



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *Vibrio vulnificus* EN
FILETE DE PESCADO FRESCO Y PICADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

IMELDA REYES BUSTAMANTE

CD. OBREGÓN, SON. MARZO DE 2007

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, Unidad Obregón, asesorado por la M. C. Olga Nydia Campas Baypoli.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE CUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Justificación.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Objetivo.....	3
1.4. Hipótesis.....	3
II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA	
2.1. La importancia del pescado en la alimentación.....	4
2.1.1 Composición y valor nutritivo.....	4
2.2. Origen de la microflora del pescado.....	5
2.2.1. Adherencia bacteriana.....	7
2.3. Vibriones.....	7
2.3.1 Aislamiento.....	9
2.3.2 Sensibilidad a los tratamientos físicos y químicos.....	10
2.3.2.1 Frío.....	10
2.3.2.2 Calor.....	11
2.3.2.3 Irradiación.....	11
2.3.2.4 Polifosfatos.....	12
2.3.2.5 Inhibidores diversos.....	12
2.3.2.6 Depuración.....	12

2.4. <i>Vibrio vulnificus</i>	13
2.4.1 Clasificación.....	14
2.4.2 Sensibilidad a factores ambientales.....	14
2.4.3 Reservoirios.....	15
2.4.4 Factores de riesgo y características de la enfermedad.....	15
2.4.4.1 Septicemia primaria.....	16
2.4.4.2 Infección de heridas.....	17
2.4.5 Medidas de control.....	18
2.5 Pruebas bioquímicas.....	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo.....	36
3.2. Período y frecuencia de muestreo.....	36
3.3. Análisis microbiológicos.....	37
3.3.1. Preparación de la muestra.....	37
3.3.2. Aislamiento.....	37
3.4. Morfología colonial.....	37
3.5. Identificación de las cepas.....	38
3.5.1 Pruebas presuntivas.....	38
3.5.2 Pruebas bioquímicas.....	38
3.6. Proceso de identificación.....	42

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación.....	47
---------------------------------------	----

CONCLUSIÓN	52
-------------------------	----

GLOSARIO	53
-----------------------	----

LITERATURA CITADA	68
--------------------------------	----

Dedicado a mis padres Manuel e Isabel por su gran apoyo durante todos mis estudios, sobre todo por la confianza y cariño que siempre me han brindado...

AGRADECIMIENTOS

Gracias a...

Dios por la gran fortaleza que siempre me da y me ha permitido llegar a este momento.

*Mis padres **Manuel e Isabel** por su gran comprensión y amor, ya que gracias a su apoyo he podido llegar a este momento tan valioso en mi vida, los amo.*

*Mi esposo **Arturo** por el gran amor que me ha brindado, por su apoyo, comprensión y paciencia, te amo.*

*Mi hijo **Fabián Arturo** por iluminar mi vida con su presencia y llenarme siempre de alegría, te amo.*

*Mis hermanas **Mirna y Goyita** por sus palabras de aliento y siempre buenos deseos para mí.*

*Mi tía **Celida** por su apoyo y a mis primos, **Mayra y Guillermo** por su ayuda en algunos momentos durante la elaboración de mi trabajo.*

*Mi amiga **Mercedes** por su colaboración en el término de éste trabajo.*

Mi asesora, MC. Olga Nydia Campas Baypoli por asesorarme y apoyarme en la elaboración de este trabajo, gracias también por su confianza.

Ing. Anacleto Felix Fuentes por brindarme su apoyo y por la oportunidad de desarrollar la investigación en el laboratorio de microbiología.

Ing. Andrés Fco. Chávez A. por haber tenido siempre disposición para ayudarme y asesorarme.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Fechas de muestreo.....	36
2	Características bioquímicas del patógeno humano <i>Vibrionaceae</i> comúnmente encontrado en alimentos marinos.....	45
3	Número de colonias típicas de <i>Vibrio</i> spp. en las muestras de pescado.....	47
4	Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de oxidasa (+) y catalasa (+).....	48
5	Prevalencia de los microorganismos encontrados en las analizadas.....	59

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Diferenciación de bacilos gramnegativos (cocobacilos) fermentativos oxidasa positivos que crecen bien en medios de aislamiento comunes.....	42
2	Diferenciación de especies <i>Vibrio</i>	43
3	Diferenciación de especies de <i>Aeromonas</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	<i>Vibrio vulnificus</i>	8
2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
3	<i>Vibrio cholerae</i>	9

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue conocer la incidencia de la especie *Vibrio vulnificus*, su aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas, en el filete de pescado fresco y picado, expedido para la preparación de ceviche en la ciudad, ya que este alimento es muy consumido en la región. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, en el período comprendido del 21 de agosto al 10 de noviembre de 2006. Se realizaron 6 muestreos en 6 pescaderías, recolectando un total de 36 muestras. El análisis de las muestras, se obtuvo de acuerdo a la metodología de la NOM-031-SSA1-1993, se utilizó caldo peptona alcalina para el enriquecimiento, el aislamiento se realizó en agar TCBS y para la identificación se seleccionaron las colonias típicas de *vibrio*, se sembró en agar tripticasa de soya al 1% de NaCl, se realizaron frotis para teñir por el método Gram para verificar si eran bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvos, posteriormente obtuvo la prueba de la oxidasa y catalasa como prueba presuntiva, para la identificación se llevaron a cabo las siguientes pruebas bioquímicas; producción de indol, prueba del citrato, licuefacción de la gelatina, aprovechamiento de lactosa, aprovechamiento de glucosa, producción de H₂S, producción de gas, prueba del rojo de metilo, motilidad, descarboxilación de la ornitina, reacción de la ureasa, reacción de Voges-Proskauer, pruebas de fermentación de los hidratos de carbono, prueba del ácido sulfhídrico, desaminación de la lisina y descarboxilación de la lisina. El 100 % de las muestras analizadas fueron negativas para la especie *Vibrio vulnificus*, además se aislaron

otras especies como *Vibrio spp.*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Aeromonas spp.* y *Aeromonas hydrophila*, por lo que se puede concluir que éste microorganismo no se encuentra en el pescado fresco y picado utilizado para la elaboración de ceviche en nuestra región, y por lo tanto el microorganismo en estudio no significa en este caso un riesgo para la salud.

I. INTRODUCCIÓN

Los pescados frescos raramente son fuente de microorganismos patógenos humanos, salvo que se capturen en aguas contaminadas. Los únicos microorganismos de interés en Salud Pública que se asocian al pescado son *Vibrio parahaemolyticus*, que se encuentra fundamentalmente en el mar y *Clostridium botulinum* (Roberts y cols., 2000).

La contaminación acaece principalmente durante el procesado y almacenamiento. La evisceración del pescado puede extender su flora intestinal por las superficies del pescado, y el hielo empleado para su refrigeración con frecuencia se contamina mucho con microorganismos potencialmente alterativos. Un control inadecuados de la temperatura del pescado, facilita la alteración microbiana (Roberts y cols., 2000).

En los pasados 30 años muchas especies de *vibrios* han sido relacionadas con enfermedades tales como gastroenteritis en humanos normales y septicemia en individuos con algún padecimiento clínico. Los *vibrios* son habitantes naturales de ambientes acuáticos, principalmente de hábitat marino y son transmitidos por la ingestión de alimentos marinos crudos o inadecuadamente cocidos (Torres y Castillo, 2002).

Vibrio vulnificus es una especie de *Vibrio* especialmente virulenta, responsable de la infección rápidamente progresiva de las heridas después de la exposición a agua de mar contaminada y de la septicemia después del consumo de ostras crudas contaminadas. La infección de las heridas se caracteriza inicialmente por hinchazón, eritema y dolor, seguido de la aparición de vesículas o ampollas e incluso de necrosis tisular. Los pacientes experimentan generalmente signos sistémicos como fiebre y escalofríos. Las infecciones son más graves en los pacientes afectados de hepatopatías, hemopatías o insuficiencia renal crónica, y en aquellos que reciben fármacos inmunosupresores (Murray y cols, 1992).

A pesar de que no se han reportado incidencias de *Vibrio vulnificus* como contaminante del pescado fresco, el siguiente trabajo se realizó con el fin de comprobar lo antes mencionado.

1. 1. Justificación

Los productos del mar que están siendo consumidos actualmente, cada vez presentan más causas de enfermedad en los humanos, principalmente por el consumo de mariscos crudos, con lo que se aumentan los casos de muertes en el mundo. Específicamente, los *vibrios* son microorganismos que se encuentran en el agua de mar y que contaminan a los alimentos marinos, en este caso se pretende analizar la incidencia que especialmente el *Vibrio vulnificus* tiene sobre el pescado que se consume crudo en la región, sobre todo porque es un alimento muy utilizado para preparar el ceviche, ya que éste es un agente causal de infecciones o lesiones en la piel, gastroenteritis y una septicemia primaria, en personas sanas causa gastroenteritis leves, sin embargo puede causar una septicemia grave en personas inmunodeprimidas, provocando la muerte en el 50% de los casos.

Con lo anterior, se puede tener una visión más amplia sobre que tanta incidencia tiene el *Vibrio vulnificus* sobre el filete de pescado fresco en ésta región, ya que, éste se encuentra principalmente contaminando a los mariscos crudos, especialmente las

ostras y no se han encontrado hasta el momento indicios que puedan probar su existencia en filete de pescado fresco y por ende ser causa de enfermedades por su consumo en pescado contaminado, lo que puede ayudar a tomar medidas en un futuro sobre las posibles consecuencias que este microorganismo puede traer en la salud pública, por ser un microorganismo altamente infeccioso en casos especiales.

1. 2. Planteamiento del problema

Es necesario realizar nuevas investigaciones con los que se pueda tener mayor información sobre la contaminación de alimentos marinos por *Vibrio vulnificus*, en este caso, para identificar la incidencia que éste tiene en el pescado que se consume crudo, y así poder tomar medidas de higiene y seguridad en un futuro sobre este producto que es altamente consumido.

1. 3. Objetivo

Conocer la incidencia de la especie *Vibrio vulnificus*, su aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas, en el filete de pescado fresco y picado, expedido para la preparación de ceviche en ciudad Obregón, Sonora.

1. 4. Hipótesis

En el filete de pescado fresco y picado de ciudad Obregón, Sonora; se puede encontrar la presencia de la especie *Vibrio vulnificus*.

II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA

2. 1. La importancia del pescado en la alimentación

Debido a su contenido proteico, a su óptima composición nutritiva y a las múltiples formas en que puede prepararse, el pescado constituye uno de los artículos comerciales más solicitados en la industria alimentaria. La proteína del pescado ocupa en lo referente a valor nutritivo el segundo lugar (después de la leche de mujer y por delante incluso de la leche de vaca y de la carne de animales de sangre caliente). Además de una elevada proporción de proteína, la carne de pescado contiene grasas fácilmente digestibles, así como una serie de importantes sustancias nutritivas y microfactores. La elevada tasa de vitaminas A, B, C, y D hace de la carne del pescado y de los productos con ella elaborados artículos muy valiosos, especialmente para dietas de niños y enfermos (Tscheuschner, 2001).

2. 1.1. Composición y valor nutritivo

La composición y el valor nutritivo de los tejidos comestibles de una determinada especie de pescado varían, entre otros factores, en función de la época del año y del grado de madurez biológica. En líneas generales, el pescado contiene entre un 18 y un

35% de extracto seco, del 14 al 20% de proteínas, entre un 0,2 y un 20% de grasa y alrededor del 1,0-1,8% de cenizas (Potter y Hotchkiss, 1999, Doyle y cols; 2001, www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s0x.htm).

Desde el punto de vista nutritivo, las proteínas del pescado son fáciles de digerir y su composición en aminoácidos esenciales es al menos tan adecuada para la nutrición humana como la de la carne. En consecuencia, la función más importante del pescado en los países tradición ictiófaga es la de proporcionar proteína de un alto valor biológico. Otro de los aspectos nutritivos que destacan en la composición del pescado es que contiene lípidos que se digieren con facilidad y son ricos en ácidos grasos insaturados. No obstante, como ocurre con todas las grasas insaturadas, la del pescado es muy sensible a la oxidación y al desarrollo de rancidez y sabores desagradables (Potter y Hotchkiss, 1999, www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s0x.htm).

Los pescados son alimentos ricos en vitaminas. La grasa del pescado es una fuente excelente de vitaminas A y D, motivo por el cual se administraba aceite de hígado de bacalao a los niños hasta que se generalizó el uso de suplementos vitamínicos en comprimidos. El tejido muscular del pescado aporta también vitaminas del grupo B, aunque su contenido suele ser mayor en los moluscos y crustáceos que en los peces (Potter y Hotchkiss, 1999).

Por último, los productos del mar constituyen una buena fuente de elementos minerales y, en particular, se consideran una fuente excelente de yodo. El contenido en hierro del pescado es inferior al de la carne, mientras que los pescados que se enlatan sin eliminar las espinas como el salmón o las sardinas, constituyen una fuente excelente de calcio y fósforo (Potter y Hotchkiss, 1999, Charley, 2001).

2. 2. Origen de la microflora del pescado

La población y composición de la microflora del pescado está influenciada por el ambiente de la zona de captura, la época del año y las condiciones de pesca,

manipulación y procesado. La temperatura del agua influye significativamente en el número inicial y tipo de bacterias de las superficies del pescado. Además las poblaciones microbianas se ven influidas por la calidad del agua, siendo los pescados capturados en aguas contaminadas los que tienen mayores recuentos. En los pescados y mariscos de aguas templadas predominan los siguientes géneros bacterianos: *Clostridium botulinum* tipo E, *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio* (Doyle y cols; 2001).

Las bacterias que con mayor frecuencia intervienen en la alteración del pescado forman parte de la flora propia del mucílago que recubre el cuerpo de los peces y de la flora de su contenido intestinal. Las principales especies de bacterias que alteran al pescado dependen de la temperatura a la que se mantiene el pescado, aunque a las temperaturas que normalmente se emplean para refrigerarlo es más probable que predominen las especies de *Pseudomonas*, siguiéndoles en orden de mayor a menor importancia las especies de los géneros *Acinetobacter*, *Moraxella*, y *Flavobacterium*. Con menor frecuencia, y en caso de que las temperaturas sean más elevadas, aparecen en el pescado bacterias de los géneros *Micrococcus* y *Bacillus*. Algunas referencias bibliográficas citan otros géneros en los que se encuentran especies que intervienen en la alteración del pescado, como, por ejemplo, los géneros *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Sarcina*, y *Clostridium*. La mayoría de las especies de estos géneros sólo crecerían a las temperaturas ambientales normales y probablemente crecerían escasamente a las temperaturas de refrigeración (Frazier y Westhoff, 2000).

Normalmente, durante el tiempo que se mantiene la masa muscular del pescado en refrigeración, aumenta el número de *Pseudomonas* y disminuye el número de bacterias del género *Achromobacter*, mientras que las pertenecientes al género *Flavobacterium* aumentan al principio para disminuir después. Las bacterias se multiplican al principio en la superficie y posteriormente penetran en la masa muscular (Frazier y Westhoff, 2000).

La microflora inicial del pescado depende también del método de pesca; la pesca de arrastre generalmente tiene poblaciones microbianas mayores que los que se capturan con artes de línea. La manipulación y almacenamiento son también causales de su contaminación bacteriana. La calidad microbiológica de la salmuera y el hielo en los transportes es importante, los mismo que las variaciones de temperatura. El retraso en cubrir el pescado con hielo también favorece la posibilidad de un rápido desarrollo microbiano (Doyle y cols; 2001).

2. 2. 1. Adherencia bacteriana

La alteración microbiana de la carne de mamíferos, de aves y del pescado generalmente ocurre a consecuencia del desarrollo de bacterias que han colonizado las superficies musculares. La primera fase de la colonización y desarrollo consiste en la adherencia de las bacterias a la superficie que consta de dos etapas. La primera es una adsorción lasa reversible que puede relacionarse con las fuerzas de van der Waals u otros factores fisicoquímicos. La segunda etapa es una adherencia irreversible a las superficies que implica la producción de una capa polisacárida extracelular, conocida como glicocalix (Doyle y cols; 2001).

Otros factores que también influyen en la adherencia celular a las superficies musculares son: tipo de superficie, fase de crecimiento, temperatura y movilidad bacteriana. Se han señalado diferencias en las tasas de adherencia de algunas cepas bacterianas. Se ha visto que las especies de *Pseudomonas*, comparadas con otras bacterias alterantes, se adhieren más rápidamente a las superficies (Doyle y cols; 2001).

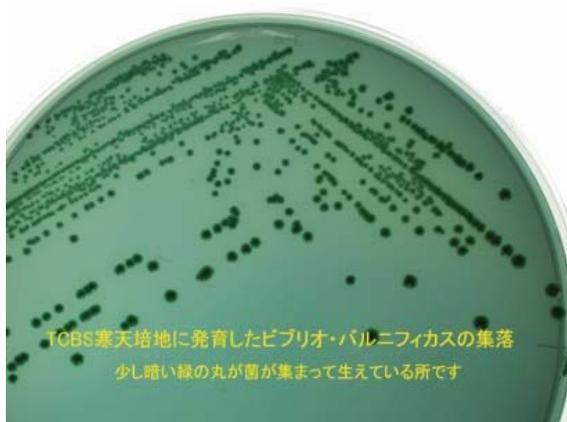
2. 3. Vibriones

Los vibriones se encuentran entre las bacterias más comunes de aguas poco profundas en todo el mundo. Son bacilos aerobios curvos, móviles con flagelos polares envainados. Las células, catalasa-positiva y oxidasa-positiva son anaerobias

facultativas y capaces de metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. El cloruro sódico estimula el crecimiento de todas las especies y para algunas es una necesidad estricta (Adams y col., 1997; Brook y cols., 2002 y Jawetz y cols., 1985).

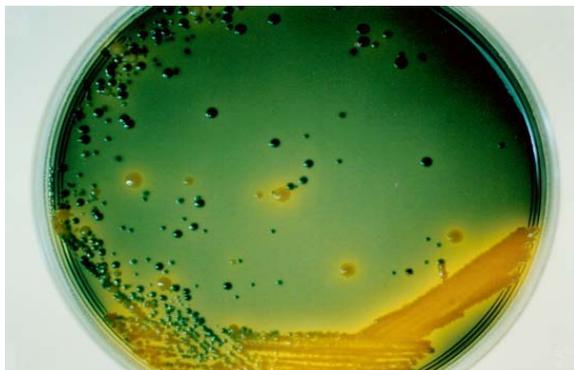
El género comprende doce especies que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos, la mayoría de las cuales son causadas por *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus*. Algunas especies se asocian principalmente con enfermedad gastrointestinal: *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*; mientras otras pueden causar enfermedad no intestinal, como septicemia: *V. vulnificus* (<http://www.fao.org/docrep/008/ae521s/ae521s07.htm#TopOfPage>).

Figura 1. *Vibrio vulnificus*



Fuente: www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/vulnificus.html

Figura 2. *Vibrio parahaemolyticus*



Fuente: idsc.nih.go.jp/.../k00-g45/k00_49/k00_49.html

Figura 3. *Vibrio cholerae*



Fuente: www.microbes-edu.org/.../diag/vibiro.html

2. 3. 1. Aislamiento

Para el aislamiento de vibrios han sido descritos varios caldos de enriquecimiento, con frecuencia asociados con el agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) o con otros medios para siembra en placa. Empleando sacarosa como rasgo diferenciador, en el agar TCBS, los 12 vibrios patógenos humanos pueden ser divididos en siete que generalmente son sacarosa-positivos. La mayoría de los vibrios crecen bien en agar TCBS, aunque *V. hollisae* muestra un crecimiento muy escaso o no crece en este medio, que también es el caso de *V. damsela* cuando se incuba a 37 °C. Además, la determinación de la actividad oxidasa, una prueba decisiva para diferenciar los vibrios de las Enterobacteriaceae, puede dar resultados erróneos cuando se toman las colonias del agar TCBS. Por esta razón, las colonias sacarosa-positivas en el agar TCBS deben ser subcultivadas mediante inoculación masiva en un medio no selectivo, por ejemplo en agar-sangre, y se deben dejar crecer durante un tiempo de 5 a 8 horas antes de realizar la prueba oxidasa (Doyle y cols., 2001, Adams y Moss, 1997).

2. 3. 2. Sensibilidad a los tratamientos físicos y químicos

Con la excepción de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, se sabe relativamente poco acerca de la sensibilidad a los métodos de conservación de los alimentos de cualquiera de los vibrios. Aquí están resumidos algunos estudios para los distintos vibrios.

2. 3. 2. 1. Frío

Si bien los informes han indicado que los vibrios son sensibles al frío, también se ha indicado que los mariscos son protectores para los vibrios a temperaturas de refrigeración. Wrong *et al.* aislaron varias cepas psicrófilas de *V. mimicus*, de *V. fluvialis* y de *V. parahaemolyticus* en mariscos congelados y averiguaron que los organismos de estas especies sobreviven perfectamente a 10,4 y -30 °C. Se ha indicado que *V. parahaemolyticus* experimenta un descenso inicial rápido de la supervivencia (99% aprox.) cuando se incubaba en camarón entero a 3,7, 10 ó -18 °C, aunque quedaron supervivientes al final de una experiencia que duró 8 días. También se ha observado que *V. parahaemolyticus* sobrevive al almacenaje en las ostras provistas de concha durante por lo menos 3 semanas a 4 °C y que posteriormente se multiplica después de incubación a 35 °C durante 2 a 3 días. De modo parecido, las células de *V. parahaemolyticus* fueron reducidas en el desmenuzado de pescado cocido y en el surimi a 5 °C durante 48 horas, pero hubo crecimiento cuando el producto era mantenido a 25 °C. A las temperaturas de refrigeración de 4 y 8 °C que se emplean habitualmente, Hood *et al.* descubrieron que los organismos de *V. vulnificus* aumentan en número, mientras que a temperatura de no refrigeración (20 °C) tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* mostraron aumentos importantes. Observaciones parecidas han sido indicadas por lo que se refiere a *V. vulnificus* en las ostras almacenadas a 18 °C o a temperaturas más elevadas. Estos estudios indican claramente que los vibrios que existen de modo natural son capaces de multiplicarse en las ostras no enfriadas provistas de concha (Doyle y cols., 2001).

2. 3. 2. 2. Calor

La totalidad de los vibrios son sensibles al calor, aunque ha sido indicada una gran variedad de porcentajes de inactivación térmica. Los tiempos de inactivación de 15 a 30 min a 60 °C y de 5 min a 100 °C parecen típicos, aunque se ha indicado que la inactivación térmica es influida por los niveles de NaCl. Cook y Rupple hallaron que los tiempos de reducción decimal a 47 °C eran de promedio 78S para las 52 cepas de *V. vulnificus* examinadas. El calentamiento a fondo del marisco para proporcionar una temperatura interna al menos de 60 °C durante varios minutos parece ser suficiente para eliminar vibrios patógenos. Cook y Rupple indicaron que el calentamiento de las ostras durante 10 min. en agua a 50 °C era suficiente para reducir las poblaciones de *V. vulnificus* a niveles no detectables (Doyle y cols., 2001).

2. 3. 2. 3. Irradiación

Se ha indicado que son necesarias dosis de 3 kGy de irradiación gamma para eliminación de vibrios en el camarón congelado. Se han utilizado niveles elevados (>50krad) de Co⁶⁰ para eliminar *V. cholerae* en las ancas de rana, tanto en las frescas como en las congeladas. También ha sido estudiado el uso de la radiación ionizante para reducir los niveles de *V. vulnificus* en las ostras provistas de concha con una dosis de 1 kGy que produce una reducción de más de 5 ciclos logarítmicos, sin mortalidad alguna en las ostras (Doyle y cols., 2001).

2. 3. 2. 4. Polifosfatos

Se ha demostrado que los polifosfatos calentados o no calentados son letales o sumamente inhibidores para una gran variedad de patógenos transmitidos por los alimentos. Sin embargo, se ha indicado que la inhibición por polifosfatos varía en función de la especie de vibrio y del tipo de polifosfatos. Averiguaron que, a la temperatura de 4 °C, *V. parahaemolyticus* es protegido significativamente por el metafosfato calentado, mientras que el pirofosfato era inhibidor a la temperatura de -30

°C. Nosotros hemos observado que el tripolifosfato al 1% no ejerce efecto letal alguno sobre *V. vulnificus* (Doyle y cols., 2001).

2. 3. 2. 5. Inhibidores diversos

Se ha informado acerca de los efectos bactericidas contra *V. parahaemolyticus* de una gran diversidad de especias desecadas, de los aceites de varias hierbas, de la salsa de tomate, y de varios ácidos orgánicos, y se ha averiguado que algunas de estas sustancias son sumamente tóxicas en niveles bajos. De modo parecido, se ha indicado que *V. vulnificus* es inactivado totalmente cuando esté expuesto a varios jugos de frutas o de hortalizas y a una gran diversidad de extractos de especias. *V. parahaemolyticus* es muy sensible a una concentración de hidroxianisol butilado (BHA) tan insignificante como 50 ppm y es inhibido por el ácido sórbico al 0.1%. De 10 productos generalmente reconocidos como inocuos ensayados contra *V. vulnificus*, se comprobó que eran inhibidores solamente el ácido láctico y el diacetilo cuando se hallaba presente en las ostras provistas de concha. Los estudios acerca del efecto del pH sobre la viabilidad de los vibrios indican que estos organismos son sumamente acidosensibles, aunque se ha informado del crecimiento de *V. parahaemolyticus* en medios con un pH de valor tan bajo como 4,8 (Doyle y cols., 2001).

2. 3. 2. 6. Depuración

La depuración, en la que se deja que los vivaldos que se alimentan por filtración se purifiquen por sí mismos mediante bombeo de agua exenta de bacterias a través de sus tejidos, es de valor considerable para eliminar bacterias contaminantes como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. Sin embargo, los muchos estudios que en la actualidad se han acumulado sobre la depuración de las ostras y de las almejas demuestran claramente que este método, por sí mismo, ofrece una expectativa escasa para reducir significativamente la microflora de *Vibrio* que se encuentra de modo natural en estos animales (Doyle y cols., 2001).

2. 4. *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus es un microorganismo marino, halofílico, se aísla con mayor frecuencia durante los meses de verano, cuando el agua de mar tiene las mejores condiciones de salinidad y temperatura para su crecimiento. Se ha aislado de cultivos de agua salada, animales, fitoplancton y sedimento marino. Se ha observado contaminación por *V. vulnificus* en los mariscos crudos procedentes del Golfo de México y de los océanos Atlántico y Pacífico. En las ostras y en las almejas se aísla con mayor frecuencia que en los productos de crustáceos. El Organismo no es aislable en los ambientes fríos de los estuarios durante los meses de invierno, y parece que esto es debido a la existencia de formas viables no cultivables (Jay, 2002, Cornejo-Juárez y cols., 2000 y <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap10.html>).

Es una bacteria que vive libremente en los estuarios y en EUA se encuentra en las costas del Atlántico, del Golfo de México y del Pacífico. Este microorganismo es el más grave en los Estados Unidos, responsable del 95% de todas las muertes relacionadas con el consumo de marisco. Con arreglo a los cálculos de los CDC y de la FDA, anualmente hay 50 casos de enfermedad por *V. vulnificus* producida por alimentos lo suficientemente grave como para ser identificada por el personal de los hospitales, aunque han sido calculadas cifras totales desde 17,000 hasta más de 41,000 casos. El *V. vulnificus* puede causar infección grave en heridas, bacteriemia y gastroenteritis. Las infecciones de heridas tienen un porcentaje de mortalidad del 20 al 25%, también están relacionadas con el agua de mar y/o con el marisco, y generalmente requieren el desbridamiento quirúrgico del tejido afectado o la amputación (Brook y cols., 2002 y Doyle y cols., 2001).

2. 4. 1. Clasificación

El primer estudio taxonómico detallado de esta especie fue de los investigadores en los CDC, quienes en 1976 describieron 38 cepas enviadas por clínicos de todas las partes de los Estados Unidos. En 1982, fue descrito un segundo biotipo de *V. vulnificus* que

puede ser diferenciado fácilmente del biotipo 1 por su reacción negativa del indol. Las cepas del biotipo 2 son la cusa principal de muertes en las anguilas y, aunque por lo general no se consideran patógenas para las personas, se ha indicado que conducen a la infección humana. Está admitido perfectamente que existe una variación considerable en los rasgos fenotípicos atribuidos a *V. vulnificus*, que incluyen la fermentación de la lactosa y de la sacarosa, que son considerados entre los más importantes para identificar esta especie (Doyle y cols., 2001).

2. 4. 2. Sensibilidad a factores ambientales

Cook y Ruple determinaron que las células de *V. vulnificus* que existen de modo natural en las ostras experimentan una inactivación dependiente del tiempo cuando las ostras provistas de concha son mantenidas a 4,0 o a -19 °C. Cook averiguó que, después de la recolección, *V. vulnificus* no crecía en 30 horas en las ostras provistas de concha almacenadas a 13 °C o a temperaturas inferiores a ésta, mientras que el patógeno crecía cuando las ostras se mantenían a 18 °C o a temperaturas superiores a ésta durante 12 ó 30 horas (Doyle y cols., 2001).

En respuesta a un informe según el cual *V. vulnificus* podía ser destruido aplicando salsas de cóctel o de Tabasco a las ostras crudas, se determinó la sensibilidad de esta especie a una salsa comercial a base de rábano picante y a la salsa de Tabasco era sumadamente eficaz para reducir el número de células de *V. vulnificus* existentes en la superficie de la carne de ostra, había poca reducción de vibrios en las ostras por cualquiera de las dos salsas. También se ha informado acerca de la actividad bactericida *in vitro* de una diversidad de compuestos generalmente reconocidos como inocuos contra *V. vulnificus*. Aunque se dice que varios de ellos son capaces de destruir las células de *V. vulnificus* en niveles bajos, solamente el diacetilo tuvo algunos efectos significativos *in vivo* contra esta especie cuando se hallaba presente de modo natural en las ostras (Doyle y cols., 2001).

2. 4. 3. Reservorios

V. vulnificus está ampliamente difundido en los estuarios, habiéndose aislado en el Golfo, en el este y en las costas del Pacífico de los Estados Unidos y en todas partes del mundo. Encontrándose principalmente en ostras, almejas y cangrejos (Brook y cols., 2002; Doyle y cols., 2001; Jay, 2002 y <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoyvibs.html>).

También se ha informado el aislamiento de *V. vulnificus* en peces; recientemente se ha descrito su aislamiento en el tracto intestinal de peces de la costa que se alimentan del fondo y se cree que estos peces pueden representar un reservorio importante de esta especie (Doyle y cols., 2001).

Ha sido observada una correlación firme entre la temperatura del agua y éste microorganismo, que concuerda con los estudios epidemiológicos sobre infecciones producidas por *V. vulnificus*. Aparentemente hay una extinción de esta especie durante los meses de tiempo frío, según las investigaciones en las que se ha considerado la estacionalidad y la incapacidad para aislar al microorganismo. En la actualidad, esto se atribuye a un estado viable no cultivable inducido por el frío, en el que las células siguen siendo viables pero ya no son cultivables en los medios de rutina que normalmente se emplean para su aislamiento (Doyle y cols., 2001; Jay, 2002; <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoyvibs.html> y www.cdc.gov/node.do/id/0900f3ec8000771d-18k).

2. 4. 4. Factores de riesgo y características de la enfermedad

Aunque no puede presentar peligros para la vida de la mayoría de la gente sana, los síntomas de la infección del *V. vulnificus* pueden ocurrir dentro de las 24 a 48 horas del consumo y pueden incluir escalofríos repentinos, fiebre, náusea, vómitos, diarrea, conmoción cerebral y lesiones en la piel. En el caso de ciertas enfermedades como cáncer, diabetes o enfermedades del hígado, la muerte puede ocurrir en el plazo de dos días. Una persona que tenga cualquiera de estos síntomas después de comer ostiones

crudos debe recibir atención médica inmediatamente (www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoyvibs.html).

Ciertas enfermedades elevan los riesgos de padecer lesiones graves o incluso morir a causa de infecciones con el *V. vulnificus*. Algunas de estas enfermedades pueden presentarse sin síntomas, por lo que las personas pueden no saber que corren riesgos. Se recomienda consultar a un médico si no está seguro de sus riesgos. Las infecciones con el *Vibrio vulnificus* en personas de alto riesgo tienen una tasa de mortandad del 50% (Torres y Castillo, 2002, www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoyvibs.html). Estas enfermedades incluyen:

- Enfermedad del hígado (a causa de hepatitis, cirrosis, alcoholismo o cáncer)
- Enfermedad de la sobrecarga de hierro (hemocromatosis)
- Diabetes
- Cáncer (incluyendo linfomas, leucemia, enfermedad de Hodgkin)
- Trastornos del estómago
- Cualquier enfermedad o tratamiento médico que debilite el sistema inmunológico del cuerpo, incluyendo infección del VIH (SIDA).

V. vulnificus ha sido asociado con septicemia primaria en individuos con enfermedades crónicas preexistentes después del consumo de bivalvos crudos. Ésta es una enfermedad grave, por lo general mortal. Hasta la fecha, la enfermedad causada por *V. vulnificus* se ha asociado casi exclusivamente con ostras. Recientemente, se han asociado las infecciones por *V. vulnificus* con una variedad de productos marinos crudos de Corea y Japón (Doyle y cols., 2001, www.fao.org/docrep/008/ae521s/ae521s07.htm#TopOfPage).

2. 4. 4. 1. Septicemia primaria

El período de incubación es, en promedio, de 16 a 38 horas, aunque puede variar desde 7 horas hasta varios días. Los síntomas más significativos incluyen fiebre,

escalofríos, náuseas e hipotensión. Un síntoma poco frecuente es el desarrollo de lesiones secundarias, las cuales aparecen usualmente en las extremidades y con frecuencia se convierten en zonas necróticas, el tejido afectado muestra una marcada vasculitis necrosante en la piel y músculos con inflamación aguda, frecuentemente se requiere debridamiento quirúrgico o amputación (Torres y Castillo, 2002, docum.azti.es/RIESGOS.nsf/0/4c3935cd902aae43c1256ad10050163b?OpenDocument)

Los pacientes más susceptibles a desarrollar septicemia primaria son aquellos con padecimientos hepáticos o desorden en las células sanguíneas. Otros factores de riesgo que han sido asociados con la septicemia primaria incluyen desórdenes hematopoyéticos, daño renal crónico, enfermedad gástrica, inmunosupresión y el consumo de alcohol mayor a una onza por día. El tiempo en que sobreviene la muerte en este tipo de pacientes varía de 2 a 24 horas, aunque en algunos casos puede tardar algunos días. Muchos de estos pacientes mueren aun después de haber recibido tratamiento con una amplia variedad de antibióticos como tetraciclinas, minociclina, cefalosporinas de tercera generación y carbapanem (Torres y Castillo, 2002, Murray y cols., 1992, Liu and cols., 2006).

Aunque se han reportado casos en niños, la septicemia primaria ocurre principalmente en personas mayores de 50 años, con mayor susceptibilidad del sexo masculino (81%). La dosis infectante necesaria para la manifestación de síntomas gastrointestinales en individuos sanos no se conoce, aunque algunos autores reportan valores de 1,000 células/g de alimento. En personas especialmente susceptibles, la septicemia puede ocurrir en dosis menores a 100 células (Torres y Castillo, 2002).

2. 4. 4. 2. Infección de heridas

Estas pueden ser el resultado de la infección de una herida abierta ya existente, por contacto en agua de mar en la cual este presente *V. vulnificus* o por laceración de alguna parte del cuerpo con un coral, por la mordedura de algún pez, etc., que permiten el ingreso del patógeno. Otra forma de contaminación con este microorganismo ocurre

por cortaduras durante la manipulación de mariscos contaminados con el patógeno cuando se preparan los alimentos. Una vez que la bacteria ingresa en una herida, los síntomas inician rápidamente. El período de incubación es de 4 a 12 horas, los primeros síntomas incluyen dolor intenso, eritema y edema en el sitio de la lesión. Las erupciones en la piel frecuentemente están delimitadas por una zona azul-morada, esta coloración puede difundir hasta cubrir grandes áreas en los días siguientes. Este progresivo proceso necrosante involucra tejido subcutáneo y la fascia muscular, acompañado de una severa toxicidad sistémica, o celulitis con una severa inflamación del tejido subcutáneo que se extiende hasta el músculo esquelético con intenso daño tisular. Los dos procedimientos quirúrgicos utilizados para detener el avance de la infección son, en primer lugar, la debridación del tejido necrosado alrededor de la herida, seguido frecuentemente de la amputación del miembro afectado, según el Departamento de Salud, el índice de mortalidad de este tipo de padecimiento varía del 22 al 40% (Torres y Castillo, 2002, www.fao.org/docrep/008/y8145s/y8145s08.htm, Murray y cols., 1992).

2. 4. 5. Medidas de control

La principal causa de septicemia primaria es el consumo de productos marinos crudos o insuficientemente cocidos, por lo tanto la principal medida de control es evitar que personas sensibles a contraer esta enfermedad consuman este tipo de alimentos (www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibriovulnificus_g.htm).

Como medidas para prevenir la infección por *V. vulnificus*, se mencionan las siguientes:

- 1 Evitar el consumo de ostiones y otros mariscos crudos.
- 2 Someter a una cocción vigorosa los mariscos (ostiones, almejas, mejillones).
- 3 Para mariscos en su concha: a) hervir hasta la apertura de la concha y continuar la ebullición durante cinco minutos más o b) en corriente de vapor hasta la apertura de la concha y continuar la cocción por nueve minutos más. No consumir aquellos mariscos que no abran durante la cocción. Hervir el ostión

desconchado por lo menos tres minutos, o freírlos en aceite al menos 10 minutos a 190 °C.

- 4 Evitar la contaminación cruzada de alimentos marinos cocidos con los crudos.
- 5 Consumir los ostiones y refrigerar el sobrante.
- 6 Evitar la exposición de heridas abiertas al agua salada, o a los mariscos crudos que se cultivan en esas aguas.
- 7 Es recomendable utilizar guantes cuando se manipulen productos marinos crudos (Torres y Castillo, 2002).

2. 5. Pruebas bioquímicas

a) Prueba de la oxidasa

Principio: Determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana (MacFaddin, 1984)

Bases bioquímicas: El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica (MacFaddin, 1984).

Reactivos: Existen varias opciones de reactivos para la oxidasa:

1. Reactivo de Kovacs: Diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%.
2. Reactivo de Gordon y McLeod: Diclorhidrato de dimetil-*p*-fenilendiamina (denominado también *N*-dimetil-*p*-fenilendiamina o monoclóhidrato de -*p*-aminodimetilanilina).
3. Reactivo de Nadi: Una mezcla por partes iguales de α -naftol al 1% en alcohol etílico (etanol) de 95° y aminodimetilanilina al 1%.
4. Reactivo de Carpenter, Suhrland y Morrison: Oxalato de -*p*-aminodimetilanilina al %.
5. Discos impregnados con oxidasa (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Colonias oxidasa positivas: Toman un color rosado (colonias viables), después marrón y finalmente negro (bacterias no viables).
- Colonias oxidasa negativas: No se produce cambio de color en las colonias, o sólo adquieren un color rosado pálido por el reactivo. Puede producirse una coloración negra del medio circundante.
- Si se emplea el reactivo de Kovacs, la reacción oxidasa positiva está indicada por un color negro purpúreo que se desarrolla en el término de 10 seg. (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993)

b) Prueba de la catalasa

Principio: Comprobar la presencia de la enzima catalasa (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Tanto las catalasas como las peroxidases entran en la clasificación enzimática general de hidropoxidases. La catalasa es una hemoproteína; el grupo prostético está formado por cuatro átomos de hierro trivalente por molécula que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática. El peróxido de hidrógeno se forma como un producto Terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. La flavoproteína reducida reacciona directamente con el oxígeno gaseoso por medio de la reducción de electrones, para formar peróxido de hidrógeno, y no por acción directa entre el hidrógeno y el oxígeno molecular. El peróxido de hidrógeno, si se deja acumular, es tóxico para las bacterias y provoca su muerte. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno u oxida los sustratos secundarios, sin embargo, no tiene acción contra otros peróxidos (MacFaddin, 1984).

Reactivos

1. Peróxido de hidrógeno, 30% (superoxal).
2. Buffer fosfato (M/15), pH:7.
3. Twen 80, 10% (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de O₂).
- Prueba negativa: no hay cambio, no se forman burbujas (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

c) Prueba del indol

Principio: Determina la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa. El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol e indolacético. El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico, del cual puede formarse indol por desaminación, y escatol por descarboxilación del ácido indolacético (MacFaddin, 1984).

Reactivos

1. Reacción del indol de Ehrlich.
2. Reacción del indol de Kovacs (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
- Prueba negativa: no se produce color en la capa alcohólica; toma el color del reactivo de Kovacs o de Ehrlich (amarillo).
- Variable: un color anaranjado en la superficie del medio debido a desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser un precursor de la formación de indol (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

d) Prueba del citrato

Principio: Determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando una alcalinización del medio (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: Este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente y azul de bromotimol como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul en el pico de flauta (prueba positiva), será prueba negativa si no se observa ningún cambio de color (verde) (MacFaddin, 1984).

Algunas bacterias pueden suministrar energía de fermentación o producción de ácido láctico, empleando el citrato como única fuente de carbono. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo del ácido tricarboxílico o el ciclo de fermentación del citrato. Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio. Si el pH aumenta, se producen más acetato y formato, con una disminución de la producción de lactato y CO₂. Con un pH ácido, el acetilmetilcarbinol (acetoína) y el lactato son los principales productos de utilización del citrato. El primer paso de la fermentación del citrato da por resultado la producción de piruvato. La degradación del piruvato depende, entonces del pH del medio (MacFaddin, 1984).

Medios empleados

1. Medio de citrato de Simmons, pH: 6.9.
2. Tiras para la prueba del citrato impregnadas con reactivo (Pathotec) (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Medio de citrato de Simmons.

Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.

Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (verde)

- Medio de citrato de Christensen.

Prueba positiva: color rojo rosado en el pico de flauta.

Prueba negativa: no se observa cambio de color (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

e) Prueba de licuefacción de la gelatina

Principio: Determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas tipo proteolítico (gelatinazas) que licuan la gelatina (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: Se incorpora gelatina a diversos medios, para determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico que, a su vez, son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Estas enzimas, que son capaces de gelatinólisis, se denominan gelatinazas. Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero debe ser catabolizada en componentes más pequeños. Las enzimas exocelulares de tipo proteolítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas, y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana. El catabolismo de las proteínas por las gelatinasas es un proceso en dos etapas, y el resultado final de una mezcla de aminoácidos individuales (MacFaddin, 1984)

Medios empleados

1. Medio de gelatina de Kohn, muy recomendado.
2. Medio de gelatina nutritiva para punción, pH: 6.8.
3. Medio de gelatina con tioglicolato, pH: 7. (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Medio de gelatina de carbón de Kohn.

Positivo: Las partículas de carbón se depositan en el fondo del tubo. Agitar suavemente el tubo para que las partículas vuelvan a suspenderse, presentándose como una nube negra visible.

Negativo: Mezcla de gelatina con carbón intacta. No se observan partículas libres de carbón en el medio.

- Medio de gelatina nutritiva para punción o medio con tioglicolato.

Positivo: medio licuado.

Negativo: el medio se mantiene sólido (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

f) Pruebas con agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

Principio: Determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (H₂S) (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: El agar hierro de Kligler (AHK) y el agar hierro triplemente azucarado (AHTA) son medios diferenciales en tubo que sirven a un doble fin: determinación de las fermentaciones de los hidratos de carbono, y determinación de la

producción de ácido sulfhídrico. El medio AHK puede sustituirse por AHTA, la diferencia es el agregado de un tercer hidrato de carbono, sacarosa, pero los fundamentos bioquímicos son los mismos y por eso sólo trataremos con detalle el AHK. En el medio AHK. Algunos organismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono. La fermentación del hidrato de carbono puede producirse con producción o no de gases. La fermentación se produce aeróbicamente y anaeróbicamente. En el pico de flauta, el monosacárido glucosa es catabolizado por el medio del ciclo anaeróbico de Embden-Meyerhof, para dar el intermediario clave, ácido pirúvico. A su vez, este ácido es degradado por medio del ciclo de Krebs, por los aerobios o anaerobios facultativos, para dar CO₂, H₂O y energía. Ambos ciclos comprenden etapas en serie que producen intermediarios; en cada etapa intervienen enzimas específicas (MacFaddin, 1984).

Se han observado tres formas básicas de fermentación en el medio AHK: fermentación de la glucosa solamente, fermentación tanto de la glucosa como de la lactosa, y no fermentación de la glucosa ni de la lactosa (MacFaddin, 1984).

Medios empleados

1. Agar hierro triplemente azucarado.
2. Agar hierro de Kligler, pH: 7.4 (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Fermentación de la glucosa.
Pico de flauta: color rojo (reacción alcalina).
Capa profunda: color amarillo (reacción ácida).
- Fermentación, tanto de la glucosa como de la lactosa.
Pico de flauta: color amarillo (reacción ácida).
Capa profunda: color amarillo (reacción ácida).

-
- No fermentación de la glucosa ni de la lactosa.

Pico de flauta: color rojo (reacción alcalina).

Capa profunda: organismo aeróbico, no se observa cambio de color y organismo facultativo es color rojo.

- Producción de gas: se manifiesta por burbujas en el medio o una sola burbuja.
- Producción de ácido sulfhídrico (H_2S): se manifiesta por un color negro distribuido por toda la capa profunda, o un anillo negro cerca de la parte superior de la capa profunda, así como también por un precipitado negro (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN,2004, NOM-031-SSA1-1993).

g) Prueba del rojo de metilo

Principio: Comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del pH); algunos organismos producen más ácidos que otros (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: La prueba del rojo de metilo (RM) se basa en el empleo de un indicador del pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno presente cuando un organismo fermenta la glucosa. En el caldo RM/Voges-Proskauer (VP), después de 18 a 24 h de incubación, la fermentación resultante da productos secundarios metabólicos ácidos; por lo tanto, inicialmente todos los entéricos darán una reacción positiva con el rojo de metilo. Después de más tiempo de incubación como lo exige la realización de la prueba, aquellos organismos que son rojo de metilo positivos continúan produciendo más ácidos, y dan como resultado un bajo pH terminal, venciendo al sistema amortiguador de fosfato, y manteniendo un medio ácido. Los organismos rojo de metilo negativos continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación por descarboxilación, produciendo acetilmetilcarbinol neutro, lo que da un elevado pH terminal que disminuye la acidez del medio elevando el pH hacia la

neutralidad. La validez de la prueba del rojo de metilo depende de un tiempo de incubación suficiente como para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa (MacFaddin, 1984).

Medio empleado

1. Medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP), pH: 6.9 (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Reactivo empleado

1. Indicador del pH rojo de metilo (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Prueba positiva: el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo (pH: 4.4) en la superficie del medio.
- Prueba negativa: color amarillo (pH: 6) en la superficie del medio.
- Reacción retardada: color anaranjado. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir la prueba (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

h) Prueba de la motilidad

Principio: Determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles. Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie

bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos (MacFaddin, 1984).

Medio empleado

1. Medio para la prueba de motilidad (semisólido).
2. Medio de motilidad con sal de tetrazolium (CTT) (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Medio de motilidad.

Prueba positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad.

Prueba negativa: crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra, el medio se mantiene claro.

- Medio de motilidad con sal de tetrazolium (CTT).

Prueba positiva: los organismos móviles muestran una nubosidad turbia rosada que se difunde por todo el medio.

Prueba negativa: el crecimiento bacteriano produce una línea rojo brillante limitada a seguir la línea de siembra, el medio que la rodea se mantiene claro (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

i) Reacción de la ureasa

Principio: Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar

este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza, dando carbonato de amonio como producto final. La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Existen dos grandes divisiones de las enzimas: hidrolasas, que están vinculadas con la hidrólisis de los esterres, hidratatos de carbono, proteínas y amidas; y las que están relacionadas con diversas reacciones de oxidación-reducción (MacFaddin, 1984).

En el caso de la ureasa, el nitrógeno es dissociado en amoníaco (NH_3). La ureasa actúa sobre los enlaces C-N del compuesto, con excepción de los que contienen enlaces peptídicos. El pH óptimo para la actividad de la ureasa es 7 (MacFaddin, 1984).

Medios empleados

1. Caldo de urea de Rustigian y Stuart, pH: 6.8.
2. Agar urea de Christensen, pH: 6.8 (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Caldo de urea de Stuart.

Reacción positiva: color rosado intenso en todo el caldo

Reacción negativa: no se produce ningún color (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

j) Reacción de Voges-Proskauer

Principio: Determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: La reacción de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias (MacFaddin, 1984).

Medio empleado

1. Medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP), pH: 6.9 (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Reactivos empleados: reactivos VP de Barritt

1. α -naftol, 5 %, intensificador del color.
2. Hidróxido de potasio (KOH), 40 %, agente oxidante (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Reacción positiva: color rojo rosado en la superficie del medio.
- Reacción negativa: color amarillo en la superficie del medio. Puede formarse un color cobrizo pero aun así la reacción es negativa (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

k) Pruebas de fermentación de los hidratos de carbono

Principio: Esta prueba determina la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido con gas visible (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: Los hidratos de carbono se clasifican como: monosacáridos, aldehídos polihidroxílicos, cetonas; polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos; o alcoholes polihídricos y ciclitoles (inositoles), productos de la reducción de los monosacáridos. Los polisacáridos, trisacáridos y disacáridos son demasiado complejos para entrar en una célula bacteriana para su degradación. Si pueden ser metabolizados por una especie bacteriana determinada, primero son catabolizados en monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares de manera que puedan penetrar en la célula. La fermentación de sustratos orgánicos como los carbohidratos dan tanto productos finales reducidos como oxidados. El tipo de productos finales producidos por la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores: el tipo de organismo que lleva a cabo el proceso de fermentación; la naturaleza del sustrato que debe ser fermentado, y a veces, los factores ambientales como la temperatura y la acidez. Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono y los alcoholes denominados colectivamente azúcares, son pocos: dos gases, hidrógeno y anhídrido carbónico; algunos pocos ácidos; algunos alcoholes, y una cetona. El ciclo de fermentación que produce como producto final el ácido láctico es el proceso de fermentación más difundido. Con la utilización de las pruebas con los hidratos de carbono podemos obtener modelos de fermentación de una determinada especie bacteriana observando: la ausencia de glucósidos, y/o la ausencia de monosacáridos en disacáridos, trisacáridos y polisacáridos más complejos, que muestran que la glucosa ha sido metabolizada. Por medio del proceso de fermentación, un hidrato de carbono es degradado y descompuesto en dos moléculas de carbono triosas que son nuevamente degradadas en un número de compuestos de 1, 2, 3 y 4 carbonos. Los productos finales varían con cada especie bacteriana, y depende del sistema enzimático existente en la especie y

las condiciones del medio ambiente. Existen distintas clases de fermentación producida por las bacterias, y cada una depende de los productos finales característicos formados (MacFaddin, 1984).

Medios empleados

1. Caldo básico rojo de fenol, pH: 7.4.
2. Medio básico semisólido con rojo de fenol, pH: 7.5 (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Medio de caldo con hidratos de carbono y rojo de fenol.

Positivo: ácido, pH: 6.8, color amarillo, producción de gas; se observan burbujas o una sola burbuja de gas en el tubo.

Retardada: color anaranjado.

Negativa: alcalina, color rosa-rojizo.

- Medios semisólidos de hidratos de carbono con rojo de fenol.

Positiva: ácida, pH: 6.8, color amarillo, producción de gas variable; se forman burbujas en todo el medio, separación de l medio y la pared del tubo o una sola burbuja; es negativo para gas cuando no hay burbujas ni descomposición del medio.

Retardada: color anaranjado.

Negativa: alcalina, color rosa rojizo, pH: 8.4.

- Medio de calco con hidratos de carbono con indicador del pH de Andrade.

Positiva: ácido, pH: 5.0, rojo rosado, producción de gas variable.

Negativa: alcalina, amarillo a incoloro (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

I) Prueba del ácido sulfhídrico

Principio: Determina si se ha liberado ácido sulfhídrico (H_2S) por acción enzimática, de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro (MacFaddin, 1984).

Bases bioquímicas: La proteólisis de las proteínas da aminoácidos individuales; algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico (H_2S). La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa. Un organismo que produzca H_2S cultivado en un medio orgánico como la peptona, reduce el azufre por hidrogenación, produciendo el gas H_2S . En uno de estos medios, el agar hierro de Kligler, los indicadores del ácido sulfhídrico son una sal, citrato férrico de amonio, y una sustancia química, tiosulfato de sodio. Ambos indicadores deben hallarse presentes, dado que el resultado final es un método en dos etapas (MacFaddin, 1984).

1ª etapa: La bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción que da un sulfito y un sulfato. Este es un proceso de respiración anaeróbica por el cual el átomo de azufre sirve como aceptor de electrones para la oxidación de los sustratos orgánicos. El ácido sulfhídrico es un gas incoloro, y por lo tanto hace falta un segundo indicador para detectar visiblemente su producción (MacFaddin, 1984).

2ª etapa: El gas incoloro H_2S reacciona con una sal pesada, citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro insoluble, sulfuro ferroso. Se determina la producción de ácido sulfhídrico cuando el gas entra en contacto con ciertos metales, plomo, hierro o bismuto, y forma con ellos sulfuros. Para determinar la producción de ácido sulfhídrico debe tenerse en cuenta cuatro factores: el tipo y la disponibilidad de la fuente de azufre; la sensibilidad de la prueba para la detección del H_2S ; el crecimiento de un organismo en un medio básico; la presencia de la enzima productora de H_2S en el organismo que se estudia (MacFaddin, 1984).

Medios empleados

1. Agar hierro de Kligler (AHK).
2. Agar hierro triple azucarado (AHTA).
3. Agar sulfuro-indol-motilidad (SIM): medio semisolido.
4. Agar con hierro y peptona (AHP).
5. Agar con sulfito de bismuto (ASB) (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

Interpretaciones

- Medios en tubo; AHK, AHTA, SIM y APH.

Positivo: se observa ennegrecimiento del medio, siguiendo la línea de inoculación y en toda la capasuperficial.

Negativo: no se observa ennegrecimiento.

- Medio en placa, ASB.

Positivo: colonias negras rodeadas por una zona negro-pardusca en el medio.

Negativo: no hay ennegrecimiento ni reflejo metálico (MacFaddin, 1984, CFSAN, 2006, CFSAN, 2004, NOM-031-SSA1-1993).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1. Muestreo

Se seleccionaron 6 pescaderías de un mercado local donde se recolectaron porciones de 200 g de filete de pescado fresco y picado expendido para la elaboración de ceviche, las muestras fueron transportadas al laboratorio para realizar los análisis correspondientes.

3. 2. Periodo y frecuencia de muestreo

Los muestreos se realizaron durante periodo comprendido del 21 de agosto al 30 de octubre del 2006, la frecuencia de muestreo fue cada 15 días; en la Tabla 1 se pueden observar las fechas de la realización de los muestreos.

Tabla 1. Fechas de muestreo

Meses	Muestreos					
	1	2	3	4	5	6
Agosto	21					
Septiembre		04	18			
Octubre				02	16	30

3. 3. Análisis microbiológicos

Para realizar los análisis microbiológicos se utilizó la metodología establecida en la Norma Oficial Mexicana, publicada en el Diario Oficial de la Federación (NOM-031-SSA1-1993).

3. 3. 1. Preparación de la muestra

Para cada muestra se utilizaron 50 g de pescado picado en 450 mL de agua peptonada alcalina (APW), se licuo para homogeneizar durante 2 minutos a alta velocidad. Se colocaron 250 g de esta dilución en dos recipientes estériles. Se Incubo un recipiente a 35-37 °C y el otro a 42 °C.

3. 3. 2. Aislamiento

Después de la incubación, y sin agitar, se transfirió el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa a una placa de agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) y se sembró por estrías por agotamiento. Se Incubaron durante 24 horas de 35-37° C.

3. 4. Morfología colonial

Se seleccionaron las colonias que crecieron aisladas pigmentadas de color verde o verde azulado, así como también algunas de color amarillo, y se aplicaron por estría para aislar en agar soya tripticasa con sal (al 1% de concentración de NaCl) y se incubaron durante 24 horas a 35-37 °C.

Después se prepararon frotis para teñir por el método de Gram; cuando la morfología colonial fue de bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvos se les realizaron las pruebas de la oxidasa y catalasa como pruebas presuntivas.

3. 5. Identificación de las cepas

3. 5. 1. Pruebas presuntivas

a) Prueba de la oxidasa

Para esta prueba se tomó una asada de la cepa y se colocó en una placa reactiva para oxidasa, para un resultado positivo las colonias deben tomar un color púrpura en los primeros 20 seg. y negativo cuando después de los 20 seg. no toma esta coloración.

b) Prueba de la catalasa

Para realizar la prueba se agregó una gota de H_2O_2 al 3% directamente a una pequeña cantidad de cultivo puro que se transfirió a un cubreobjetos para realizar la prueba. Se observó la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

3. 5. 2. Pruebas bioquímicas

Cabe mencionar que a todos los medios para las pruebas bioquímicas se les adicionó 1% de NaCl, para un desarrollo óptimo de los vibrios, ya que éstos microorganismos son halófilos.

a) Crecimiento en BHI

Para la identificación de cada cepa, se prepararon 5 tubos con el caldo BHI (Infusión cerebro-corazón) para cada una de las siguientes concentraciones 0, 3, 6, 8 y 10% de cloruro de sodio. Se inocularon los tubos y se realizaron dos series de las concentraciones anteriores y una se incubó a 35-37 °C y la otra a 42-44 °C, durante 24 horas, se reportó como positivo si el tubo presenta turbidez en el caldo y negativo si no se presenta ningún cambio.

b) Prueba del indol

Para la realización de esta prueba la bacteria se sembró por picadura hasta el fondo y se incubó durante 24-48 horas a 35-37 °C, en el medio SIM. Se añadieron 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs, es positivo para indol cuando se forma un anillo rojo en la superficie del medio y negativo cuando es amarillo, esto quiere decir que la bacteria no puede degradar el triptófano. Para la producción de H₂S es positivo si se forma un precipitado negro y negativo si el medio de cultivo se queda igual. Para determinar si la bacteria es móvil es positivo si hay difuminación de la bacteria hacia los lados y negativo si sólo crece en la línea de inoculación.

c) Prueba del citrato

Se inocularon tubos con agar citrato de Simmons inclinados por picadura y estría, luego se incubaron durante 24-48 h a 37 °C. Este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente y azul de bromotimol como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul en el pico de flauta (prueba positiva), será prueba negativa si no se observa ningún cambio de color (verde).

d) Prueba de licuefacción de la gelatina

Se utilizaron tubos con gelatina nutritiva e inoculados por picadura y se incubaron a 37 °C durante 24-48 h. Antes de determinar si es positivo o negativo los tubos se ponen en refrigeración por 20 min. La prueba es positiva si resulta el medio licuado y negativo si el medio se mantiene sólido.

e) Prueba con agar hierro triple azúcar

Se sembró por picadura y estrías en tubos con el medio agar hierro de triple azúcar (TSI). Se incubaron de 18 a 24 horas a 35 °C. Se determinó la utilización de la glucosa cuando tomará un color rojo en el pico de flauta y un color amarillo en el fondo del tubo (positivo), para utilización de lactosa y/o sucrosa es positivo cuando se forma un color amarillo en el pico de flauta y en el fondo un color rojo, la prueba es negativa cuando se forma un color rojo en el pico de flauta y también en fondo del tubo.

f) Prueba del rojo de metilo

Se inocularon tubos con caldo RM/VP (medio de Clark y Lubs) y se incubaron a 35-37 °C por 48 horas. Se le agregó a cada tubo 2 a 3 gotas del indicador de rojo de metilo y se agitó, se considera positiva si vira al rojo y negativa si permanece amarillo. Es una reacción retardada si el color es anaranjado, se continúa la incubación hasta 4 días y se repite la prueba.

g) Prueba de la motilidad

Se utilizaron tubos con el medio MIO y se sembraron por picadura. Para la determinación de movilidad se considera positiva cuando existe crecimiento en la punción y en el seno del medio de cultivo y negativo cuando crece solamente sobre la línea de inoculación. Para la descarboxilación de la ornitina se considera positivo cuando ocurre un cambio de color a púrpura en el fondo del tubo y negativo cuando hay un color amarillo en el medio de cultivo. Para indol es positivo si al añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs se forma un anillo de color rojo y negativo si no hay ningún cambio de color.

h) Reacción de la ureasa

Se cultivó el microorganismo en tubos con caldo urea, y se incubó a 35-37 °C de 24-48 horas. La prueba es positiva cuando se produce un color rosa intenso en el caldo y negativa cuando el caldo permanece igual.

i) Reacción de Voges-Proskauer

Para la realización de esta prueba se cultivó el microorganismo en tubos con caldo RM/VP (medio de Clark y Lubs) y se incubó a 35-37 °C durante 24 a 48 horas; se le agregan a los tubos 10 gotas de alfa-naftol 5% y 5 gotas de KOH 40% y se agita la prueba resulta positiva, si antes de cinco minutos aparece un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo (presencia de acetoína). Si la prueba es negativa no aparece coloración alguna (ausencia de acetoína).

j) Pruebas de fermentación de los hidratos de carbono

Se prepararon los tubos con el medio oxidación-fermentación (OF), dos con sacarosa, dos con glucosa y dos con manitol, para cada colonia. Luego se inoculan por picadura, a uno de cada par se le agrega aceite mineral para ver si el microorganismo es fermentador, la prueba es positiva con aceite o sin él cuando el medio cambia a amarillo.

k) Prueba del ácido sulfhídrico

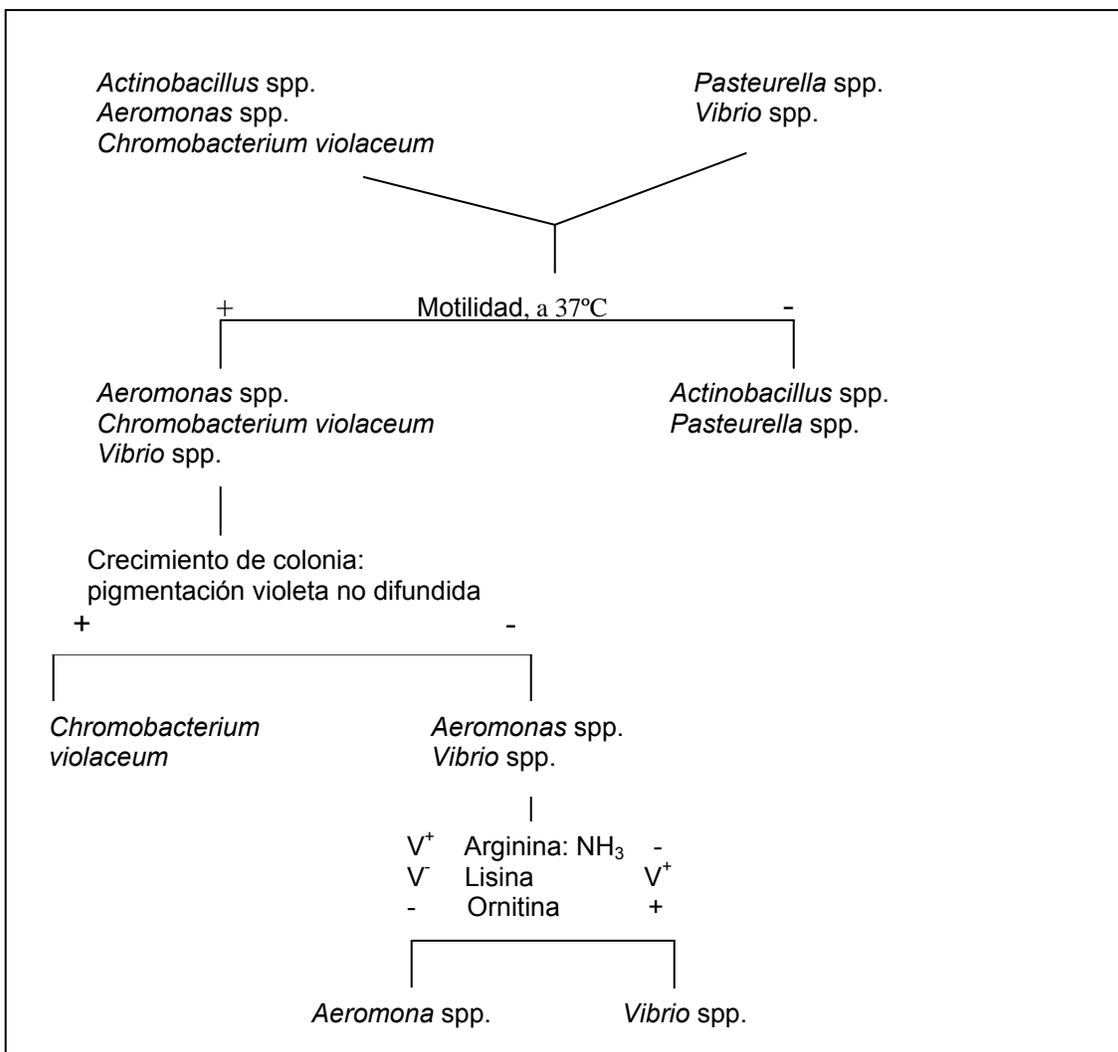
Para esta prueba se utilizó un tubo con agar de hierro triple azúcar (TSI) inclinado, sembrado por picadura y estría. Se incubó de 18 a 24 horas a 35-37 °C, la prueba es positiva si se observa ennegrecimiento en el medio y negativa si el medio no cambia de color.

3. 6. Proceso de identificación

Para la identificación de las especies se siguieron los siguientes pasos:

a) Se realizó una diferenciación de bacilos oxidasa positivos mediante la motilidad, crecimiento y algunas pruebas como la arginina, lisina y ornitina.

Cuadro1. Diferenciación de bacilos gramnegativos (cocobacilos) fermentativos oxidasa positivos que crecen bien en medios de aislamiento comunes.



Fuente: MacFaddin, 1984.

b) Después de haber identificado el tipo de especie, se utilizaron los Cuadros 2, 3 y la Tabla 2, para la identificación de las cepas por medio de pruebas bioquímicas de diferentes especies de *Vibrios* y *Aeromonas*.

Cuadro 2. Diferenciación de especies de *Vibrio*.

Fermentadoras	<i>V. cholerae</i> ¹	<i>V. parahaemolyticus</i> ²
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	+
Hemólisis ASC 5%	γ	γ
Agar Mac Conkey	G ³	G
CLNa 7-10%	V	G ⁴
Caldo libre de sal	G	NG ⁴
Reducción del nitrato	V ⁺	+
O-F glucosa	F	F
Motilidad, a 37°C	+	+
Licuefacción de la gelatina, a 22°C	+	+
Indol	V	+
Citrato de Simmons	V	+
KCN	V	NR
Malonato	-	NR
Gluconato	-	NR
H ₂ S (AcPb)	-	-
Ureasa de Christensen	-	-
Rojo de metilo	V	V
Voges-Proskauer	V	V
Arginina dehidrolasa: NH ₃	-	-
Lisina decarboxilasa	V ⁺	+
Ornitina decarboxilasa	+	+
Fenilalanina deaminasa	-	NR
ONPG	NR	NR
Hidrólisis del almidón	+	+
Lecitinasa	+	+
Reacción rojo-cólera	V ⁺	-
Arabinosa	-	V

Lactosa	A ⁵	-
Inositol	-	-
Manitol	A	A
Manosa	V ⁺	A
Sacarosa	A	V

¹ *Vibrio cholerae* biotipos *cholerae* y *eltor* (vibriosis cholerae) y *proteus* (que no son vibrios cholerae).

² *Vibrio parahaemolyticus* biotipos *parahaemolyticus* y *alginolyticus*.

⁴ Halofílicos ("amantes de la sal").

⁵ Lenta.

γ gamma, A ácido, G crecimiento, NG no se observa crecimiento, F fermentación, NR no se dispone de resultados. V resultados variables, 10-89% en un sentido o en el otro. V⁺ resultados variables, en su mayoría positivos. + 90% o más de resultados positivos, - 90% o más de resultados negativos.

Fuente: MacFaddin, 1984.

Cuadro 3. Diferenciación de especies de *Aeromonas*.

Catalasa positivas Oxidasa positivas Fermentadores	<i>Aeromona hydrophilia</i>¹	<i>Aeromona punctata</i>²	<i>Aeromona salmonicida</i>³
Hemolisis, ASC 5%	V ⁺⁴	γ	β
Agar de Mac Conkey	G	G	G
Reducción del nitrato	+	+	+
Licuefacción de la gelatina, a 22°C	+	+	+
Motilidad, a 37°C	+	+	+
Indol	+	+	V ⁺
Citrato de Simmons	V ⁺	NR	-
SH ₂ (agua de peptona al 2.5 %)	V ⁺	+	V ⁻
Ureasa de Christensen	-	-	-
Rojo de metilo	V ⁺	V	-
Voges-Proskauer	V ⁺	-	V ⁻
KGN	G	G	NG
Arginina: NH ₃	+	V	V
Lisina decarboxilasa	V ⁻	-	V ⁻
Ornitina decarboxilasa	-	-	-
Fenilalanina deaminasa	V ⁻	NR	NR
AHTA	ALK/A, Gas	NR	NR
Gluconato	V ⁺	-	V ⁻
Gas-glucosa	V ⁻	V	V ⁺

Lactosa	V ⁺	A	-
Sacarosa	V	V ⁺	V ⁺
Manitol	A	V ⁺	V ⁺
Dulcitol	-	-	-
Salicina	V ⁻	-	A
Sorbitol	V ⁻	A	-
Arabinosa	V	V ⁺	V ⁺
Inositol	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Rafinosa	-	A	-
Galactosa	V ⁺	A	A

¹ *Aeromonas hydrophilia* tiene la subespecie *hydropila*, ss anaerogenes y ss proteolytica.

² *Aeromonas punctata* tiene las subespecies *caviae* y *ss punctata*.

³ *Aeromonas salmonicida* tiene las subespecies *salmonicida*, *ss masoucida* y *ss achromogenes*.

⁴ β -hemólisis.

γ gamma, β beta, A ácido, G crecimiento, NG no se observa crecimiento, F fermentación, NR no se dispone de resultados. V resultados variables, 10-89% en un sentido o en el otro. V⁺ resultados variables, en su mayoría positivos. V⁻ resultados variables, en su mayoría negativos. + 90% o más de resultados positivos, - 90% o más de resultados negativos. Alk/A alcalino/ácido(rojo/amarillo).

Fuente: MacFaddin, 1984.

Tabla 2 . Características bioquímicas del patógeno humano *Vibrionaceae* comúnmente encontrado en alimentos marinos.

	V. <i>algi-nolyticus</i>	V. <i>cholerae</i>	V. <i>fluvialis</i>	V. <i>furnissii</i>	V. <i>hollisae</i>	V. <i>metschnikovii</i>	V. <i>mimicus</i>	V. <i>parahaemolyticus</i>	V. <i>vulnificus</i>	A. <i>hydrophilia</i> *	P. <i>shigelloides</i> **
Agar TCBS	Y	Y	Y	Y	NG	Y	G	G	G	Y	G
Agar mCPC	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
Agar CC	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA	KK	nd
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Descarboxilación de la Ornithina	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Descarboxilación de la Lisina	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-	-	-
10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec. a 42°C	+	+	V	-	nd	V	+	+	+	V	+
Sucrosa	+	+	+	+	-	+	-	-	-	V	-
D-Celobiosa	-	-	+	-	-	-	-	V	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-

Arabinosa	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V	-
D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
D-Manitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	-
ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	-
10 µg O/129	R	S	R	R	nd	S	S	R	S	R	S
150 µg O/129	S	S	S	S	nd	S	S	S	S	R	S
Gelatinasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-

* Adaptado por Elliot *et al.* (31)

** *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*

Abreviaciones: TCBS, tiosulfato-citrato-bilis sal-sucrosa; mCPC, celobiosa-polimixina B-colistina modificado; AGS, inclinación arginina-glucosa;

Y = amarilla NG = nada o poco crecimiento S = susceptible nd = no se hizo

G = verde R = resistente P = púrpura, V = variable

KK = inclinación alcalina / tope alcalina KA = inclinación alcalina /tope ácido, Ka = inclinación alcalina/ tope ligeramente ácido

Fuente: CFSAN, 2004.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1. Aislamiento e identificación

En la Tabla 3 se muestran las colonias típicas que se encontraron de las 43 colonias aisladas en las muestras de pescado, después de realizar las pruebas presuntivas, resultaron 7 cepas oxidasa (+) y catalasa (+), las cuales se identificaron por pruebas bioquímicas y los resultados se compararon con la bibliografía (Cuadros 1, 2, 3 y Tabla 2).

Tabla 3. Número de colonias típicas de *Vibrio* spp. en las muestras de pescado.

Muestreos	Muestras					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	*1	1	1	*1	1	1
2	1	*1	*1	2	3	1
3	1	2	2	2	2	1
4	3	3	1	1	0	2
5	0	*1	1	*1	0	0
6	1	0	*1+ 1	1	0	1

*Colonias verdes o amarillas, oxidasa (+) y catalasa (+) en agar TCBS.

En la Tabla 4 se pueden observar los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas encontradas, con esto se pudieron establecer las posibles especies en las muestras.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas oxidasa (+) y catalasa (+).

Pruebas bioquímicas		Cepas						
		1	2	3	4	5	6	7
Agar TCBS		A	V	V	V	V	V	V
LIA	H ₂ S	+	-	-	+	-	-	-
	DA	-	-	-	+	-	+	-
	DC	+	-	-	-	-	-	-
Citrato de simmons		-	-	-	+	-	-	-
Gelatina nutritiva		+	-	+	+	+	+	+
Urea		+	+	-	+	+	-	-
Rojo de metilo		-	+	+	-	-	+	+
Vogues Proskauer		-	+	-	-	-	-	-
MIO	M	+	+	+	+	+	+	+
	I	-	-	+	+	-	-	-
	O	+	-	+	+	-	+	-
Malonato		+	-	-	-	-	-	-
SIM	H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+
	I	+	-	+	+	-	-	-
	M	+	+	+	+	+	+	+
OF de glucosa		O-	O+	O+	O+	O+	O+	O+
		F+	F+	F+	F+	F+	F+	F+
OF de manitol		O+	O-	O+	O+	O-	O-	O-
		F-	F+	F+	F+	F+	F+	F-
OF de sacarosa		O+	O+	O+	O+	O-	O-	O+
		F-	F+	F+	F+	F-	F-	F+
TSI	G	-	+	-	+	+	+	+
	L	+	+	+	+	+	+	-
	Gas	+	-	+	-	+	+	+
	H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+

Crec. En BHI incubados a 35-37°C	0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
	3% NaCl	-	+	+	+	+	+	+
	6% NaCl	-	+	+	+	+	+	+
	8% NaCl	-	+	-	+	-	-	-
	10% NaCl	-	-	-	-	-	-	+
Especie presumible		<i>V. cholerae</i>	<i>Aeromona spp.</i>	<i>A. hydrophilia</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Aeromonas spp.</i>

V= cepa verde, A= cepa amarilla, O= Oxidación, F= Fermentación

De las 7 cepas identificadas se encontraron 3 de la especie de *Vibrio spp.* y 4 de la especie de *Aeromonas spp.*, como se puede ver en la Tabla 5. La especie de *Vibrio vulnificus* no se encontró en ninguna de las muestras, aunque si se identificaron bioquímicamente cepas que concordaron con las especies *V. Cholerae*, *V. mimicus* y *Aeromona hydrophila*.

Tabla 5. Prevalencia de los microorganismos encontrados en las muestras analizadas.

Microorganismo	Prevalencia
<i>Vibrio spp.</i>	3 (42,86%)
<i>Aeromona spp.</i>	4 (57,01%)

Según Frazier (2000), la congelación destruye algunos de los microorganismos existentes, aunque no todos, y de aquí que una vez descongelados en los mismos tendrá lugar su multiplicación si se les da tiempo para ello. El pescado contiene una flora de bacterias psicrótrofas, la mayoría de las cuales resisten la congelación y están dispuestas a multiplicarse tras su descongelación, por ejemplo, las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, y *Flavobacterium*.

El pescado utilizado en el ceviche es previamente congelado en la mayoría de los casos antes de ser picado y posteriormente puesto a la venta, este es quizás el principal factor que hace que la especie de *Vibrio vulnificus* se elimine en el producto, ya que este microorganismo es muy susceptible a cambios de temperatura y su

viabilidad se afecta con la refrigeración por debajo de 8,5 °C y fácilmente puede morir (Torres y Castillo, 2002).

Algunos estudios han reportado porcentajes considerables de la presencia de este microorganismo en algunos alimentos, como es el caso del estudio realizado en Chetumal, Quintana Roo que se encontró una prevalencia de 28,57%, en productos marinados sin calor y un 29,49% en alimentos crudos, un estudio similar en Ciudad Obregón, Sonora, reporta una incidencia de 25% de *V. vulnificus* en muestras de papa de mula.

Este microorganismo ha tomado gran importancia en los últimos años por ser asociado a infección en heridas, gastroenteritis y septicemia primaria, principalmente en personas con insuficiencia hepática y la mortalidad varía entre 40 y 63%, según un estudio realizado en Durango, Durango, también las personas con insuficiencia renal, artritis gotosa, alcoholismo y diabetes mellitus tienen el riesgo de infección por este microorganismo aunque en menor peso. En este estudio se encontraron 8 casos de infección, todos cursaban enfermedad hepática crónica, 3 diabetes mellitus y 1 recibía inmunosupresores. La evolución promedio de fallecimiento fue de 4 días, siendo la mortalidad de 87,5%, lo cual es muy alarmante, por lo que se debe tener una atención inmediata de los pacientes de alto riesgo y que tienen antecedentes de ingestión de mariscos.

De los valores presentados, el porcentaje de *Aeromonas* en total es de 57,01%. El papel de las *Aeromonas* como agente productor de enfermedad alimentaria no ha sido totalmente confirmado, pero su potencial como agente infeccioso se da a través de varios mecanismos incluyendo la producción de una enterotoxina similar a la toxina del cólera, citotoxina y hemolisina. Puede aislarse en cantidades importantes en pescado y productos derivados, aunque su poder patógeno parece que es poco importante. Uno de los principales problemas asociados a este tipo de microorganismos es la existencia de contaminaciones cruzadas con otros productos en el momento de la preparación de

los alimentos, lo que conlleva una posible multiplicación post-preparación, con el consiguiente riesgo para consumidores de comidas preparadas o listas para consumo.

Según el estudio realizado en Chetumal, Quintana Roo con muestras de alimentos marinos que fueron clasificados en crudos, marinados sin calor, parcialmente cocidos con calor y completamente cocidos con calor. Tres fueron las variedades (crustáceos, moluscos y peces) y 19 las especies estudiadas (camarón, cangrejo, jaiba, calamar, caracol, ostión, pulpo, abadejo, boquinete, cazón, coronado, corvina, chihua, mero, pámpano, pargo, picuda, rubia y sierra. Se obtuvo que las más altas prevalencias de *Vibrio hollisae* (11,54%), y *Vibrio mimicus* (7,69%), fueron obtenidas en los alimentos marinos crudos. Para alimentos marinados sin calor resultó que *Vibrio hollisae* tuvo un 7,14% de incidencia y de *Vibrio mimicus*, igualmente con un 7,14% con lo que se puede decir que son especies algo comunes aunque en una cantidad mínima, por lo que no representan un riesgo para la salud.

En un estudio hecho para detectar *Vibrio Cholerae* 0:1 en ostras realizado en la Ciudad de México se aislaron e identificaron *Vibrio cholerae* 0:1 (26%), *V. parahaemolyticus* (8%), *V. alginolyticus* (46%), otras especies de *vibrio* spp. (6%) y especies del género *Aeromonas* spp. (12%).

Todas las especies antes mencionadas son muy comunes en alimentos crudos tales como mariscos y pescados, en comparación con este estudio realizado con pescado fresco y picado, se puede notar una gran disminución de las especies de *vibrio*, pero cabe destacar que si se encuentran y pueden ser una fuente de contaminación si no se toman las medidas necesarias, ya sea al momento de mantener el producto para su venta, o bien, cuando se prepara el ceviche y no se mantiene en refrigeración como debe de ser, se puede provocar una proliferación de éstos microorganismos patógenos y provocar la enfermedad.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que *Vibrio vulnificus* no se encuentra en el pescado fresco y picado utilizado para la elaboración de ceviche, por lo tanto no representa un riesgo para la salud de los consumidores.

GLOSARIO

Ácido láctico: Intermediario metabólico implicado en numerosos procesos bioquímicos; es el producto final de la glucólisis, el cual suministra energía en forma anaeróbica al músculo esquelético durante el ejercicio intenso, y puede ser oxidado aeróbicamente en el corazón para la producción de energía, o reconvertirse en glucosa en el hígado. Durante el ejercicio intenso se producen elevaciones moderadas de ácido láctico en la sangre; las elevaciones intensas (acidosis láctica) pueden presentarse en la diabetes mellitas y en deficiencias genéticas de las enzimas implicadas en la gluconeógenesis. El lactato también es el producto final de la fermentación en varias especies bacterianas.

Ácido sórbico: Ácido 2, 4 – hexadecenoico compuesto que se encuentra en las bayas del fresno de monte, *Sorbus aucuparia* y en otras muchas plantas; inhibe el crecimiento de levaduras y mohos y se emplea como conservante antimicrobiano.

Adsorción: Fijación de una sustancia a la superficie de otra; concentración de un gas o sustancia en solución en un líquido, que resulta en concentraciones relativamente elevada del gas o de la solución en la superficie.

Afectos: Expresión externa de la emoción asociada a ideas o representaciones mentales de objetos.

Bacteriemia: Presencia de bacterias en la sangre.

Citotoxina: Toxina o anticuerpo que posee una acción tóxica específica sobre las células de órganos especiales; se denominan según sea la variedad especial de la célula de la que son específicas.

Crustácea: Clase extensa de artrópodos que abarca los cangrejos, langostas de mar, gambas, camarones, langostinos, centollos, etc.

Depuración: Acción de depurar o aclarar, especialmente la eliminación de las bacterias de los moluscos después de introducirlos en agua limpia.

Desbridamiento quirúrgico: Eliminación del material extraño y del tejido desvitalizado de una lesión traumática o infectada, o de zonas adyacentes, hasta que se descubre tejido sano circundante. Se efectúa por métodos mecánicos, generalmente por disección cortante.

Diacetilo: 2, 3 – butanodiona líquido amarillo con olor a mantequilla.

Edema: Presencia de cantidades excesivamente grandes de líquido intercelular en los tejidos del cuerpo; suele hacer referencia a una acumulación demostrable en el tejido subcutáneo. El edema puede ser localizado, por obstrucción venosa o linfática, o por aumento de la permeabilidad vascular, o generalizado debido a insuficiencia cardíaca o neuropatía.

Eritema: Enrojecimiento de la piel producido por congestión de los capilares.

Halofílico: Relativo o caracterizado por afinidad hacia la sal; dicese en especial de microorganismos que necesitan una concentración elevada de sal para un crecimiento óptimo.

Hematopoyesis: Formación y desarrollo de las células sanguíneas. En el embrión y el feto, tiene lugar en diversos lugares, como el hígado, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos y la médula ósea; a partir del nacimiento durante el resto de la vida, ocurre principalmente en la médula ósea, con un pequeño porcentaje en los ganglios linfáticos.

Hematopoyético: Pertenece o relativo a la hematopoyesis, o que la efectúa.

Hemolisina: Sustancia que ocasiona hemólisis.

Hemólisis: Rotura de la membrana eritrocitaria que causa liberación de hemoglobina; puede ser causada por hemolisinas bacterianas, anticuerpos que causan lisis dependiente del complemento, al colocar eritrocitos en una solución hipotónica o por defectos de la membrana del eritrocito.

Hemopatía: Cualquier enfermedad de la sangre.

Hemoproteína: Proteína conjugada que contiene hem como grupo prostético; son ejemplos, la catalasa, el citocromo, la hemoglobina y la mioglobina.

Hepatopatía: Término general que se aplica a cualquier enfermedad del hígado.

Heritema: Enrojecimiento de la piel producida por congestión de los capilares.

Hidroxianisol butilado (BHA): Sólido céreo blanco o ligeramente amarillo con un olor suave característico; se usa como antioxidante en alimentos; cosméticos, y preparados farmacéuticos que contienen grasas o aceites.

Hipotensión: Presión sanguínea anormalmente baja; se encuentra en el shock pero no siempre indica presencia de shock.

Fenotípico: Pertenece o relativo al fenotipo a que lo expresa.

Fenotipo: Toda la constitución física, bioquímica y fisiológica de un individuo determinada por medios tanto genéticos como ambientales, a diferencia del genotipo.

Fitoplancton: Conjunto de organismos vegetales minúsculos que, con los del reino animal, constituyen el plancton de las aguas naturales.

Ictiófago: Que se alimenta de peces.

Inmunodeprimida: Que presenta una atenuación de la respuesta inmunitaria. Puede deberse a la administración de fármacos inmunodepresores, radiación, desnutrición o la presencia de algún estado patológico.

Insuficiencia renal: Incapacidad del riñón para excretar metabolitos en niveles plasmáticos normales en condiciones normales de carga, o incapacidad para retener electrolitos en condiciones de ingesta normal. La forma aguda se caracteriza por uremia y habitualmente por oliguria o anuria, con hiperpotasemia y edema pulmonar. Las formas crónicas pueden deberse a muy numerosos trastornos, y pueden requerir hemodiálisis o trasplante.

Irradiación: Dispersión del impulso nervioso más allá de la vía de conducción normal.

Mucílago: Pasta viscosa artificial de goma o dextrina que se emplea en farmacia como vehículo excipiente, o en terapéutica como demulcente. Principio viscoso formado de manera natural en una planta, que consiste en una goma disuelta en el jugo de la misma.

Necrosis: Conjunto de cambios morfológicos que indican muerte celular, y que son debidos a la acción degradante progresiva de las enzimas; puede afectar a grupos de células, a parte de una estructura o a un órgano.

Necrótico: Perteneiente o relativo a la necrosis, o caracterizado por ella.

Pirofosfato: Cualquier sal, anión o éster del ácido pirofosfórico. Formado en muchas reacciones metabólicas es un importante intermediario porque su gran energía liberada por hidrólisis hace las reacciones esencialmente irreversibles.

Septicemia: Enfermedad general acompañada de presencia y persistencia de microorganismos patógenos o de sus toxinas en la sangre.

Shock séptico: Shock asociado con una infección arrolladora, muy frecuentemente infección por bacterias gramnegativas, aunque puede ser producida por bacterias, virus, hongos o protozoos. Se cree que resulta de la acción de endotoxinas u otro productos del agente infeccioso sobre el sistema vascular, lo que provoca que grandes volúmenes de sangre sean secuestrados en los capilares y venas; pueden estar involucrados la activación del complemento y de los sistemas de cininas, y la liberación de histamina, citocinas, prostaglandinas, y otros mediadores. Las características clínicas consisten en escalofríos iniciales y fiebre, piel caliente y enrojecida, aumento del gasto cardíaco y menor grado de hipotensión que en el shock hipovolémico; si el tratamiento no es eficaz puede evolucionar al cuadro clínico asociado al shock hipovolémico.

Taxonómico: Perteneiente o relativo a la taxonomía.

Taxonomía: Clasificación ordenada de los organismos en categorías apropiadas (taxones), según las relaciones que muestran entre ellos, y aplicación de nombres adecuados y correctos.

Vasculitis necrosante: Inflamación de un vaso sanguíneo o linfático.

LITERATURA CITADA

Adams, M. R. y Moss, M. O. 1997. Microbiología de los alimentos. Acribia, S. A. España. pp. 245 y 268.

Arias-Echandi, M. L., Antillón G. F. 2000. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. Revista Biomédica. Volumen 11 No. 2.

Brook, S. Batel y A. Morse. 2002. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª. edición. El Manual Moderno S. A. de C. V.. México, D. F. pp. 293 y 296.

CFSAN, 2006. *Salmonella* .U. S. Food and Drug Administration. Center for food safety and applied nutrition. Bacteriological Analytical Manual. (ver <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>).

CFSAN, 2004. *Vibrio* .U. S. Food and Drug Administration. Center for food safety and applied nutrition. Bacteriological Analytical Manual. (ver <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>).

-
- Charley Helen. 2001. Tecnología de Alimentos (procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos). Editorial Liusa, S. A. de C. V. México, D. F. pp. 602-604.
- Cornejo-Juárez, P., A.L. Rolón-Montes de Oca, J.C. Tinoco-Favila y J. Sifuentes-Osornio 2000. Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus*. Serie de Casos. La Revista de Investigación Clínica Vol. 52 No. 6: 632-637. (ver <http://bvs.insp.mx/articulos/5/4/102001.htm>).
- Dorland. 2003. Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina. 29ª edición. Mc. Graw Hill Interamericana. Madrid, España.
- Doyle; Beuchat y Montville. 2001. Microbiología de los alimentos. Acribia, S. A. España. pp. 88, 89, 239, 242, 244, 245 y 261-266.
- Félix-Fuentes, A., Campas-Baypoli, O. N. y Meza-Montenegro, M. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México.2005. Revista Salud Pública y Nutrición. Volumen 6 No. 3 (ver http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm).
- Franco-Monstreal, J., J.J. Flores-Abuxapqui, G.J. Suárez-Hoil, M.A. Puc-franco, M.R. Heredia-Navarrete y M.L. Vivas-Rosel.2003. Prevalencias de las especies de *Vibrio hollisae*, *V. mimicus* y *V. vulnificus* en alimentos marinos de origen animal de marisquerías de la ciudad de Chetumal, Quintana Roo, México. Revista Salud Pública y Nutrición. Vol. 4 No. 1 (ver <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/iv/1/articulos/vibrio.html>).
- Frazier, W. C. y Westhoff, D. C. 2000. Microbiología de los alimentos. 4a. edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 330 y 337.

-
- Jawetz; Melnick y Adelberg. 1985. Microbiología médica. Undécima edición. El Manual Moderno S. A. de C. V. México, D. F. pp. 253.
- Jay, James M. 2002. Microbiología moderna de los alimentos. 4ª edición. Acribia, S. A. España. pp. 522.
- Liu and cols., 2006. Prognostic Factors and Antibiotics in *Vibrio vulnificus* Septicemia. Archives of internal medicine. Vol.166 (19): 2117-2123.(Abstrac). (ver <http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/abstract/166/19/2117>).
- MacFaddin, Jean F. 1984. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. pp. 27- 48, 84 - 88, 94 -125, 134 -146, 154 -158, 183-196, 236 – 238 y 249.
- Murray y cols., 1992. Microbiología Médica. Cuarta edición Editorial Elsevier science. España. pp. 280 y 281.
- NOM-031-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- NOM-027-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- Potter, Norman y Hotchkiss, Joseph, 1999. Ciencia de los Alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 382.

Roberts y cols., 2000. Microbiología práctica de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 55 y 56.

Rosario Quintanilla Vior. 2003. Los ostiones crudos contaminados por *Vibrio vulnificus* pueden ocasionar enfermedades e incluso la muerte. U.S. Food and Drug Administration (FDA). (ver <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoyvibs.html>).

Torres y Castillo, 2002. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Volumen II. Primera edición. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. pp. 111-113 y 120.

Tscheuschner, Horst-Dieter, 2001. Fundamentos de Tecnología de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 60-62.

Vibrio vulnificus. Center of Food Safety & Applied Nutrition, U. S. Food & Drug Administration. (FDA). (ver <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap10.html>).

Villalpando-Guzmán, S. Eusebio-Hernández, M. G. y Avilés-Ruiz, D. 2000. Detection of *Vibrio cholerae* 0:1 in oysters by the visual colorimetric immunoassay and the cultura technique. Revista Latinoamericana de Microbiología. Volumen 42.

Páginas de Internet

<http://www.fao.org/docrep/008/ae521s/ae521s07.htm#TopOfPage>

<http://vm.cfsan.fda.gov>

<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap10.html> - 15k

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/027ssa13.html>

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/031ssa13.html>

<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/vulnificus.html>

http://idsc.nih.gov/.../k00-g45/k00_49/k00_49.html

<http://www.microbes-edu.org/.../diag/vibiro.html>

<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoyvibs.html>

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibriovulnificus_g.htm

<http://www.fao.org/docrep/008/y8145s/y8145s08.htm>

<http://www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s0x.htm>

<http://docum.azti.es/RIESGOS.nsf/0/4c3935cd902aae43c1256ad10050163b?OpenDocument>