

1989 - A

CODIGO 082113789

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

" SELECCION DE TECNICAS E INCIDENCIA DE
Vibrio parahaemolyticus EN PESCADO,
OSTION Y CAMARON CRUDOS.

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARTHA ALICIA RODRIGUEZ CABRERA

GUADALAJARA, JAL.

1991



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 1551/89

SRITA. MARTHA ALICIA RODRIGUEZ CABRERA
 P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
 tema de Tesis "SELECCION DE TECNICAS E INCIDENCIA DE VIBRIO PARAHAEMOLY
TICUS EN OSTION Y CAMARON CRUDOS" para obtener la Licenciatura en Biolo
 gía.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptada --
 como Directora de dicha Tesis la Q.F.B. Rosa Ma. Puebla Pérez.



A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara, Jal., Diciembre 11 de 1989
 EL DIRECTOR

FACULTAD DE CIENCIAS ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS

Biblioteca de la Facultad
 de Ciencias.



EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. La Q.F.B. Rosa Ma. Puebla Pérez, Directora de Tesis.-Pte.
 c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
Expediente
Número

SRITA. MARTHA ALICIA RODRIGUEZ CABRERA
P R E S E N T E.-

Por este conducto nos permitimos informar a usted que se autoriza cambio de tema de Tesis "Selección de técnicas e incidencia de Vibrio parahaemolyticus en ostión y camarón crudos" por "Selección de técnicas e incidencia de Vibrio parahaemolyticus en pescado, ostión y camarón crudos".

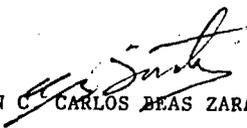
Sin otro particular nos es grato reiterar a usted la expresión de nuestra consideración más distinguida.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., 14 de Diciembre de 1990.

EL DIRECTOR.



FACULTAD DE CIENCIAS

M. EN C.  CARLOS BEAS ZARATE.

EL SECRETARIO



M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA.



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

CBZ/MTM/vsg'

Guadalajara Jal. 12 de Septiembre de 1990

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E:

Por este conducto me permito informar a Ud. que fue revisada la Tesis intitulada: SELECCION DE-TECNICAS E INCIDENCIA DE Vibrio parahaemolyticus EN PES-CADO, OSTION Y CAMARON CRUDOS. Que presenta la pasante de Biología. Martha Alicia Rodríguez Cabrera; por lo -- que no tengo inconveniente en que dicha tesis se impri-- ma, y ruego a Ud. tramita a quien corresponde, el exá-- men respectivo.

Sin otro particular, aprovecho la oca-- sión para reiterarle mi distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E



Q. F. B. Rosa María Puebla Pérez.

TRABAJO EFECTUADO EN EL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGIA SANITARIA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA BAJO LA
ASESORIA DE LA Q.F.B MARIA DEL
REFUGIO TORRES VITELA.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	6
HIPOTESIS	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSION	38
ESQUEMAS Y TABLAS	45
RESUMEN	59
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFIA	62

SELECCION DE TECNICAS E INCIDENCIA

DE Vibrio parahaemolyticus EN PES-

CADO, OSTION Y CAMARON CRUDOS.

INTRODUCCION | .

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

En México, la gastroenteritis y otras enfermedades diarréicas constituyen la segunda causa de mortalidad y morbilidad, según el boletín Mensual de epidemiología del Sistema Nacional de Salud (22). La causa primaria en la mayoría de los casos son microorganismos de asiento intestinal que llegan a las víctimas por la vía oral.

Los hábitos alimenticios suelen ser un factor decisivo en la incidencia de las enfermedades asociadas al consumo de alimentos. Por tal razón en Estados Unidos durante el periodo de 1970 a 1978, aproximadamente el 11% de las enfermedades vehiculizadas por alimentos fueron ocasionadas por peces, moluscos y crustáceos marinos (6).

Desde tiempo atrás el consumo de productos marinos ha tenido repercusiones en el renglón de la Salud Pública por — considerarse vehículos potenciales de infecciones humanas e — intoxicaciones (4, 33).

Los agentes causantes de enfermedades vehiculizadas — por pescados y mariscos se dividen en 3 grupos según la fuente primaria del agente etiológico:

- a) Agentes naturalmente presentes en habitats acuáticos como son: Vibrio parahaemolyticus y C. botulinum tipo E.
- b) Agentes provenientes de desagüe que contaminan los habitats acuáticos. Entre ellos se encuentran algunas enterobacterias como: Salmonella sp. y ciertos virus entéricos.
- c) Agentes provenientes de la piel y manos de los trabaja-

dores, equipos o del medio ambiente, por ejemplo: Staphylococcus aureus, Shigella y Salmonella.

El conocimiento que se tiene sobre la incidencia de microorganismos enteropatógenos en los productos que se ofrecen a la venta al público es incompleto.

Algunos patógenos como la Salmonella han sido ampliamente estudiados, en cambio de otros como Vibrio parahaemolyticus se sabe muy poco.

Estudios realizados en alimentos adquiridos en la Ciudad de Guadalajara revelan una incidencia de Salmonella del 62% en empacadoras de carne (3). 32.6% en jamón adquirido de tiendas al menudeo (17). Un 33.7% en requesones adquiridos de mercados públicos (13). En aguas frescas y licuados con leche adquiridos de la vía pública, el 13.2% y 12.7% respectivamente (15). Estudios en objetos inanimados mostraron el 30.9% de positivos en trapos de limpieza adquiridos en comercios de alimentos fijos y ambulantes (14). En trapos adquiridos de cocinas de hospitales la positividad fué del 70% (42). El 78% de positividad en carnes crudas obtenidas en carnicerías y pollerías (18). En aguas superficiales, aguas de arroyos, lagos y manantiales, se encontró un 80.0, 38.1 y 14.3% respectivamente, en aguas de desecho el porcentaje fué de 94 y en fuentes de ornato ubicadas en plazas públicas se reportó un 20% (19).

Bacterias patógenas como Vibrio parahaemolyticus han sido plenamente identificadas como agentes etiológicos de gastroenteritis.

En Japón en los pasados 25 años dicho microorganismo -

ha sido causa de un gran número de brotes de gastroenteritis aguda (2).

En un principio se creía confinado a este país y al lejano oriente, debido a sus hábitos alimenticios. Posteriormente ha podido ser aislado en otros países en distintas variedades de mariscos y aguas marinas (22, 23).

En Tokio desde 1963 a 1973 en un brote por alimentos contaminados de 4,426 heces de enfermos se aisló el patógeno en 606, por otra parte 88% fueron Kanagawa positiva. En contraste, solo el 2.3% de las 814 cepas aisladas del alimento incriminado fueron hemolíticas.

En 1973, sucedió un ataque por alimentos contaminados por Vibrio parahaemolyticus el cual ocurrió a bordo de un trayecto aéreo internacional de Bangkok a Londres, el alimento implicado fue carne de cangrejo cruda y curtida (39).

Un estudio realizado en cangrejos obtenidos de la bahía de Galvestón Texas mostraron un 23% de prevalencia de Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus 7% y Vibrio cholerae 2%. La incidencia de Vibrio parahaemolyticus y Vibrio vulnificus fue relativamente incrementada durante la primavera (8).

En agosto de 1971, ocurrieron 3 brotes por separado en Maryland por alimentos contaminados, involucraron alrededor de 425 personas enfermas (57%) de 745 en riesgo. En cada brote los cangrejos y carne de cangrejo al vapor fueron el --

vehículo sospechoso transmisor de la enfermedad. El Vibrio --- parahaemolyticus se aisló tanto del cangrejo como de las heces de algunas personas enfermas en cada brote (7).

De octubre de 1979 a junio de 1980 en Island Long-- se analizarón un total de 36 muestras de ostión, de las cuales 12 (33 %) se estableció que contenían Vibrio parahaemolyticus con límites del número más probable (NMP) de 3.6, 23 cel/gr. - (40).

En un estudio realizado en un estuario ubicado en -- East Schelde con moluscos holandeses, 3 de 79 muestras analiza das (3.8%) fueron positivas a Vibrio parahaemolyticus (5).

Estudios en las costas del Japón y Estados Unidos - muestran una relación directa entre la variación estacional y la incidencia de Vibrio parahaemolyticus en alimentos contami nados. Así mismo se ha aislado de aguas con bajo y alto conte nido orgánico, de sedimento, planctón, pescados y mariscos (11, 27).

En la literatura se reportan un gran número de bro tes de enfermedades en peces marinos asociadas a diversas espe cies de vibrio (44).

El Vibrio parahaemolyticus ha sido señalado como un gérmen causante de gastroenteritis aguda en el hombre. Su papel patógeno ha sido demostrado en varias partes del mundo y su presencia sin referencias de enfermedad humana, ha sido se ñalada en países como Panama y Perú.

Miranda-Ramírez del Perú obtuvieron tan solo el 1% de positividad en 100 muestras de pescado fresco adquirido - en playas limeñas; no obstante en la provincia de Trujillo - Perú se obtuvo un 75.4% de positividad a partir de 84 muestras (3).

En 1989 se reportó un brote de gastroenteritis en Luisiana asociado al consumo de alimentos marinos crudos y - cocinados. El Vibrio parahaemolyticus fué el patógeno más comunmente asociado con los casos de diarrea (43).

En México se han llevado a cabo algunos estudios, Puebla es el Estado que mayor número de datos de incidencia - a aportado a la literatura, algunos de estos revelan:

- 1.- El 8.66% en alimentos de origen marino (34).
- 2.- 6.0 y 0.25% en mariscos crudos y heces de manipuladores de alimentos respectivamente (20, 22, 23).
- 3.- En moluscos, pescados y crustáceos se encontró una incidencia de Vibrio parahaemolyticus de 16.4, 5.9 y 9.6% respectivamente (20).

Estudios realizados en Acapulco muestran una incidencia del 5% en ostiones (20) y 0.72% en manipuladores de - alimentos (32).

Considerando la demanda de los pescados y mariscos en la Ciudad de Guadalajara y los riesgos de contaminación - que implica el mal manejo del cual son objeto durante su comercialización, se llevó a cabo un estudio en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara, teniendo como objetivos:

OBJETIVOS :

- 1.- Determinar la incidencia de Vibrio parahaemolyticus en pescado, ostión y camarón crudos (el vehículo más común).
- 2.- Valorar algunas técnicas de análisis que permitan un diagnóstico confiable ante brotes del padecimiento.

GENERALIDADES .

En la vigilancia y control de las gastroenteritis es indispensable disponer de información exhaustiva de las fuentes y mecanismos de contaminación de microorganismos a los alimentos, de los reservorios animales e inanimados, la distribución del padecimiento en el espacio y en el tiempo y otras cuestiones de similar importancia (42).

Las causas que con mayor frecuencia contribuyen a la aparición de brotes y casos en la población, incluyen el consumo de productos del mar crudos o insuficientemente cocidos, una defectuosa o falta total de refrigeración que favorece la multiplicación del microorganismo y el manejo inadecuado de los alimentos en las cocinas que propician la contaminación cruzada de los alimentos crudos a los cocinados (11).

El conocimiento de las diferentes bacterias y sus características son de gran importancia en el perfeccionamiento de los métodos de manejo y preservación en el pescado y sus productos (36). La flora microbiana del pescado y los métodos de manejo de los mismos, determinan su vida de anaquel, sobre todo cuando se distribuyen frescos (9).

Numerosos métodos químicos han sido propuestos como un apoyo para estimar el grado de frescura en pescado, entre ellos se incluye la cuantificación de nitrógeno volátil total (NVT) producto de la descomposición bacteriana y de las enzimas naturales de los tejidos que puede ser utilizada pa-

ra determinar el grado de frescura en el pescado, siendo importante el conocer la temperatura bajo la cual el producto-- ha sido almacenado, con la finalidad de poder trazar el índice de descomposición y su potencial de preservación (38).

La determinación del pH de los alimentos constituye en consecuencia una prueba de apreciable valor para determinar dos propósitos. Los métodos más utilizados hacen uso del papel indicador y el potenciómetro.

El pH ha sido mencionado como un indicador del grado de frescura que puedan tener ciertos alimentos.

Valores reportados para:

Pescado recién muerto	5.5 - 6.5
Ostiones	5.9 - 6.6
Camarones	6.9 - 8.2 (11).

El recuento de colonias bacterianas en medios de cultivo con un adecuado soporte nutricional y libres de agentes inhibidores es ampliamente utilizado con diversos propósitos en el análisis de alimentos perecederos o no, agua, equipo y otros productos.

Cuando se pretende contar el máximo de microorganismos y la incubación se ha realizado entre los 20 y los 37°C - se les designa como cuenta de bacterias mesofílicas aerobias. La variedad de microorganismos que conforman el grupo es muy heterogéneo. El significado de su presencia en los alimentos- y otros sustratos es el siguiente:

- a) Como indicador de la posible presencia de gérmenes-patógenos.

- b) Como indicador del valor comercial de un alimento.
- c) Como indicador de las condiciones higiénicas con -- que a sido manejado un producto.
- d) Como indicador de la idoneidad de un ingrediente -- crudo que se va a incorporar a un alimento.
- e) Para seguir la eficiencia de un proceso germicida o de preservación.
- f) Para predecir la vida de anaquel de un alimento (11).

Dado el carácter perecedero tan marcado que exhibe -- el pescado y demás alimentos marinos, el renglón de la conservación, merece especial atención tanto en lo que respecta a la tecnología como a los métodos de preservación utilizados (9).

Son tres los grupos de microorganismos que llenan -- el campo de acción de la microbiología sanitaria en el control higiénico de los alimentos.

- 1.- Aquellos que afectan las características organolépticas de los productos, con los cuales se estudiaran -- las causas que los desencadenan y los medios para evitarlos y controlarlos.
- 2.- El grupo de patógenos, en donde interesa el papel e -- importancia del vehículo de transmisión (agua o alimento) que determina la aparición de casos en una población.
- 3.- Microorganismos llamados indicadores, los cuales se -- agrupan al margen de las líneas taxonómicas en función de ciertas características morfológicas, fisiológicas y ecológicas a través de las cuales adquieren -- significado como indicadores de fuentes de contaminación indeseables o de malas prácticas de trabajo du--

rante el manejo de agua y alimento (11).

La familia vibrionaceae está formada de un grupo de microorganismos relacionados, se caracterizan por ser báculos -- gram negativos, la mayoría móviles con 1 o 3 flagelos polares, aerobios o anaerobios facultativos, aunque la mayoría de los miembros de ésta familia son saprófitos que se encuentran en el agua, algunos son parásitos o patógenos del hombre y de los animales. Gran número son halofílicos, algunos luminiscentes y muchos viven en el suelo o ambientes marinos (31).

Vibrio parahaemolyticus recientemente ha sido incorporado a la lista de microorganismos plenamente identificados como patógenos. Fue descubierto y aislado por Fujino y col. en 1950 y reportado un año después.

Vibrio parahaemolyticus es una de las 20 especies del género vibrio, es un báculo halofílico estricto, gram negativo, recto o ligeramente curvo de 1 a 3 micras de longitud por 0.4- a 0.6 micras de diámetro, no esporulados y no capsulado, típicamente móvil con un solo flagelo polar (11, 22).

La temperatura óptima para el desarrollo de Vibrio parahaemolyticus es de 35 - 37°C. El crecimiento se detiene por encima de 44°C. Es inhibido a pH entre 4.5 y 5, el pH recomendado para su aislamiento oscila entre 7.4 y 8.6.

Generalmente se reconoce un 3% de cloruro de sodio --- (NaCl) como la concentración óptima y es incluso la utilizada en los medios de cultivo para su aislamiento en el laboratorio. No obstante puede crecer desde el 1% hasta el 8% pero no con 0% de NaCl (11, 22).

Vibrio parahaemolyticus fermenta con producción de ácido la glucosa, trehalosa, fructosa, maltosa, manitol, hidroliza el almidón, es catalasa positiva, produce indol, reduce los nitratos, licua la gelatina, peptoniza la leche, -- descarboxila la lisina, es citrato positiva en medio de Simmons, reacción de oxidasa positiva, oxida a la glucosa en -- anaerobiosis, da positiva la reacción de fosfatasa y es rojo de metilo positiva y Voges Proskauer negativa.

Dicho microorganismo sobrevive a 5°C por largos períodos sobre la superficie del pescado y en ostiones a 4°C - puede sobrevivir hasta tres semanas sin cambios importantes en su número. Por otra parte diversos autores reportan que - el germen se inactiva a temperaturas de refrigeración y congelación. Las temperaturas moderadamente elevadas ejercen un efecto letal sobre él. La ebullición lo inactiva rápidamente (11).

Vibrio parahaemolyticus fué conocido en Japón como patógeno transmitido por alimentos, 15 años antes de que lo fuera en Estados Unidos. En Japón este microorganismo es el agente causal de casi la mitad de los casos de intoxicación alimentaria bacteriana (31).

Los pescados, moluscos y camarones crudos son los - alimentos más frecuentemente implicados en la presentación - de vibriosis (30).

En los casos en que la enfermedad es producida por la ingestión de alimentos no procedentes del mar, es posible que halla tenido lugar una contaminación a partir de-

portadores humanos o de agua marina (11).

La infección humana por Vibrio parahaemolyticus consiste en una gastroenteritis caracterizada por diarrea que puede ser moderadamente o de tipo coleriforme y ocasionalmente disenteriforme, con sangre y moco en las heces, suele presentarse náusea y vómito, con frecuencia hay fiebre moderada y cefalea, más constantemente es el dolor en el epigastrio semejante, aunque más intenso al de la salmonelosis. El período de incubación varía de 12 a 20 hrs., con limitación de 2 a 48, - lo que probablemente depende del tamaño de la dosis infectante, la acidez del estómago y la naturaleza del alimento. Se requiere alrededor de 10^6 - 10^9 células viables para dar lugar a una respuesta clínica.

La tasa de ataque suele ser alta (30 - 60%), pero la letalidad reducida y limitada a individuos especialmente susceptibles, tales como ancianos o adultos debilitados (11).

H I P O T E S I S .

- 1.- Los pescados, ostiones y camarones crudos que se expenden en comercios de la Ciudad de Guadalajara se encuentran contaminados con Vibrio parahaemolyticus.
- 2.- El caldo de enriquecimiento Caldo Glucosa Sal Lauril (CGSL) presenta una mayor productividad que la siembra directa en placas de agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y Sales Biliares # 3 (SB #3)- en la recuperación del Vibrio parahaemolyticus.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS.

Abatelenguas estériles.

Algodón

Asas de nicromo

Auto-clave.

Balanza analítica

Balanza granataria

Baño maría

Bolsas de polietileno

Cajas de Conway

Cajas de petri estériles de 100 X 15 mm.

Cajeteros

Centrifuga

Cubre objetos

Cuchillos estériles

Cuenta colonias Quebec

Embudos

Frascos botella con tapón de gasa estériles

Frascos botella con tapón de rosca estériles

Frascos gerber estériles

Gradillas

Incubadora a 35 -37°

Incubadora a 20°

Mecheros bunsen

Mecheros fisher

Microscopio

Morteros de porcelana

Papel filtro

Pipetas estériles de 1, 2, 5, 5 10 ml.

Pipeta volumétrica de 1 ml.

Pipeteros

Porta objetos

Portapipeteros

Potenciómetro conductronio

Refrigerador

Termómetros

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 13x100 mm.

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 16x150 mm.

Vasos de licuadora estériles

Varillas de vidrio.

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar almidón 3% sal	(Alm. 3%).
Agar citrato de Simmons 3% sal	(CS 3%).
Agar cuenta estandar	(CE).
Agar de hierro y lisina 3% sal	(LIA 3%).
Agar de hierro y triple azúcar 3% sal	(TSI 3%).
Agar sales biliares #3	(SB #3).
Agar soya tripticaseína 3% sal	(AST 3%).
Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa	(TCBS).
Caldo glucosa sal lauril	(CGSL).
Caldo lactosado	(CL).
Caldo nitrito 3% sal	(C. Nit. 3%).
Caldo manitol 3% sal	(C. Man. 3%).
Caldo malonato 3% sal	(C. Mal. 3%).
Caldo MR-VP 3% sal	(MR-VP 3%).
Caldo tripticasa	(CT 0%).
Caldo tripticasa 3% sal	(CT 3%).
Caldo tripticasa 8% sal	(CT 8%).
Caldo tripticasa 10% sal	(CT 10%).
Caldo verde brillante bilis 2%	(CVBB 2%).
Gelatina nutritiva 3% sal	(GN 3%).
Medio de Hugh-Leifson 3% sal	(O/P 3%).
Medio de micro-assay 3% sal	(M-A 3%).
Medio de SIM 3% sal	(SIM 3%).
Peptona de gelatina al 0.1% como diluyente	(Dil.).

REACTIVOS.

Acido tricloroacético 7%.

Solución saturada de carbonato de potasio 90% (K_2CO_3). Agente sellador.

Solución saturada de ortofosfato de sodio potasa (Na_2PO_4KOH). Agente liberador.

Acido bórico al 3%

Acido sulfúrico 0.024N (H_2SO_4).

Indicador de Conway.

Para-dimetil anilina ($C_8H_{14}Cl_2N_2$).

Alfa-naftol.

Hidroxido de potasio (KOH).

Reactivo de kovac.

Cloruro de trifeniltetrazolium (TTC).

COLORANTES.

Cristal violeta.

Lugol.

Alcohol.

Safranina.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

AGAR ALMIDON (Agar nutritivo sal + almidón).

Fórmula:

Extracto de carne-----	3.0	gr.
Peptona-----	5.0	gr.
Cloruro de sodio-----	30.0	gr.
Agar-----	15.0	gr.
Almidón-----	50.0	gr.
Agua destilada-----	1000.0	gr.

Disolver los ingredientes en el agua agitando y calentando hasta ebullición. Ajustar el pH a 7.0 aproximadamente. - Agregar el almidón previamente disuelto. Distribuir en frasco-botella y esterilizar a 121° durante 15 minutos.

AGAR CITRATO DE SIMMONS.

Fórmula:

Fosfato dihidrogenado de amonio---	1.0	gr.
Fosfato dipotásico-----	5.0	gr.
Cloruro de sodio-----	5.0	gr.
Citrato de sodio-----	2.0	gr.
Súlfato de magnesio-----	0.20	gr.
Agar-----	15.0	gr.
Azúl de bromotimol-----	0.08	gr.
Agua destilada-----	1000.0	ml.

Disolver los ingredientes en el agua. Dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Calentar suavemente, agitando frecuentemente hasta que el medio hierva durante un minuto. De ser nece-

sario ajustar el pH a 6.9. Distribuir en tubos y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada.

AGAR CUENTA ESTANDAR.

Fórmula:

Peptona de caseína -----	5.0 gr.
Extracto de levadura -----	2.5 gr.
Glucosa -----	1.0 gr.
Agar -----	15.0 gr.
Agua destilada -----	1000.0 gr.

Disolver los ingredientes en el agua por ebullición, agitando frecuentemente. De ser necesario ajustar el pH de manera que después de la esterilización el valor sea de 7.0 + 0.1. Distribuirlo en frascos y esterilizar a 121° durante 15 minutos.

AGAR DE HIERRO Y LISINA SAL.

Fórmula:

Peptona de gelatina -----	5.0 gr.
Extracto de levadura -----	3.0 gr.
Dextrosa -----	1.0 gr.
L-lisina -----	10.0 gr.
Citrato de hierro y amonio -----	0.50 gr.
Tiosulfato de sodio -----	0.04 gr.
Púrpura de bromocresol -----	0.02 gr.
Agar -----	13.50 gr.
Cloruro de sodio -----	30.0 gr.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

Disolver los ingredientes en el agua mediante ebullición, agitando continuamente. De ser necesario ajustar el pH a 6.7. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Dejar enfriar en forma inclinada.

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR SAL.

Fórmula:

Mezcla de peptonas -----	20.0	gr.
Cloruro de sodio -----	30.0	gr.
Lactosa -----	10.0	gr.
Sacarosa -----	10.0	gr.
Dextrosa -----	1.0	gr.
Sulfato de hierro y amonio -----	0.20	gr.
Tiosulfato de sodio -----	0.20	gr.
Rojo de fenol -----	0.025	gr.
Agar -----	13.0	gr.
Agua destilada -----	1000.0	ml.

Disolver los ingredientes en el agua por ebullición y agitación continua. De ser necesario ajustar el pH de manera - que después de esterilizar sea 7.4. Distribuir en tubos de 13x 100 mm y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Inclinarse los tubos procurando un fondo de 2 cm. para la picadura.

AGAR SALES BILIARES #3.

Fórmula:

Agar soya tripticaseína -----	40.0	gr.
-------------------------------	------	-----

Cloruro de sodio -----	40.0 gr.
Sacarosa (Sucresa) -----	25.0 gr.
Sales biliares #3 -----	20.0 gr.
Cloruro de trifeniltetrazolium al 1% -	3.0 ml.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

Disolver los ingredientes en el agua agitando y calen- hasta ebullición. De ser necesario ajustar el pH de manera que después de la esterilización el valor sea de 7.1. Distribuir - en frascos de 100 ml. y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Al momento de usarse agregar a 0.3 ml. de cloruro de trifenil- tetrazolium (TTC).

AGAR SOYA TRIPTICASEINA SAL.

Fórmula:

Peptona de caseína -----	15.0 gr.
Peptona de soya -----	5.0 gr.
Cloruro de sodio -----	30.0 gr.
Agar -----	15.0 gr.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

Disolver los ingredientes en el agua agitando y calen- tar hasta ebullición. De ser necesario ajustar el pH de mane- ra que después de la esterilización el valor sea de 7.3 ± 0.2. Distribuir en tubos y esterilizar a 121° durante 15 minutos.- Inclinar los tubos procurando un fondo de 2 cm. para la pica- dura.

AGAR TIOSULFATO CITRATO BILIS SACAROSA.

Fórmula:

Extracto de levadura -----	5.0 gr.
Peptona de carne -----	5.0 gr.
Peptona de caseína -----	5.0 gr.
Sacarosa -----	20.0 gr.
Tiosulfato de sodio $5H_2O$ -----	10.0 gr.
Citrato de sodio $2H_2O$ -----	10.0 gr.
Colato de sodio -----	3.0 gr.
Oxgall -----	5.0 gr.
Cloruro de sodio -----	10.0 gr.
Citrato férrico -----	1.0 gr.
Azul de bromotimol -----	0.04 gr.
Azul de timol -----	0.04 gr.
Agar bacteriológico -----	15.0 gr.
Agua destilada -----	1000.0 ml.

Disolver los ingredientes en el agua calentando y agitar continuamente hasta ebullición y dejar hervir durante 1 minuto. De ser necesario ajustar el pH a 8.6 ± 0.2 . Distribuir en frascos estériles y refrigerar hasta que se use, fundir y distribuir en cajas estériles.

CALDO GLUCOSA SAL LAURIL (TEEPOL).

Fórmula:

Extracto de carne -----	3.0 gr.
Peptona -----	10.0 gr.

Cloruro de sodio -----	30.0	gr.
Glucosa -----	5.0	gr.
Violeta de metilo -----	0.002	gr.
Teepol (o Lauril sulfato de so-- dio 200 mg.) -----	4.0	gr.
Agua destilada -----	1000.0	ml.

Disolver los ingredientes en el agua, Ajustar el pH a 9.4 ± 0.2 . Distribuir en frascos o tubos. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. Se utiliza como caldo de enriquecimiento o presuntivo en el aislamiento o recuento de Vibrio parahaemolyticus.

CALDO LACTOSADO.

Fórmula:

Peptona de gelatina -----	5.0	gr.
Extracto de carne de res -----	3.0	gr.
Lactosa -----	5.0	gr.
Agua destilada -----	1000.0	ml.

Disolver 13 gramos de polvo en un litro de agua--destilada. Ajustar el pH de ser necesario a 6.9. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. Se usa en la investigación y presencia de microorganismos coliformes y fermentación de la lactosa por microorganismos comunes.

CALDO NITRATO.

Fórmula:

Extracto de carne -----	3.0	gr.
Peptona de gelatina -----	5.0	gr.
Cloruro de sodio -----	3.0	gr.

Nitrato de potasio (libre de nitritos) — 3.0 gr
 Agua destilada ----- 1000.0 ml

Disolver los ingredientes en el agua, ajustar el pH a 7.0. Estérilizar a 121° durante 15 minutos. Se aplica para demostrar la capacidad de reducir los nitratos a nitritos.

CALDO MANITOL

Fórmula:

Peptona de caseína ----- 10.0 gr
 Cloruro de sodio ----- 3.0 gr
 Rojo de fenol ----- 0.018 gr
 Manitol ----- 5.0 gr
 Agua destilada ----- 1000.0 ml

Disolver 20 gramos de polvo en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4. Estérilizar a 12 libras durante 15 minutos. Se emplea para el estudio de la fermentación de carbohidratos.

CALDO MALONATO

Fórmula:

Extracto de levadura ----- 1.0 gr
 Sulfato de amonio ----- 2.0 gr
 Fósforo dipotásico ----- 0.6 gr
 Fósforo monopotásico ----- 0.4 gr
 Cloruro de sodio ----- 3.0 gr
 Malonato de sodio ----- 3.0 gr
 Dextrosa ----- 0.250 gr
 Azul de bromotimol ----- 0.025 gr
 Agua destilada ----- 1000.0 ml

Disolver 9.3 gramos de polvo en un litro de agua des-

tilada. Ajustar el pH a 6.7. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. Es usado para la diferenciación de microorganismos entéricos.

CALDO MR-VP.

Fórmula:

Peptona especial #1 -----	7.0	gr
Dextrosa -----	5.0	gr
Fósforo dipotásico -----	5.0	gr
Cloruro de sodio -----	3.0	gr
Agua destilada -----	1000.0	ml

Disolver 17 gr de polvo en un litro de agua destilada. Ajustar el pH de ser necesario a 6.9 ± 0.02 . Esterilizar a 121° durante 15 minutos.

CALDO TRIPTICASA SAL.

Fórmula:

Triptosa (peptona de gelatina) -----	10.0	gr
Extracto de levadura -----	3.0	gr
Cloruro de sodio -----	0,30,80,100	gr
Agua destilada -----	1000.0	ml

Disolver los ingredientes en el agua, adicionar 0, 3, 8, 10 gramos de cloruro de sodio por cada 100 ml para obtener concentraciones salinas finales de 0, 3, 8 y 10 %. Se usa para determinar la capacidad de algunos Vibrios de desarrollarse a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

CALDO VERDE BRILLANTE BILIS AL 2%.

Fórmula:

Bilis de buey deshidratada -----	20.0	gr
----------------------------------	------	----

Lactosa -----	20.0	gr
Peptona de gelatina -----	10.0	gr
Verde brillante -----	13.0	gr
Agua destilada -----	1000.0	ml

Disolver 40 gr de polvo en un litro de agua destilada, ajustar el pH a 7.2. Estérilizar a 121° durante 15 minutos.

GELATINA NUTRITIVA.

Fórmula:

Peptona de gelatina -----	5.0	gr
Extracto de carne de res -----	3.0	gr
Gelatina -----	120.0	gr
Cloruro de sodio -----	30.0	gr
Agua destilada -----	1000.0	ml

Disolver 128 gr de polvo en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución. Ajustar el pH a 6.8. Estérilizar a 121° durante 15 minutos.

MEDIO DE HUGH-LEIFSON SAL (O/F).

Fórmula:

Peptona de gelatina -----	2.0	gr
Extracto de levadura -----	0.5	gr
Cloruro de sodio -----	30.0	gr
Dextrosa -----	10.0	gr
Púrpura de bromocresol -----	0.015	gr
Agar bacteriológico -----	15.0	gr
Agua destilada -----	1000.0	ml

Disolver los ingredientes en el agua mediante ebullición.

ción y agitación continua. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 . Esterilizar a 121° durante 15 minutos.

MEDIO DE MICRO-ASSAY (para Vibrio parahaemolyticus).

Fórmula:

Extracto de levadura -----	20.0 gr
Peptona de caseína -----	5.0 gr
Dextrosa -----	1.0 gr
Fósforo monopotásico -----	2.0 gr
Tween 80 -----	0.1 gr
Cloruro de sodio -----	10.0 gr
Agar bacteriológico -----	10.0 gr
Agua destilada -----	1000.0 gr

Disolver los ingredientes en el agua mediante calentamiento y agitación continua. Ajustar el pH a 6.7. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. Se usa para la conservación de cepas de Vibrio parahaemolyticus.

MEDIO SIM.

Fórmula:

Peptona de caseína -----	20.0 gr
Peptona de carne -----	6.1 gr
Sulfato de hierro y amonio -----	0.2 gr
Tiosulfato de sodio -----	0.2 gr
Agar bacteriológico -----	3.5 gr
Cloruro de sodio -----	30.0 gr
Agua destilada -----	1000.0 ml

Suspender 30 gr de polvo en un litro de agua destilada, mezclar bien y cuando se obtenga una suspensión uniforme,

calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante un -
minuto. Ajustar el pH a 7.3, esterilizar a 121° durante 15 -
minutos.

PEPTONA DE GELATINA AL 0.1% (Diluyente).

Fórmula:

Peptona de gelatina ----- 1.0 gr

Agua destilada ----- 1000.0 ml

Disolver la peptona en el agua. Ajustar el pH a 6.9
+ 0.1. Esterilizar a 121° durante 15 minutos.

PREPARACION DE REACTIVOS.

ACIDO TRICLOROACETICO 7%.

Fórmula:

Acido tricloroacético -----	7.0	gr.
Agua destilada -----	100.0	ml.

SOLUCION SATURADA DE ORTOFOSFATO DE SODIO POTASA $\text{Na}_3\text{PO}_4\text{KOH}$ ---
(AGENTE LIBERADOR).

Fórmula:

Hidróxido de potasio en escamas -----	10.0	gr.
Fosfato trisódico -----	44.0	gr.
Agua destilada -----	100.0	ml.

Disolver el hidróxido en agua, enseguida agregar el -
fosfato trisódico y agitar.

SOLUCION SATURADA DE CARBONATO DE POTASIO 90% K_2CO_3 (AGENTE -
SELLADOR).

Fórmula:

Carbonato de potasio -----	90.0	gr.
Agua destilada -----	100.0	ml.

ACIDO BORICO 3%.

Fórmula:

Acido bórico -----	3.0	gr.
Agua destilada -----	100.0	ml.

INDICADOR DE CONWAY.

Fórmula:

Verde de bromocresol -----	0.33	gr
Rojo de metilo -----	0.066	gr
Alcohol étilico -----	100.0	ml

AGENTE ATRAPANTE.

Fórmula:

Indicador de Conway -----	1.0	ml
Acido bórico 3% -----	50.0	ml
Disolver el indicador en el ácido bórico.		

REACTIVO DE OXIDASA.

Fórmula:

Monoclorhidrato de p-dimetilamino- fenilendiamina -----	1.0	gr
Agua destilada -----	100.0	ml
preparar inmediatamente antes de usar.		

ALFA NAFTOL.

Fórmula:

Alfa-naftol -----	1.0	gr
Alcohol étilico 95% -----	100.0	ml

HIDROXIDO DE POTASIO (REACCION DE VOGES-PROSKAUER).

Fórmula:

Hidróxido de potasio en escamas ----	4C	gr
Agua destilada -----	100.0	ml

ALFA NAFTOL (REACCION DE VOGES-PROSKAUER).

Fórmula:

Alfa-naftol -----	5.0	gr
Alcohol étilico absoluto -----	100.0	ml

REACTIVO DE KOVAC (PRUEBA DE INDOL).

Fórmula:

p-demetil benzaldehido -----	5.0	gr
Alcohol amílico -----	75.0	ml
Acido clorhídrico concentrado -----	25.0	ml

Disolver el aldehído en el alcohol y adicionar lentamente el ácido clorhídrico.

CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIUM (TTC).

Fórmula:

Cristal violeta -----	2.0	gr
Alcohol étilico -----	20.0	ml

Disolver el cristal violeta en el alcohol. Mezclar con una solución que contenga 0.8 gramos de oxalato de amonio en 80 mililitros de agua destilada. Dejar reposar 24 hrs y filtrar en papel filtro.

LUGOL (COLORACION DE GRAM)

Fórmula:

Yodo -----	1.0 gr
Yoduro de potasio -----	2.0 gr
Agua destilada -----	300.0 ml

SAFRANINA O.

Fórmula:

Safranina O -----	2.5 gr
Alcohol étilico al 95% -----	100.0 ml
Agua destilada -----	90.0 ml

Disolver el colorante en el alcohol y adicionar el agua.

ALCOHOL (COLORACION DE GRAM).

Fórmula:

Alcohol étilico -----	95.0 ml
Agua destilada -----	5.0 ml.

M E T O D O L O G I A .

- I.- Se adquirieron 57 muestras de mariscos a lo largo de un año: 18 de camarón, 25 de ostión y 14 de pescado, de tres centros de abasto de esta ciudad.
- II.- La investigación de Vibrio parahaemolyticus se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Marvin L. Speck - (29). Se incluyó la evaluación de dos medios selectivos diferenciales en placas de agar Sales Biliares #3 (SB - #3) y Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS).
- III.- Para cada muestra se incluyeron las siguientes determinaciones:
- a) Identificación de Vibrio parahaemolyticus (Esquema - 1).
 - b) Pruebas bioquímicas (Tabla 1).
 - c) Morfología microscópica (Tabla 2).
 - d) Recuento de bacterias mesofílicas aerobias (Tabla 2, Esquema 2).
 - e) Determinación de Nitrógeno Volátil Total (NVT) (Esquema 3).
 - f) pH (Potenciométrico) (Esquema 4).

PROCEDIMIENTO.

I.- OBTENCION DE LA MUESTRA.

- a) Se obtuvieron las muestras de ostión, camarón y pescado-
crudos, de tres centros grandes de abastecimiento de la
Ciudad de Guadalajara.
- b) Se transportaron al laboratorio en bolsas de polietile--
no para su análisis inmediato.
- c) Las muestras de ostión seleccionadas, fueron aquellas --
que conservaron su concha herméticamente cerrada; se so-
metieron a un lavado con agua estéril y posterior descon-
chado en condiciones asépticas.
- d) El pescado fué seleccionado apoyandonos en los criterios
de frescura comunmente conocidos: olor fresco a algas ma-
rinas, a mariscos sin olor neutro. Piel brillante, lus-
trosa, iridiscente y opalescente, no blanquecina. Aga-
llas rojas o rosas, brillantes, mucosas. Substancias ex-
ternas viscosas, transparentes o acuosas. Ojos convexos-
y brillantes. Se incluyó para el análisis agallas, piel-
y músculo.
- e) El camarón fresco fué adquirido mediante una apreciación
sensorial. Se consideró para el estudio todo el especí-
men.

II.- AISLAMIENTO DE V. parahaemolyticus.

- a) Vibrio parahaemolyticus se investigó mediante alicuotas-

de 20 gr de muestra en 180 de Caldo Glucosa Sal Lauril (CGSL), 2 gr de muestra en 20 ml de CGSL y 0.2 gr de muestra en 2 ml de CGSL, homogeneizando durante 90 segundos en licuadora estéril.

- b) A partir del homogeneizado se sembró por estría una --placa de agar Sales Biliares #3 (SB #3) y una de agar-Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS).
- c) Ambos; caldo de enriquecimiento y placas de medio se--lectivo se incubaron 24 hrs/35^oC.

III.- DETERMINACIONES PARA CADA MUESTRA.

- a) A partir de las placas de medios diferenciales se se--leccionaron las colonias típicas de Vibrio parahaemo - lyticus. En agar Sales Biliares #3 son rojas brillan--tes, de 2 a 3 mm de diámetro, lisas, planas. En agar - TCBS son azul a verde, planas, de 2 a 3 mm de diámetro (25). Posteriormente sembradas en agar Soya Trypticasefina 3% sal, Caldo Trypticasa 3% sal y Caldo Trypticasa 0% sal. Incubando 24 hrs/35^oC. Seleccionando unicamen--te cepas halofílicas estrictas.
- b) A partir de agar Soya Trypticasefina 3% sal se realizó--la tinción de Gram y otras pruebas bioquímicas descri--tas en los manuales de Berge's y Speck (1, 29)(Esq. 1).
- c) Recuento de Bacterias mesofílicas Aerobias (B M A).
 - 1.- Medio utilizado agar Cuenta Estandar (C E).
 - 2.- Para cada muestra se utilizaron las diluciones 4,- 5 y 6. (Esquema 2).

- 3.- Inocular con 1 ml de cada dilución las cajas de petri.
- 4.- Incorporar 12 a 15 ml del medio de cultivo estéril, fundido y conservado en baño maría a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- 5.- Dejar solidificar.
- 6.- Incubar a 20°C durante 48 horas.
Incluir en el recuento todas las colonias desarrolladas en la placa seleccionada (Esquema 2).

d) Nitrógeno Volátil Total (NVT).

- 1.- En un mortero macerar 5 gramos de muestra (agallas y músculo) en 10 ml de ácido tricloroacético.
- 2.- Filtrar en algodón y papel filtro ordinario.
- 3.- Colocar el extracto líquido en tubos de ensayo y -- centrifugar durante 15 minutos a 2500 rpm.
- 4.- Colocar 2.5 ml de la solución saturada K_2CO_3 (agente sellador) en el compartimiento periférico de la caja de Conway.
- 5.- Depositar 1 ml de la solución saturada de fosfato -- de sodio potasa $\text{Na}_3\text{PO}_4\text{KOH}$ (agente liberador) en uno de los extremos del compartimiento intermedio de la caja y 1 ml de la muestra en el otro extremo del -- mismo compartimiento.
- 6.- Colocar 1 ml de la solución compuesta de ácido bórico e indicador de Conway (agente atrapador) en el -- compartimiento central.
- 7.- Colocar la tapa de la caja de Conway y girarla cuidadosamente para sellar.
- 8.- Girar cuidadosamente la caja de Conway ya tapada y-

sellada hasta mezclar la muestra con el agente sellador.

- 9.- Dejar reposar 2 horas y titular el agente atrapante-- hasta su color original con ácido sulfúrico (H_2SO_4) - 0.024 N.

De acuerdo a los mililitros gastados de ácido-sulfúrico, nos damos cuenta de la cantidad de nitrógeno volátil total (NVT), contenido en la muestra analizada por medio de la siguiente fórmula:

NVT (mg N/100 g de la muestra).

$NVT = ml H_2SO_4 \times 0.024 \times 14.01 \times 100 \times 2.7 \times 1.3$ ----
(Esquema 3).

- e) pH (potenciométrico).

A partir de 5 g de la muestra (músculo para el caso del pescado), realizar una dilución peso a volumen con 5 ml de agua destilada recién hervida y fría. Homogeneizar y medir el pH potenciométricamente (Esquema 4).

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION.

Para la identificación de Vibrio parahaemolyticus fueron seleccionadas las pruebas que recomiendan los manuales como Bergey's y Speck (1, 29). Estas pruebas incluyen además de la caracterización microscópica del germen, su capacidad para desarrollar en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), así como la producción de indol, lisin Descarboxilasa, citocromo oxidasa y pruebas de fermentación de carbohidratos entre otras tal como se indica en la tabla 1.

Un recurso utilizado para poner de manifiesto el potencial patógeno del Vibrio parahaemolyticus es la prueba de Kanagawa, la cual se basa en la capacidad de la bacteria para producir hemolisinas beta. Esta prueba es considerada por los especialistas como obligatoria en las cepas provenientes de especímenes humanos (21, 29). Prácticamente la totalidad (96%) de las cepas aisladas de casos de gastroenteritis poseen la capacidad de lisar los eritrocitos humanos (prueba de Kanagawa positiva), en tanto esta facultad es excepcional entre las cepas obtenidas a partir de especímenes marinos 1% (35).

Estudiamos 57 muestras: 14 de pescado, 18 de camarón y 25 de ostión, la positividad global para Vibrio parahaemolyticus fué de 45.6%, observándose el índice más elevado en pescado (71.4%), le siguió el ostión con 44.0% y el más bajo fué el camarón con 27.9% (Tabla 3). La incidencia de 45.6% obtenida en el presente trabajo es superior a los da--

tos que se registran en la literatura, tanto nacional como - extranjera. En Tokio de 1963 a 1973 de 814 cepas aisladas de alimentos, se obtuvo un 2.3% de positivos a Vibrio parahae - molyticus. En 1973 en un avión que viajaba de Bangkok a Lon - dres se aisló el Vibrio parahaemolyticus en carnes de cangre - jo cruda y curtida (39).

En la bahía de Galvestón Texas se realizó un estu - dio en cangrejo los cuales mostraron un 23% de prevalencia - (8).

En octubre de 1979 a Junio de 1980 en Long Island se analizaron 36 muestras de ostión de las cuales 12 (36%) - se estableció que contenían Vibrio parahaemolyticus (40).

En otro estudio realizado en un estuario al Este - de Shelde en moluscos holandeses, 3 de 79 muestras analiza - das 3.8% fueron positivos (5).

En Perú Miranda-Ramírez analizaron 100 muestras - de pescado fresco obteniendo sólo el 1% de positividad (3).

En nuestro país existe poca información en cuanto a la frecuencia de aislamiento de este microorganismo en ali - mentos marinos.

En 1979 Gil y col. en Puebla investigaron la in - cidencia del microorganismo en 103 muestras de peces y maris - cos crudos obteniendo un 6% de positividad (23).

En 1977 Villanueva en Acapulco analizó 150 mues - tras de ostión encontrando una incidencia de 5% (45).

En 1978 Ramírez realizó otro estudio en Puebla -

con 88 muestras de pescado, 31 de moluscos y 31 de crustáceos encontrando una incidencia de Vibrio parahaemolyticus de 5.6, 6.4 y 9.6% respectivamente (34).

Mota y col. en 1988 reportaron 0% de incidencia en 389 muestras de pescado adquirido del mercado de la Viga de México D.F (20).

Al comparar la productividad de la técnica en caldo de enriquecimiento Caldo Glucosa Sal Lauril (CGSL) contra la siembra directa en placas de Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sa carosa (TCBS) y Sales Biliares #3 (SB #3) encontramos que solo una muestra del total de positivos se manifestó por ambas técnicas, 15 se recuperaron exclusivamente a través del caldo de enriquecimiento que corresponde al 60% de positivos mismos que se hubieran perdido con la exclusión del caldo. El 36% de los positivos (9 muestras) fueron recuperadas únicamente mediante la técnica de siembra directa. La inclusión de ambas técnicas ofreció sin duda una mayor posibilidad de hallazgo del patógeno (Tabla #4). se ha señalado ampliamente la ventaja que ofrece el diversificar la metodología empleada para la investigación de patógenos en alimentos. Patógenos como la Salmonella ha sido recuperado a través de distintos procedimientos (11). En ceviche de pescado el preenriquecimiento en caldo nutritivo (CN), aplicado a las muestras, condujo a un solo positivo contra 29 por la vía de enriquecimiento directo, haciendo uso en ambos casos del caldo tetracioneto (CTT) y caldo selenito cistina (CSC) (41). En un estudio realizado en carne cruda el empleo de CTT mostró clara ventaja sobre el CSC en la recuperación de Salmonella en 4 variedades de carne

cruda, tanto a 35° como a 43°C (18). En el ceviche de pescado almacenado a 10° y 20°C resultó más productivo el CSC que el CTT. En cambio en chorizos y longanizas el CSC no exhibieron diferencias significativas en su productividad (10). Estudios realizados en requesón y queso fresco no pasteurizado revelan un gran porcentaje de falsos negativos a Salmonella a través de CSC (12, 41). Hobbs como otros autores aboga por el uso de los dos caldos de enriquecimiento (CTT y CSC) para así obtener un número mayor de aislamientos a Salmonella en muestras de alimentos (24).

En el año de 1982 en la revista Applied se publicó un artículo en el cual se daba a conocer un nuevo medio selectivo y diferencial para la identificación de Vibrio parahaemolyticus. Dicho medio se basa en la inclusión de ingredientes selectivos como sales biliares #3 (SB #3), cloruro de trifeniltetrazolium (TTC), el cual mostró una productividad igual o mayor al medio tradicional de Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), (25). Según la formulación descrita en la tabla 5, la composición del medio SB #3 es menos compleja que la del agar TCBS.

Al incluir estos dos medios diferenciales en el presente trabajo, observamos (Tabla 6) que 5 de las muestras positivas se recuperaron simultáneamente por ambos medios (SB #3 y TCBS), 8 hallazgos (40%) se recuperaron exclusivamente en el agar SB #3 y 7 (35%) únicamente se manifestaron en el agar TCBS.

Esta experiencia hace ver la importancia de in--

cluir en la práctica para la identificación del Vibrio parahaemolyticus el medio propuesto por Kourany (25) que junto con el tradicional TCBS que recomiendan manuales como Speck (29) disminuyen el riesgo de obtener falsos negativos.

Es posible que la diversificación en la metodología aplicada para la investigación del Vibrio parahaemolyticus en pescado, ostión y camarón crudos explique el elevado índice de positivos que contrastan con los que se registran en la literatura tanto nacional como extranjera.

En la tabla 7 se observa una marcada influencia en la positividad a Vibrio parahaemolyticus según la época del año. En la época calurosa (Abril a Septiembre) se obtuvo el 77.0% de positivos mientras que en la época fría (Noviembre a Febrero) solo el 23.0%. Estudios realizados en Estados Unidos y costas del Japón muestran una relación directa entre la variación estacional y la incidencia de Vibrio parahaemolyticus, tanto en alimentos marinos como en aguas con bajo y alto contenido orgánico.

En la tabla 8 se registran los valores de bacterias mesofílicas aerobias (B. M. A.), pH y nitrógeno volátil total (NVT), donde se muestra que las muestras de pescado fueron las que contenían cargas microbianas más altas, con una media de 4.9×10^7 , le sigue en camarón con una media de 6.0×10^5 y 5.6×10^3 en el ostión.

En cuanto a los valores de pH encontramos que la media fue de 6.38, 7.88 y 6.44 para pescado, camarón y ostión respectivamente. En la literatura se menciona que la-

mayoría de las bacterias desarrollan en límites de pH muy — próximos a los mencionados. Silleker le atribuye un pH de — alrededor de 6.9 al pescado fresco (35). Los límites de pH— señalados para el desarrollo de Vibrio parahaemolyticus van de 7.4 a 8.6 (11).

Parámetros de frescura microbianos como es la— determinación de nitrógeno volátil total (NVT) se han suge— rido como un medio exploratorio del grado de frescura en al— gunas especies de pescado (11).

Lannelongue y col, reportaron los siguientes— valores de NVT/100 gr. de tejido de pescado de diferentes — grados de frescura: menos de 12 mg, en pescado fresco recién capturado, de 12 a 20 mg. ligeramente descompuesto y de buena calidad, de 20 a 25 mg. aún comestible, más de 25 mg. des— compuesto, no comestible (26).

Si tomamos en cuenta las cifras anteriores, — valores como el 33.63 mg. de NVT en las muestras de pescado— analizadas en el presente trabajo, serán imputables a un pro— ducto descompuesto, sin embargo estos pescados se encontra— ban en el comercio con una frescura aparente desde el punto— de vista sensorial, basándonos en el criterio universal para determinar la frescura sensorial: olor fresco a algas mari— nas, a mariscos sin olor o neutro, piel brillante, lustrosa, iridiscente y opalescente, no blanquecina, agallas rojas a— rosas, brillantes, mucosas, substancias externas viscosas,— transparentes o acuosas, ojos convexos y brillantes.

En algunos estudios se señala el papel tan importante que juega la flora asociada, como un factor que suele interferir de manera significativa en la manifestación de patógenos incluso a través de medios selectivos. Según se ilustra en la tabla 9 tanto las muestras positivas como las negativas al patógeno contenían indistintamente cargas de bacterias mesofílicas aerobias (B. M. A.), de 10^7 , 10^5 , 10^3 en pescado, ostión y camarón.

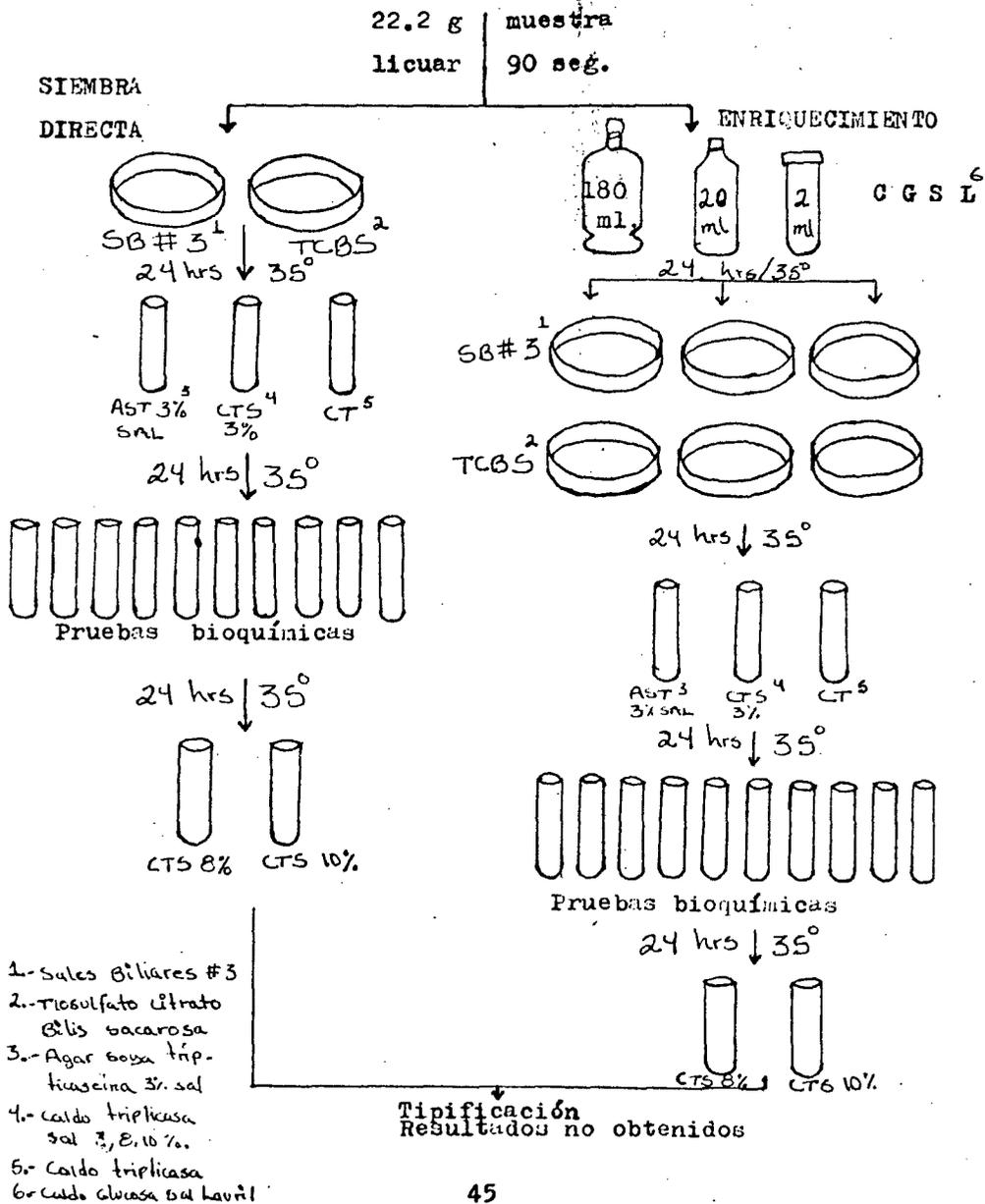
Mediante la información adquirida en el presente-trabajo, podemos afirmar que aislar el Vibrio parahaemolyticus de alimentos marinos (el vehículo más común) no resulta difícil, siempre y cuando se incluya la metodología adecuada para ese propósito. Dada la limitación que tiene la prueba de Kanagawa para decidir la patogenicidad de las cepas aisladas de mariscos, se hace necesario el apoyo de pruebas serológicas que permitan confirmar de manera definitiva la identidad del microorganismo. La larga lista de pruebas utilizadas en el presente trabajo para la identificación del Vibrio parahaemolyticus nos ofrece un amplio margen de aproximación a la identidad del patógeno.

El conocimiento de la incidencia de patógenos en alimentos es fundamental para el establecimiento de estrategias que conduzcan al control epidemiológico de las enfermedades a que dan lugar.

ESQUEMAS Y TABLAS

ESQUEMA 1.

Incidencia de Vibrio parahaemolyticus

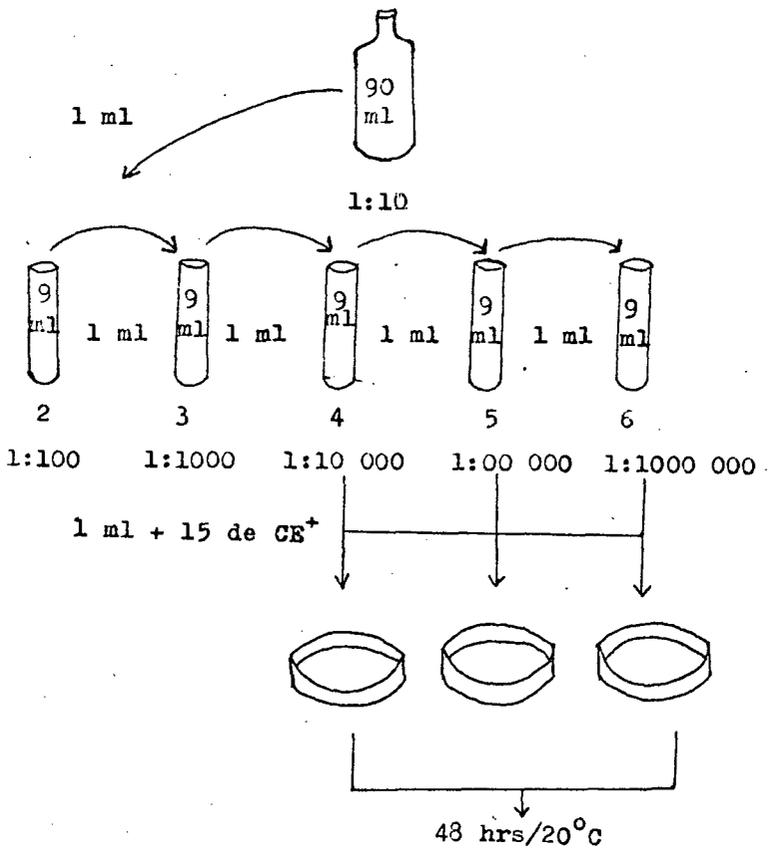


ESQUEMA 2.

Recuento de Bacterias Mesofílicas Aerobias (BMA).

10 gr de muestra + 90 ml de diluyente

Licuar 90 seg.

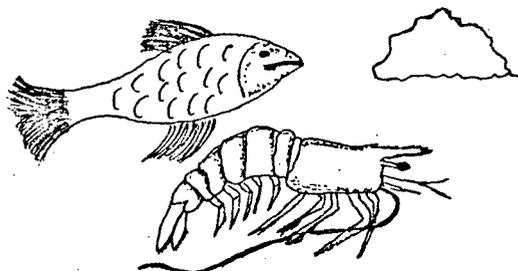


+ Cuenta Estandar.

Contar colonias

ESQUEMA 3

Determinación de Nitrógeno Volátil Total.

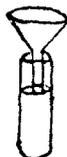


5 gr. de muestra + 10 ml. de ác. tricloroacético

macerar



filtrar



Centrifugar.
2500 rpm/15 minutos.

1 ml. de agente
atrapante.

2.5 ml. de K_2CO_3
(Agente sellador)

1 ml. de muestra.

1 ml. de agente
reaccionante.

Reposar 2 hrs.
titular H_2SO_4 . (0.024N).

Na_3PO_4 KOH.

ESQUEMA 4

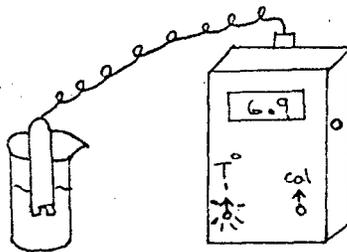
pH

5 gr. de muestra + 10 ml. de H₂O hervida.

macerar



Tomar lectura

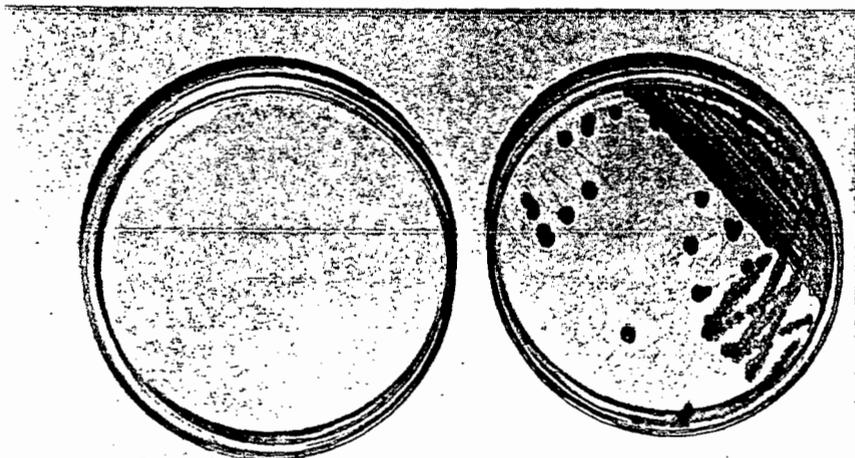


Reportar

AGAR SALES BILIARES #3

Tal cual

Colonias características



AGAR TIOSULFATO CITRATO BILIS SACAROSA

Tal cual

Colonias características

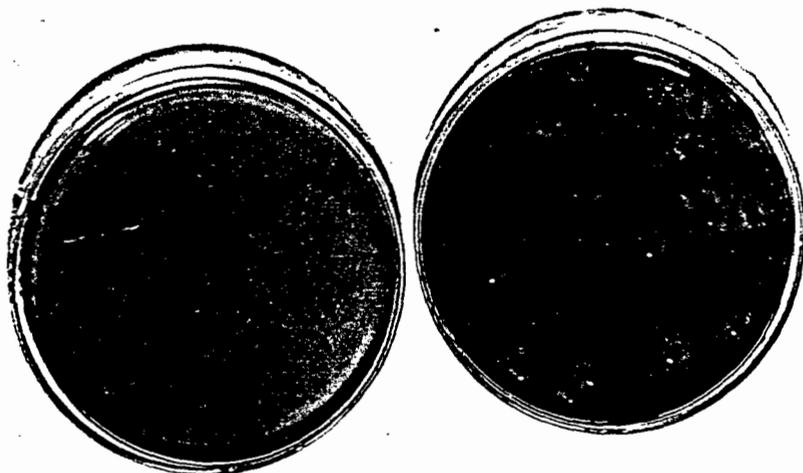


TABLA 1.

CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION
DE Vibrio parahaemolyticus.

Movilidad al microscopio	positivo
Bacilos cortos incurvados	positivo
Gram	negativo
Desarrollo en CT ⁺ sin NaCl	negativo
Desarrollo en CT con 3% NaCl	positivo
Desarrollo en CT con 8% NaCl	positivo
Desarrollo en CT con 10% NaCl	negativo
Movilidad SIM-sal	positivo
H ₂ S SIM- sal	negativo
Indol SIM-sal	positivo
Voges Proskauer	negativo
Gelatinasa	positivo
Lisina descarboxilasa	positivo
Citocromo oxidasa	positivo
O/F ⁺⁺	fermentativo
Manitol	positivo
Sacarosa	negativo
Lactosa	negativo
Gas de glucosa	negativo

+ Caldo Tripticasa

++ Oxidación Fermentación

TABLA 2.

PRUEBAS DE LABORATORIO

DETERMINACION	TECNICA	INCUBACION	TEMPERATURA
Bacterias mesofili- cas aerobias.	Vaciado en placa (CE). ⁺	48 hrs.	20°
Nitrógeno Volátil- Total	Microdifu- sión de - Conway.	24 hrs.	ambiente
pH	Potenciomé- trico.		
Morfología microscópica.	Tinción al gram: Bacilo gram negativo recto o ligera- mente curvo, móvil, con un flagelo- polar, de 1 a 3 micras de longitud- por 0.4 a 0.6 de diámetro.		

⁺ Cuenta Estándar.

TABLA 3.

Incidencia de Vibrio parahaemolyticus
 en pescado, ostión y camarón crudos.

PRODUCTO	No. MUESTRA	No. DE (+)	PORCENTAJE
Pescado	14	10	71.4 %
Ostión	25	10	44.0 %
Camarón	18	5	27.6 %
Global	57	25	45.6 %

TABLA 4.

Recuperación de Vibrio parahaemolyticus
 en pescado, ostión y camarón crudos se-
 gún técnica de aislamiento.

Enriquecimiento	+	+	-	-
Siembra directa	+	-	+	-
Pescado	1	7	2	4
Ostión	0	5	5	15
Camarón	0	3	2	13
Global	1	15	9	32

TABLA 5

COMPOSICION Y COMPARACION DE LOS DOS
MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

A

B

AGAR SALES BILIARES #3
(SB #3).

AGAR TIOSULFATO CITRATO BILIS
SACAROSA (TCBS).

Agar soya tripticasa	40 g	Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	25 g	Peptona de carne	5 g
Sacarosa	20 g	Peptona de caseína	5 g
Sales biliares #3	0.5 g	Sacarosa	20 g
TTC al 1%	3 ml	Tiosulfato de sodio	10 g
Agua destilada	1000 ml	Citrato de sodio 2H ₂ O	10 g
pH = 7.1		Colato de sodio	3 g
		Oxgall	5 g
		Cloruro de sodio	10 g
		Citrato férrico	1 g
		Azul de bromotimol	0.04 g
		Azul de timol	0.04 g
		Agar bacteriológico	15 g
		Agua destilada	1000 ml
		pH = 8.6	

TABLA 6.

Positividad a Vibrio parahaemolyticus
 en pescado, ostión y camarón según --
 medio selectivo en placa.

Medio selectivo	Positividad			
	+	-	+	-
TCBS	+	-	+	-
SB #3	+	+	-	-
Pescado	2	5	3	4
Ostión	3	2	3	5
Camarón	0	1	1	4
Total	5	8	7	13

TCBS = Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa.

SB #3 = Agar Sales Biliares #3.

TABLA 7.

Positividad de Vibrio parahaemolyticus
según época fría y calurosa del año.

	Epoca del año:	
	Fría	Calurosa
Muestras analizadas	24	33
Positivos	6	20
%	23.0	76.9

Epoca fría de Noviembre a Febrero.

Epoca calurosa de Abril a Septiembre.

TABLA 8.

Bacterias Mesofílicas Aerobias, pH y Nitrógeno Volátil Total en 57 muestras de pescado, ostión y camarón crudos.

PRODUCTO	BMA	pH	NVT
	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
Pescado	4.9×10^7	6.38	33.63
Ostión	5.6×10^3	6.46	-
Camarón	6.0×10^5	7.88	43.93
Global	1.2×10^5	6.53	37.76

BMA = Bacterias mesofílicas aeróbicas

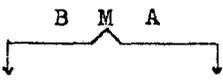
NVT = Nitrógeno volátil total

\bar{X} = media aritmética.

- = no realizado

TABLA 9.

Bacterias mesofílicas aerobias según presencia de Vibrio parahaemolyticus en pescado, ostión y camarón crudos.

PRODUCTO	<div style="text-align: center;"> B M A  </div>	
	positivo a V. p.	negativo a V. p.
Pescado	4.8×10^7	9.6×10^7
Ostión	6.9×10^3	5.5×10^3
Camarón	1.6×10^5	6.3×10^5
Global	1.2×10^5	1.2×10^5

BMA = Bacterias mesofílicas aerobias

V.p. = Vibrio parahaemolyticus

R E S U M E N .

En algunos países la gastroenteritis causada -- por Vibrio parahaemolyticus alcanza un nivel superior al -- 50% entre los agentes etiológicos transmitidos por alimentos. Consideramos conveniente estudiar la incidencia de esta bacteria en alimentos de origen marino (el vehículo más común) y valorar algunas técnicas de análisis que permitan un diagnóstico confiable ante brotes del padecimiento. Se colectaron en tres centros de distribución 57 muestras de ostiones, pescado y camarón crudos en los que se determinó su contenido en bacterias mesofílicas aerobias (BMA), Vibrio parahaemolyticus y pH. En los últimos además el nitrógeno volátil total (NVT). Las BMA se contaron por la técnica de vaciado en placa (20° por 48 hrs.) el pH con potenciómetro y el NVT con la técnica de Conway. El patógeno se investigó por enriquecimiento en Caldo Glucosa Sal Lauril (CGSL) y aislamiento en agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y agar Sales Biliares #3 (SB #3) y con siembra directa en ambos medios sólidos. En uno y otro caso, fueron examinados 20 gramos de muestra. El Vibrio se identificó con las siguientes pruebas: morfología microscópica y colonial, movilidad, desarrollo en 0, 3, 8 y 10% de cloruro de sodio (NaCl), producción de indol, H₂S, lisindescarboxilasa, citocromo oxidasa y gelatinasa, prueba de Voges-Proskauer y Hugh Leifson y fermentación de glucosa, manitol, lactosa y sacarosa. La positividad global a Vibrio --

parahaemolyticus fué de 45.6%, con 71.4 para pescado y 27.6 el camarón. Solo una muestra resultó positiva por enriquecimiento y por siembra directa; las 24 restantes lo fueron -- por una u otra técnica. No se observó diferencia en las medianas del contenido de NVT y pH según positividad. Las medianas respectivas de BMA en ostiones, pescado y camarón -- fueron 1.4×10^4 , 3×10^7 y 2.9×10^6 , sensiblemente iguales entre las muestras negativas y positivas.

CONCLUSIONES .

- 1.- La incidencia global a Vibrio parahaemolyticus en pescado, ostión y camarón crudos fue del 45.6%.
- 2.- El enriquecimiento en Caldo Glucosa Sal Lauril (CGSL) permitió un 62% de positivos contra solo 38% a través de la siembra directa en placas de agar Sales Biliares #3 (SB #3) y agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS).
- 3.- La inclusión de agar Sales Biliares #3 (SB #3) en la investigación de Vibrio parahaemolyticus incrementó la positividad en un 40%.
- 4.- Niveles de flora asociada de 10^3 a 10^7 no interfirieron en la recuperación del patógeno.
- 5.- El conocimiento de la incidencia de patógenos en alimentos es fundamental para el establecimiento de estrategias que conduzcan al control epidemiológico de las enfermedades a que dan lugar.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Bergy's. Manual of Determinative Bacteriology. 1975.--
Ed. Board. Eighth Edition. 8: 340-345.
- 2.- Beucht. L. R. 1977. Evaluation of Enrichment Broths --
for Enumerating Vibrio parahaemolyticus in chilled and
frozen crab meat. Journal of Protection. 40: 592-595.
- 3.- Bocanegra, F. A., Mercado, P. E., y Saldaña, W. H. ---
1981 Vibrio parahaemolyticus: Presencia en ambientes -
marinos y mixohalinos de la provincia de trujillo, Pe-
rú. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 23: 135-140.
- 4.- Brown, L. D. and Dorn, C. R. 1977. Fish, Shelfish and-
human health. J. Food. prot. 40: 712-717.
- 5.- Broek, M. J. M. Mossel, D. A. A. and Eggenkamp Ali E.-
1978. Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in Dutch -
Mussels. Applied and Environmental Microbiology. 37: -
438-442.
- 6.- Bryan, F. L. 1980. Epidemiology of food borne diseases
transmitted by fish, shelfish and marine crustaceans -
in the United States 1970-1978. Journal of food protec-
tion. 43: 859-876.
- 7.- Dadisman, T. A., Jr. Nelson, R. and Molenda, J. R. 1972.
Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis in Maryland: -
Clinical and epidemiologic aspects. Milk Food Technol.
36: 111-112.

- 8.- Davis J. W., and Sizemore, R. K. 1982. Incidence of Vibrio Species Associated with Blue Crabs (Callinectes sapidus) Collected from Galveston Bay Texas. Applied and Environmental Microbiology. 43: 1092-1097.
- 9.- De León Fajardo, L. R. and Marth, E. H. 1979. Bacterial flora of fish from tropical sea water. J. Food Protection. 42: 724-728.
- 10.- Fernández Escartín E. y Castillo Ayala A. 1980. Efi -- ciencia del preenriquecimiento en la recuperación de Salmonella apartir de chorizos y longanizas. XI Congre -- so Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos. Méxi -- co D.F.
- 11.- Fernández Escartín E. 1981. Microbiología Sanitaria -- agua y alimentos. 1: 544-560. U de G. Guadalajara Jal.
- 12.- Fernández Escartín E., Castillo Ayala A. y Torres Vite -- la R., 1983. Destino de Staphylococcus aureus nativo -- de Salmonella artificialmente inoculada en leche, du -- rante la evaporación y almacenamiento de quesos fres -- cos no pasteurizados. II influencia del pH, de la flo -- ra asociada y el nivel original de contaminación del -- patógeno. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 25: 19-86.
- 13.- Fernández Escartín E., Castillo Ayala A. y Torres Vite -- la R. 1983. Salmonella en requesones adquiridos de mer -- cados públicos. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Chihuahua Chih.

- 14.- Fernández Escartín E., Ayala Castillo A. y Saldaña Lozano J. 1983. El " Trapo de limpieza como reservorio de enterobacterias entre vendedores ambulantes y establecidos de alimentos. XIV Congreso Nacional de Microbiología Chihuahua, Chih.
- 15.- Fernández Escartín E., Ayala Castillo A. 1983. Evidencias bacterianas de contaminación fecal de agua y líquidos con leche. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Chihuahua, Chih.
- 16.- Fernández Escartín E. y Hernández Mireles C. 1983. --- Fuentes de contaminación de Salmonella en empacadoras de carne. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Chihuahua, Chih.
- 17.- Fernández Escartín E. y Saldaña Lozano J. 1983. Incidencia de Salmonella en jamón adquirido de tiendas almenudeo. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Chihuahua, Chih.
- 18.- Fernández Escartín E., Saldaña Lozano J., Hernández Mireles C. 1983. Incidencia de Salmonella en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación del microorganismo. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 25: 263-269.
- 19.- Fernández Escartín E., Saldaña Lozano J. y Torres Vite la R. 1983. Aplicación de la Técnica de la torunda en el aislamiento de Salmonella a partir de algunas fuentes de agua superficial. XIV Congreso Nacional de Mi---

- 20.- Fernández Rendón E., Nava Fernández L. y Mota de la Garza L. 1988. Ausencia de Vibrio parahaemolyticus en pescado crudo. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 30: 91-96.
- 21.- Fishbein, M. y Wentz, B. 1972. Vibrio parahaemolyticus-methodology for isolation from seafoods and epidemic. J. Milk Food Technol. 36: 118-123.
- 22.- Franco Monsreal J., y J. J. Flores Abuxapqui. 1988. -- Prevalencia de Vibrio parahaemolyticus en productos marinos y heces de manipuladores de alimentos. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 30: 223-227.
- 23.- Gil-Recansens M. E., Peral-López, A. M. y Ruiz Reyes - G. 1974. Aislamiento de Vibrio parahaemolyticus en casos de gastroenteritis y en mariscos crudos de la Ciudad de Puebla. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 85-88.
- 24.- Greenwood. D. E., Swaminathan, B., and Morse, E., V. - 1983. Two Selective enrichment media for the isolation of Salmonella, from mechanically deboned poultry meat. J. Food Science. 45: 1131-1135.
- 25.- Kourany Miguel. 1982. Medium for isolation and Differentiation of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus. Applied and Environmental Microbiology. 45: 310-312.
- 26.- Lannelongue, M. G., Finne, M. O., Hanna, R. Nickelson-

- II and Vanderzant, C. 1982. Microbiological and Chemical changes during storage of sword fish (*Xiphias gladius*) steaks en retail packages containing CO₂. Enriched atmospheres. *J. Food protection.* 45: 1197-1203.
- 27.- Liston J. and Baross J. 1973. Distribution of Vibrio parahaemolyticus in the Natural environmente. *J. Milk-Food Technol.* 36: 113-117.
- 28.- López Carrillo L., Bustamante Montes P., Borja Aburto. 1989. V Boletín mensual de epidemiología. Sistema Nacional de Salud. 4: 100-110.
- 29.- Lowry Philip W., McFarland Louise M., Peltier Barbara-H. y col. 1989. *Vibrio Gastroenteritis in Louisiana: A prospective Study among Attendees of a Scientific Congress in New Orleans.* *The Journal of Infectious Diseases.* 160: 978-984.
- 30.- Marvin L. Speck. 1976. Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. American Public-Health Asspiation. 29: 358-369.
- 31.- Nickerson J. T. y Anthony J. Sinskey. Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración. 1978. Ed. Acribia. 10: 209-229.
- 32.- Pelczar, M. J. y Reid, R. D. 1982. Microbiología. Segunda Edición en español. Ed. McGraw-Hill de México. - 29: 532-533.

- 33.- Pérez Memije E., Vélez González M. L. y Galván Rodríguez F. 1980. Búsqueda de Vibrio parahaemolyticus en heces de manejadores de alimentos en el puerto de Acapulco Gro. VII Reunión de Provincia Asociación Mexicana de Microbiología. Oaxaca, Oax.
- 34.- Raj H. and Liston J. 1961. Survival of bacteria of -- public health significance in frozen sea foods. Food Technol. 15: 429-434.
- 35.- Ramírez Guarneros A. D. y Pérez-Pérez G. I. 1979. Incidencia de Vibro parahaemolyticus en alimentos de -- origen marino y estudio de dos medios para la prueba de Kanagawa como medida de enteropatogenicidad. XI -- Congreso Nacional de Microbiología. Zapopan, Jalisco.
- 36.- Sakazak, R. 1969. Halophilic Vibrio infections. 115-- 129. En "Food borne infections and intoxications". -- Ed. H. Riemann. Acad. Press. Inc. New York. Citado en Microbiología Sanitaria agua y alimentos. Fernández - Escartín E.
- 37.- Salle, A. J. 1985. Fundamental principles of bacteriology U.S.A Ed. McGraw-Hill. 23: 772-773.
- 38.- Somaatmadja Dardjo, Powers Jhon J. and Pratt Dan E. - 1960. Chemical methods for the determination of the-- freshness of fish. Food Technology. págs. 2-6.
- 39.- Spite, G. T., Brown D. F. and Twedt Robert, M. 1978.- Isolation of an Enteropathogenic, Kanagawa-Positive--

Strain of Vibrio parahaemolyticus from seafood implicated in Acute Gastroenteritis. American Applied and Environmental Microbiology. 35: 1226-1227.

- 40.- Tepedino Anthony A. 1981. Vibrio parahaemolyticus in Long Island Oysters. Journal of Food Protection. 45: 150-151.
- 41.- Torres Vitela R. y Fernández Escartín E. 1988. Bacterias enteropatógenas en trapos de limpieza colectados en cocinas de hospital. V Reunión Anual de Microbiología Sanitaria agua y alimentos. U de G. Fac. de Cienc. Quim.
- 42.- Torres Vitela R. y Fernández Escartín E. 1986. Microbiología de ceviche de pescado XVII Congreso Nacional de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología. Puebla, Pue.
- 43.- Vanderzant C. and Nickelson R. 1973. Vibrio parahaemolyticus: a problem in mariculture?. J. Milk Food Technol. 36: 135-139.
- 44.- Villanueva, G. A. 1977. "Busqueda de Vibrio parahaemolyticus en ostiones frescos de la Bahía de Acapulco Gro". Tesis recepcional. Escuela de Ciencias Químicas Biológicas. U. A. G. Acapulco Gro.

FE ERRATA

- 1.- En la página 37 es agente liberador y no sellador.
- 2.- En la página 51 Tabla No. 2 la incubación es de 2 horas y no de 24 hrs.
- 3.- En las páginas 57,58 se omitió (UFC) Unidades Formadoras de Colonias.