

1989 - 1993 B

CODIGO: 085254669

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



“INCIDENCIA DE Vibrio cholerae EN PESCADO CRUDO”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

AGUILAR QUÉZADA MARIA ISABEL

GUADALAJARA, JAL. NOVIEMBRE DE 1994



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

C. MARIA ISABEL AGUILAR QUEZADA
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "INCIDENCIA DE Vibro cholerae EN PESCADO CRUDO " para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informo que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la M. en C. María del Refugio Torres Vitela.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
Guadalajara, Jal., 09 de Junio de 1993.
EL SECRETARIO
ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA DIRECCION



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

c.c.p.- M.en C.María del Refugio Torres V.; Directora de tesis.-
c.c.p.- El expediente del alumno.

JAEA>Cglr.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número

C. DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) Pasante AGUILAR QUEZADA MARIA ISABEL, código número 085254669, con el título "Incidencia de Vibrio cholerae en pescado crudo".

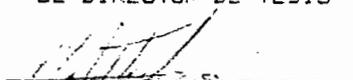
consideramos que reúne los meritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 19 de Octubre. 1994.

EL DIRECTOR DE TESIS


M. en C. MA. DEL REFUGIO TORRES VITELA.

SINDDALES

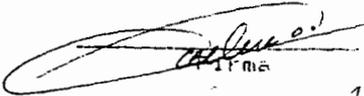
1. DR. SERGIO AGUILAR BENAVIDES.

Nombre completo


Firma

2. Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA.

Nombre completo


Firma

3. Q.F.B. MARGARITA BONILLA MORENO.

Nombre completo


Firma

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
SANITARIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUIMICAS, BAJO LA DIRECCION DE LA M.
EN C. MA. REFUGIO TORRES VITELA.

PENSAMIENTOS

P E N S A M I E N T O S :

Dame Señor:

agudeza para entender,
capacidad para retener,
metodo y facultad para aprender,
sutileza para interpretar,
gracia y abundancia para hablar.
Dame acierto al empezar,
direccion al progresar,
y perfeccion al acabar.

Sto. Tomas de Aquino.

Ser Joven es tener ideales,
y luchar hasta lograrlos,
es soñar en el futuro,
por el que se trabaja en el presente.
Es tener siempre:

ALGO QUE HACER,

ALGO QUE CREAR,

ALGO QUE DAR.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES :

Que me han tolerado y conducido con paciencia a obtener lo que yo más he deseado, gracias por su comprensión y apoyo.

A MIS HERMANAS Y
A MI PRIMO
TITO GODINEZ . Z:

Por su cariño y comprensión, por apoyo que me han otorgado y quienes me han ayudado en superarme cada día más.

A MI MAESTRA :
REFUGIO TORRES VITELA.

Mi agradecimiento por haberme aceptado y tolerado dandome la enseñanza de sus conocimientos y experiencias; para mi superación profesional.

A MIS SINODALES:

Por dedicarme un poco de su tiempo y contribuir en nuestra preparación profesional, para poder ser mejores día a día.

A MIS AMIGAS (OS) :

Memo, Lupita, Adriana, Rodolfo, Mary.

Ya que nos permiten sentir que existen personas con gran calidad humana, y así palpar la nobleza de la amistad y por su amistad desinteresada y entusiasmo constante.

A MIS COMPAÑERAS DE LABORATORIO:

Ruth, Alex, Gaby, Tere, Dianel, Bety, Olimpia, Eva, Luisa, Martha, Maricela, Juan José.

Por su amistad, ayuda y colaboración, de esta tesis; y por los momentos de felicidad y angustia, que hemos pasado.

A VERONICA NAVARRO
LUZ MARIA IBARRA
NANCY E. M:

Por su gran amistad y comprensión, quienes me ayudaron a superarme y aprender más cada día; aprendiendo algo nuevo, dando a conocer y recibiendo.

A CARLOS SANCHEZ R. :

Por su ayuda incondicional como amigo y compañero profesionalista.

AL LABORATORIO AMYCSA :

Adriana, Diana, Laura, Marcela, por su cariño, comprensión y dedicación, al alentarme en la realización de esta meta.

CON GRATITUD Y CARIÑO, A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA MANERA HAN COLABORADO EN MI SUPERACION Y EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

GRACIAS.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- OBJETIVOS	7
3.- HIPOTESIS	9
4.- GENERALIDADES	11
5.- MATERIAL Y REACTIVOS	24
6.- METODOLOGIA	36
7.- RESULTADOS Y DISCUSION	48
8.- TABLAS Y GRAFICAS	56
9.- CONCLUSIONES	82
10.- RECOMENDACIONES	84
11.- RESUMEN	86
12.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

INTRODUCCION

Actualmente en todo el mundo las gastroenteritis constituyen un serio problema de salud pública lo mismo en países desarrollados que en vías de desarrollo. La población principalmente afectada suelen ser los ancianos y niños en países con alto índice de desnutrición. Las enfermedades diarreicas son fuente importante de morbilidad y mortalidad mundial. Su impacto es crítico en países con pocos medios para afrontarlos, lo cual es una de las causas más importantes de muerte en áreas subdesarrolladas, incluso en países desarrollados la diarrea continua siendo causa de mortalidad infantil (23,49).

En Estados Unidos El Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) notificó que en el período 1983-1987, se presentaron un total de 2,397 brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) con 91,6788 casos de los cuales 1,582 brotes con 84,344 casos eran de origen microbiano (46).

Según el Boletín Semanal de Epidemiología del Sistema Nacional de Salud las diarreas en México ocupan el segundo lugar como causa de enfermedad (4). Aunque no se aplican estudios sistemáticos para esclarecer la etiología del agente microbiano involucrado, se estima que la participación de patógenos como *Salmonella* juegan un papel importante. En 1989, las diferentes instituciones de salud notificaron 3,419 casos de brucelosis, 9,790 de shigelosis, 10,939 de tifoidea 72,754 de salmonelosis y 1,948,542 de otras infecciones intestinales, lo que da un total de 2,076,343 episodios relacionados con transmisión alimentaria.

Se sabe que el síndrome diarreico puede ser ocasionado por una gran variedad de factores y agentes etiológicos. Sin embargo, las diarreas de origen infeccioso son debidas a bacterias enteropatógenas (*Salmonella*, *Shigella*, *C. perfringens*, *E. coli*, *B. cereus* y actualmente *V. cholerae*), recientemente se

han incorporado nuevos agentes patógenos: *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Arizona hinxhawii*, *Vibrio parahaemolyticus* y rotavirus. Los cuales han adquirido importancia gracias a que se ha perfeccionado la metodología para su aislamiento e identificación y se ha intensificado el estudio de los cambios biológicos de estos microorganismos (23,25,53).

Históricamente, *Vibrio cholerae* O1 ha sido el *Vibrio* de mayor importancia con respecto a la salud pública. Las otras especies fueron calificadas como no aglutinables o *Vibrios no cholerae* (40). Sin embargo, el género *Vibrio* es muy grande, contiene alrededor de 28 especies con numerosos biotipos, por lo menos 11 especies se consideran patógenas al humano y de estas solo 6 son asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae* y probablemente *Vibrio furnisii* (19,40,53)

Los síntomas de la infección por *Vibrio cholerae* pueden variar desde asintomáticos, a una diarrea moderada o enfermedad severa (*Cholera gravis*). En casos severos, el *V. cholerae* O1 puede causar diarrea profusa (agua de arroz), deshidratación y muerte si no se trata oportunamente. El período de incubación varía de 6 horas a 5 días (61).

Desde 1961 el cólera se ha difundido extensamente hasta afectar a más de 98 países. La amplia experiencia con el cólera ha demostrado que es imposible evitar su introducción a un país pero si es posible evitar su propagación (2).

A la fecha se reconocen 7 pandemias de cólera. El primer brote de cólera en este siglo en América Latina, ocurrió en Enero de 1991 en Perú, y a la fecha ha afectado a 18 países. Hasta el primero de Septiembre de 1993 se habían reportado

146,436 casos en América; específicamente en el estado de Jalisco, y a la semana epidemiológica número 41 (10-16 de Octubre), los casos de cólera se han incrementado en 541% (de 31 casos acumulados en 1992 a 168 casos acumulados en 1993) (4).

Los peces y mariscos han sido identificados como vehículo más frecuentes con respecto a otras variedades de alimentos (38). En países desarrollados, como Estados Unidos, los productos de origen animal (pescados, mariscos, carnes rojas, aves) son los alimentos más comúnmente asociados a casos o brotes de enfermedad, principalmente infecciosas (47).

El *V. cholerae* llega al agua de los estuarios y de las costas a través de las aguas de desecho, en número suficiente para contaminar el pescado, moluscos y crustáceos al ser ingeridos por ellos. Los alimentos se pueden contaminar también a través de la manipulación por personas infectadas por *V. cholerae* por descuido en su higiene personal, al ponerse en contacto con redes, cuerdas, puentes, cajas de depósitos, etc. Por lo que no debe sorprender que el pescado ya manipulado presente un número significativo de bacterias Gram positivas e incluso bacterias Gram negativas y coliformes. Estas bacterias pueden proceder del ambiente extra marino y no ser autóctonas del pescado (18). El pescado se considera como un producto altamente perecedero debido a su propia constitución y a que la cantidad de gérmenes existentes en la piel oscila entre 10^2 y 10^6 por cm^2 ; en las branquias de 10^3 a 10^5 por gramo, y en el intestino desde números muy pequeños en peces en ayunas hasta 10^7 o más por gramo en los peces que comieron (21). Se ha comprobado que el *V. cholerae* puede ser afectado por factores tales como la temperatura, la salinidad y la concentración de nutrientes (1,54,58). Datos de sobrevivencia señalan que se mantiene viable en agua salada estéril hasta por 285 días, en agua salada no estéril por 7 días y en mariscos de 15 a 45 días (25). En algunos alimentos el *Vibrio cholerae* puede llegar a

multiplicarse hasta alcanzar un número suficiente para causar el cólera (29).

La flora microbiana del pescado y mariscos y los métodos de manejo de los mismos, determinan sin duda su vida de anaquel, sobre todo cuando se distribuyen frescos (21).

La mayoría de los productos de la pesca se conservan en hielo cuyo grado higiénico y procedencia muchas veces se desconoce. Cuando el hielo es reutilizado suele estar contaminado con bacterias psicrófilas (Shewan 1962). Por otra parte, el pescado no debe quedar expuesto a los rayos del sol, ya que esto acelera los procesos de descomposición (51).

Estudios de incidencia revelan que el *V. cholerae* O1 y no O1 se encuentran ampliamente distribuidos en las Costas del Golfo y del Atlántico (34). En la literatura se registran un gran número de datos de incidencia de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos (8). Algunos estudios revelan la influencia de la variación estacional (7a,61). La resistencia de *V. cholerae* a las influencias ambientales no es grande; no obstante, el biotipo El Tor es más resistente y sobrevive durante más tiempo en el medio (en el agua y en los alimentos); por tanto se puede difundir más fácilmente que el biotipo Clásico. El Tor puede sobrevivir en el mar entre 10 y 60 días, en la superficie de pescados y mariscos contaminados que se conservan en refrigeración entre 7 y 14 días; en la superficie de verduras de 1 a 10 días (23). El tiempo de sobrevivencia en acidez elevada es generalmente menor de un día y en alimentos deshidratados menor de dos días. En utensilios y equipo se ha registrado una sobrevivencia de 4 a 48 horas (60).

En un trabajo realizado por Silvia Giono Cerezo de Enero a Abril de 1992, en 581 muestras, 398 de pescado (68.5%), 119 (20.5%) de crustáceos y 64 (11%) moluscos; Aislarón *V. cholerae*

O1 en un 0.3 %, *Vibrio* no O1 en un 23.9% y *Vibrio* spp. en un 25% (25).

La intensa propagación del cólera primero en las Américas y más recientemente en nuestro país, justifica realizar trabajos de investigación tendientes a valorar la magnitud del riesgo a la salud que puede implicar el consumo de alimentos contaminados por este microorganismo.

Tomando en cuenta que en nuestro país se consume el pescado crudo en forma de ceviche, las condiciones higiénicas pobres que prevalecen en nuestro medio y la costumbre de ingerir alimentos preparados fuera del hogar, se hace más grave el problema para la salud pública. Estudios previos han demostrado la capacidad para multiplicarse de patógenos como la *Salmonella* en pescado crudo molido en forma de ceviche (46). Por otra parte se ha determinado una incidencia de *Salmonella* del 32% de 195 muestras de ceviche adquirido en expendios en esta ciudad, sin embargo en el caso del *V. cholerae* se carece de información (57).

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivos los siguientes:

OBJETIVO GENERAL:

- 1.-- Determinar la magnitud del riesgo a la salud por el *V. cholerae* asociado al consumo de pescado crudo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1 Determinar la incidencia de *V. cholerae* en pescado crudo, adquirido de ostionerías en esta ciudad.
- 1.2 Determinar la incidencia de *V. cholerae* en ceviche de pescado que se expende en la vía pública.
- 1.3 Estudiar la calidad sanitaria de muestras de pescado crudo y ceviche, mediante el recuento de grupos microbianos indicadores y pruebas de frescura.

HIPOTESIS

Es posible medir y conocer el riesgo de enfermar de cólera en nuestro medio, conociendo la incidencia de *V. cholerae* en productos de amplio consumo popular como es el pescado crudo el cual es uno de los vehículos más importantes del patógeno.

GENERALIDADES

El pescado es un alimento básico en la dieta ya que es un producto con alto valor proteico. En la actualidad se capturan al año aproximadamente 70 millones de toneladas de diversas especies marinas en el mundo. Dentro de la jurisdicción de las aguas mexicanas, habitan cerca de 1,400 especies de pescado de las cuales más de 200 son comestibles (27).

El tejido del pescado es más perecedero que el de otros animales, aún manejado a bajas temperaturas. La calidad de este empieza a cambiar en el momento en que se retira del agua, y el pescado "fresco" que se considera muy aceptable desde el punto de vista comercial, no es lo que era en el momento de la captura. Aunque la carne de los peces se encuentra prácticamente estéril, existe un gran número de bacterias de diferentes tipos en la superficie y sistema digestivo del animal vivo. Cuando el pez muere, estas bacterias atacan rápidamente los componentes de los tejidos, presentándose alteraciones que disminuyen su aceptabilidad por parte del consumidor. Estos procesos ocasionan pérdidas muy cuantiosas en el renglón económico (47).

La microbiología del pez y los métodos de manipulación para un largo alcance, determinan la vida de anaquel del pez cuando es distribuido en estado fresco. El deterioro químico y microbiológico del pez en aguas templadas o frías ha sido extensamente estudiado (22).

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 como producto de la descomposición bacteriana y de las enzimas naturales de los tejidos que puede ser utilizada para 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 (50).

Algunos miembros de la familia *Vibrionaceae* han emergido recientemente como un serio problema de salud pública asociado al consumo de agua y alimentos (25).

De acuerdo al manual de Bergey la familia *Vibrionaceae* fué inicialmente propuesta por Verón en 1965, en el cual se incluyó que son móviles por flagelos polares y oxidasa positivos (25).

El genero *Vibrio* esta clasificado en la familia *Vibrionaceae* junto con otros 3 géneros: *Photobacterium*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (25,40).

EL *V. cholerae* es un bacilo curvado, gram negativo que mide 0.5 a 0.8 micras de diámetro por 1.4 a 2.6 micras de largo, rectos o ligeramente curvos, son móviles con flagelos polares monotricos (19). Es anaerobio facultativo pero posee ambos metabolismos; respiratorio y fermentativo (25).

Existen alrededor de 28 especies de *Vibrio* de las cuales por lo menos 10 son patógenas para el hombre (25) :

<i>V. alginoliticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>
<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnisii</i>	<i>V. hollisae</i>
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahemolyticus</i>
<i>V. vulnificus</i> .		

De la lista antes mencionada son 5 las especies de *Vibrio* que han sido reconocidas como causantes de diarrea: *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. hollisae* y *V. mimicus* (19,20,38,41).

Se reconoce que existen por lo menos 70 grupos diferentes de *V. cholerae*. Estos de manera colectiva se les denomina como *V. cholerae* no-O1 o no aglutinable (NAG) .

El *V. cholerae* O1 es el causante del cólera asiático (cepa endémica). Todos los biotipos incluyen cepas toxigénicas y no toxigénicas. Los biotipos son diferenciados por su sensibilidad a la polimixina B y la capacidad para aglutinar eritrocitos de pollo (40).

Existen dos biotipos de *V. cholerae*: Clásico y El Tor, con dos serotipos principales dentro de cada biotipo que son Ogawa e Inaba. Es el biotipo El Tor el que ha causado los brotes de cólera recientes, aunque en el subcontinente Indico aún ocurren casos ocasionados por el biotipo clásico (2,4,25,33,37,60).

Existen informes recientes de epidemias en el Sur de Asia ocasionadas por una cepa de *V. cholerae* diferente de la que causo la pandemia actual y la epidemia en América. Esta nueva cepa denominada *V. cholerae* O139, produce la misma toxina y clínicamente la misma enfermedad. Sin embargo, las personas inmunes a la antigua cepa no son inmunes a esta nueva cepa, por lo tanto, este factor puede permitir que nuevas epidemias ocurran en el mundo (12).

El *V. cholerae* ha sido ampliamente estudiado y reconocido como el agente causal de cólera. Dicho padecimiento es una enfermedad entérica bacteriana aguda, de comienzo súbito, que se manifiesta por deposiciones líquidas, muy abundantes, de color blanquecino, como "agua de arroz". Se asocia a vómitos y calambres musculares. La fiebre es baja o no la hay. La persona afectada puede perder de uno a dos litros de agua por hora en las deposiciones. La deshidratación puede aparecer rápidamente si no se compensan las pérdidas con suero oral y el estado de shock puede presentarse en pocas horas (21,30,52). Los síntomas de gastroenteritis asociados a *V. cholerae* han incluido diarrea (100% de los casos, 25 con sangre en las heces), dolor abdominal (93%), y fiebre 71%. Náuseas y vómito se presenta en el 21% de

las víctimas. La diarrea puede ser ocasionalmente severa (de 20 a 30 evacuaciones líquidas por día) (31).

El *V. cholerae* O1 se encuentra ampliamente distribuido y probablemente formando parte de la flora autóctona en agua de los estuarios (16,30,36). El *Vibrio cholerae* Clásico y El Tor puede persistir en el agua por largo tiempo, así la ingestión de alimentos crudos o mal cocidos procedentes de aguas contaminadas ocasionó brotes o epidemias en Guam y Portugal (1).

El *V. cholerae* O1 biotipo Clásico puede ocasionar que el 10% de los pacientes requieran hospitalización. Mientras que el 75% son asintomáticos (2). Con el *V. cholerae* biotipo El Tor el 2% manifiestan enfermedad severa y el 75% son asintomáticos.

La mayoría de las cepas aisladas de alimentos marinos y de pacientes no toxigénicas; menos del 5% de las cepas no-O1 de fuentes humanas en los E.U. producen toxina del cólera. Las cepas no toxigénicas están asociadas principalmente con enfermedades gastrointestinales; pero en Estados Unidos alrededor de la tercera parte de los aislamientos humanos son de fuente extraintestinales, incluyendo infecciones en heridas, oídos y septicemia primaria y secundaria (17).

Considerando la relativa frecuencia con que se aísla este microorganismo de alimentos marinos, la incidencia de enfermedad es baja. Es evidente que las víctimas frecuentemente padecieron enfermedad del hígado, lo cual puede considerarse un factor de predisposición, por parte del huésped. Además en la mayoría de los casos la enfermedad no es severa y no requiere atención médica, lo que propicia que la incidencia sea subestimada (23).

La difusión del cólera sigue las rutas migratorias y comerciales de los pueblos y en una época de transporte rápido pueden utilizar las vías aéreas y marítimas, pero sobre todo, el

cólera en una región determinada, se desplaza por vía terrestre a través del excremento de los contagiados, en los alimentos frescos o en las bebidas contaminadas (23).

El primer brote de cólera en este siglo en América Latina, ocurrió en 1991 en Perú. durante ese año, se propagó a 14 países, provocando más de 390,000 casos y 4,000 muertes. Durante 1992, un total de 20 países notificaron más de 350,000 casos con aprox. 2,400 muertes (14).

Hasta el primero de Septiembre de 1993, 21 países han notificado a la OMS casos confirmados de cólera en América, el último país en incorporarse a la lista es la República de Paraguay. En 1993 el total de casos acumulados es de 146,436 a los que se asociaron 1,502 defunciones. La tasa de Incidencia por millón de habitantes es de 223 casos. Los países con mayor tasa son Perú con 3,600, Guatemala con 1,966 y Bolivia con 1,346. Los que presentan la menor tasa son Paraguay con 0.7 casos y Estados Unidos con 0.05 casos por millón de habitantes (Tabla 1) (13,14).

En el período de 1991-1992 se recibieron en el Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud de Jalisco 2,400 muestras de hisopos rectales para la investigación de *V. cholerae* de las cuales 58 resultaron positivas, siendo el serotipo predominante el Ogawa con un total de 40 (69%) aislamientos (34,45).

Hasta el 3 de Septiembre de 1993 en México se han notificado a la Dirección General de Epidemiología 7,586 casos. Los estados que más casos han presentado son Puebla 1,415, México 994, Distrito Federal 816, Veracruz 737, Morelos 605, Chiapas 449, Guerrero 430, Tamaulipas 397, Michoacán 395 y Oaxaca 351. El resto de los estados han presentado casos aislados o pequeños brotes (Tabla 2) (34).

La proporción de casos letales es ahora de 1.9%. El 76% de las entidades que notificaron casos de cólera también han presentado defunciones asociadas a la presencia de *V.cholerae* O1 (34).

Su reservorio en el hombre y su modo de transmisión se debe a la ingestión de agua y alimentos contaminados con heces de pacientes de cólera (4).

En el agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa) las colonias típicas del *Vibrio cholerae* son amarillas, planas un poco, de aproximadamente 2 mm de diámetro, entre otros géneros del *Vibrio* por lo que es necesario hacer cierto número de pruebas bioquímicas para su identificación (25).

PRUEBAS BIOQUIMICAS	REACCION
Lisina descarboxilasa	Positiva
Arginina descarboxilasa	Negativa
Oxidasa	Positiva
Ornitina descarboxilasa	Positiva
Licuefacción de gelatina	Positiva
Glucosa sin producción de gas	Positiva
Acido sulfhídrico (H ₂ S)	Negativa

TABLA 1. INCIDENCIA DEL COLERA EN AMERICA
Casos acumulados hasta el 1 de Septiembre de 1993

País	Fecha de inicio de la epidemia	Casos	Tasas*	Defunciones
Perú	23/Ene/91	63,107	3,600	445
Ecuador	1/Mar/91	5,391	591	43
Colombia	10/Mar/91	230	8	4
Estados Unidos	9/Abr/91	13	0.05	0
Chile	16/Abr/91	32,468	245	350
Brasil	17/Abr/91	28	2	0
México	17/Jun/91	7,586	86	148
Guatemala	24/Jul/91	14,952	1,966	158
Panamá	13/Ago/91	42	20	4
El Salvador	16/Ago/91	4,004	743	9
Bolivia	27/Ago/91	8,420	1,346	211
Honduras	13/Oct/91	481	114	12
Nicaragua	6/Nov/91	1,727	546	83
Venezuela	3/Dic/91	380	22	9
Guyana Franc.	14/Dic/91	2	23	0
Costa Rica	10/Ene/92	8	2	0
Belice	13/Ene/92	21	120	0
Argentina	5/Feb/92	1,515	47	24
Surinam	6/Mar/92	0	0	0
Guyana	5/Nov/92	58	58	2
Paraguay	25/Ene/93	3	0.7	0
Total		146,436	223	1,502

* Tasa por millón de habitantes
Fuente: Cólera/Diarreas Infecciosas

TABLA 2. MORBILIDAD Y MORTALIDAD POR COLERA
DE ACUERDO A ENTIDAD FEDERATIVA, MEXICO, 1993

ENTIDAD	CASOS	TASA INC*	DEFUNCIONES**	TASA MORT.*
Campeche	132	19.6	3	0.44
Colima	122	27.4	1	0.22
Chiapas	1309	48.9	3	0.11
Chihuahua	9	0.4	0	0.00
Distrito Federal	1101	10.4	32	0.30
Guanajuato	298	8.0	4	0.11
Guerrero	674	24.7	14	0.51
Hidalgo	125	6.5	1	0.05
Jalisco	238	4.4	2	0.07
México	1166	8.8	32	0.24
Michoacán	497	14.0	11	0.31
Morelos	620	45.2	2	0.15
Nuevo León	96	2.9	1	0.03
Oaxaca	572	21.0	25	0.92
Puebla	1614	37.1	15	0.34
Querétaro	36	3.4	4	0.38
Quintana Roo	31	6.5	0	0.00
San Luis Potosí	55	2.6	5	0.18
Sinaloa	9	0.4	0	0.00
Sonora	2	0.1	0	0.00
Tabasco	245	17.6	1	0.10
Tamaulipas	443	18.7	5	0.21
Tlaxcala	202	28.5	4	0.56
Veracruz	1293	17.9	32	0.44
Yucatán	30	2.1		
Total	10,919	12.3	198	0.22

* Tasa por 100,000 habitantes

** Incluidas en los casos

TABLA 3. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE VIBRIO CHOLERAЕ

AÑO	NUMERO DE CASOS	SEROVARIEDAD
1991	2	INABA
1992	4	INABA
	2	OGAWA
	4	O1
1993	6	INABA
	366	OGAWA
	1	O1

Fuente: Lab. Regional Ref. Epidemiológica

MECANISMO DE PATOGENICIDAD

Las cepas de *V. cholerae* O1 producen una toxina colérica cuya acción sobre la mucosa del intestino delgado es responsable de la diarrea característica de la enfermedad. La toxina colérica es una proteína oligomérica (84Kda) compuesta por una subunidad A (21 Kda), una subunidad A (7Kda) y 5 subunidades B (10Kda).

Las subunidades B son responsables de la fijación de la toxina al receptor GM₁ en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. La subunidad A₁ activa el complejo enzimático adenilato ciclasa incrementando los niveles intracelulares del AMPc que provocan la hiper-secreción de sales y agua, dando como consecuencia una diarrea isotónica con respecto al plasma; es decir, con concentraciones de cloro y sodio ligeramente inferiores a la del plasma (25).

La dosis infecciosa es variable, la susceptibilidad puede variar ampliamente:

- 1.- Dependiendo de la acidez gástrica (el vibrio es destruido en un pH de 5 o menos, por lo tanto, individuos aclorhídricos o con gastrectomía son particularmente más susceptibles).
- 2.- La cantidad y tipo de comida que haya en el estómago (la comida disminuye la dosis infecciosa).
- 3.- La adquisición de cierta inmunidad en el caso de que se haya presentado una infección previa con *V. cholerae* O1. Se ha demostrado que la lactancia natural produce protección (43).

El período de incubación puede ser de unas cuantas horas a 5 días, generalmente de 2 a 3. La excreción del vibrio en las heces se mantiene generalmente durante sólo unos cuantos días después del restablecimiento (4).

TRATAMIENTO

En casos graves de cólera, los antibióticos pueden reducir el volumen y duración de la diarrea y acortar el período durante el cual se excretan los vibriones. Los antibióticos deberán administrarse por vía oral tan pronto como cesen los vómitos siendo el mejor la doxiciclina. En algunos lugares, el *V. cholerae* ha adquirido resistencia a la tetraciclina; esto se debe tener en cuenta cuando la diarrea continúa después de 24 hrs. de tratamiento. Cuando hay cepas resistentes, se puede utilizar furazolidona o trimetoprim sulfametoxazol (otras alternativas son la eritromicina y el cloramfenicol) (60).

En 1959 fué la primera vez que se demostró la presencia de una enterotoxina de *V. cholerae*, al observar que en presencia de filtrados de cultivo del microorganismo del serotipo Ogawa se obtenía una respuesta enterotóxica de eliminación de fluidos en

asa ligada de conejo. La toxina colérica (CT), se purificó en 1969. Sin embargo, se acepta actualmente, que CT es tan solo un miembro de una familia de enterotoxinas muy cercanamente relacionadas (61).

En el estudio de la dinámica de microorganismos patógenos suele ser de gran utilidad la determinación de grupos microbianos de interés sanitario con el propósito de conocer el papel que juegan estos en el destino del patógeno en un alimento, los grupos microbianos más ampliamente utilizados son la cuenta total de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y organismos coliformes (OC).

El recuento de colonias bacterianas en medios de cultivo con un adecuado soporte nutricional y libre 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 20 y 37°C, se le designa como cuenta de bacterias mesófilas 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 en que ha sido manejado un alimento.
- d) Como indicador de la idoneidad de un ingrediente crudo que se va incorporar a un producto.
- e) Para seguir la eficiencia de un proceso germicida o de preservación.
- f) Para predecir la vida de anaquel de un alimento.

Los organismos coliformes se definen como bacterias aerobias o facultativamente anaerobias, gram negativas, no esporuladas que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas de incubación a 35°C (24).

Los organismos coliformes pueden ser de habitat intestinal, pueden sobrevivir en una gran variedad de sustratos, incluso fuera del intestino del hombre y de los animales. Su sobrevivencia, desarrollo o muerte depende de varios factores como son: la acidez, la desecación, congelación, descongelación y otros.

Su presencia y recuento en los alimentos adquiere cierto significado, dependiendo de cada caso en particular:

- a) Son indicativos de prácticas sanitarias objetables en el manejo o fabricación de un alimento.
- b) Expresan la calidad microbiológica de un producto, lo que necesariamente implica un riesgo sanitario.
- c) Revelan la eficiencia de un proceso descontaminante o germicida.
- d) Su presencia y número es algo fortuito; no guarda relación con la obtención o conservación del alimento.

MATERIAL
Y
REACTIVOS

- Abatelenguas estériles
- Algodón
- Asas de nicromo
- Bolsas de polietileno
- Cajas de Conway "Science Ware" de productos Bel-Art.
- Cajas de petri estériles de 100 x 15 mm.
- Cajeteros metálicos
- Charolas
- Cuchillos estériles
- Embudos de plástico
- Espátulas
- Frascos botella de 200 ml con tapón de rosca
- Gradillas metálicas
- Ligas
- Matraces Erlen-Mayer de 250, 500, 1000, 2000 ml.
- Morteros de porcelana
- Mecheros bunsen
- Mecheros fisher
- Papel filtro
- Papel de estraza
- Pipetas bacteriológicas estériles de 1, 2, 5 y 10 ml graduadas
- Pipetas bacteriológicas estériles de 1 ml graduadas
- Pipeteros metálicos
- Portapipeteros
- Tripies
- Telas de asbesto
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón rosca
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapón rosca.

EQUIPO UTILIZADO

- Agitador mecánico Vortex Genie 2
- Auto-clave
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 grs.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 grs.
- Baño María de precisión Riossa, 35 a 37°
- Centrífuga Marca Solbat, Modelo J-300
- Cuenta-colonias Quebec
- Horno para esterilizar material de vidrio
- Incubadora de 35° a 37°
- Potenciómetro Corning 125
- Stomacher (Homogenizador) STO- 400
- Refrigerador
- Termómetros

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

AGUA PEPTONADA ALCALINA

Fórmula:

Peptona de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Ph final: 9.0 ± 0.2	

Preparación:

Se suspende la peptona de caseína en un litro de agua, agregando el cloruro de sodio. Distribuir en recipientes adecuados al volumen deseado. Esterilizar a 15 libras de presión por 15 minutos.

AGAR NUTRITIVO

Fórmula:

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g
Agar	15.0 g

pH final: 6.8 ± 0.2

Preparación:

Suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien y dejar reposar 15 minutos. Calentar a ebullición de 1 a 2 minutos. Distribuir y esterilizar a 121° durante 15 minutos.

AGAR DE HIERRO Y LISINA

Fórmula:

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
L-lisina	10.0 g
Citrato de amonio férrico	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar (desecado)	13.50 g

pH final: 6.7 ± 0.2

Preparación:

Suspender 33 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar por 15 minutos. Calentar cuidadosamente agitando con frecuencia y hervir durante un minuto o hasta disolución completa del agar. Distribuir en tubos de tapón de rosca. Esterilizar a 121° durante 12 minutos. Enfriar en posición inclinada. Cerrar cuidadosamente a fin de evitar pérdidas de agua por evaporación.

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR

Fórmula:

Mezcla de peptonas	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Sulfato de amonio férrico	0.2 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	13.0 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Preparación:

Suspender 59.4 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 118° durante 15 minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2 cm.

CALDO DE SOYA TRIPTICASEINA

Fórmula:

Peptona de caseína:	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Preparación:

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien, calentar ligeramente hasta disolución completa. Distribuir en tubos y esterilizar a 121° durante 15 minutos.

AGAR TIOSULFATO CITRATO BILIS SACAROSA (TCBS)

Fórmula:

Extracto de levaduras	5.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Peptona de caseína	5.0 g
Sacarosa	20.0 g
Tiosulfato de sodio	10.0 g
Citrato de sodio	10.0 g
Oxalato de sodio	3.0 g
Oxgall	5.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Citrato férrico	1.0 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Azul de timol	0.04 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000.00 ml

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua calentando y agitando continuamente hasta ebullición y dejar hervir durante un minuto. De ser necesario ajustar el pH a 8.6 ± 0.2 . Distribuir en frascos estériles o en cajas petri.

AGAR PARA METODOS ESTANDAR (ACE)

Fórmula:

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g

pH final: 7.0 ± 0.2

Preparación;

Suspender 23.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar remojando de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir por un minuto. Distribuir en frascos y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Puede volverse a fundir por una ocasión cuando se utilice.

AGAR BILIS ROJO VIOLETA (ABRV)

Fórmula:

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona o gelisato	7.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Sales biliares	1.5 g
Lactosa	10.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final : 7.4 ± 0.2

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua mediante ebullición y agitación continua. Dejar hervir durante 2 minutos. Enfriar a 50° aproximadamente.

PEPTONA DE GELATINA AL 0.1% (DILUYENTE)

Fórmula:

Peptona de gelatina	1.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH final: 6.9±0.2	

Preparación:

Disolver la peptona en el agua, ajustar el pH, distribuir en frascos o en tubos y esterilizar a 121° durante 20 minutos.

CALDO ARGININA

Fórmula:

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa	1.0 g
Púrpura de bromocresol	1.0 ml (1.6 %)
Agua destilada	1000.0 ml
pH final: 6.7±0.1	

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua y ajustar el pH. Adicionar el L-aminoácido, disolver y distribuir en tubos de 13x100 mm. Esterilizar a 121° durante 10 minutos. Después de la inoculación cubrir el medio con una capa de aceite mineral esterilizado a 121° durante 30 minutos.

MEDIO MIO

Fórmula:

Digerido pancreático de caseína	9.5 g
Digerido pancreático de gelatina	10.5 g
Extracto de carne	3.0 g
Glucosa	1.5 g
Monohidroclorhidrato de L-ornitina	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	2.0 g

pH final: 6.6±0.2

Preparación;

Disuelva 31 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Caliente hasta ebullición durante un minuto hasta disolver completamente, y distribuir en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca, esterilice en autoclave a 121° durante 15 minutos.

REACTIVO PARA OXIDASA

Fórmula:

N,N,N,N, Tetrametil p-feniléndiamina	1.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Preparación:

Pesar 0.1 g del reactivo en balanza analítica y disolver en 10 ml de agua destilada estéril; agregar una gota en cada colonia a probar.

SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA

Fórmula:

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000.0 ml

Preparación:

Disolver el cloruro perfectamente en el agua, distribuir en frascos y esterilizar a 121° durante 20 minutos.

REACTIVOS PARA LA TÉCNICA DE MICRODIFUSION DE CONWAY

ACIDO TRICLOROACETICO AL 7%

Fórmula:

Acido tricloroacético	7.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Preparación:

Disolver el ácido perfectamente en el agua con agitación, conservar en frascos ámbar.

SOLUCION SATURADA DE ORTOFOSFATO DE SODIO Y POTASIO

Na_3PO_4 KOH AGENTE LIBERADOR

Fórmula:

Hidróxido de potasio en escamas	10.0 g
Fosfato trisódico	44.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

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

SOLUCION SATURADA DE CARBONATO DE POTASIO 90%

K_2CO_3 (AGENTE SELLADOR)

Fórmula:

Carbonato de potasio	90.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

Disolver perfectamente el carbonato en el agua, conservar en frascos ámbar perfectamente cerrados.

ACIDO BORICO 3%

Fórmula:

Acido bórico	3.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Preparación:

Disolver perfectamente el sólido en el agua y guardar en frascos ámbar.

INDICADOR DE CONWAY

Fórmula:

Verde de bromocresol	0.33 g
Rojo de metilo	0.066 g
Alcohol etílico	100.0 ml

Preparación:

Incorporar cuidadosamente los ingredientes sólidos ya pesados en los 100 ml de agua hasta disolución completa y conservar en frascos bien cerrados.

AGENTE ATRAPANTE

Fórmula:

Indicador de Conway

1.0 ml

Acido bórico al 3 %

50.0 ml

Preparación:

Disolver el indicador cuidadosamente en el ácido bórico y guardar en frascos ámbar.

METODOLOGIA

Según información emitida por la Secretaría de pesca del estado de Jalisco y el artículo 27 constitucional se encuentran 27 especies que se explotan en 5 grandes zonas pesqueras:

- I. Abulón, atún, barrilete, caruna, camarón, langosta, macarela, ostión, sardina, sargazos, tiburón, tortuga y totoaba.
- II. Parte meridional de la costa del pacífico desde Jalisco hasta Chiapas. Atún, camarón, langosta, lisa, mojarra, sardina, sierra y huachinango.
- III. Litoral de tamaulipas y Veracruz. Cervina, huachinango, lisa, mero, mojarra, sardina, sierra.
- IV. Plataforma continental de la zona de Campeche y litoral del Caribe. Camarón, langosta, lisa, mero, mojarra, sierra, tiburón y tortuga.
- V. Aguas interiores. Bagre blanco, carpa, charal, mojarra, rana y trucha.

Tomando en cuenta la producción pesquera en la zona comprendida en Jalisco se seleccionaron dos variedades de pescado:

1. Variedad Sierra (*Scamberomorus sierra*) es un pez que abunda en toda la costa del pacífico, no presenta escamas, mide 70 cm de largo y con un peso aproximado de 2 kg. Se pesca en las profundidades y anualmente a nivel nacional se obtienen 33,461 toneladas.
2. Variedad huachinango (*Lutjanus purpureos* comúnmente poey) Este pez habita a 50 metros de profundidad, llega a la superficie de zonas rocosas, litorales y en las

profundidades. Mide aprox. 75 cm y presenta escamas, a nivel nacional se obtienen 18,815 toneladas al año.

1.1 Se Adquirieron 100 muestras de pescado crudo de 2 grandes centros de abastecimiento localizados en esta ciudad, 30 del mercado Alcalde, 33 del mercado del mar #36 y 37 del mercado del mar en Zapopan, Jal. Muestreandose 49 de la variedad Huachinango y 51 de la variedad Sierra. Analizandose 8 muestras por semana durante un año.

1.1.1 Determinaciones aplicadas a cada muestra:

- a) Exámen sensorial.
- b) Medición de pH.
- c) Prueba de Nitrógeno Volátil Total (NVT).
- d) Prueba de Trimetilamina (TMA).
- e) Recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA).
- f) Investigación de *V. cholerae*.

El criterio para seleccionar las muestras se basó en los signos de frescura descritos en la literatura (53,55). Observando el brillo de los ojos, color de agallas y apariencia de la piel.

1.2 Ceviche de pescado

Se seleccionaron expendios de ceviche (35 puestos fijos y 65 puestos ambulantes) localizados en los 4 sectores de esta ciudad (Sector Juárez, Hidalgo, Reforma y Libertad). Las 100 muestras fueron obtenidas tal y como se expenden al público y transportadas al laboratorio para su análisis inmediato en bolsas de polietileno previo registro de temperatura.

1.2.1 Determinaciones aplicadas a cada muestra:

- a) Exámen sensorial.
- b) Medición de pH.
- c) Recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA).
- d) Recuento de organismos coliformes.
- e) Investigación de *V. cholerae*.

a) Examen sensorial

Criterios de frescura que se describen para el pescado en la literatura:

OLOR: EL olor del pescado es diferente en las distintas especies, pero en general es fresco (algas marinas) y no desagradable.

OJOS: Salientes, brillantes y vivos. Pupila convexa y azabache. córnea transparente.

AGALLAS: Color rojo sanguíneo brillante, limpias, exentas de limo y olor normal.

CONSISTENCIA Y COLOR: Firme y elástico al tacto. Blanco o blanco azulado y translúcido. Ausencia de decoloración. Se adhiere firmemente a las espinas y es difícil de desprender, sangre bajo la vejiga natatoria de color rojo.

ASPECTO GENERAL: Aspecto limpio y claro, liso y brillante. Humedecido con un limo transparente. Ausencia de decoloración.

b) Medición del pH

Esta se efectuará con el potenciómetro Conductronic 10. La medición se realiza con 5 g del alimento al que se le agregan 10 ml de agua destilada exenta de CO₂.

c) Prueba de NVT (Nitrógeno Volátil Total)

Técnica de Microdifusión de Conway

Procedimiento:

1. Pesar 10 g de la muestra.
2. Colocar en el mortero los 10 g de muestra y adicionar 20 ml de ácido tricloroacético; moler perfectamente.
3. Filtrar la mezcla anteriormente molida; primero a través de una torunda de algodón y enseguida a través de papel filtro.
4. Centrifugar el filtrado hasta obtener una solución clara (45 minutos).
5. Colocar 2.5 ml de solución saturada de carbonato de potasio en el primer nivel de la caja de Conway (Figura 1).
6. Colocar 1 ml de agente reaccionante (solución saturada de fosfato de sodio/ hidróxido de potasio) por un lado en el segundo nivel del disco. Por el otro lado en el mismo nivel, colocar 1 ml de la muestra filtrada y centrifugada.
7. Colocar 1 ml de agente atrapante en el centro de la caja.
8. Colocar la tapa de la caja Conway cuidadosamente.

9. Proporcionarle movimientos rotatorios que permita que entre en contacto la muestra con el agente reaccionante.
10. Dejar en reposo la caja de Conway por 2 horas.
11. Transcurridas las 2 horas, titular el agente atrapante con ácido sulfúrico 0.024 N, cuyo punto final será indicado por el color original.

Cálculos:

NVT: (mgs N / 100 g de muestra)

NVT: ml de H_2SO_4 X 0.024N X 100 X 2.7 X 1.3

d) Prueba de TMA (trimetilamina)

Para la determinación de Trimetilamina (TMA) se siguen los mismos pasos, excepto en el paso 6, en donde se adicionan 0.5 ml de formaldehído en el segundo nivel.

e) Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)

Procedimiento:

1. Pesar perfectamente 15 g de muestra en una bolsa de polietileno.
2. A los 15 g de muestra agregar 135 ml de diluyente y llevar al Stomacher por 1 minuto.
3. Efectuar diluciones.
4. Inocular 1 ml de cada dilución en las cajas petri estériles.

5. Adicionar medio de Agar Cuenta Estándar mantenido a 48°C a las cajas, homogenizar, dejar solidificar e incubar durante 48 horas a 35°C.
6. Efectuar el recuento de todas las colonias desarrolladas.

f) Recuento de Organismos Coliformes Totales (OC)

Procedimiento:

1. Pesar perfectamente 15 g de muestra en una bolsa de polietileno.
2. A los 15 g de muestra agregar 135 ml de diluyente y llevar al Stomacher por un minuto.
3. Efectuar diluciones decimales.
4. Inocular 1 ml de cada dilución en las cajas de petri estériles.
5. Adicionar medio de Agar Bilis Rojo Violeta mantenido a 48°C a las cajas, homogenizar, dejar solidificar.
6. Adicionar 4 ml más de agar bilis rojo violeta de sobrecapa, homogenizar, dejar solidificar.
7. Incubar durante 24 horas a 23°C.
8. Contar todas las colonias de color rojo oscuro menores a 1 mm de diámetro, ligeramente convexas y de bordes bien definidos.

g) Investigación de *Vibrio cholerae*

La Técnica para el aislamiento de *V.cholerae* será la recomendada por la I.C.M.S.F. (31,33).

Procedimiento:

1. Pesar 25 g de muestra incluyendo la piel y agallas (ó 25 g de intestinos) del pescado retiradas en condiciones asépticas.
2. Homogenizar con 225 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) durante un minuto en Stomacher.
3. Sembrar dos asadas biconvexas en 1 caja de TCBS y una de AN.
4. Incubar la muestra y placas a 35° durante 6 y 24 Hrs. respectivamente.
5. A partir de la muestra incubada de 6 Hrs. inocular nuevamente una placa de TCBS y una de AN y transferir 1 ml del homogenizado a un tubo de 10 ml de APA e incubar nuevamente.
6. Una vez logradas las 24 Hrs. de incubación sembrar a partir del caldo peptonado alcalino dos asadas biconvexas en placas de TCBS y AN las cuales serán incubadas a 35°C por 24 Hrs.
7. Seleccionar 4 colonias típicas o sospechosas de *V. cholerae*. Proceder a su identificación mediante Tinción al Gram, oxidasa, TSI, LIA, MIO y caldo Arginina, estos últimos incubados 24 hrs. a 35°C.

8. Someter a la prueba de aglutinación en portaobjetos con suero polivalente O1 (DIFCO) para *V. cholerae* y en caso de ser positiva aglutinar con suero monovalente (Ogawa e Inaba) para identificar el serotipo. En caso de que la cepa autoaglutina en solución salina fisiológica someterla a la prueba de acriflavina para determinar si es una cepa rugosa.

9. Las cepas que no aglutinan con el antisuero polivalente O1 se someterán a las siguientes pruebas bioquímicas para ser clasificadas como *Vibrio cholerae* no O1:

Medio MIO

Movilidad.....	(+)
Indol.....	(+)
Ornitina Descarboxilasa.....	(+)

Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)

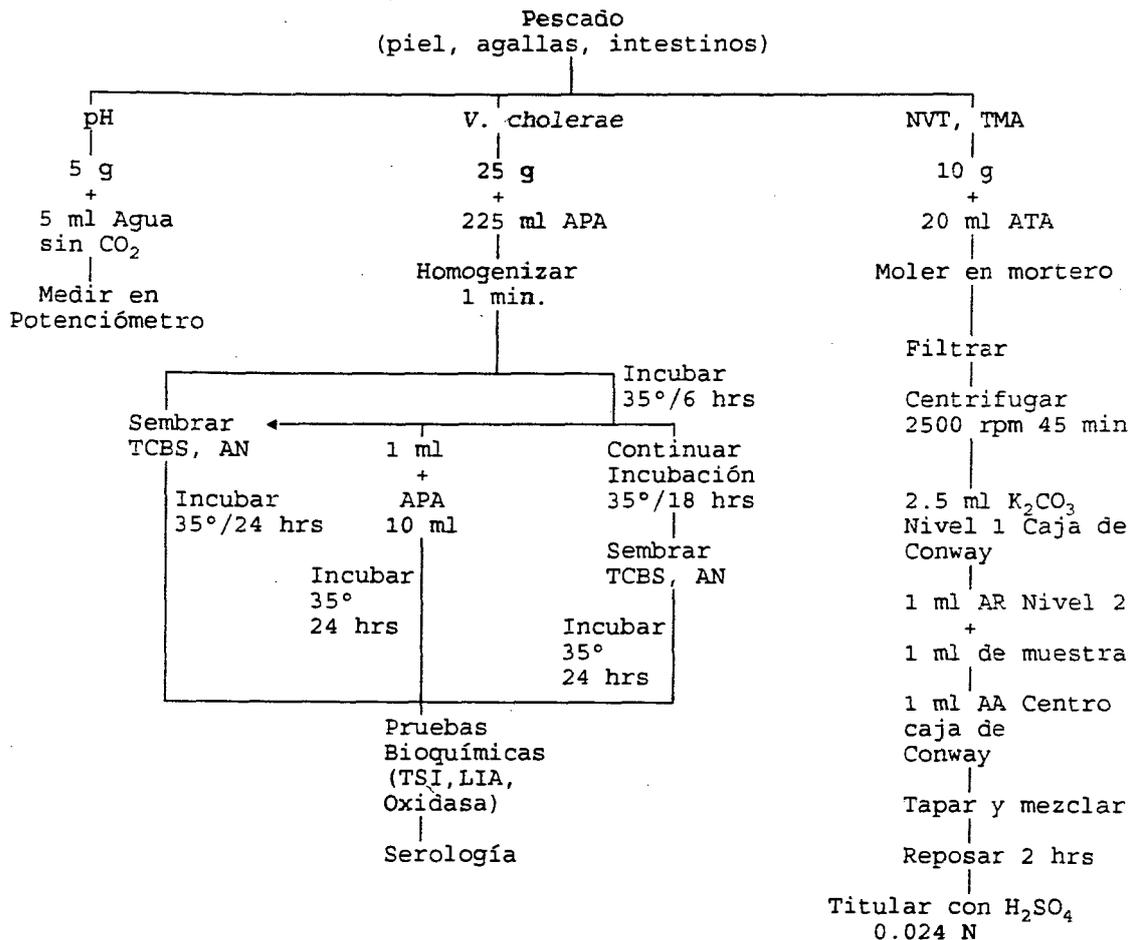
Fermentación de Glucosa.....	(+)
Fermentación de Lactosa.....	(-)
Fermentación de Sacarosa.....	(+)
Producción de Gas de Glucosa.....	(-)
Producción de H ₂ S.....	(-)

Agar de Hierro y Lisina

Lisina Descarboxilasa.....	(+)
Producción de Gas.....	(-)
Producción de H ₂ S.....	(-)

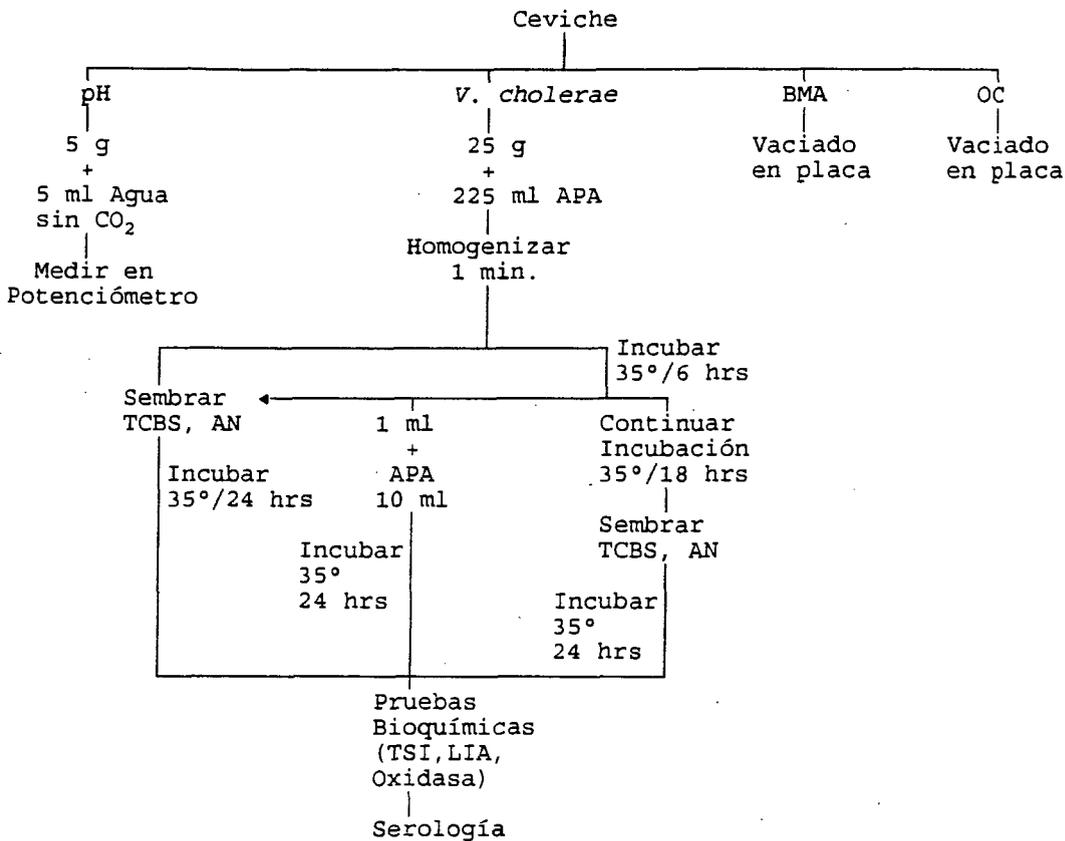
Arginina Descarboxilasa..... (-)

Esquema 1.
Incidencia de *Vibrio cholerae* en pescado crudo



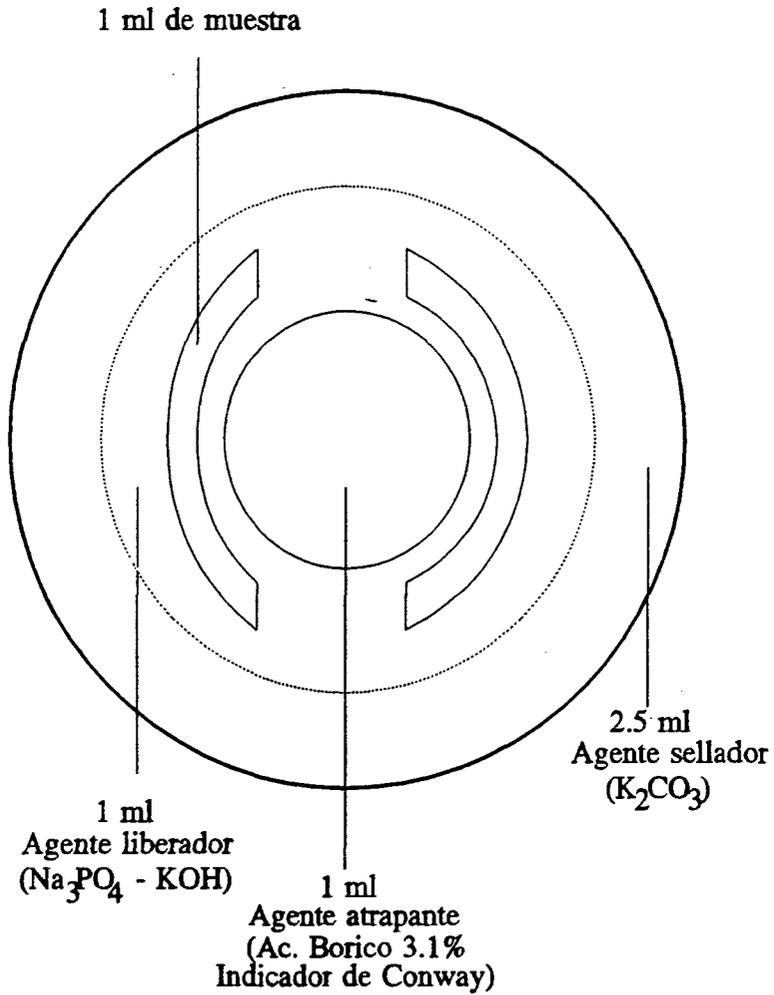
- NVT : Nitrógeno Volátil Total.
 TMA : TriMetil Amina.
 APA : Agua Peptonada Alcalina.
 ATA : Acido Tricloro Acético.
 TCBS : Agar Tiosulfato, Citrato, sales Biliares, Sacarosa.
 AN : Agar Nutritivo.
 AR : Agente Reaccionante.
 AA : Agente Atrapante.
 TSI : Agar Hierro y Triple Azúcar.
 LIA : Agar Hierro y Lisina.

Esquema 2.
 Incidencia de *Vibrio cholerae* en ceviche



- BMA : Bacterias Mesófilas Aerobias.
- OC : Organismos Coliformes.
- APA : Agua Peptonada Alcalina.
- TCBS : Agar Tiosulfato, Citrato, sales Biliares, Sacarosa.
- AN : Agar Nutritivo.
- TSI : Agar Hierro y Triple Azúcar.
- LIA : Agar Hierro y Lisina.

Figura No. 1
Camara de Conway



RESULTADOS
Y
DISCUSION

En la vigilancia y control de las enfermedades infecciosas que aquejan a una comunidad, son de gran ayuda el estudio y conocimiento de las características generales de los microorganismos y sus ciclos de vida (4).

Cuando una bacteria ingresa a un alimento tiene tres perspectivas: desarrollar, sobrevivir o morir. El destino de un microorganismo en un alimento se encuentra influenciado por una serie de factores tales como son: la flora asociada, pH, temperatura, presencia de inhibidores y composición química del alimento (5).

Las Bacterias Mesófilas Aerobias son consideradas en la Microbiología Sanitaria como indicadores de la calidad sanitaria de un alimento; de esta manera al incrementarse el número de ellas, disminuye proporcionalmente su calidad (24). En conjunto los grupos microbianos, pruebas sensoriales y las pruebas químicas aportan información práctica para estimar el grado de frescura de un alimento. El grado de frescura del producto se determina mediante el recuento de BMA dada la activa multiplicación que estas bacterias manifiestan en el alimento cuando se conservan a más de 10°C. El recuento no permite ver si se partió de una materia prima falta de frescura o producto ya preparado no refrigerado adecuadamente (6).

En las dos variedades de pescado fresco estudiadas encontramos que el 45% de las muestras presentaron valores de BMA superiores a 6 logaritmos (Gráfica 1 y 5), tomando en cuenta que en la literatura se ha reportado que la cantidad de microorganismos sobre la piel oscila entre 10^2 y $10^6/cm^2$, consideramos que nuestros valores elevados revelan un alto grado de contaminación con respecto a lo ya reportado.

En cuanto a los parámetros de frescura como es la determinación del Nitrógeno Volátil Total (NVT), Trimetilamina (TMA) y el pH los cuales se han sugerido como un medio exploratorio del grado de frescura de muchas especies de pescado, observamos que tan sólo una de las muestras de cada variedad de pescado que analizamos contenía 11 mg/100 de NVT (Gráfica 3 y 7), cifra que se aproxima a la considerada para un pescado fresco (4,20,24).

- Pescado fresco recién capturado	<12 mg/100
- Pescado ligeramente descompuesto de buena calidad	12-20 mg/100
- Pescado comestible	20-25 mg/100
- Pescado descompuesto	>25 mg/100.

El resto de las muestras (43%) mostraron cifras mayores de 25 mg/100. De las 49 muestras de la variedad Sierra analizadas se encontraron valores menores a 25 mg/100, el resto correspondería a pescados descompuestos (81%). En la variedad Huachinango el 83% rebasó los límites de frescura establecidos para un pescado comestible (Gráfica 7).

Los valores de nitrógeno volátil total rebasan los que se han propuesto en los EUA para pescado fresco <25 mg (20,24), no obstante, en todos los casos el alimento se calificó como fresco desde el punto de vista organoléptico. En general podemos decir que el 82% de las muestras analizadas mostraron >25 mg/100 (pescado descompuesto) (4,20). Es necesario establecer criterios de frescura para el pescado, dado que los componentes del pescado varían con la especie y área geográfica. En evaluaciones hechas en el laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Universidad de Guadalajara se han reportado valores de 30 y 35% de NVT compatibles con pescado fresco, aunque esos valores varían con la especie de pescado estudiada (59)

En todas las especies marinas de peces existe óxido de trimetilamina (OTMA) cuya reducción a trimetilamina es característica de un proceso de deterioro. Se cree que este proceso se debe fundamentalmente a la acción de bacterias putrefactivas que pueden utilizar el OTMA como un aceptor terminal de hidrógeno cuando el oxígeno se agota, por lo que puede esperarse cierta correlación en el aumento de TMA y la presencia de bacterias reductoras del OTMA (50). La literatura señala los siguientes valores (4,20):

-Pescado fresco (0-5 días)	≤1-1.5 mg/100
-Pescado comestible (5-10 días)	<5 mg/100
-Pescado descompuesto	10 mg/100
-Pescado nauseabundo	>10 mg/100

El 90% de las muestras analizadas de la variedad Sierra tenían una concentración de Trimetilamina (TMA) <5 mg/100 (Gráfica 2). El 63% de 49 muestras de Huachinango se encontraron con valores de 1-9 mg/100 de TMA y el resto se encontraba con >5 mg/100 (Gráfica 6).

El 41% de 100 muestras de pescado mostraron límites altos de TMA, rebasando los 5 mg/100, lo que indica según la literatura falta de frescura.

Aplicando las normas para el pescado se vería que estos alimentos son inaceptables para su consumo dado que las sustancias volátiles nitrogenadas son productos de la putrefacción. Sin embargo dado que los componentes del pescado varían con la especie y el área geográfica (50,51), esta aseveración no puede hacerse. En efecto, las características organolépticas del pescado fueron aceptables.

En la literatura se menciona que el pH óptimo para la mayoría de las bacterias incluso patógenas es cercano a la

neutralidad. El pH promedio de las variedades de pescado fresco estudiadas fue cercano a 6.0 (Gráfica 4,8 y 12). En alimentos marinos el pH tiende a aumentar conforme el producto se descompone, pero ese aumento es sumamente discreto por lo que no se puede utilizar sólo el pH para medir la aceptabilidad (57).

El pH en los pescados de la variedad Sierra mostraron límites desde 5.0 y 6.0 en el 68% y 3% de las muestras respectivamente (Gráfica 4). Y en la variedad Huachinango el 90% de 49 muestras se encontraban cercano a 6.0 (Gráfica 8).

De las 100 muestras de pescado analizadas el 80% contenían entre 5 y 6 logaritmos. Tan sólo 2 de las 100 muestras registraron valores extremos en cuanto a los parámetros de frescura. Una con 1000 BMA, 10 mg% de NVT y 1.5 mg% de TMA y otra con 10^8 logaritmos de BMA, 99 mg/100 de NVT y con 14 mg/100 de TMA (Gráficas 9,10 y 11).

Al explorar la calidad sanitaria del ceviche pescado en venta directa al público, observamos que el 49% de las muestras obtenidas durante los meses de Abril a Septiembre (Epoca calurosa) contenía 10^7 logaritmos de BMA (Gráfica 13). La carga microbiana detectada descendió hasta en 2 logaritmos en los meses de Octubre a Marzo (Epoca fría).

De las 47 muestras de ceviche analizadas a partir de puestos ambulantes se obtuvieron 7 muestras positivas a *V. cholerae* O1 (Gráfica 14). Dichas muestras contenían entre 5 y 7 logaritmos de BMA.

El 66% de las muestras de ceviche de puestos ambulantes contenían entre 3 y 4 logaritmos de Bacterias Coliformes Totales, límites dentro de los cuales se detectaron 4 de las 7 muestras positivas a *V. cholerae* O1, las 3 restantes contenían alrededor de 100 coliformes (Gráfica 15).

Aunque los OC pueden asociarse con la exposición a fuentes de contaminación objetables, como son el agua, hielo, recipientes, superficies de trabajo y otras. Estas evidencias pierden valor por el hecho de su capacidad para multiplicarse en el pescado conservado bajo condiciones inadecuadas de temperatura (24,57). No obstante su presencia y número nos indica un manejo poco cuidadoso del alimento.

En las 53 muestras de ceviches colectadas en puestos fijos la carga de BMA también mostró diferencias según la época del año. El 39% de las muestras contenían números $> 10^6$ logaritmos de BMA en la época fría (Meses de Octubre a Marzo) con respecto a la época calurosa (Gráfica 16). A la carga de BMA en ceviche de pescado difícilmente se le puede atribuir un valor sanitario de peso, puesto que se trata de un alimento cuya preparación implica la inclusión de ingredientes crudos y que además no recibe tratamiento térmico alguno.

A partir de puestos de ceviche fijos se obtuvieron 2 muestras positivas a *V. cholerae* O1, 1 durante la época calurosa del año que contenía 10^7 logaritmos de BMA y 10^3 de OC (Gráfica 17 y 18). Y otra durante la época fría (Abril a Septiembre) con 10^5 logaritmos de BMA y 10^3 de OC (Gráfica 19 y 20).

En las 100 muestras de ceviche analizadas detectamos una mayor carga microbiana en la época calurosa que en la época fría (Gráfica 21 y 22).

Los Límites de pH en las 100 muestras de ceviche fueron de 3.0 a 4.5. (Gráfica 23).

En total obtuvimos 12% de positividad a *Vibrio cholerae* O1 en pescado fresco (variedad Huachinango y Sierra) y el 8% en ceviche de pescado.

En cuanto a la ruta para la recuperación de *V. cholerae* en pescado fresco el doble enriquecimiento (18 hrs) y la siembra en placas de medios selectivos y diferenciales permitió un 41.66% de recuperación, no obstante encontramos positividad en rutas alternativas en medios de enriquecimiento como fué la incubación a las 0, 6 y 24 Hrs (Tabla 1).

En el caso de los intestinos cabe señalar que de las 50 muestras analizadas se obtuvieron 2 muestras positivas a *V. cholerae* de 50 muestras de intestinos mismas que resultaron también positivas en piel y agallas, como se ilustra en la Tabla 1. Dicha positividad para el caso de los intestinos se vio favorecida por el tiempo 6 y 18 Hrs. de enriquecimiento. En ceviche no se obtuvo ninguna muestra positiva mediante la siembra directa, la recuperación se vio favorecida conforme transcurría el tiempo de enriquecimiento (Tabla 1).

Ninguna ruta fué superior a la otra como lo muestran los resultados de este trabajo, aunque con las diferentes rutas se encontraron muestras positivas que resultaron negativas por el método alternativo. En lo que respecta a la productividad de los dos medios de aislamiento (AN y TCBS), la recuperación en agar TCBS fué estadísticamente significativo ($p=0.0001$) con respecto al AN (Tabla 2).

En la Tabla 3 observamos una positividad global a *V. cholerae* en pescado crudo de 25.6% en la época calurosa y 8.8% en la época fría ($p=0.0139$) estadísticamente significativa. En el ceviche de pescado un 12.5% en la época calurosa y 2.8% en la fría ($p=0.0250$) estadísticamente significativo. Estos resultados coinciden con otros estudios de incidencia de *Vibrio cholerae* O1 y no O1 en los cuales se demuestra la influencia de la variación estacional a favor de la época calurosa con respecto a los meses fríos (36).

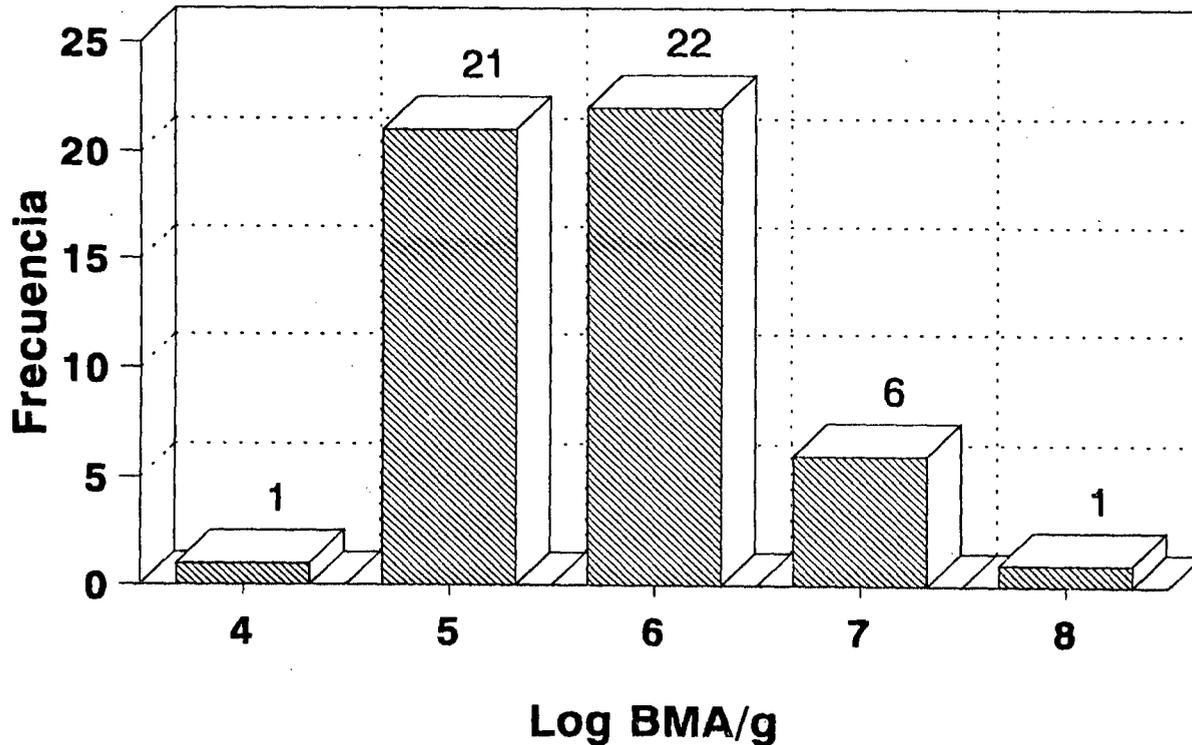
Del total de positivos a *V. cholerae* pudimos identificar ambos serotipos, resultando 12 Ogawa y 13 Inaba. La frecuencia en la recuperación de ambos serotipos según la época del año fué estadísticamente significativa a favor del serotipo Inaba en la Época calurosa (Tabla 4).

La distribución de ambos serotipos Ogawa e Inaba en estos alimentos guarda relación con la identificación de los mismos en los casos de cólera diagnosticados en nuestro país (34).

El aislamiento de *Vibrio cholerae* en este tipo de alimentos en venta directa al público pone en evidencia el riesgo a la salud en nuestra población, por lo que esta información debería ser utilizada por las autoridades sanitarias como una herramienta epidemiológica para implementar medidas de control tendientes a disminuir el riesgo para el consumidor y ejercer acciones efectivas para contener la propagación de cólera en nuestro país.

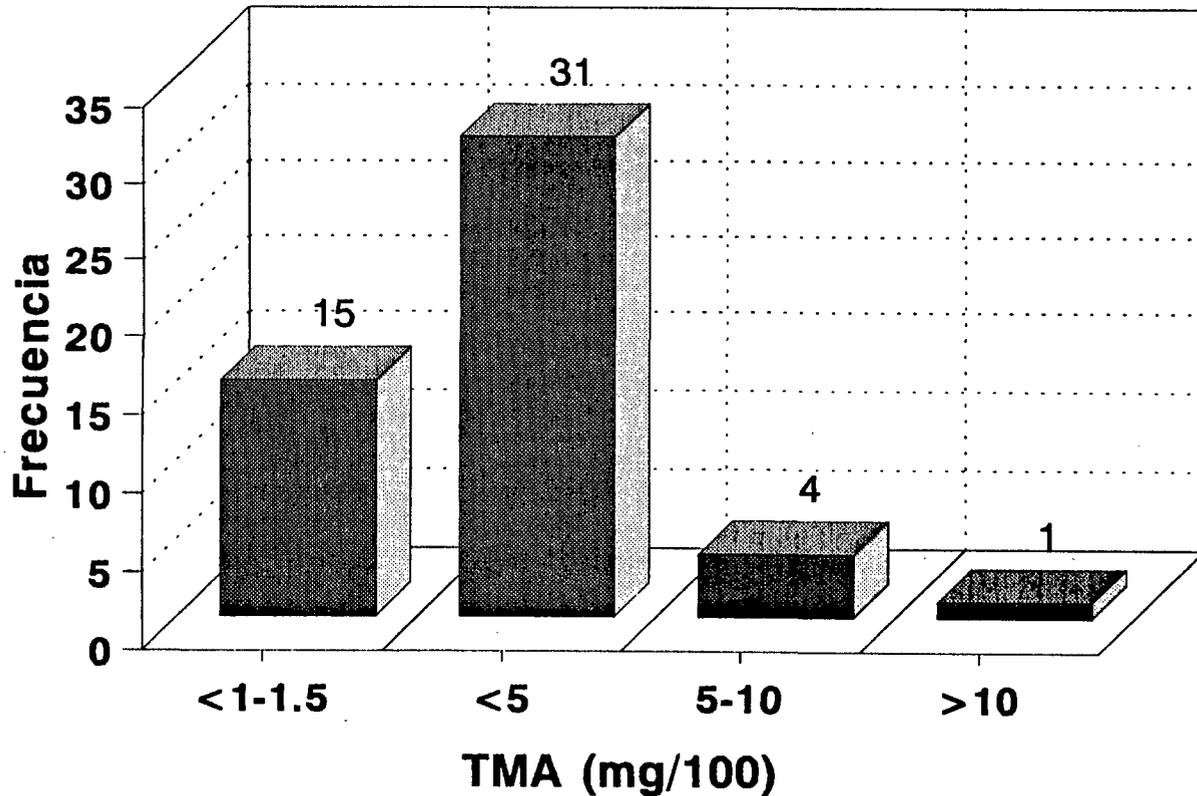
TABLAS
Y
GRAFICAS

Gráfica 1. BMA/g en 51 pescados variedad "Sierra" colectados en la Zona Metropolitana de Guadalajara

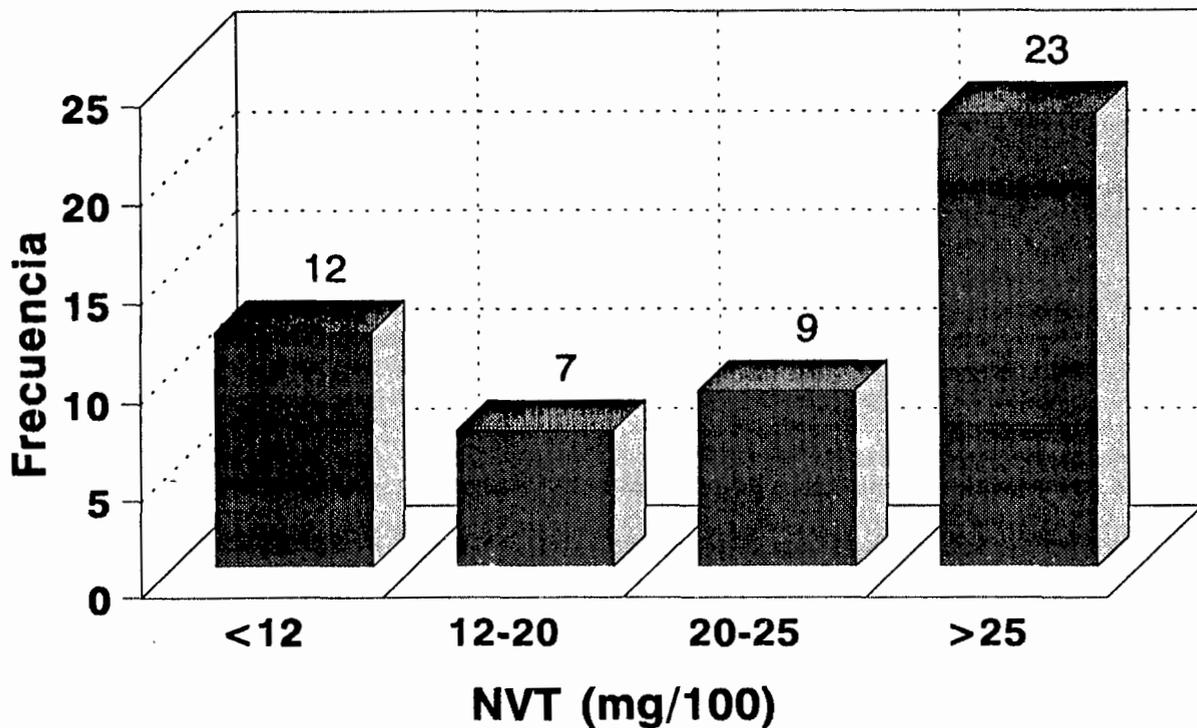


BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

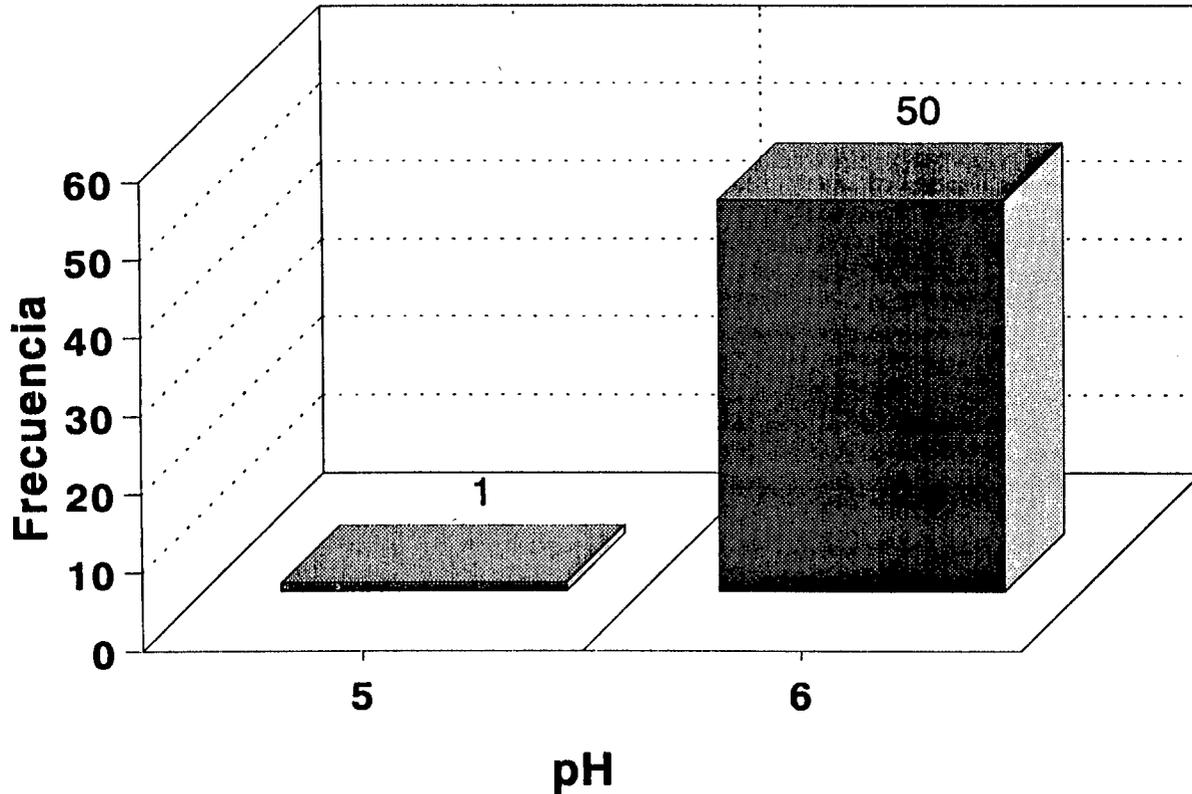
Gráfica 2. Trimetilamina en 51 muestras de pescado de la variedad "Sierra"



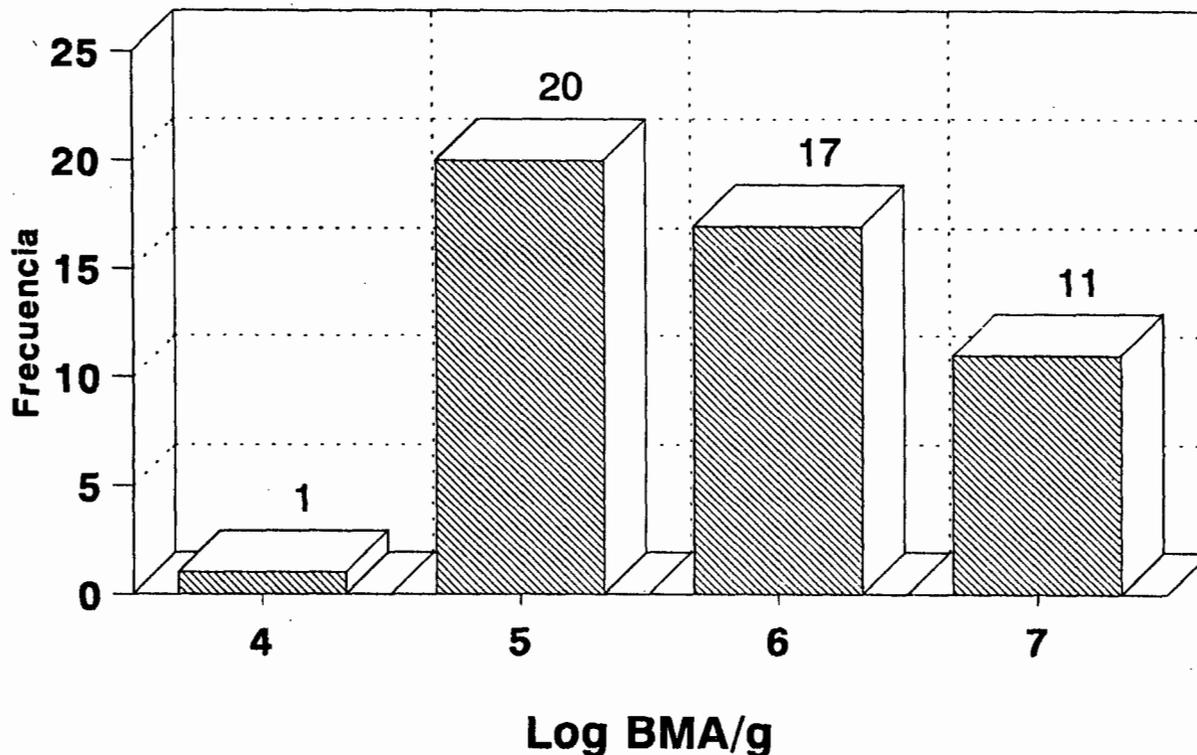
Gráfica 3. Nitrógeno Volátil Total en 51 muestras de pescado de la variedad "Sierra"



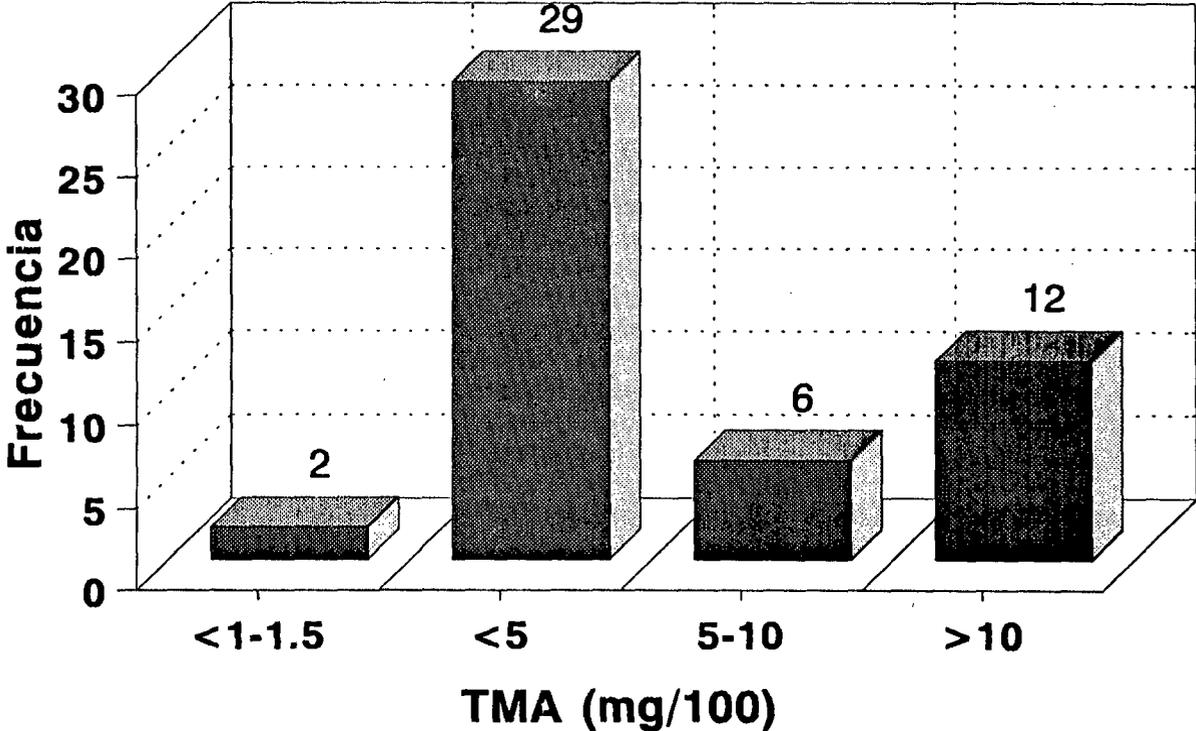
Gráfica 4. pH en 51 muestras de pescado de la variedad "Sierra"



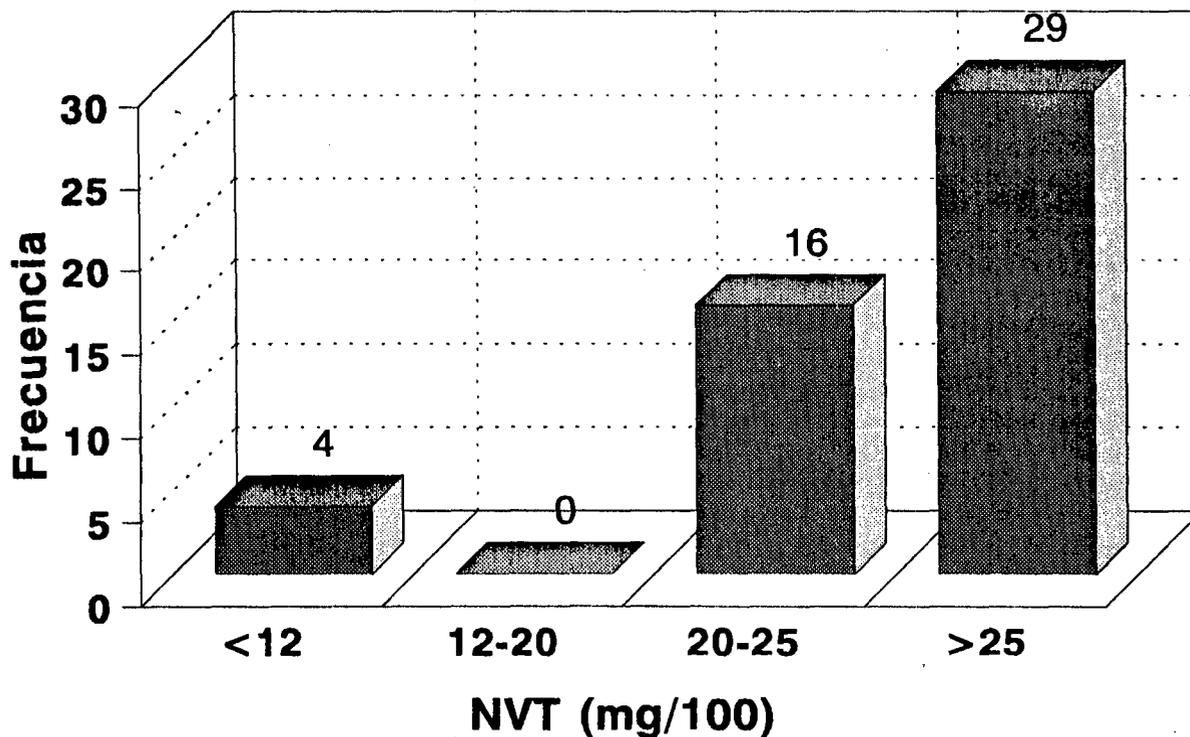
Gráfica 5. BMA/g en 51 pescados variedad "Huachinango" colectados en la zona Metropolitana de Guadalajara



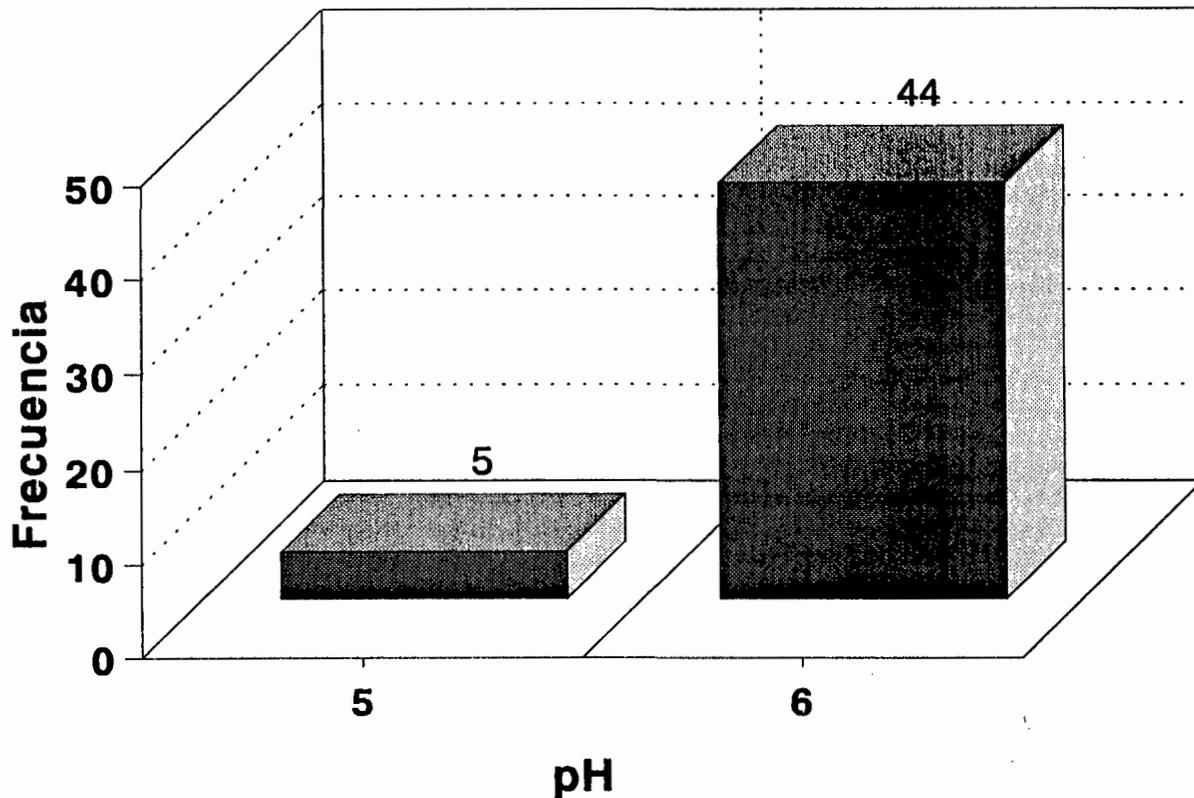
Gráfica 6. Trimetilamina en 49 muestras de pescado de la variedad "Huachinango"



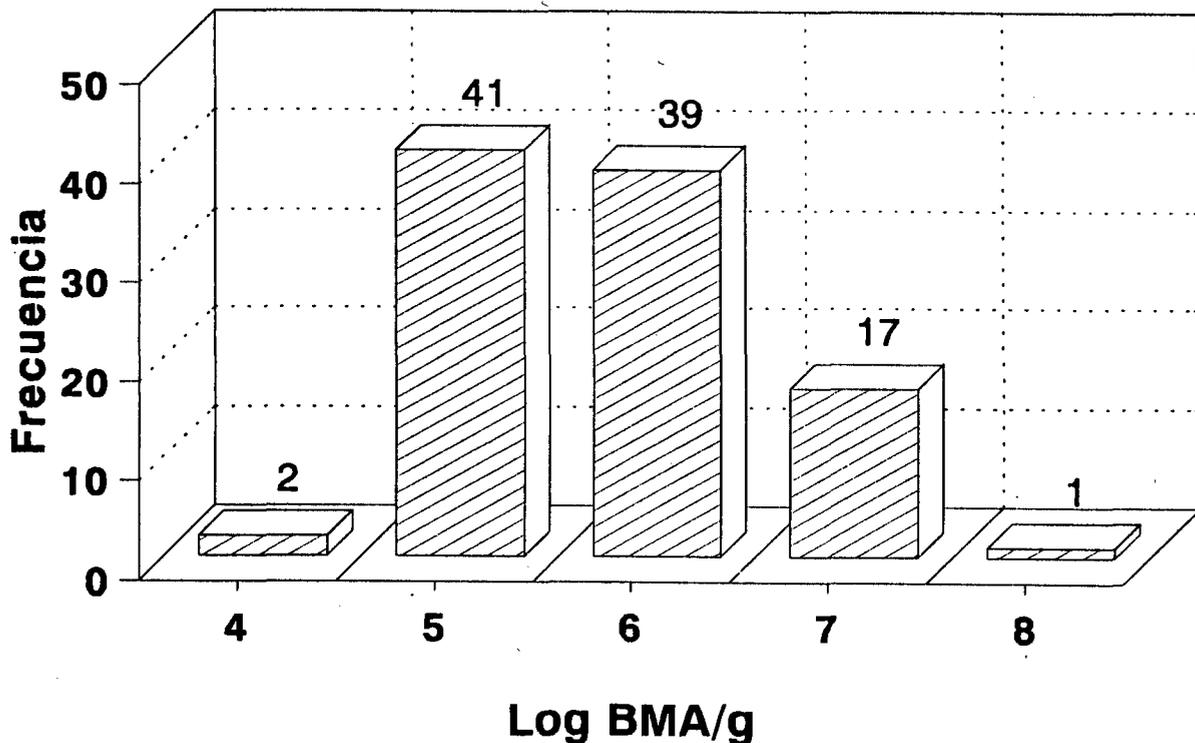
Gráfica 7. Nitrógeno Volátil Total en 49 muestras de pescados de la variedad "Huachinango"



Gráfica 8. pH en 49 muestras de pescado de la variedad "Huachinango"

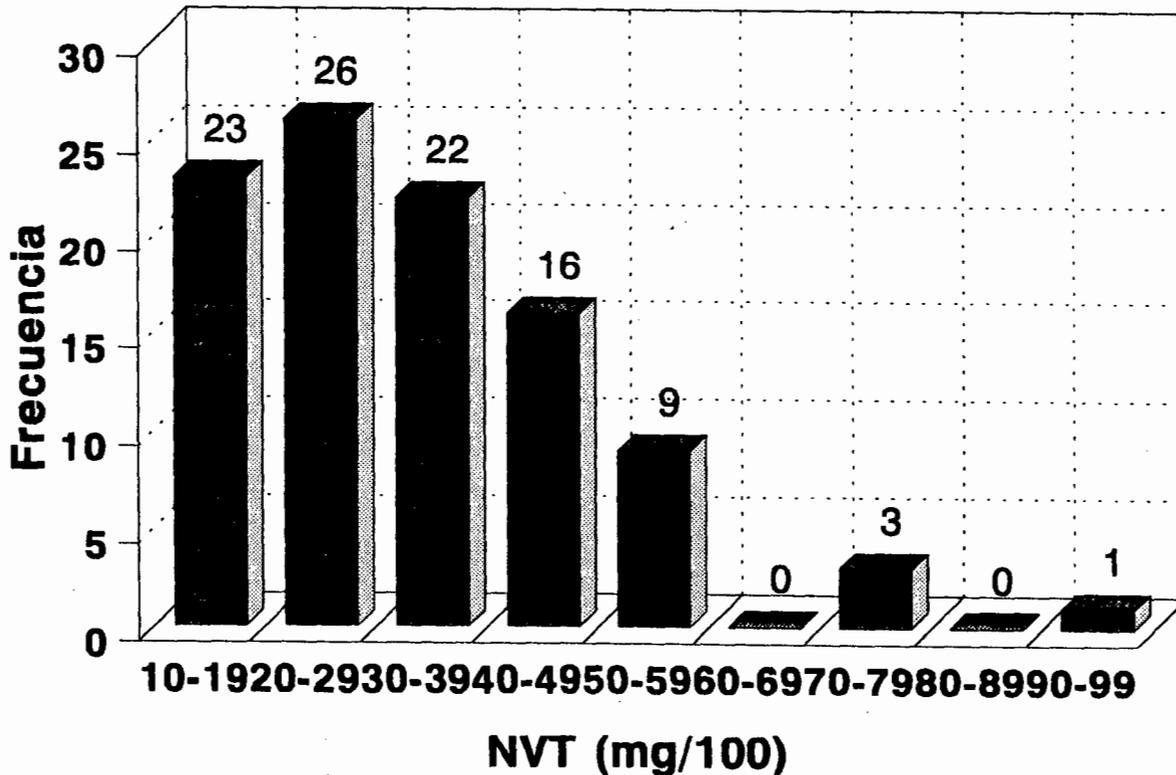


Gráfica 9. BMA/g en 100 muestras de pescado colectadas en la Zona Metropolitana de Guadalajara

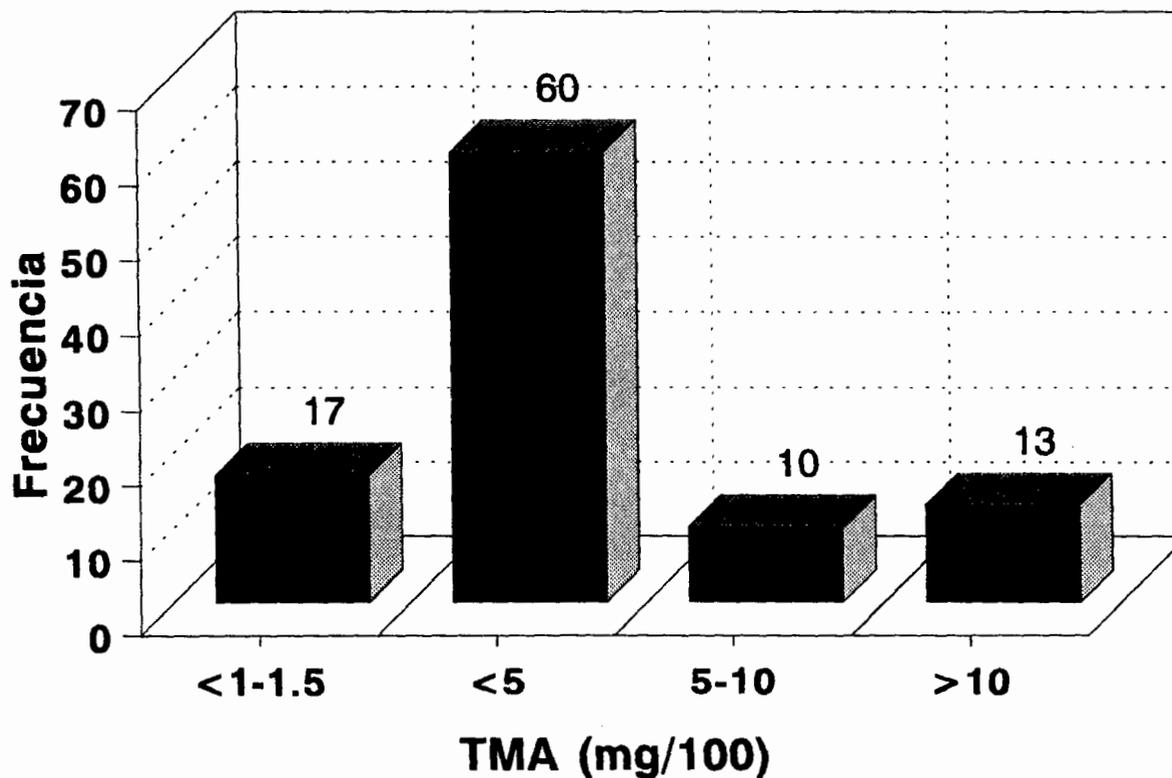


BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

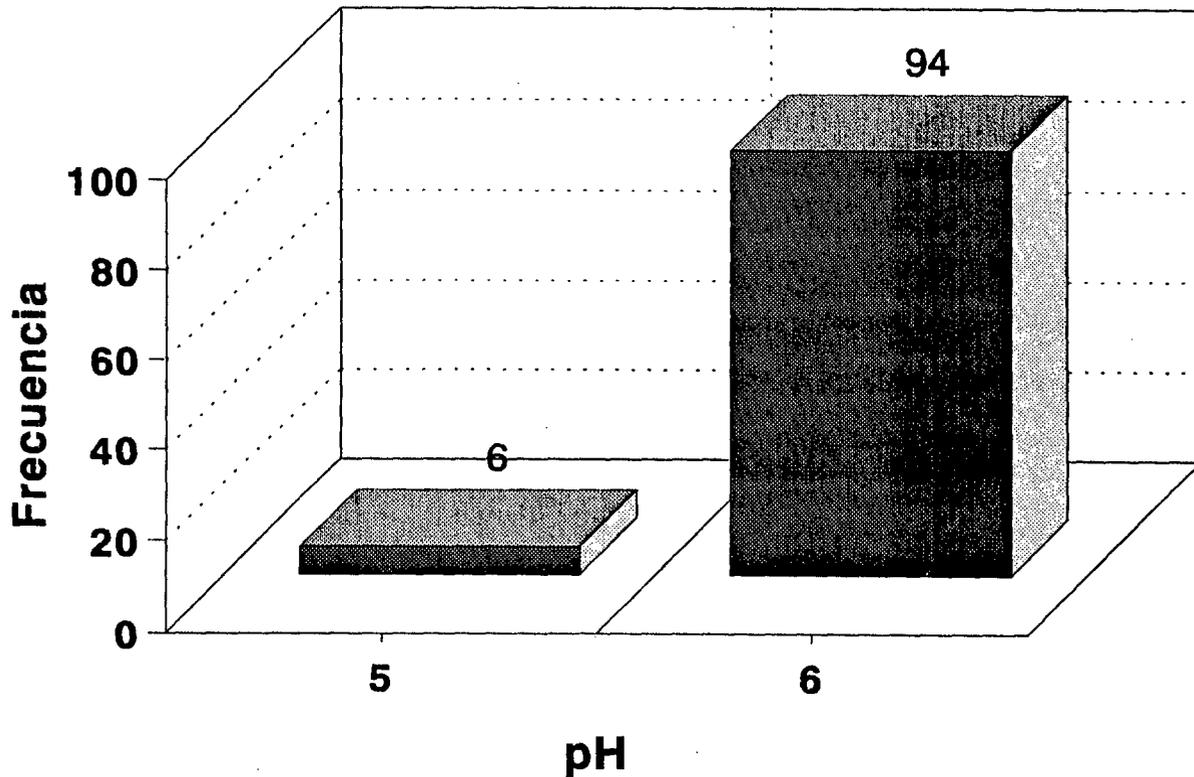
Gráfica 10. Nitrógeno Volátil Total en 100 muestras de pescado colectadas en la Zona Metropolitana de Guadalajara



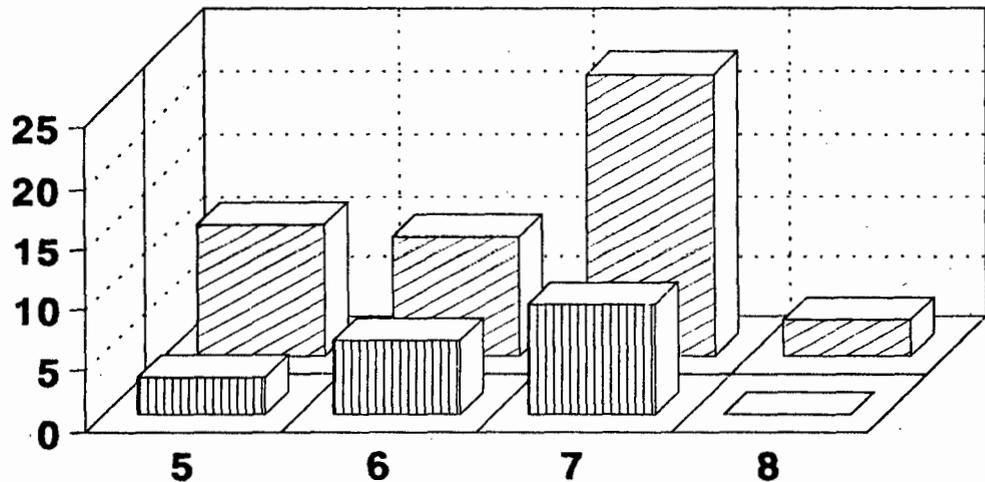
Gráfica 11. Trimetilamina en 100 muestras de pescado colectadas en la Zona Metropolitana de Guadalajara



Gráfica 12. pH en 100 muestras de pescado colectadas en la Zona Metropolitana de Guadalajara



Gráfica 13. BMA/g en 65 muestras de ceviche colectadas en puestos ambulantes según época del año

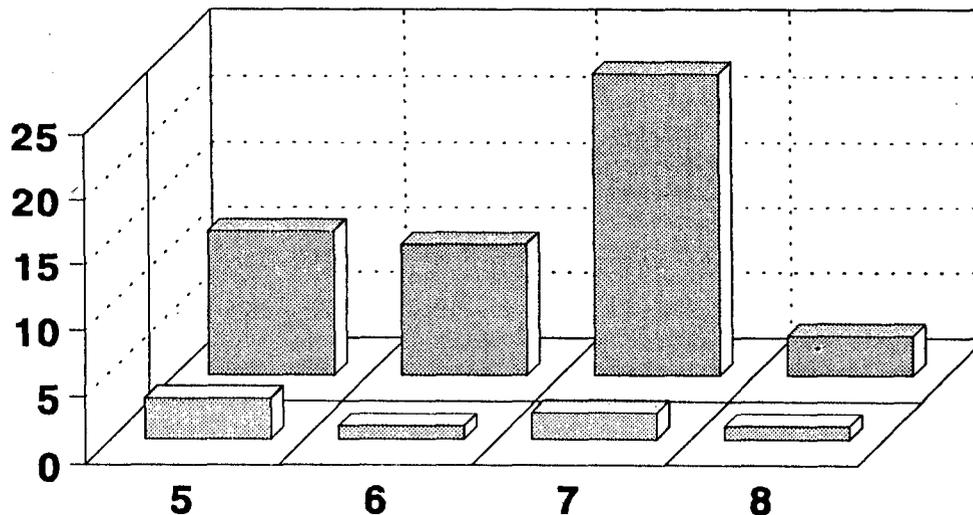


Epoca Calurosa		11	10	23	3
Epoca Fría		3	6	9	0

Log BMA/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
Epoca Fría: Octubre-Marzo
BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

Gráfica 14. *Vibrio cholerae* y BMA/g en 65 muestras de ceviche colectadas en puestos ambulantes en la época calurosa

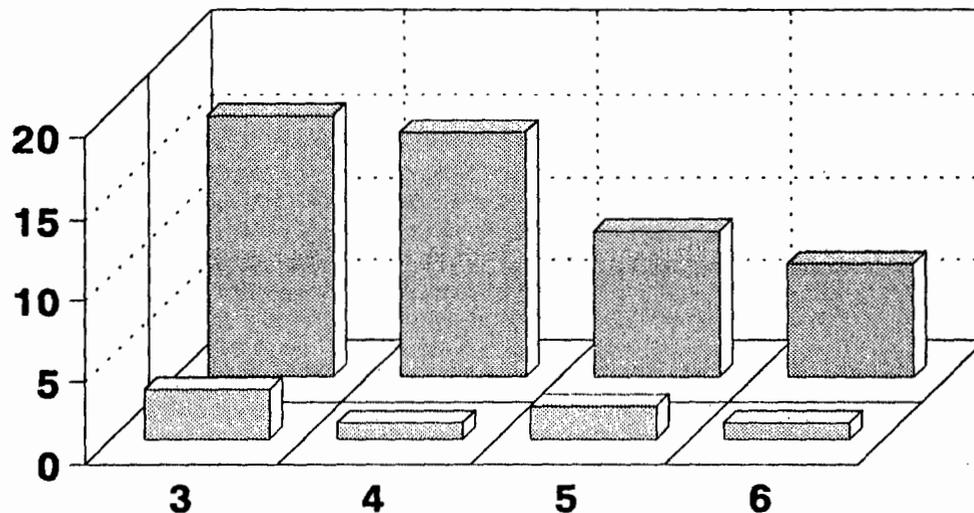


Epoca Calurosa	11	10	23	3
<i>Vibrio cholerae</i>	3	1	2	1

Log BMA/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

Gráfica 15. *Vibrio cholerae* y OC/g en 65 muestras de ceviche colectadas en puestos ambulantes en la época calurosa

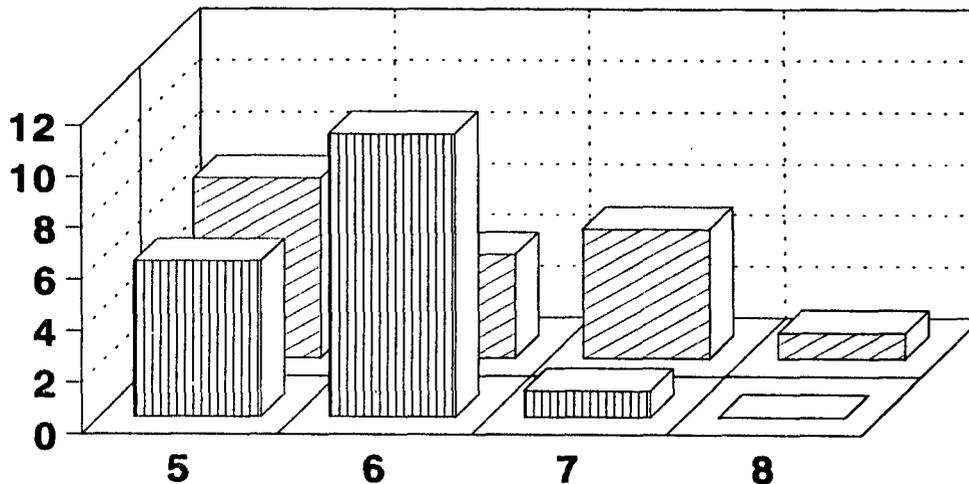


Epoca Calurosa	16	15	9	7
Vibrio cholerae	3	1	2	1

Log OC/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
OC: Organismos Coliformes

Gráfica 16. BMA/g en 35 muestras de ceviche colectadas en puestos fijos según época del año

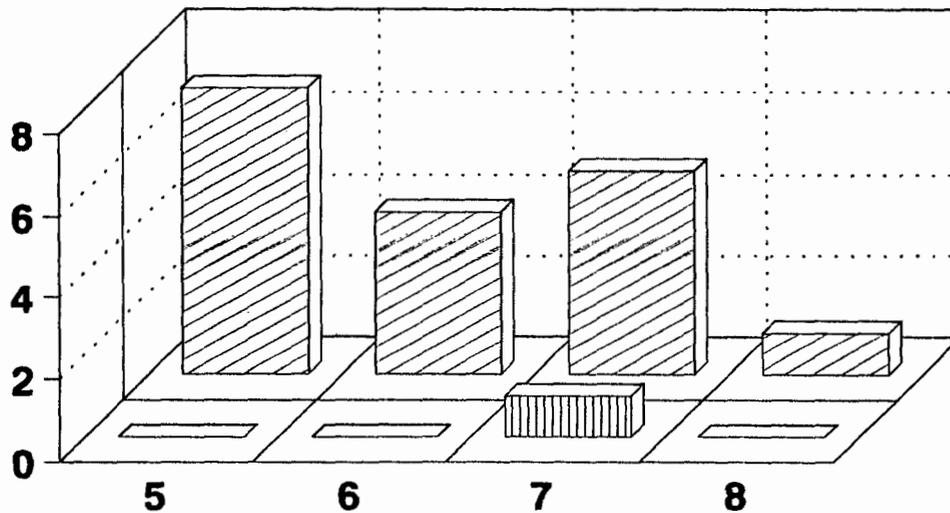


Epoca Calurosa		7	4	5	1
Epoca Fría		6	11	1	0

Log BMA/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
Epoca Fría: Octubre-Marzo
BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

Gráfica 17. *Vibrio cholerae* y BMA/g en 35 muestras de ceviche colectadas en puestos fijos en la época calurosa

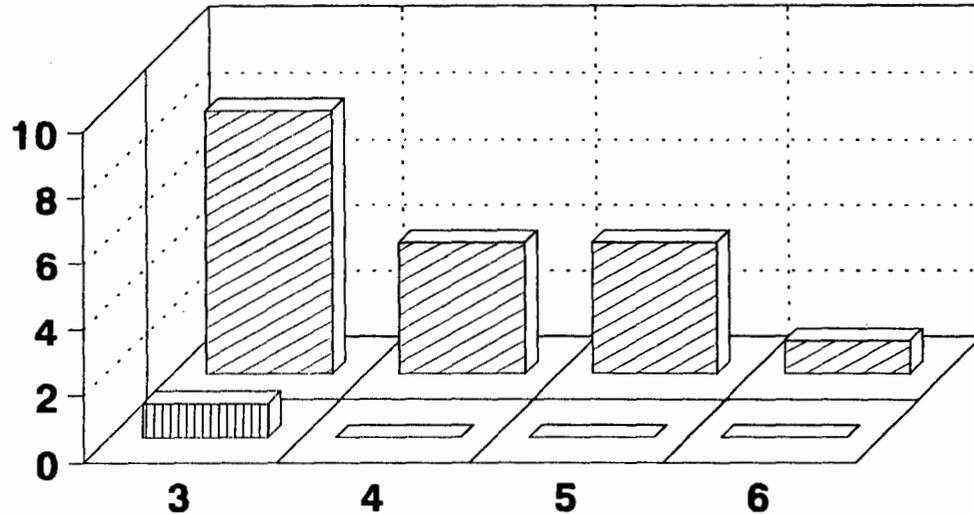


Epoca Calurosa		7	4	5	1
<i>Vibrio cholerae</i>		0	0	1	0

Log BMA/g

**Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias**

Gráfica 18. *Vibrio cholerae* y OC/g en 35 muestras de ceviche colectadas en puestos fijos en la epoca calurosa

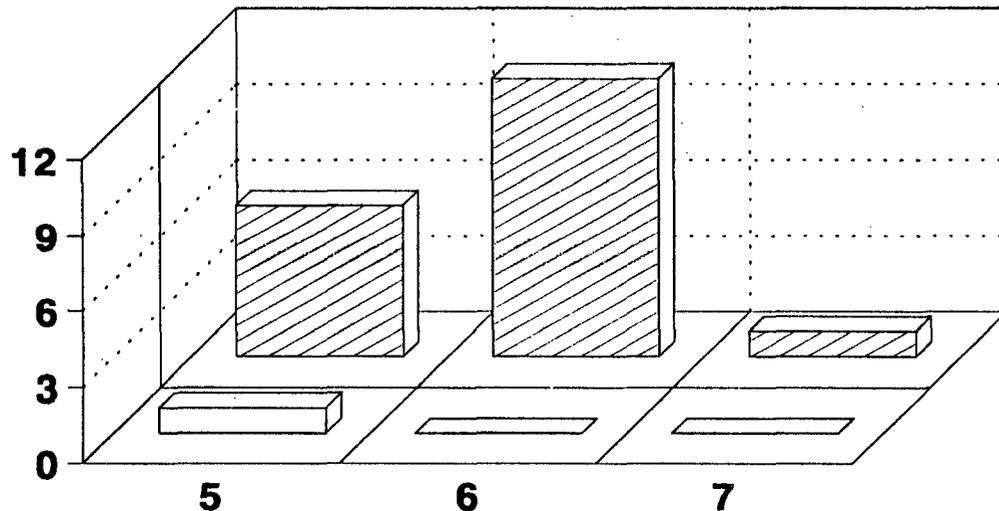


Epoca Calurosa		8	4	4	1
Vibrio cholerae		1	0	0	0

Log OC/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
OC: Organismos Coliformes

Gráfica 19. *Vibrio cholerae* y BMA/g en 35 muestras de ceviche colectadas en puestos fijos en la época fría

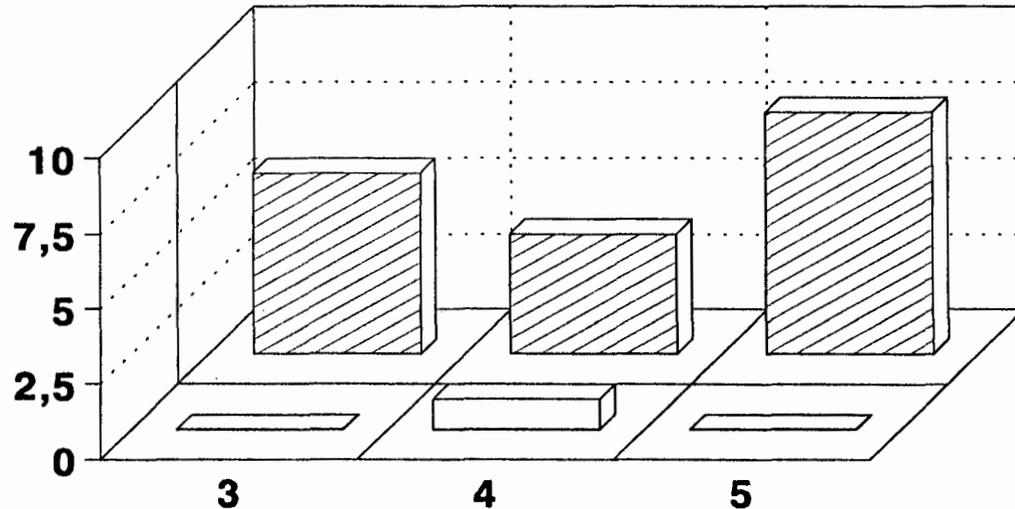


Epoca Fría		6	11	1
<i>Vibrio cholerae</i>		1	0	0

Log BMA/g

Epoca Fría: Octubre-Marzo
BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

Gráfica 20. *Vibrio cholerae* y OC/g en 35 muestras de ceviche colectadas en puestos fijos en la época fría

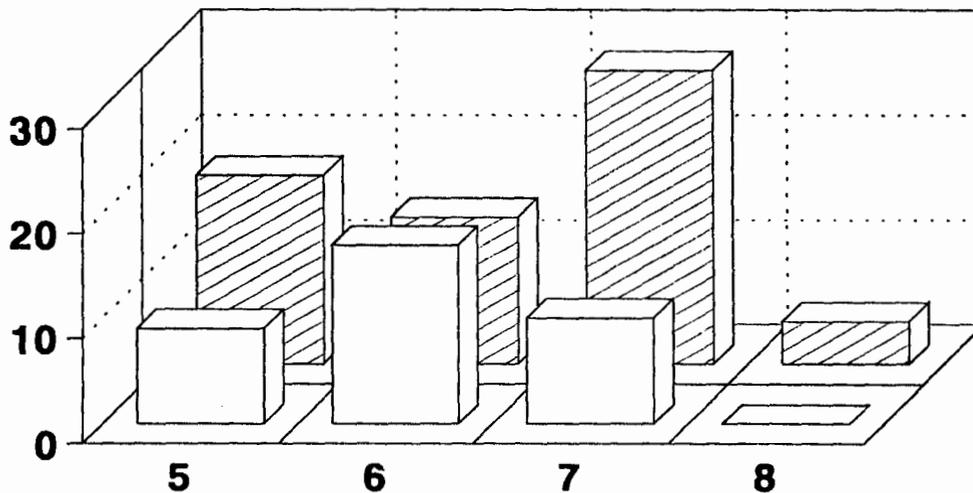


Epoca Fría		6	4	8
Vibrio cholerae		0	1	0

Log OC/g

Epoca Fría: Octubre-Marzo
OC: Organismos Coliformes

Gráfica 21. BMA/g en 100 muestras de ceviche colectadas en Guadalajara según época del año

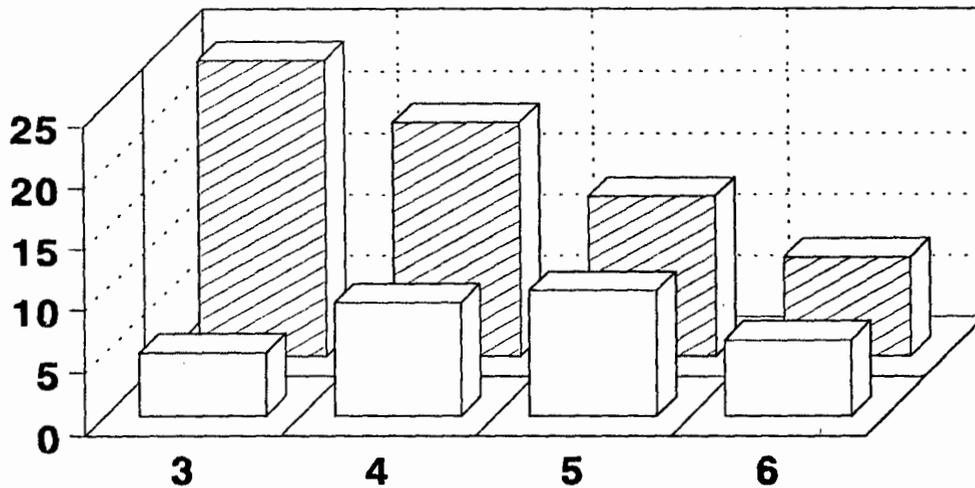


Epoca Calurosa		18	14	28	4
Epoca Fría		9	17	10	0

Log BMA/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
Epoca Fría: Octubre-Marzo
BMA: Bacterias Mesófilas Aerobias

Gráfica 22. OC/g en 100 muestras de ceviche colectadas en Guadalajara según época del año



Epoca Calurosa		24	19	13	8
Epoca Fría		5	9	10	6

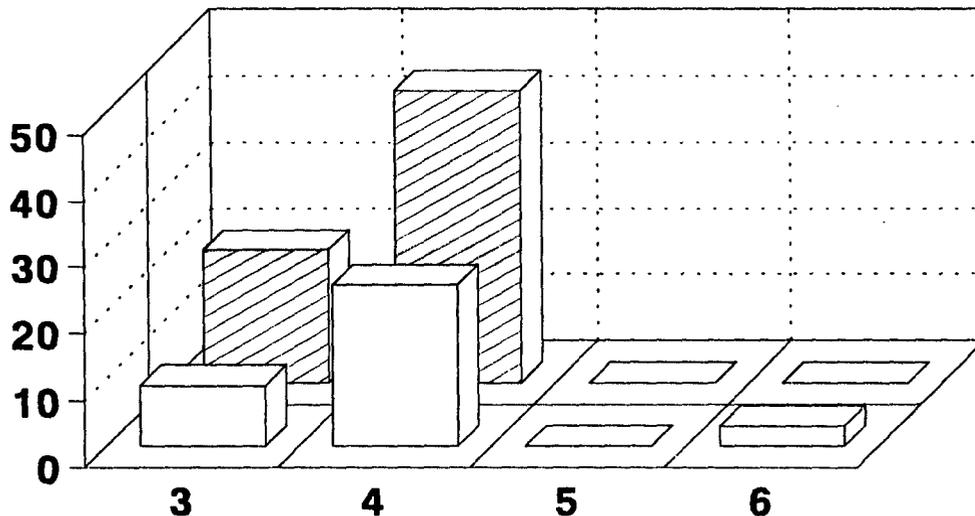
Log OC/g

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre

Epoca Fría: Octubre-Marzo

OC: Organismos Coliformes

Gráfica 23. pH en 100 muestras de ceviche colectadas en Guadalajara según época del año



Epoca Fría		20	44	0	0
Epoca Calurosa		9	24	0	3

pH

Epoca Calurosa: Abril-Septiembre
Epoca Fría: Octubre-Marzo

Tabla 1. Recuperación de *Vibrio cholerae* en 100 muestras de ceviche y 100 muestras de pescado según ruta de aislamiento.

Ruta	Combinaciones probables																		
Total																			
Siembra Directa	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-					
Enriquecimiento 6 hrs ^a	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-				
Enriquecimiento 18 Hrs ^b	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-			
Enriquecimiento 24 hrs ^c	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-			
Pescados																			
Piel y Agallas											1	3	1	4	1	1	12		
Intestinos														1	1		2		
Ceviches												1		1	4	2	8		
Total											1	1	1	3	3	9	3	1	22

^a Tiempo de incubación del tubo del primer enriquecimiento.

^b Tiempo de incubación del tubo del segundo enriquecimiento inoculado a las 6 hrs.

^c Tubo del primer enriquecimiento con incubación prolongada hasta 24 hrs.

Tabla 2. Positividad a *Vibrio cholerae* según medio de aislamiento

Medio de aislamiento	Tiempo de enriquecimiento (Agua Peptonada Alcalina)				Total
	0 horas	6 horas	18 horas	24 horas	
TCBS	4	5	11	4	24
AN	0	2	0	2	4
Total	4	7	11	6	28 ^a

TCBS : Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa.

AN : Agar Nutritivo

^a : p=0.0001

TABLA 3. FRECUENCIA DE *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* NO O1 EN MUESTRAS DE PESCADO Y CEVICHE

	Pescado					
	Piel y agallas		Intestinos		Ceviche	
	Calurosa ^a	Fría ^b	Calurosa	Fría	Calurosa	Fría
<i>V. cholerae</i> O1	8/43	2/57	2/50	0/50	7/64	0/36
<i>V. cholerae</i> no O1	21/43	5/57	12/50	0/50	0/64	0/36

^aAbril-Septiembre
^bOctubre-Marzo

TABLA 4. INCIDENCIA DE SEROTIPOS DE *V. cholerae* O1 EN PESCADO Y CEVICHE SEGUN EPOCA DEL AÑO

	<i>V. cholerae</i>	Epoca		
		Calurosa ^a	Fría ^b	p ^c
Pescado	Ogawa	6/43	2/57	0.0367
	Inaba	5/43	3/57	0.1335
Total		11/43	5/57	0.0139
Ceviche	Ogawa	3/64	1/36	0.3085
	Inaba	5/64	0/36	0.0270
Total		8/64	1/36	0.0250
Total	Ogawa	9/107	3/93	0.0559
	Inaba	10/107	3/93	0.0344
Total		19/107	6/93	0.0060

^aAbril-Septiembre
^bOctubre-Marzo

^cnivel de significancia estadística. Estadísticamente significativo p<0.05

CONCLUSIONES

1. La incidencia de *V. cholerae* en ceviche y pescado en venta directa al público fué mayor en la época calurosa que en la época fría, 85% y 15% respectivamente, ($p=0.0139$) estadísticamente significativo.
2. En pescado fresco el pH (6.0) es un factor que favorece la viabilidad de los microorganismos, en el caso del ceviche el bajo pH (3.0 - 4.0) no resulta ser un factor determinante que asegure la inocuidad del alimento.
3. La flora microbiana asociada en ceviche de pescado pesar de su bajo pH fué igualmente elevada tanto en puestos fijos como ambulantes, revelando una mala calidad sanitaria del alimento.
4. La incidencia de *V. cholerae* en pescado fresco es de 10% en piel y agallas, 2% en intestinos y 8% en ceviche con una marcada influencia de la variación estacional a favor de la época calurosa.
6. Los serotipos identificados fueron 13 Inaba y 12 Ogawa. La frecuencia de ambos serotipos fué similar en las 2 épocas del año, con una incidencia mayor en la época calurosa, ($p=0.0060$) estadísticamente significativo.
7. El pescado fresco y en forma de ceviche son un importante vehículo de *V. cholerae*, por lo que debe recibir mayor atención por parte de las autoridades sanitarias.

RECOMENDACIONES

- 1.- Adquirir productos marinos que cumplan con los criterios sensoriales de frescura ya establecidos.
- 2.- Asegurar la inocuidad del pescado utilizado en la preparación de ceviche, sometiéndolo a un tratamiento térmico.
- 3.- Lavar y desinfectar cuidadosamente las verduras utilizadas en la preparación de ceviche.
- 4.- Evitar el consumo de ceviche en la vía pública.
- 5.- Concientizar a los manejadores de alimentos sobre los riesgos de contaminación durante la preparación y servicio de los mismos.
- 6.- A través de los medios de comunicación recomendar a la población modificar los hábitos alimentarios que implican riesgos sanitarios.

RESUMEN

Los casos actuales de cólera en nuestro país justifican el realizar trabajos de investigación que permitan conocer el riesgo a la salud que puede entrañar el consumo de alimentos como el pescado y más aún cuando se consume crudo en forma de ceviche. Tomando en cuenta la gran demanda de estos alimentos en nuestro medio, llevamos a cabo un estudio que nos permitió determinar la incidencia de *V. cholerae* en pescado fresco y ceviche en expendios de la vía pública en la ciudad de Guadalajara.

Se estudiaron 100 muestras de ceviche de establecimientos fijos y ambulantes con el propósito de conocer la incidencia de *Vibrio cholerae* y la calidad sanitaria mediante las siguientes determinaciones: Exámen sensorial, pH, recuento de bacterias mesófilas aerobias y organismos coliformes. Se adquirieron además 100 muestras de dos variedades de pescado (Sierra y Huachinango) a las cuáles se les determinaron los parámetros antes mencionados adicionando la determinación de Nitrógeno Volátil Total (NVT) y Trimetilamina (TMA) y excluyendo el recuento de Organismos Coliformes.

La positividad global de las muestras de *Vibrio cholerae* resultó ser estadísticamente significativa a favor de la época calurosa (Abril a Septiembre) con un 85% con respecto a la época fría (Octubre a Marzo) con un 15%.

Los hallazgos obtenidos ponen en evidencia el riesgo a la salud que puede implicar el consumo del ceviche en la vía pública, así como la sola presencia del patógeno en las variedades de pescado analizadas es objetable por representar un riesgo para la salud pública.

REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS

1. Amako, Kazunobu, Shimodori, Shoichi, Imoto, Taiji, Miake, hunjliand Umeda, Akiko. 1987. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *V. cholerae* O1 at low temperature. Applied and environmental Microbiology. 53:603-605.
2. Anónimo. 1991. Epidemia de Cólera en el Perú y Pautas para su Control. Bol. de la Ofic. Sanit. Panam. 110:440.
3. Anónimo. 1991. ISSC Recommends Consumer Message on raw ShellFish. Dairy Food Environ. Sanit. 11:734.
4. Anónimo. 1991. Boletín Internacional sobre el control de enfermedades diarreicas. pp. 35.
5. A. Donohue-Roulfe, David W.K., Gerald T. Keush. 1991. Shiga toxin: purification, structure and function. Reviews of infectious diseases. Society of America published by the University of Chicago. pp. 13.
6. Barile, L. E., Milla, A., Reilly, A. and Villadsen, A. 1985. Spoilage potters of mackerel (*Rastreloliger faughni* Matsui). 1. Delays in icing. ASEAN food J. 1 (2): 70.
7. Barret, Timothy J., Blaake, Paul A. 1981. Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *V. cholerae* Biotype "El Tor" during the seventh pandemic. Journal of clinical Microbiology. 13:126-129.
- 7a. Bean, N.H. and P.M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the Unites States, 1973-1987: Pathogens, vehicles and trends. J. Food prot. 53: 804-817.
8. Boletín semanal de vigilancia epidemiológica del cólera en México. 1992. Epidemiología. SSA No.6.
9. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 1991. 11:440.
10. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 1991. 11:356.
11. Boletín Internacional sobre el control de enfermedades diarreicas. No.45. Sep-Dic. 1993. Diálogo sobre la Diarrea. Publicación de AHRTAG, Inglaterra, edición en español por grupo CID con la asesoría de CED, OPS/OMS.
12. Boletín mensual Cólera/diarreas infecciosas. 1993. No.9. Instituto Nacional de Diagnóstico y referencia epidemiológicos. 3:361-365.

13. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiologica del Cólera en México . 1992. No. 6.
14. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica, Cólera en México. 1993. Semana 50. pp. 2,4.
15. Boutin, B.A. Finkelstein, R.A. 1986. Presence of haemagglutinating protease and other potential virulence factors in O1 and non-O1 *Vibrio cholerae* J. infect. Dis. 154:183-186.
16. Blaser, M.J and L.S. Newman. 1982. A Review of Human salmonellosis: I. Infective Dose. Rev. Inf. Dis. 4:1096-1106.
17. Brener D., Hickman-Brener, F. and Lee J. 1983. *Vibrio furnisii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*) a new species isolated from human feces and the environment. Microb. 18:816.
18. D'Aoust, J.V., Gelinos, R. and Maisment, C. 1980. Presence of indicator organisms and recovery of *Salmonella* in fish and shellfish. Journal of food protection. 43(9): 679-682.
19. Davidson, Larrys and Oliver, James D. 1986. Plasmid carriage in *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios. Appl. environ Microbiol. 51(2):211-213.
20. Davis, J.W. and Sizemore, R.K. 1981. Incidence of *Vibrio* species associated with blue crab. (*Callinectes sapidus*) Collected from Galveston Bay Texas. Appl. Environ Microbiol. 43:1092-1097.
21. Davis, B.D. Dulbeco, P. and Eisenth, N. 1979. Tratado de Microbiología. 2a. Edición. Salvat Editores S.A.
22. De León Fajardo, L.R. and Marth, E.H. 1979. Bacterial Flora of Fish from Tropical Sea Water. J. Food. Prot. 42(9):724-728.
23. Doyle, Michael P. *Vibrio cholera* Foodborne bacterial pathogens. Center for food safety and applied nutrition, U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. 1989. 525-600.
24. Fernández Escartín E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Vol. 1. Edit. U. de G.

25. Giono Cerezo Silvia, Lucina Gutiérrez Cogno Asela, María Hinojosa A. Manual de procedimientos y caracterización de *V. cholerae* O1. Publicación Técnica INDRE 10. Secretaría de Salud.
26. Glass, R.F. Hug, M.I., Lee, J.V. Threifull, E.J. Khan, M.R., A.R. Ma. Rowe and Gross, R.J. 1983. Plasmid-Borne multiple drug Resistance in *V. cholerae* O1, Biotype El Tor; evidence for a Point-source Outbreak in Bangladesh. The journal of diseases infectious. 147:204.
27. González Raymundo. Microbiología de los productos marinos. pp. 8-11. Edit. Pueblo y Educación de la Habana.
28. Hackney, Cameron R. and Dicharry Angela. 1988. Seafood borne bacterial pathogens of marine origin. Food Technology. 42:104-109.
29. Hada, Howard D; and Sizemore, Ronald, K. 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. Isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of México. Applied and Environmental Microbiology, 41:199-202.
30. Hood, M.A., G.E. Ness and G.E. Rodrick. 1991. Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Appl. Environ. Microbiol. 41:559-560.
31. ICMSF. Pescados y mariscos y sus productos. Ecología microbiana de los Alimentos. 11:573-581.
32. ICMSF. 1978. Microorganisms in Foods 1. Their Significance and Methods of Enumeration. pp. 15. Univ. Toronto Press. Toronto.
33. ICMSF. 1980. Microbial Ecology of Foods , Vol. II: Food Commodities. Academic Press, Inc. New York. Citado en 45.
34. INDRE. 1991. Cólera, Diarreas infecciosas. Boletín Quincenal. Año 1. No.1.
35. Kaper, J., J. L. Nataro, N. Roberts, R. Sewibeling, and H. Bradford. 1986. Molecular epidemiology of non-O1 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* in U.S. gulf coast region. J. Clin. Microbiol. 23:652.
36. Kenyon Jane E, Piexoto Donald R., Austin Brett and Gillies Duncan C. 1984. Seasonal variation in numbers of *V. cholerae* (non O1), isolated from a California coastal waters. Applied and environmental Microbiology, 47(6):1243-1245.

37. Lamatas de las Casas Claudio. "La enfermedad del cólera" El comercio en Lima. Año 5. No.80,099.2-9.
38. Levine M. M. Black R.E. Clements M.L. The pathogenicity of non enterotoxigenic *V. cholerae* serogroup O1 biotype El Tor isolated from sewage water in Brazil. *J. Infect. Dis.* 160:975.
39. Lowry Philip, W. MacFarland, Louise M.; Peltier, Barbara H.; Roberts, Nell C. 1989. *Vibrio* Gastroenteritis in Louisiana: A Prospective Study Among Attendees of a Scientific Congress in New Orleans. *J. Infectious Diseases.* 160:978
40. Madden, J.M. and Mc. Cardell B. 1989. *V. cholerae*. Foodborne bacterial pathogens. M.D. Doyle ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. 525-542.
41. Martinez Lombarda, Miguel Gerardo y Morales García J.I. de la C. Marzo de 1992. Situación del cólera en México. Boletín mensual de epidemiología. Sistema Nacional de Salud. 7:71.
42. Molenda J.R. 1992. *Cholerae*, John Snow and the Pump Handle. *Dairy Food Environ. Sanit.* 12:12-15.
43. Nickerson, J.T. and A.J. Sinskey. 1972. *Microbiology of Foods and Food Processing.* Amer. Elsevier Pub. Co., Inc. New York. USA. Citado en 45.
44. Oliver, James D. and Stringer, William F. 1984. Lipid Composition of a Psychrophilic Marine *Vibrio* During Starvation Induced Morphogenesis. *A.A.E.M.* 47:461-466.
45. Parra Parra, Ma. Gpe. y Velázquez Pérez, Tomás. 1993. Incidencia de casos de *V. cholerae* en el estado de Jalisco entre 1991-1992. X Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal.
46. Parrilla Cerrillo, M.C.; Vazquez Castellanos, J.L.; S.C.E. Ofelia; Nava F., L.M. 1993. Brotes de Intoxicaciones Alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública.* 35:456-463.
47. Potter, N. 1973. *La Ciencia de los alimentos.* México, D.F. Eduter. 15:469-478.
48. Romero O.C., Guzmán R. 1986. *Revista del Consumidor.* Instituto Nacional del Consumidor. pp. 13-18,25-26.

49. Sánchez Gúzman Gabriela. 1993. Sobrevivencia de *V. cholerae* O1 en jugo de naranja fresco. X Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal.
50. Sánchez Larios P. y Padilla Medrano Elbia del C. 1992. Sobrevivencia de *V. cholerae* en pescado crudo molido destinado a la preparación de ceviche. Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo. Fac. de Ciencias Químicas. U de G.
51. Sánchez Robles M. R. y Peregrina Alaniz O. L. 1987. Criterios de frescura en la comercialización del pescado crudo. Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo. Fac. Ciencias Químicas. U de G.
52. Sleisenger, H.M. ; John, S.F. Tratado de Gastroenterología. pp 822.
53. Sidimu, V. and Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family vibrionaceae. *App. Environmental Microbiol.* 50: 781-790.
54. Singleton, F.L. Attwell, R.W. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *V. cholerae* in aquatic microcosms. *Applied and environmental.*
55. Somaatmadja Dardjo, Powers, John J. and Pratt, Dan E. 1960. Chemical methods for the determination on the freshness of fish. *Food technology.* pp. 2-6.
56. Spira, W.M. and Ahmed, Q.S. 1981. Gauze Filtration and Enrichment Procedures for Recovery of *V. cholerae* from Contaminated Waters. *A.A.E.M.* 42:730-733.
57. Torres Vitela Ma. Refugio. 1992. Riesgos a la Salud Asociados al Consumo de Peces y Mariscos. Tesis Maestría. Universidad de Guadalajara.
58. Torres Vitela R. y Fernández, Escartín E. 1986. Microbiología de ceviche en pescado. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Asoc. Mexicana de Microbiología. Puebla, Puebla.
59. Torres Vitela M.R. y Fernández Escartín. 1993. Incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado, ostión y camarón crudos. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 35:267-272.

60. Valdespino José L., García Ma. de Lourdes Hinojosa Marina, Sarti Elsa. 1991. Epidemia de Cólera en América. Ciencia y desarrollo del Consejo Nacional de Ciencia y Téc. XVII 54-64.
61. Valdespino Gómez J.L., García G. Ma de L. 1981. Manual del cólera para personal de salud. Publicación técnica del INDRE # 11. Nacional del diagnóstico y Ref. epidemiológicas.