



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DEL ESTADO DE PUEBLA

TESIS:

“Aislamiento e identificación de las especies patógenas *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarones y moluscos bivalvos en el Departamento de Vigilancia Sanitaria del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla”.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. PAOLA SHADENI BENITEZ COTZOMI

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. MARCO ANTONIO FLORES ROMERO

ASESOR DE TESIS:

M. C. GLORIA LEÓN TELLO

PUEBLA, PUE. FEBRERO 2016

No existen más que dos reglas para escribir:

Tener algo que decir y decirlo.

Oscar Wilde (1854 – 1900)

Dedicatoria:

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi madre por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor, ayuda en los momentos difíciles. Me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios, carácter, empeño, perseverancia, coraje para seguir mis objetivos. A mis hermanos por apoyarme durante este sueño sin su ayuda no podría haberlo logrado.

Agradecimientos:

Al Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitir la realización de este trabajo en sus instalaciones. A mi director de tesis al Q.F.B Marco Antonio Flores Romero, mi asesor de tesis a la M.C. Gloria León Tello, por el apoyo en la realización de este trabajo, su conocimiento, sus consejos y su tiempo brindado. A todos aquellos químicos que de alguna forma me apoyaron mil gracias, nunca los olvidare.

Resumen

Actualmente se conocen 12 especies patógenas no coléricas del género *Vibrio*. Estas especies además de ser patógenas para el ser humano infectan peces y camarones. En los últimos años se ha incrementado el interés sobre la investigación del género *Vibrio* en los sistemas marinos costeros, ya que son la causa principal de afecciones gastrointestinales asociadas al consumo de moluscos bivalvos. En función de lo anterior, tres especies tienen importancia clínica: *Vibrio cholerae* responsable del cólera; *Vibrio vulnificus*, causa gastroenteritis, infecciones invasivas de heridas contaminadas y septicemias mortales, y *Vibrio parahaemolyticus*, produce gastroenteritis y septicemia. Estas patologías afectan pescadores, criadores, vendedores y consumidores de productos marinos, individuos inmunocomprometidos como diabéticos, cirróticos, con afección crónica en el hígado, alcohólicos, personas con VIH. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar especies patógenas *cholerae*, *vulnificus* y *parahaemolyticus*, del género *Vibrio* en muestras de camarones y moluscos bivalvos analizados durante el periodo abril a mayo de 2015, en el Departamento de Vigilancia Sanitaria del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla mediante la técnica del número más probable (NMP). Confirmando los resultados mediante el sistema semi automatizado Vitek II. Se analizó un total de 65 muestras, de este total 57 fueron de camarón, 5 de almeja y 3 de mejillón de las cuales se obtuvo un aislamiento de 5 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, 3 cepas de *Vibrio vulnificus* y 1 cepa de *Vibrio cholerae* no O1. Los resultados obtenidos mediante la técnica del número más probable están por arriba de la dosis infectiva, por ello es importante evaluar el riesgo que presenta a la población del estado, ya que ésta, según las estadísticas, ocupa el quinto lugar con personas infectadas de VIH y el cuarto, en personas diabéticas y alcohólicas. Es importante señalar, que a la fecha no se encuentran reportes de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en Puebla, sin embargo, tomando en consideración lo que marca la bibliografía, la población es un blanco perfecto para contraer alguna patología debida a estos microorganismos, lo cual, en caso de suceder, generaría un gasto elevado en atención médica; impactando de manera negativa al gasto familiar y al Sector Salud al incrementar costos en lo referente a la salud pública.

Palabras clave: *Vibrio*, especies patógenas, alimentos marinos.

| Índice | Página |
|---|---------------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Marco teórico..... | 3 |
| 3. Marco de referencia | 7 |
| 4. Planteamiento del problema..... | 9 |
| 5. Justificación | 10 |
| 6. Objetivos | 11 |
| a) General..... | 11 |
| b) Particulares | 11 |
| 7. Diseño del estudio:..... | 12 |
| 8. Material y metodología | 14 |
| 9. Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable (NMP). Cuantificación de los <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , en alimentos de origen marino. | 15 |
| 10. Diagramas de trabajo..... | 17 |
| a) Esquema general de trabajo. | 17 |
| 11. Esquema de trabajo base para la determinación de <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> , en alimentos de origen marino, en base a la técnica del número más probable. (Prueba presuntiva) | 18 |
| 12. Cuantificación de los <i>Vibrio cholerae</i> , <i>vulnificus</i> y <i>parahaemolyticus</i> | 19 |
| | 19 |
| 13. Confirmación mediante Vitek II | 20 |
| 14. Resultados y discusión | 21 |
| 15. Conclusiones | 28 |
| 15. Sugerencia | 29 |
| 16. Bibliografía: | 30 |
| Anexo 1 | 32 |

1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son de especial importancia por sus altas tasas de morbilidad y mortalidad entre los grupos más vulnerables de la población porque representan una proporción muy alta en costo de la atención médica y de hospitalización. Dentro de los productos alimenticios involucrados como causantes de ETAs se encuentran los productos de la pesca como los moluscos que se alimentan filtrando el agua en donde se cultivan, concentrando los microorganismos y sustancias presentes en el medio, convirtiéndose en vehículos de enfermedades, aumentando su peligrosidad al ser consumidos crudos o ligeramente cocidos. ⁽²⁾

Dentro de las especies, del género *Vibrio*, clasificados como patógenos se encuentran *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Estas especies han sido descubiertas en zonas costeras de los Estados Unidos de América y otras partes del mundo. Se han detectado en muestras ambientales de áreas libres de desagües o contaminación por coliformes. En general, las enfermedades causadas por mariscos, moluscos, como las infecciones causadas por *Vibrio* sp, tienden a ocurrir cuando la temperatura del agua es mayor, son comúnmente reportadas como causa de enfermedades gastrointestinales asociadas con el consumo de mariscos que contengan moluscos bivalvos.

El cólera es un problema de salud pública de importancia creciente. Tiene tendencia a producir epidemias y pandemias, con frecuencia de enorme mortalidad, y a permanecer después de forma endémica en las zonas afectadas. El número de países afectados sigue aumentando. El continente más afectado es África (más del 90% de los casos notificados), seguido de Asia y América. En Estados Unidos, Europa y Oceanía sólo se notifican casos esporádicos, casi siempre importados. Los casos notificados seguramente constituyen sólo una parte de los reales, dadas las deficiencias sanitarias de los países más afectados. En países no desarrollados se transmite habitualmente a través del consumo de agua contaminada, y en países desarrollados a través de alimentos, especialmente de origen marino, poco cocinados. El ciclo de transmisión se cierra cuando los seres humanos infectados liberan la bacteria al medio ambiente y contaminan los suministros de agua y los alimentos. ^(9, 14)

En Japón los reportes anuales de Instituciones de Salud Pública y Centros de Salud sobre aislamiento de *V. parahaemolyticus* de origen humano han mostrado un incremento desde 1997. ⁽¹⁴⁾

Según los reportes del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica, en 2004 se documentaron 92 casos de infección por *Vibrio vulnificus*, de los cuales 64 habían desarrollado septicemia y en 28 de estos la puerta de entrada fue una herida en la

piel. ⁽¹³⁾ En México se han reportado casos de infección por *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* documentados en México documentados en 2013, 2012 y 2011. ^(1, 13)

2. Marco teórico

El género *Vibrio* está compuesto de más de 60 especies de bacilos curvos; 12 especies se han implicado en las infecciones humanas. *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Aunque *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* son considerados los agentes de transmisión más significativos. ^(8, 9,13)

Las especies del género *Vibrio* son Gram negativos, con forma de bacilos curvados, móviles, flagelados de vida libre y rápido crecimiento. Bioquímicamente se caracterizan por dar positivo en las pruebas de la catalasa y de la oxidasa. Es una bacteria anaerobia facultativa, y su metabolismo es fermentativo; pueden metabolizar, entre otros sustratos, la glucosa. Poseen flagelos polares, que les otorga una movilidad máxima. Toleran pH alcalinos y algunas especies necesitan medios de alta salinidad para crecer (halófilos). Tiene un antígeno flagelar H que no distingue entre vibriones patógenos y no patógenos, y un antígeno somático O, que sí permite esta distinción. ⁽¹⁾

a) *Vibrio cholerae*

Es un bacilo que no forma esporas, sobrevive en medios alcalinos a temperaturas entre 22 - 42°C. La infección por *Vibrio* no es invasiva: estos quedan en el tubo intestinal donde se adhieren a receptores celulares específicos presentes en las vellosidades de las células epiteliales del intestino. Allí se multiplican y secretan la enterotoxina que es la causante de la diarrea acuosa, Esta enterotoxina induce un bloqueo de la absorción de sodio y cloro por las vellosidades y promueve la secreción de cloro y agua por las células de las criptas intestinales, con deposiciones típicamente poco dolorosas y muy abundantes (pueden alcanzar los 500-1.000 ml/hora), sin contracción violenta, con característico aspecto de agua de arroz y olor a pescado. ^(12,13)

La toxina colérica producida por los vibrios adheridos se secreta, a través de la membrana externa bacteriana, al ambiente extracelular y se introduce a la célula a través de la unión de la subunidad B pentamérica con el gangliósido receptor GM1. Una vez dentro de la célula, la subunidad A, compuesta por dos dominios estructurales denominados péptido A₁ y A₂ sufre un procesamiento proteolítico.

El péptido A₁ es la subunidad que posee una actividad enzimática específica, actúa intracelularmente, incrementando los niveles de AMPc (adenosín monofosfatocíclico), cambiando la tendencia de absorción del intestino delgado por secreción. La subsecuente pérdida de agua y electrolitos conduce a la diarrea severa característica del cólera. ⁽¹⁰⁾ Se han identificado formas

benignas del síndrome colérico relacionadas con vibrios muy similares al causado por la bacteria del cólera. Estos organismos carecen del antígeno O1 por lo que se identifican como *V. cholerae* no-O1. Abundan en las aguas marinas cercanas a la costa y son una causa de gastroenteritis leve. No han sido asociados a epidemias. ⁽¹⁰⁾

Diagnóstico

Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de ELISA son más sensibles que el cultivo e incluso superiores en la detección de vibriones en alimentos contaminados, Sin embargo, el diagnóstico de certeza aún se basa en el aislamiento de la bacteria en medios de cultivos específicos como el agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) o el agar con taurocolato-telurito-gelatina (TTGA), que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias entéricas. Las colonias sospechosas deben ser confirmadas mediante aglutinación con antiseros específicos como *V. cholerae* O1 o O139. ⁽⁹⁾

Otra técnica para el diagnóstico es mediante un cultivo microbiológico de alimentos de origen marino, o un coprocultivo mediante un hisopado rectal. ^(1,2)

b) *Vibrio vulnificus*

Hollis et al lo describieron por primera vez en 1976 y se le denominó “*Vibrio lactosa* positivo”, posteriormente se le llamo *Beneckea vulnificus* y finalmente *V. vulnificus*. ^(2,5) Dentro del género *Vibrio* la especie *vulnificus* es una de las 12 de importancia clínica. Es una bacteria que se encuentra en ambientes marinos y estuario, crece en aguas marítimas con temperaturas aproximadas de 20°C y salinidad entre el 0.7 y 1.6 %. Se desarrolla predominantemente del mes de abril al mes de octubre. La infección por esta bacteria puede causar septicemia primaria por dos mecanismos: al ingerir crustáceos, moluscos crudos o poco cocidos, o por exponer una herida abierta al agua de mar. Se asocia a cuadros sépticos de alta mortalidad. ^(1,21)

En individuos inmunocomprometidos como diabéticos, cirróticos, con afección crónica en el hígado, alcohólicos y sobrecarga de hierro. Actúa 24 horas después de la ingestión de la bacteria. Infecta el torrente sanguíneo caracterizado por fiebre, escalofrío, y los niveles de hierro son elevados en suero hasta la disminución de la presión sanguínea llegando al shock séptico. ⁽²²⁾

Diagnóstico

Se puede realizar hemocultivos o tomando una muestra de la zona lesionada. ^(1, 2, 23) El cultivo en TCBS presenta colonias verde-azul de 2-5 mm de diámetro, Posteriormente se realizan pruebas de halofilismo (diferentes concentraciones de sal 0%, 3%, 6%, 8%, 10% de NaCl). Para descartar otros tipos de vibrios, se realizan pruebas de oxidasa y pruebas bioquímicas para su confirmación. ^(2, 11)

c) *Vibrio parahaemolyticus*

Pertenece a la familia Vibrionaceae es un microorganismo halofílico marino ampliamente distribuido en el agua de las costas, sedimento marino. Esta especie está integrada por formas bacilares, sin esporas, ni cápsulas y se desplazan mediante un único flagelo polar, anaerobias facultativas con metabolismo oxidativo y fermentativo. Su crecimiento es más activo entre valores de pH 7,5 a 8,5. La temperatura del agua es el factor más importante que controla los niveles ambientales de *V. parahaemolyticus*, las densidades se incrementan a partir de los 10°C hasta los 30°C. Crecen entre 15-43°C, con temperatura óptima a 37°C. ^(7, 19)

Puede estar presente en alimentos marinos, como los pescados y mariscos, tienen un importante papel en la transmisión de este agente etiológico cuando se consumen crudos o insuficientemente cocinados. Los mariscos, especialmente los moluscos bivalvos, como ostiones y almejas acumulan cantidades importantes del microorganismo. ^(11, 23)

Crece en condiciones de salinidad entre el 3 al 8 %, con un tamaño de 1.4 – 2.6 µm de longitud por 0.5 – 0.8 µm de diámetro, tiempo de generación estimado en 10 a 12 minutos; fermenta glucosa sin producción de gas, fermenta manitol, arabinosa y manosa, pero no fermenta sacarosa, lactosa. ⁽²³⁾

La intoxicación causa tres entidades clínicas reconocidas: gastroenteritis, septicemia e infección de heridas. El cuadro intestinal es el más frecuente, caracterizado por diarrea acuosa y cólicos abdominales, que pueden acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefalea. ⁽¹⁶⁾

Diagnóstico

El microorganismo es demostrable mediante coprocultivo, a través de un hisopado rectal y cultivado en agar TCBS presentando colonias verdes-azul de 2.5 mm de diámetro. ⁽²³⁾ Análisis microbiológico de alimentos cultivados en agar TCBS presentando colonias verdes-azul de 2.5 mm de diámetro. ^(17, 23)

Tratamiento

Para tratar cualquier infección de los 3 vibrios antes mencionados, el pilar básico es la adecuada y precoz rehidratación. La mayoría de los casos pueden tratarse con solución líquida oral; el tratamiento intravenoso sólo es necesario en los casos más graves. La antibioterapia disminuye la duración de los síntomas y la excreción de vibriónes por heces. La doxiciclina en dosis única es el tratamiento actual de elección. ^(1, 9, 10, 13,19)

3. Marco de referencia

- ✚ En el 2004 Baizabal y col, En el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica documentaron 92 casos de infección por *Vibrio vulnificus*, de los cuales 64 habían desarrollado septicemia y en 28 de estos la puerta de entrada fue una herida en la piel. ⁽¹⁾
- ✚ El 20 de noviembre de 2010 el Ministerio de Salud Pública y Población (MSPP) de Haití notifico 60 240 casos de cólera en todo el país, 1415 de ellos mortales. La tasa de letalidad en los hospitales fue del 2.3%; el 67% de las muertes se produjo en los servicios de salud, y el 33% en la comunidad. ⁽¹⁴⁾
- ✚ El 3 de octubre de 2010 se registraron 40 468 casos, 1879 de ellos mortales, en cuatro países (Camerún, Chad, Níger y Nigeria). A esta incidencia inusualmente elevada de cólera contribuyeron factores como la estación de las lluvias y las inundaciones, las malas condiciones higiénicas y los movimientos de población de la zona. ⁽¹⁴⁾
- ✚ En el año 2010 Monsreal y col, en Japón los reportes anuales de Instituciones de Salud Pública y Centros de Salud sobre aislamiento de *V. parahaemolyticus* de origen humano mostraron un incremento desde 1997. De acuerdo a los informes sobre brotes durante 1996-1998, mensualmente la intoxicación alimentaria por *V. parahaemolyticus* prevaleció más en verano. También aumentaron en otros países como Tailandia. ⁽¹⁶⁾ En Japón, es un agente diarreico extremadamente importante, causo entre 50 y 70% de los casos de enteritis transmitidas por alimentos, todos los brotes fueron asociados directa o indirectamente con alimentos provenientes del mar. En el año 1950, investigadores japoneses encabezados por Fujino identificaron por primera vez a *Vibrio parahaemolyticus* como el causante de intoxicación alimentaria. ⁽¹²⁾
- ✚ EL 23 de Julio de 2012, La República Democrática del Congo (RDC) notifico un gran aumento del número de casos de cólera en la zona de conflicto armado de Kivu Norte. De acuerdo con el informe, se notificaron 368 casos nuevos. Las zonas más afectadas fueron Birambizo, Goma, Karisimbi, Kiroshe, Mutwanga, Mweso y Rwanguba. ⁽¹⁴⁾
- ✚ En el año 2012, Muños y col, en Sucre Venezuela identificaron bacterias del género *Vibrio* en moluscos bivalvos. Observando que la mayoría de las cepas aisladas corresponden a *V. alginulyticus* seguida de *V. parahaemolyticus*. Lo cual indica que existen condiciones favorables para su hábitat, por lo que se debe considerar su vinculación con posibles infecciones adquiridas por el consumo de alimentos marinos crudos o mal cocidos. ⁽¹³⁾

✚ En el año 2013 (COFEPRIS) notifico en el país 180 casos confirmados de cólera por *Vibrio cholerae* O1 Ogawa, uno de ellos mortal. De estos 180 casos, 2 fueron registrados en el Distrito Federal, 159 en el estado de Hidalgo, 9 en el estado de México, 2 en el estado de San Luis Potosí, y 8 en el estado de Veracruz, lo cual demuestra la necesidad de permanecer en constante alerta, dada la cercanía del estado de Puebla con las entidades afectadas por el brote.

4. Planteamiento del problema

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's), constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Estas enfermedades se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con bacterias, parásitos o bien las sustancias tóxicas que ellos producen. Durante la temporada de calor se incrementa el consumo de productos del mar y la venta de estos en diferentes establecimientos en el estado de Puebla, por ello, es necesario tener un control sanitario para poder cuidar la salud del consumidor y poder identificar a microorganismos patógenos que puedan estar presentes en estos alimentos y que pudieran presentar un riesgo potencial para la población al estar pasando desapercibidos.

El más reciente brote de cólera en México en septiembre del 2013 demuestra la susceptibilidad de la población frente a estos patógenos y muestra la importancia de la vigilancia y control sanitario de los alimentos de origen marino. Tomando en consideración que en el Laboratorio de Salud Pública solo se busca la especie *cholerae* del género *Vibrio*, pudieran estar pasando desapercibidas otras especies como *parahaemolyticus* y *vulnificus* los cuales según la bibliografía son causantes en enfermedades importantes en el ser humano; por lo tanto, se desconoce si se encuentran o no presentes en los alimentos de origen marino sobre todo en aquellos que se llegan a consumir crudos o insuficientemente cocidos, lo cual acontece un problema ya que al no encontrar a *Vibrio cholerae* el resultado se da como negativo y no se le da seguimiento a este tipo de productos, lo que posteriormente pudiera generar un riesgo para la población del estado de Puebla.

¿Se encuentran presentes las especies patógenas *cholerae*, *vulnificus* y *parahaemolyticus* del género *Vibrio* en muestras de camarones y moluscos bivalvos de mercados y supermercados del Estado de Puebla?

5. Justificación

En los últimos años se ha incrementado el interés sobre la investigación de algunas especies del género *Vibrio* en los sistemas marinos y alimentos debido a las enfermedades causadas en la población mundial, por ello es necesario ofrecer a la población alimentos seguros libres de contaminación por este tipo de microorganismos. Una deficiente calidad sanitaria de los alimentos se traduce en daños de variada naturaleza para las poblaciones implicadas. Los daños incluyen presentación de enfermedades, gastos de atención médica, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos, daño al turismo, y causa de muerte.

En el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla se realiza la búsqueda intencionada de microorganismos de interés sanitario entre ellos *Vibrio cholerae* en pescados y mariscos, pero se desconoce si están o no presentes otras especies de importancia de este género como *vulnificus* y *parahaemolyticus*, las cuales, según la bibliografía, causan gastroenteritis y septicemias.

Tomando en consideración que en 2013 se notificaron en el país 180 casos confirmados de cólera por *Vibrio cholerae* O1 Ogawa, uno de ellos mortal; 2 registrados en el Distrito Federal, 159 en el estado de Hidalgo, 9 en el estado de México, 2 en el estado de San Luis Potosí, y 8 en el estado de Veracruz, lo cual demuestra la necesidad de permanecer en constante alerta, dada la cercanía del estado de Puebla con las entidades afectadas por el brote. De igual manera, cabe destacar que existen reportes donde se menciona la presencia de las especies *vulnificus* y *parahaemolyticus*, los cuales se encuentran presente de entre un 23 y un 27% para el primero y hasta un 16% del segundo. Por lo tanto, surge el interés de conocer si se encuentran o no presentes en moluscos bivalvos y camarones ya que pudieran ser considerados como un riesgo latente para la población en general, ya que este tipo de alimentos se llegan a consumir crudos o insuficientemente cocidos en el estado.

Con base a lo anterior el presente trabajo pretende poner de manifiesto la presencia de las tres especies de este género consideradas patógenas y que son transmitidas por alimentos de origen marino especialmente moluscos bivalvos y camarones; y de esta manera brindar la información necesaria a las autoridades sanitarias que permita sentar las bases para considerar su posterior búsqueda de manera rutinaria y de esta manera contribuir al cuidado de la salud de la población en general.

6. Objetivos

a) General

1. Aislar e identificar especies patógenas *cholerae*, *vulnificus* y *parahaemolyticus*, del género *Vibrio* en muestras de camarones y moluscos bivalvos analizados durante el periodo abril a mayo de 2015, en el Departamento de Vigilancia Sanitaria del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla.

b) Particulares

2. Procesar muestras de camarones y moluscos bivalvos (mejillón, almeja, ostras) de acuerdo a la técnica del número más probable.
3. Aislar e Identificar a *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* mediante la técnica del número más probable y cultivo microbiológico.
4. Confirmar resultados mediante el sistema semi- automatizado Vitek II.

7. Diseño del estudio:

a) Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

b) Universo de trabajo

Población fuente

Todas las muestras de alimentos que ingresan en la coordinación de Vigilancia Sanitaria del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, en el periodo abril a mayo de 2015.

Tamaño de la muestra

57 muestras de camarón, 5 de almeja y 3 de mejillón recibidas en la Coordinación de Vigilancia Sanitaria del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla durante el periodo abril a mayo de 2015 y cumplan con los criterios de inclusión.

c) Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Muestras de camarones y moluscos bivalvos (mejillón, almeja, ostras, navaja).
- Cantidad mínima de 160 g.
- Muestras recibidas dentro de las 24 h de su recolección.
- Muestras transportadas a temperatura de refrigeración (2-8°C)
- Muestras acompañadas de un acta de muestreo o solicitud de análisis con datos necesarios.
- Muestra perfectamente identificada mediante una etiqueta completamente requisitada.

Criterios de exclusión

- Cantidad insuficiente
- Muestreo con más de 24 h de haber sido tomada.
- Muestras mezcladas en un mismo recipiente.
- Recipiente no autorizado por la SSA.

Criterios de eliminación

- Todas aquellas muestras de camarones y moluscos bivalvos que ingresen al laboratorio y que no cumplan con los criterios de inclusión

d) Diseño estadístico

Para la presentación de la información se utilizará una estadística descriptiva; mediante el uso de tablas de frecuencia y gráfica de barras.

8. Material y metodología

Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable (NMP).

Aplicación.

Este método es aplicable a cualquier grupo bacteriano de interés sanitario, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (10 por gramo o ml). Ejemplo: Leche, agua, alimentos; que por su consistencia pueden interferir con la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.).

Fundamento.

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución más alta sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas o crecimiento microbiano.

Para obtener el Número Más Probable (NMP) en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio, cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de 3, 5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumentan se reducen los límites de confianza.

9. Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable (NMP). Cuantificación de los *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*, en alimentos de origen marino.

Prueba presuntiva.

1. Preparación de la muestra.

a) Crustáceos.

Para el caso de camarones, utilizar todo el cuerpo hasta completar 50 gramos; si el carideos es muy grande utilizar, porciones de todas las partes del cuerpo.

b) Moluscos bivalvos.

En general se debe tener un mínimo de 10 a 12 piezas de moluscos seleccionar animales completos, desconcharlos y obtener 50 gramos entre licor y carne.

2. Preparación de las diluciones decimales.

a) crustáceos.

Adicionar 450 ml de agua peptonada como diluyente para obtener la dilución 1:10, homogenizar por 1 minuto en licuadora y preparar diluciones decimales adicionando 1 ml de la dilución 1:10 a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada hipersalina para formar la dilución 1:100 y de esta tomar 1 ml y adicionarlo a un tubo que contenga 9 ml de peptona hipersalina para formar la dilución 1:1000.

b) Moluscos bivalvos.

Adicionar 450 ml de agua peptonada como diluyente para obtener la dilución 1:10, homogenizar por 1 minuto en licuadora y preparar diluciones decimales adicionando 1 ml de la dilución 1:10 a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada hipersalina para formar la dilución 1:100 y de esta tomar 1 ml y adicionarlo a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada hipersalina para formar la dilución 1:1000.

3. Enriquecimiento.

Por duplicado, Inocular 1 ml de cada dilución en tres tubos que contengan 10 ml de agua peptonada hipersalina e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C.

Prueba confirmatoria.

4. **Lectura de la prueba presuntiva:** Observar y elegir los tubos de ambas series que presenten turbidez; homogenizar.
5. **Aislamiento:** Tomar de estos una asada y sembrar mediante el método de estría cruzada en placas de TCBS e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C.
6. **Lectura de placas de TCBS.**

Seleccionar de 2-3 colonias amarillas grandes, lisas, (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos; y de 2-3 colonias verde azules redondas, opacas de 2- 3 mm de diámetro. Sembrar en base de agar con 2% de NaCl, e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C.

7. Identificación bioquímica.

Realizar pruebas de género (oxidasa, catalasa, string). En caso de ser positivas, proceder a la siembra de las siguientes pruebas bioquímicas TSI, LIA, MIO, ARGININA, T₁N₀, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀, e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C. Y adicionar NaCl en diferentes concentraciones de acuerdo a la siguiente tabla.

| Caldo triptona | T ₁ N ₀ | T ₁ N ₃ | T ₁ N ₆ | T ₁ N ₈ | T ₁ N ₁₀ |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| [] NaCl | 0% | 3% | 6% | 8% | 10% |

Nota: a menos que se especifique otra cosa todos los medios de esta sección deberán contener de 2 a 3 % de NaCl. ⁽¹⁷⁾

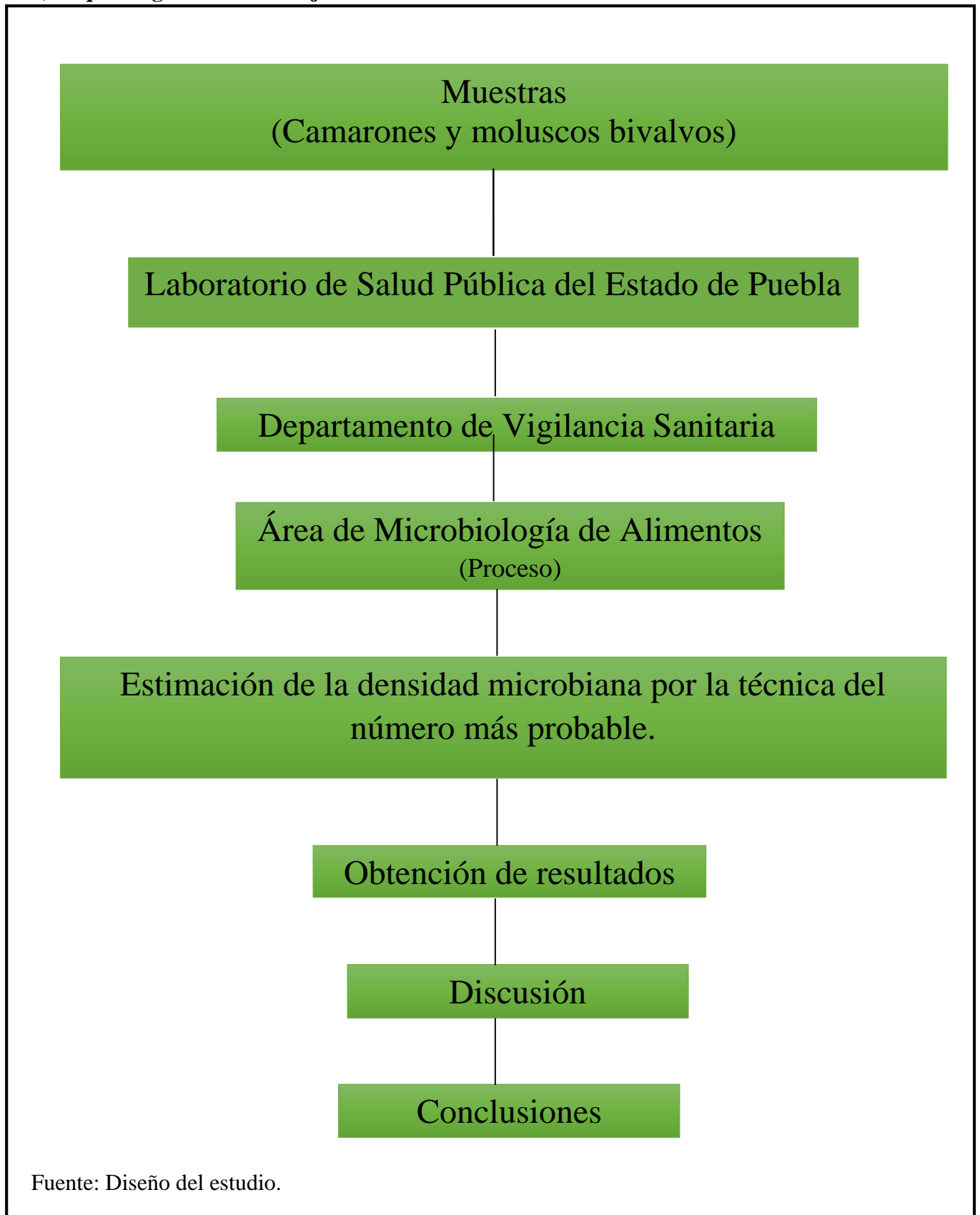
8. Estimación del NMP.

Realizar lectura de las pruebas

Considerar positivos aquellos que hayan sido confirmados mediante pruebas bioquímicas

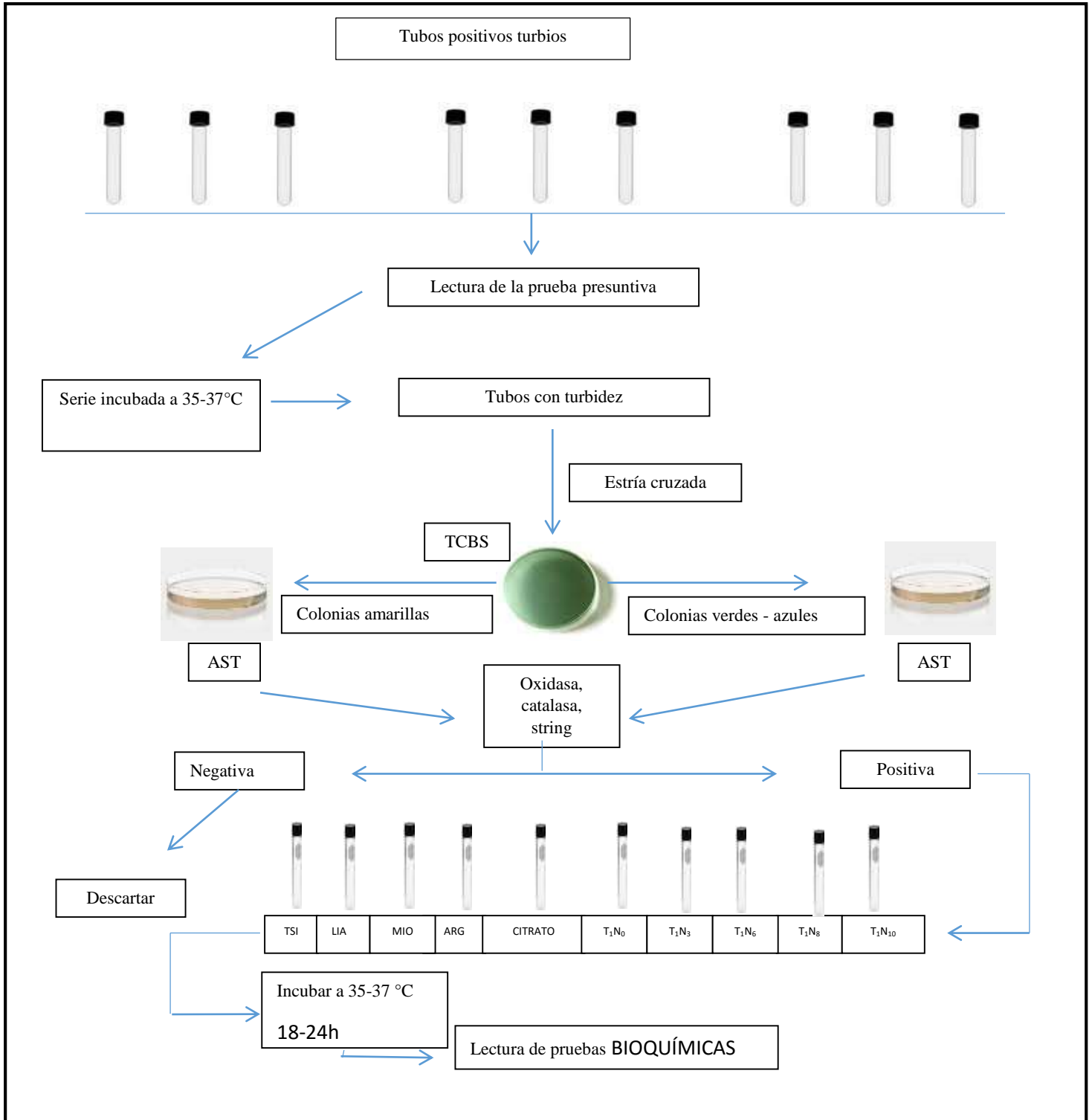
10. Diagramas de trabajo

a) Esquema general de trabajo.



Fuente: Diseño del estudio.

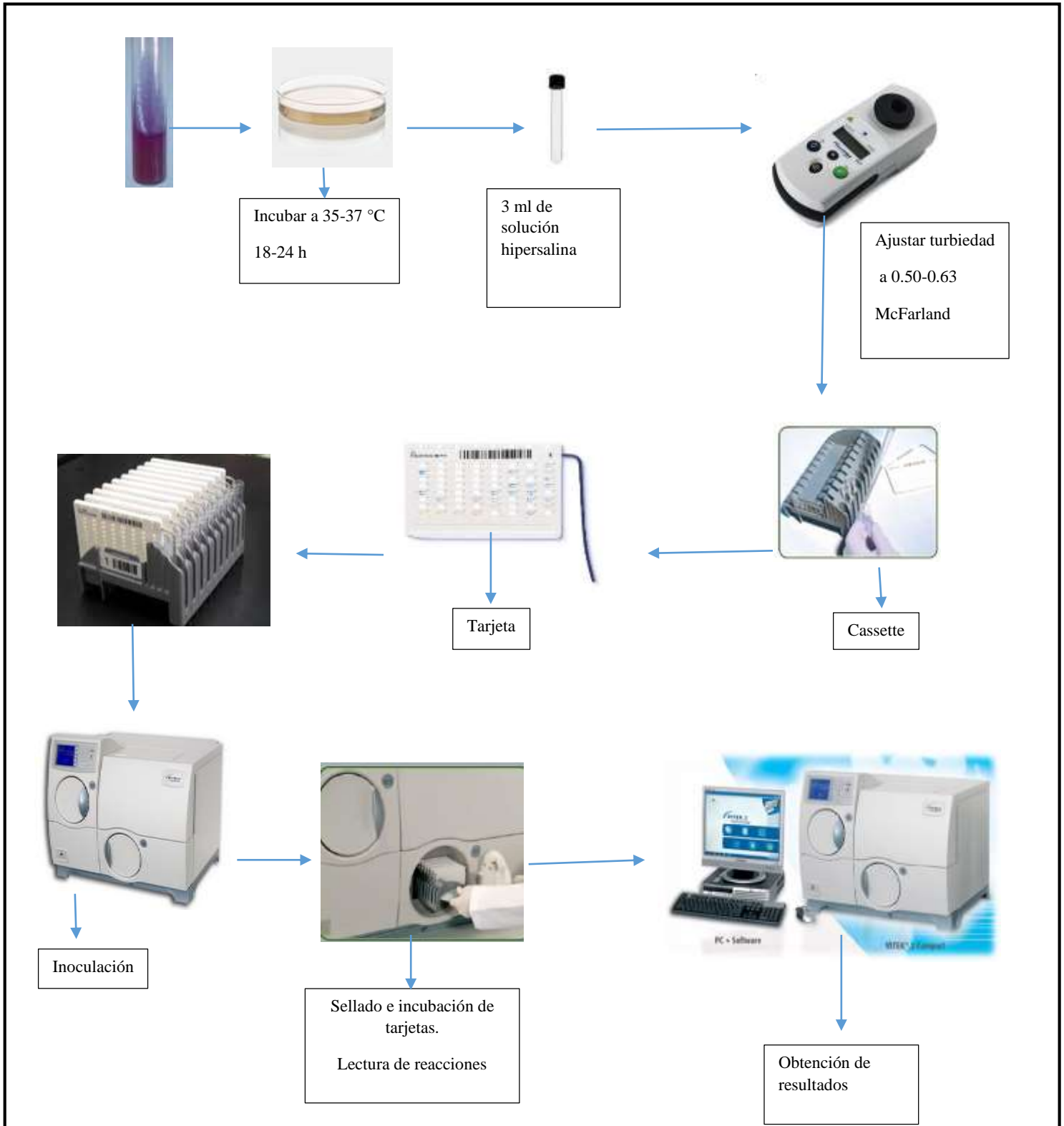
12. Cuantificación de los *Vibrio cholerae*, *vulnificus* y *parahaemolyticus*.



Fuente: NOM-112-SSA1-1994

NOM-242-SSA1-2009

13. Confirmación mediante Vitek II



Fuente: Diseño del estudio

14.Resultados y discusión

Las infecciones causadas por la mayoría de las especies de *Vibrio* están usualmente asociadas a la ingestión de camarones y moluscos contaminados; los síntomas que manifiesta el paciente van desde gastroenteritis, infección en la piel, septicemia, llegando a la mortalidad en el caso de pacientes inmunocomprometidos. Además, pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial.

El estado se integra por 217 municipios agrupados en 10 Jurisdicciones Sanitarias (J.S.), las cuales varían en características geográficas, lo cual determina las características fisiográficas, clima, vegetación, fauna y uso de suelo. En el trabajo realizado se obtuvieron muestras de sólo 6 jurisdicciones, de las 10 que conforman el estado.(Tabla 1)

Tabla 1. Jurisdicciones del estado de Puebla.

| No. de jurisdicción | Nombre de jurisdicción | No. de jurisdicción | Nombre de jurisdicción |
|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| 1 | Huachinango | 6 | Puebla |
| 2 | Chignahuapan | 7 | Izúcar de Matamoros |
| 3 | Zacapoxtla | 8 | Acatlán de Osorio |
| 4 | San Salvador el Seco | 9 | Tepexi de Rodríguez |
| 5 | Huejotzingo | 10 | Tehuacán |

Fuente: Ortega y col en 2009 (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909/090909.pdf>)

Se procesaron 65 muestras en total, procedentes de 6 jurisdicciones y un establecimiento particular, de las cuales, 57 fueron de camarón, 5 de almeja y 3 de mejillón (Gráfico 1). El número de muestras por jurisdicción fue: 6 de la jurisdicción 3 (9%); 12 de la jurisdicción 5 (19%); 31 de la jurisdicción 6 (48%); 3 de la jurisdicción 7 (5%); 1 de la jurisdicción 8 (2%); 3 de la jurisdicción 10 (5%); 8 del particular (12%) (Gráfico 2) y fueron analizadas en el laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla en el periodo de abril – mayo de 2015.

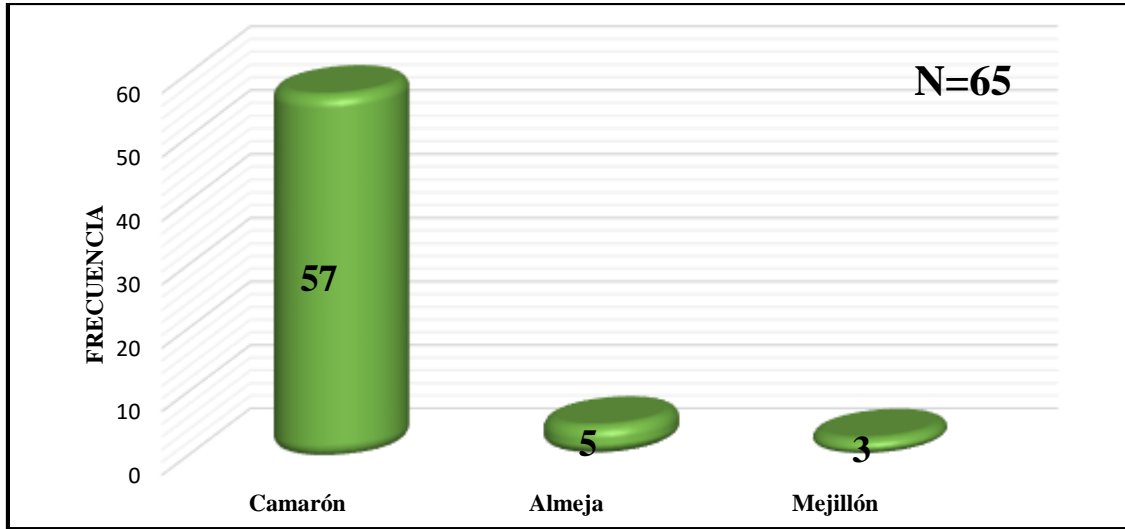


Gráfico 1. Tipo y número de muestras.

Fuente: Resultado del estudio.

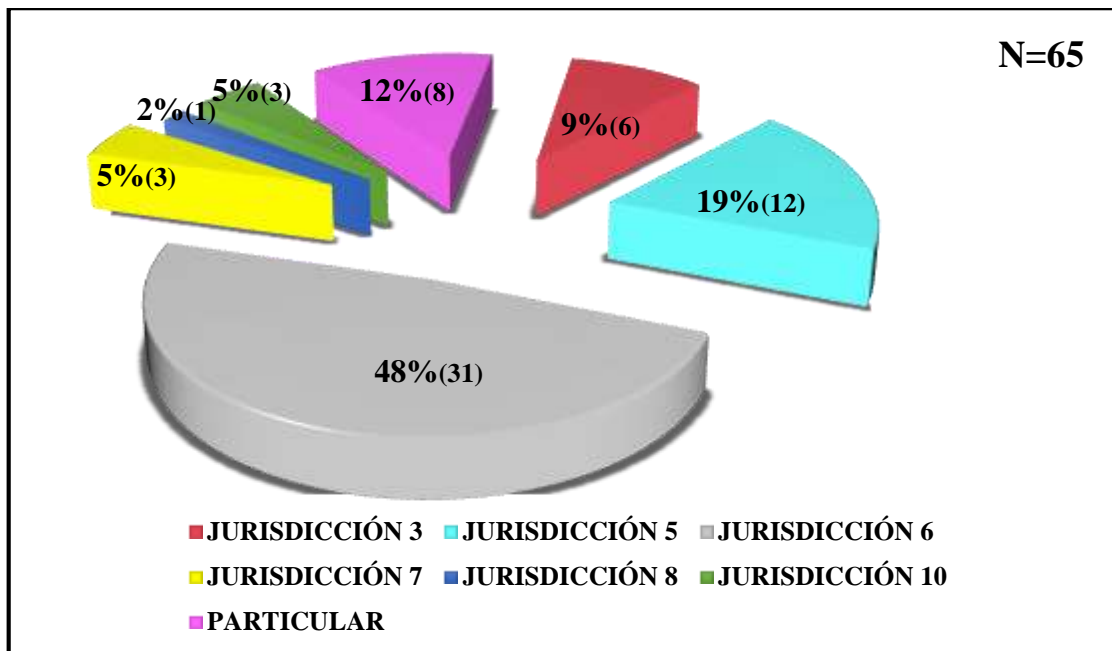


Gráfico 2. Número de muestras obtenidas por jurisdicción y un particular.

Fuente: Resultado del estudio.

Se muestra el número de muestras positivas al género *Vibrio* de un total de 65 que se recibieron en el laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, resultado (9) de muestras positivas contra (56) muestras negativas de un total de (65) muestras grafico 3.

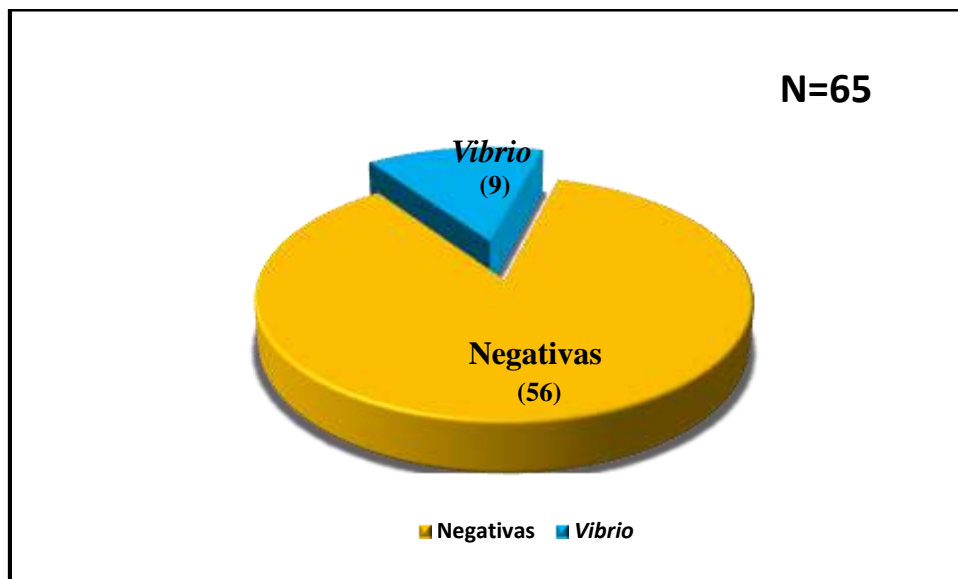


Gráfico 3. Número de muestras positivas al género *Vibrio*

Fuente: Resultados del estudio.

En la tabla 2 se muestra el número de cepas aisladas de acuerdo a las 3 diferentes especies de *Vibrio* aisladas obteniendo *Vibrio parahaemolyticus* (5/65), *Vibrio vulnificus* (3/65) y *Vibrio cholerae* (1/65). Esto es de un número total de 65 muestras de las cuales solo 9 presentaron crecimiento positivo a especies del género *Vibrio* de interés en este estudio.

Tabla 2. Numero de muestras y jurisdicción por especie del género *Vibrio*.

| <i>Vibrio</i> especie | Cepas 9/65 | Tipo de muestra |
|-----------------------------------|-------------------|---|
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 5/9 | Puebla (4) camarón, Huejotzingo (1) almeja |
| <i>V. vulnificus</i> | 3/9 | Puebla (2) camarón Particular (1) camarón |
| <i>V. cholerae</i> | 1/9 | Zacapoaxtla (1) camarón |
| Total | | 9 |

Fuente: Resultado del estudio.

De las 65 muestras analizadas de las 6 jurisdicciones y un particular, sólo se identificó al género *Vibrio* en 3 de éstas (3,5,6) y en las muestras del particular obteniendo un total de 9 cepas, presentando la jurisdicción 6 el porcentaje más alto con un 67 %, seguido de la jurisdicción 3, y 5 y el particular con un 11 %. De el resto de las jurisdicciones no se obtuvieron aislamientos del género (Gráfico 4).

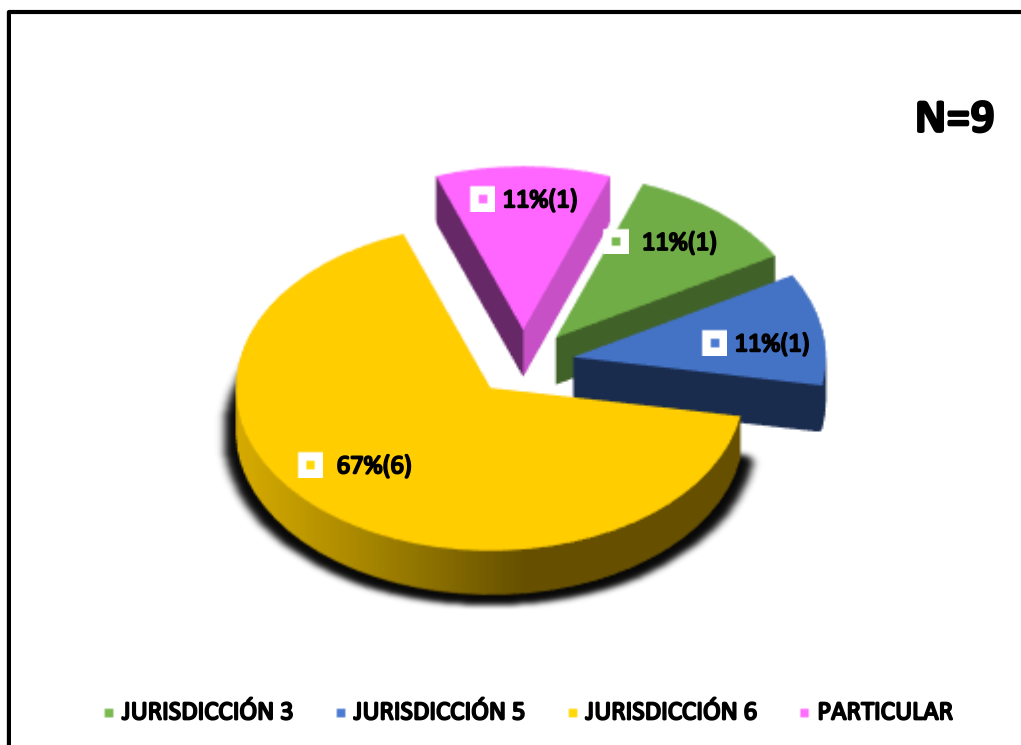


Gráfico 4. Porcentaje total de cepas aisladas del género *Vibrio* de la jurisdicción 3, 5, 6 y particular.

Fuente: Resultado del estudio.

Al presentar la jurisdicción 6 el porcentaje más alto de aislamiento (67 %) se puede deducir que tiene una relación lógica con el número de muestras procedentes de ésta que fueron 31/65 muestras recibidas, esto podría estar relacionado con que la jurisdicción 6 es Puebla capital y, es importante recordar que se encuentra un número considerable de marisquerías y pescaderías que en algunos casos la venta se realiza al aire libre.

De las 9 cepas identificadas como *Vibrio*, 5 fueron positivas a *Vibrio parahaemolyticus*, 3 a *Vibrio vulnificus* y 1 muestra positiva a *Vibrio cholerae* no O1 (Tabla 3).

Las 9 cepas fueron procedentes de muestras de las jurisdicciones 3,5,6 y el particular. Las 3 especies, según la bibliografía, causan algún tipo de daño al ser humano, esto dependerá del estado fisiológico en que este se encuentre y la cantidad de microorganismos que ingiera, *Vibrio cholerae*

fue aislada de camarón, una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* fue aislada de almeja y 4 de camarón, las 3 cepas de *Vibrio vulnificus* fueron aisladas de camarón.

Tabla 3. Especies de *Vibrio* aisladas en 6 jurisdicciones y un particular.

| No de especies aisladas de <i>Vibrio</i> | | | |
|--|-----------------|-------------------------|-------------------|
| Jurisdicción | <i>cholerae</i> | <i>parahaemolyticus</i> | <i>vulnificus</i> |
| 3 | 1 | | |
| 5 | | 1 | |
| 6 | | 4 | 2 |
| 7 | | | |
| 8 | | | |
| 10 | | | |
| Particular | | | 1 |
| Total de colonias | 1 | 5 | 3 |

Fuente: Resultados del estudio.

Las muestras se procesaron mediante la técnica del número más probable (NMP) obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3), se puede considerar que la dosis infectiva para *Vibrio parahaemolyticus* es de 10^5 - 10^7 UFC/g, el periodo de incubación es de 12-24 horas, Se han reportado casos de infecciones extraintestinales en el ojo, oído, tracto urinario y en heridas superficiales, además de procesos de septicemia asociado a enfermedades como alcoholismo, enfermedad renal, vascular, VIH, diabetes. Para *Vibrio vulnificus* se reporta que la dosis infectiva es de menos de 100 organismos, En individuos inmunocomprometidos como diabéticos, cirróticos, con afección crónica en el hígado y alcohólicos, actúa 24 horas después de la ingestión de las bacterias. invade el torrente sanguíneo caracterizado por fiebre, escalofrío, y los niveles de fierro son elevados en suero hasta la disminución de la presión sanguínea llegando al shock séptico.

La dosis infectiva de *Vibrio cholerae* requerida para causar enfermedad clínica varía de 100-10 000 organismos / g. El periodo de incubación de la bacteria es de 24 - 48 horas. Los síntomas se inician con ataque súbito de diarrea acuosa, seguido por vómito, Todas las personas están en riesgo, pero los niños y los ancianos son los que se encuentran en mayor peligro y son más severamente afectados. Además, las personas con grupo sanguíneo “O” son más susceptibles y la causa de esto es desconocida. Con base a los resultados obtenidos nos damos cuenta que la dosis es menor de lo obtenido en este estudio, lo cual demuestra que la población pudiera encontrarse en riesgo de contraer alguna patología relacionada con estos microorganismos.

Tabla 3. Resultados obtenidos por técnica del número más probable.

| Especie | Resultado |
|-------------------------|----------------|
| <i>cholerae</i> | 240 NMP/g |
| <i>parahaemolyticus</i> | > 1, 100 NMP/g |
| <i>Parahaemolyticus</i> | > 1, 100 NMP/g |
| <i>Parahaemolyticus</i> | > 1, 100 NMP/g |
| <i>Parahaemolyticus</i> | 1,100 NMP/g |
| <i>parahaemolyticus</i> | 1,100 NMP/g |
| <i>vulnificus</i> | > 1, 100 NMP/g |
| <i>vulnificus</i> | 1,100 NMP/g |
| <i>vulnificus</i> | 1,100 NMP/g |

Fuente: resultados del estudio.

En el gráfico 5 se muestra el porcentaje de cepas aisladas de acuerdo a las 3 diferentes especies de *Vibrio* aisladas obteniendo *Vibrio parahaemolyticus* 56 %, *Vibrio vulnificus* 33% y *Vibrio cholerae* 11%.

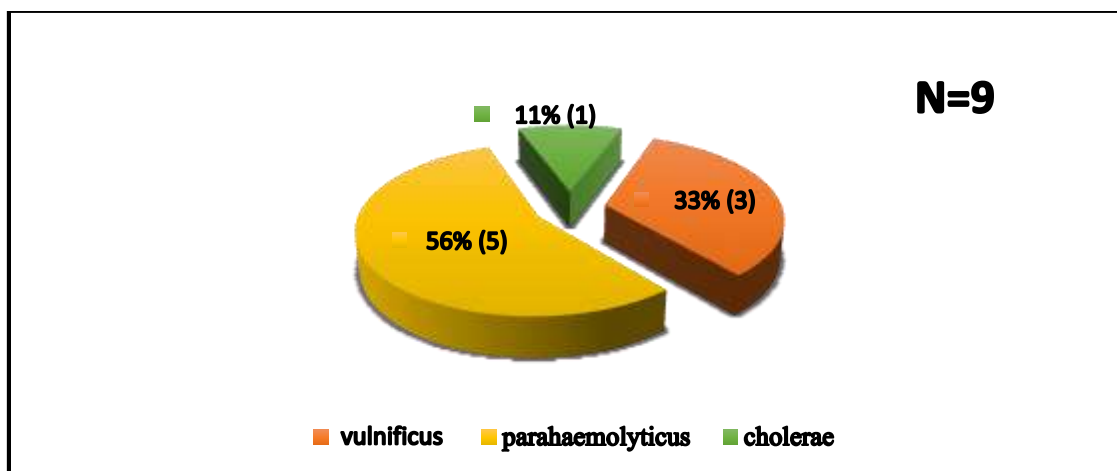


Gráfico 5. Porcentaje por especie del género *Vibrio*.

Fuente: Resultados del estudio.

Para la identificación de dichos microorganismos se requiere la combinación de diferentes ensayos, entre ellos el uso de medios de cultivo selectivo, realización de pruebas bioquímicas y aplicación de sistemas comerciales automatizados. Los métodos bioquímicos automatizados han sido motivo de constante actualización en los últimos años y han demostrado un progresivo aumento en el nivel

de certeza en la identificación, como se ha mostrado en la utilización de este tipo de sistemas en este trabajo. Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio se pone de manifiesto la insalubridad de los alimentos de origen marino, específicamente el camarón, el cual se vende en algunos lugares del estado sin estar en cadena en frío, comercializando este tipo de alimentos en banquetas al aire libre con temperaturas altas, lo cual incrementa la proliferación de los microorganismos. Las personas que se dedican a la manipulación de este tipo de alimentos están en riesgo latente de llegar a contraer algún tipo de patología.

Los moluscos bivalvos son un vehículo bien documentado de transmisión de enfermedades causadas por las especies de *Vibrio*, (Rodríguez y col., 2014) especialmente por *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio cholerae*. Representando un riesgo intrínsecamente mayor que otros alimentos de origen marino debido a su actividad como animales filtrantes que concentra los patógenos presentes en el agua. A menudo se consumen vivos, crudos o después de un cocimiento insuficiente.

La mejor medida para la prevención de la infección es realizar una adecuada higiene personal y ambiental, medidas preventivas que pueden resumirse en 3 puntos fundamentales:

- Suministro adecuado de agua potable.
- Desecho higiénico de las heces humanas.
- Buena higiene en los alimentos.

Las medidas para la higiene efectiva de los alimentos incluyen cocinar bien la comida, refrigerarla; prevenir la contaminación de tipo cruzada.

Con respecto a los sistemas semi automatizados de identificación como el Vitek II se puede decir que tiene una sensibilidad del 71.1 % y especificidad del 100 % según lo reportado por Oderiz y col en el año 2011, por lo tanto, es importante la utilización de este tipo de sistemas para la identificación de microorganismos. Sin embargo, el cultivo microbiológico sigue siendo considerada la prueba de oro para la identificación. La confirmación de los aislamientos de las muestras analizadas se realizó al 100 %, los resultados obtenidos por el sistema Vitek II presentan porcentajes de probabilidad bastante confiables con lo cual se demuestra que dicho método constituye una herramienta con un nivel de confianza confiable en la identificación de microorganismos.

15. Conclusiones

1. Se logró aislar e identificar 5 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, 3 cepas de *Vibrio vulnificus* y 1 cepa de *Vibrio cholerae* mediante la técnica del número más probable y cultivo microbiológico.
2. 56 muestras resultaron negativas a las especies del género *Vibrio* de interés.
3. los aislados obtenidos por la técnica del número más probable y cultivo microbiológico fueron satisfactorios al confirmarlos por Vitek II.

15. Sugerencia

Buscar de manera rutinaria en el laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* que permitirá evaluar la calidad sanitaria de los productos del mar consumidos por la población. En este sentido en este trabajo se combinó la técnica probable para su aislamiento e identificación. Basándose inicialmente en la NOM-242-SSA1-2009 (peso y diluyente) y en la Fuente: NOM-112-SSA1-1994 del NMP.

16. Bibliografía:

1. Baizabal, R. O., Negrete, P. M., Guerrero, D. D., Martínez, H. N., Aburto, D. Y., Mata, M. P. (2011). Choque séptico por *Vibrio vulnificus* en las costas del Golfo de México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* .**49** (4): 433-436
2. Dávalos, M. S., Vázquez S. C., Quiñones R. E. (2005). Patógeno Oportunista *Vibrio vulnificus*. *Rev. Digital Universitaria* .**6** (4) UNAM
3. Directrices sobre la aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos para el control de las especies patógenas de *Vibrio* en alimentos de origen marino. CAC/GL 73-2010. Disponible en ftp://ftp.fao.org/codex./Temp/Simone/CXG_073s.docx
4. Dueñas, T., Greta, A. T. (2008). Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en especies marinas de consumo en Lima Metropolitana y Callao.
5. Dworkin, M., Y Falkow, S. (2006). The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass (Tercera edición ed., Vol. VI). Singapore: Springer
6. Fica, A. (2007). Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus*, Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile
7. Fratamico, P., Bhunia, A., Y Smith, J. (2005). Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Horizon Scientific Press.
8. García, B. I. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*, servicio de microbiología hospital de Getafe. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/vibrio.pdf>
9. García, L. M., Almodóvar, P. A. R., y Torre, C. J. (2010). Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. *Medicine*.**10**(52):3489-3496
10. Gavilán, G. R., Urtaza M. J. (2011). Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Rev. Perú Med. Exp Salud Publica* **28** (1):109-115
11. Monsreal, J. F. (2007). *Vibrio vulnificus* en alimentos marinos de origen animal del puerto de Santa María de Sisal, Yucatán, México.
12. Monsreal, J. F., Zarza, G. A. L., Villa, N. N., Ramón, C. L. G., Galván, V. O., Meza, J. M. L., y Mota, M. L. (2010). Especies Patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, México. *Ciencia*.**15** (40): 31-44

13. Muñoz, D., Graü, C., Marval, H., Martínez, C. (2012). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado Sucre, Venezuela. *Revista científica* **22** (1) :459-467
14. Organización Mundial de la Salud, alerta y respuesta mundiales (GAR). Disponible en <http://www.who.int/csr/es/>
15. Ortega, C. V., Calderón, T. F., Rosas, A. A., Vásquez, R., Santos, E., Balderas, T. J. Estudio retrospectivo de la Rabia en Animales de Importancia Económica en el Estado de Puebla, México, del año 2001 al 2008. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909/090909.pdf>
16. Paris, M. E. (2005) intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuad Méd Soc (Chile)* ; (45): 43 – 47 Revisado el 22 de junio de 2015
17. Rodríguez, C. J. C., Méndez, E., Rivas, M. A. M., Cortés, R. J. A. (2014). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuario en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista Bio Ciencias* **2** (4): 282-292
18. Orderiz, S., Palau, M. J., Palacio, P., Lewis, M.C., Bettioli, M. P., Bosch, A., Yantorno, O. M., Gantti, B.M. (2011). Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación de organismos del complejo *Burkholderia cepacia* aislados de muestras clínicas. *Rev. argent. microbiol.* **43** (3) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
19. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
20. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. especificaciones sanitarias y métodos de prueba.
21. Serrano, M. L. (2014). Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida.
22. *Vibrio vulnificus*- Infección por *Vibrio vulnificus* (cie-10 05.8) encontrado en <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2j.html> revisado el 28 de junio 2015
23. Zamora, P. D., Quiroz, S. C., Quiñones, R. E. (2005). Un enemigo Silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev. Digital Universitaria* **6** (4) UNAM.

Anexo 1

- ✓ Botellas de dilución
- ✓ Termómetro de máximas para autoclave calibrado
- ✓ Tubos de ensaye de tapón de rosca 16x150mm
- ✓ Tubos de ensaye de tapón de rosca 25x200mm
- ✓ Tubos de ensaye de tapón de rosca 13x100mm
- ✓ Espátulas
- ✓ Cuchillos
- ✓ Pinzas
- ✓ Matraces Erlenmeyer o botella de polipropileno de 500 ml y 1000ml
- ✓ Desconchadores
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Frascos de 500 ml
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Probetas de 100, 200 y 1000ml

Equipo:

- ✓ Incubadora con termómetro verificado
- ✓ Balanza granataria
- ✓ Autoclave con termómetro calibrado
- ✓ Horno
- ✓ Potenciómetro

Reactivos y medios de cultivo:

- ✓ Regulador de fosfatos pH 7.4
- ✓ Agua peptonada alcalina (APA) con 3% de NaCl
- ✓ Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS)
- ✓ Caldo triptona y caldo tripona con cloruro de sodio (concentraciones de 3, 6,8 y 10%)
- ✓ Agar soya tripticasa con 2% de NaCl
- ✓ Agar medio MIO