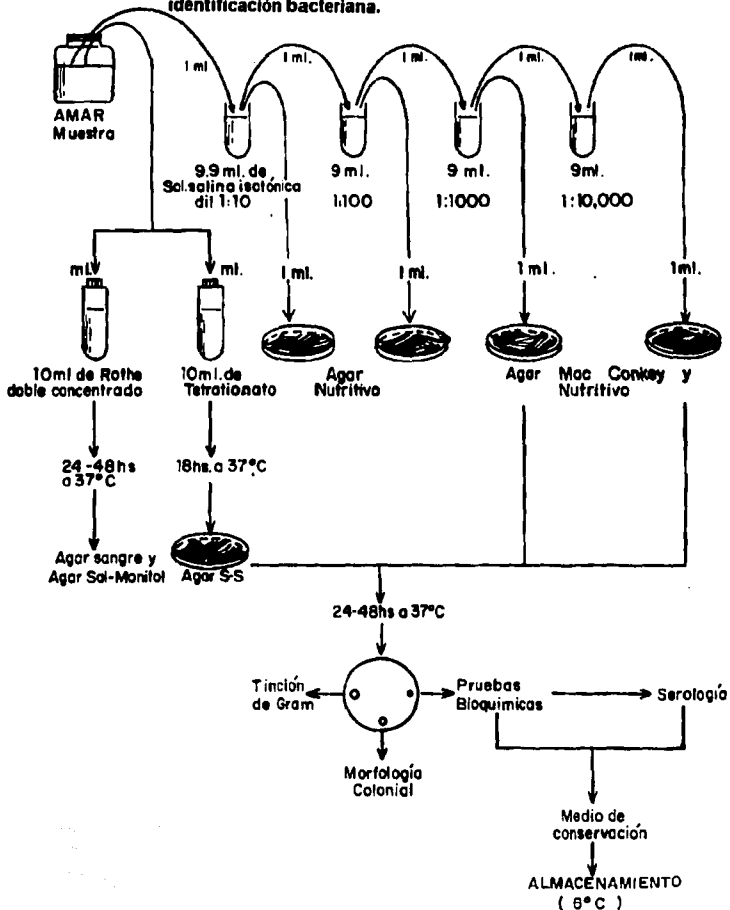
Streptococcus faecalis

CUADRO 9. VIRULENCIA DE *S. typhimurium* EN RATON DESPUES DE INCUBAR A DISTINTOS TIEMPOS EN AGUA DE MAR.

TIEMPO DE INCUBACION EN AMAR	NUMERO DE RATONES MUESTOS*	
	(N=3) INTRAPERITONEAL	(N=3) ORAL
30	1/3	2/3
60	0/3	2/3
90	2/3	1/3
120	2/3	2/3
150	3/3	0/3
180	1/3	2/3

*** OBSERVADOS HASTA DESPUES DE 14 DIAS POS-INOCULACION.**

Diagrama No. 1. Procesamiento de muestras para recuento, aislamiento e identificación bacteriana.



FALLA DE ORIGEN

Diagrama No. 2. Procedimientos para la determinación del efecto del AMAR sobre la Virulencia de S. Thyphimurium.

FALLA DE ORIGEN

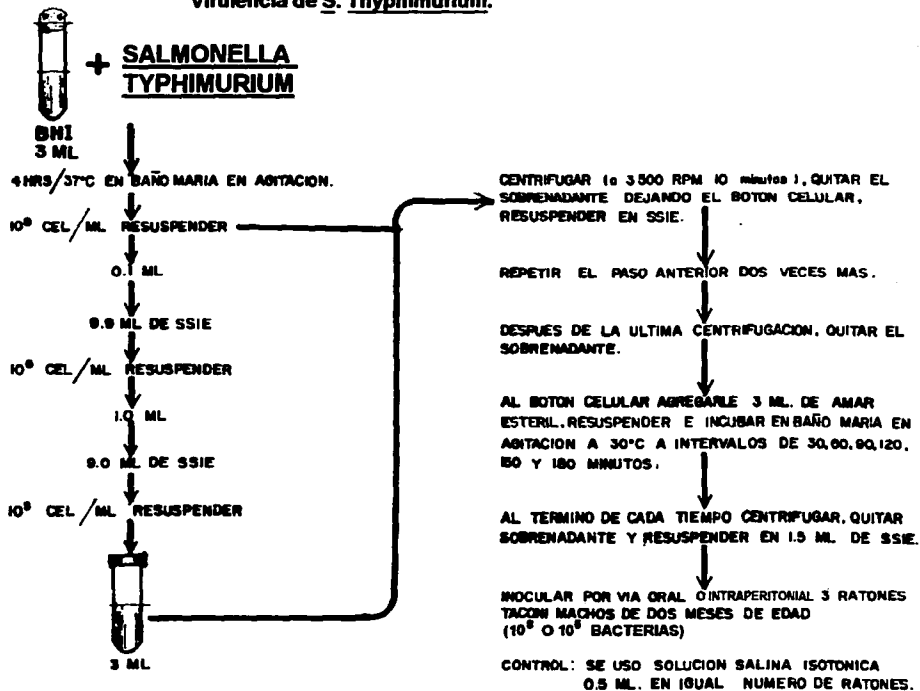


Diagrama No. 3 *Recuperación de la Cepa (Salmonella typhimurium)*

procedimiento

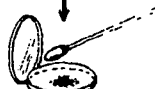


Necropsia



Higado + sol. salina isotónica esteril

Moler hasta obtener un homogenizado



Con un hisopo tomar una muestra e inocular en el extremo de una caja de petri que contiene agar S.S.

Estríar con el asa e incubar 24-48hs. a 37°C



inocular una colonia en Agar Kligler

18-24hs a 37°C

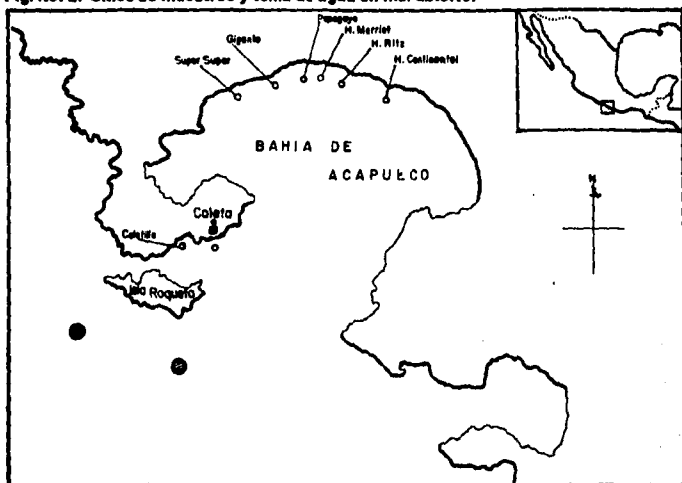
Pruebas Bioquímicas Y Serológicas

FALLA DE ORIGEN

Fig. No.1. DIFERENTES FUENTES DE CONTAMINACION.



Fig. No. 2. Sitios de muestreo y toma de agua en mar abierto.



- = TOMAS DE AGUA A MAR ABIERTO
- = TOMAS DE AGUA PARA ANALISIS BACTERIOLOGICO

FALLA DE ORIGEN

FIG.3. GRADO DE CONTAMINACION BACTERIANA DE LA BAHIA DE ACAPULCO

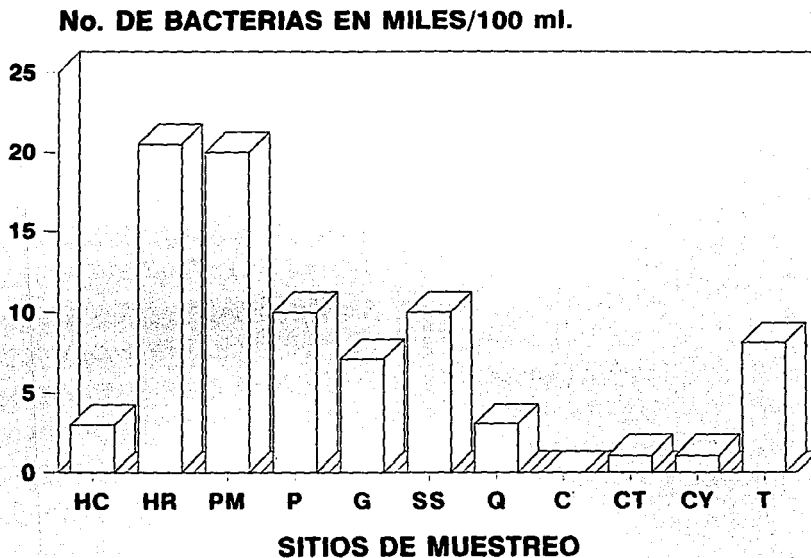
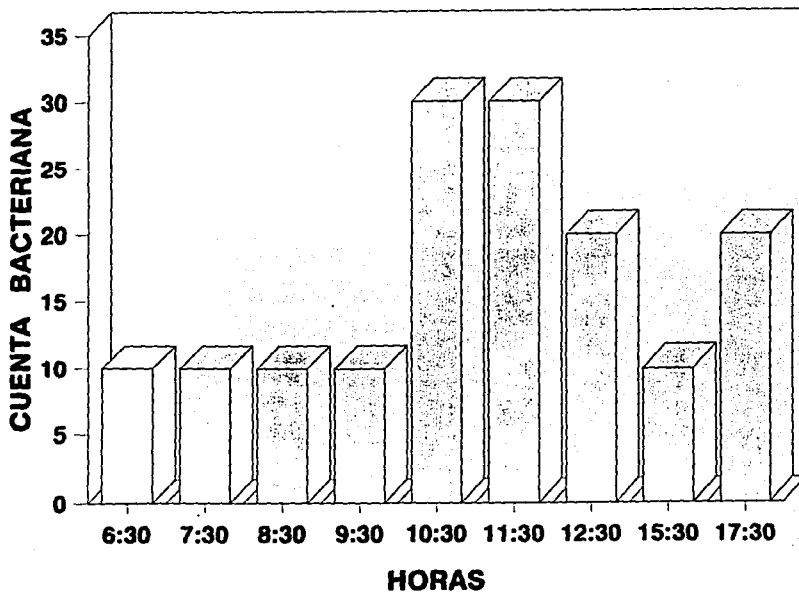


FIG. 4. FRECUENCIA DE CONTAMINACION BACTERIANA DE ACUERDO A LA HORA DEL DIA.



FALLA DE ORIGEN