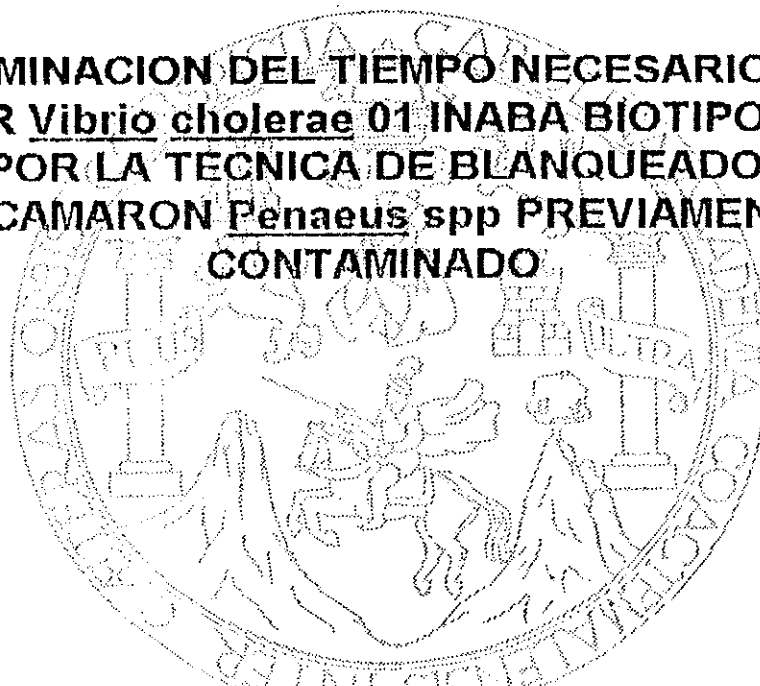


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**DETERMINACION DEL TIEMPO NECESARIO PARA
ELIMINAR Vibrio cholerae 01 INABA BIOTIPO EL TOR
POR LA TECNICA DE BLANQUEADO
DE CAMARON Penaeus spp PREVIAMENTE
CONTAMINADO**



Informe de tesis

Presentado por

NORMA ELIZABETH CASTILLO DIAN

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, febrero 1995.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06
T(1638)

C. 3

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIA	LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

DEDICO ESTA TESIS

- A DIOS fuente inagotable de amor,
 guia y apoyo en mi vida.
- A MIS PADRES Blanca Lidia Dian
 por su amor y sacrificio que dedicó a
 mi superación.
- Victor Manuel Castillo (+)
- A MI ESPOSO Marlon Omar Agreda
 por su amor y comprensión en todo
 momento.
- A MI HIJA Norma Yulissa
 tesoro de mi vida, con todo mi amor.
- A MI HERMANA Silvia Eugenia
 con mucho cariño.
- A Mi abuela Marta Dian
 mi tia Mirna Mazul de Galvez
 Por su cariño y apoyo brindado.
- A TODOS MIS AMIGOS En especial a Patty Flores, Irma Juárez
 y Lissette de Krumbach por su amistad
 sincera, con mucho cariño.
- A USTED QUE ME ACOMPAÑA

A G R A D E C I M I E N T O

- A Licda. Norma Gil de Castillo
- A Centro de estudios del mar y Acuicultura
- CEMA -
- A Dirección General de Servicios de Salud
- DGSS -
- A Personal de los departamentos de:
Bioquímica
Anatomía y Fisiopatología
Microbiología, en especial a los señor Luis
Arévalo y Julio César Maas
- A Toda aquella persona que de una u otra forma
contribuyeron a la realización de esta tesis

I N D I C E

		<i>Fgg.</i>
1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	2
3.	ANTECEDENTES	4
3.1.	EL COLERA	4
3.1.1.	Definición	4
3.1.2.	Agente etiológico: <i>Vibrio cholerae</i>	4
3.1.3.	Epidemiología	7
3.1.4.	Fisiología y manifestaciones clínicas	9
3.1.5.	Tratamiento	10
3.1.6.	Transmisión de la enfermedad	11
3.1.7.	Sobrevivencia de <i>V. cholerae</i> en los alimentos	13
3.1.8.	Aislamiento de <i>V. cholerae</i> de camarón	15
3.1.9.	Identificación de <i>V. cholerae</i> en el laboratorio	17
3.2.	EL CAMARON	19
3.2.1.	Generalidades	19
3.2.2.	Microbiota del camarón	20
3.3.	BLANQUEADO O ESCALDADO	22
4.	JUSTIFICACION	23
5.	OBJETIVOS	25
6.	HIPOTESIS	26
7.	MATERIALES Y METODOS	27
8.	RESULTADOS	34
9.	DISCUSION	36
10.	CONCLUSIONES	38
11.	RECOMENDACIONES	39
12.	REFERENCIAS	40
13.	ANEXOS	46

1. RESUMEN

En la presente investigación se analizó la efectividad de la técnica de blanqueado para eliminar a V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor, que se encontraba como contaminante en dosis infectivas (1×10^8 bacterias/ml) en camarones Penaeus spp.

Los camarones previo a ser contaminados, fueron analizados para verificar que se encontraban libres de V. cholera O1 serotipo Inaba biotipo El tor. Luego de ello se contaminaron con dicha bacteria y se dividieron en dos grupos, el grupo No. 1 no recibió tratamiento y sirvió como control positivo, el grupo No. 2 recibió tratamiento de blanqueado (introducir las muestras en agua hirviendo) a cuatro tiempos diferentes 1, 2, 4 y 5 minutos, formándose así 4 subgrupos. El grupo No. 1 y cada subgrupo poseía un total de nueve muestras, cada una de 25 gramos de camarón.

Los resultados obtenidos mostraron una recuperación abundante en el grupo No. 1 de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor, ésto aseguró que todas las muestras estuvieran contaminadas antes de ser tratadas. Por otro lado, de las muestras tratadas con la técnica de blanqueado en los cuatro tiempos, no se obtuvo aislamiento alguno. Esto indica que la técnica de blanqueado es efectiva para eliminar a V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor de camarones Penaeus spp contaminados en dosis infectivas, con una probabilidad de error menor de 0.001.

La información a la comunidad de estos resultados contribuirán a incrementar el consumo de camarones, ya que esta técnica los deja inocos y con sus características organolépticas.

2. INTRODUCCION

Vibrio cholerae O1 se encuentra en el grupo de las bacterias que habitan tanto en agua salada como en agua dulce.

Esta bacteria presenta características que le permiten llegar al ser humano, en donde produce una toxina polimérica (su principal factor de patogenicidad), responsable de la característica diarrea "de agua de arroz".

Esta enfermedad se transmite por la ingesta de una dosis de 10^8 a 10^{10} de *V. cholerae* O1 vivas por gramo de alimento o agua contaminada con heces o vómitos de personas infectadas.

En alimentos la sobrevivencia de *V. cholerae* O1 depende estrechamente de las condiciones físicas, químicas y microbiológicas que posea. Así altas temperaturas, pH ácido, microorganismos antagónicos y otros factores afectan o inhiben su crecimiento.

Los mariscos han sido incriminados en la actual pandemia, a pesar que la Organización Mundial para la Salud -OMS- no cuenta con evidencia documentada de que hayan ocurrido brotes de cólera como resultado de la importación de alimentos a través de fronteras. Así también que la FDA no ha aislado *V. cholerae* de producto pesquero de países afectados. Sin embargo, análisis de esta naturaleza no se realizan en países como Guatemala, en donde la contaminación del producto para consumo local, está estrechamente relacionada con el mal manejo del producto y en donde además, no existe un buen control de calidad que le asegure al consumidor un producto sin ningún peligro para su salud.

El tratar de introducir control de calidad y normas de higiene en los mercados locales es sumamente difícil y complicado. Es por ello que la presente investigación determinó la efectividad del blanqueado (una nueva técnica o medida de higiene) en eliminar a V. cholerae O1 serotipo Inaba Biotipo El tor en dosis infectivas, de camarones Penaeus spp previamente contaminados.

Los resultados obtenidos muestran que tratando camarones contaminados con dosis infectivas de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor, con la técnica de blanqueado en cualquiera de los tiempos de 1, 2, 4 ó 5 minutos, logra eliminar por completo dicha contaminación.

Además es importante señalar que los camarones tratados por medio de esta técnica no alteran su aspecto apetecible. Esto contribuye a incrementar el consumo de dicho producto y aumentar los ingresos de las personas que lo distribuyen.

3. ANTECEDENTES

3.1. EL COLERA

3.1.1. Definición

El cólera es una infección aguda, cuyo agente causal es la bacteria llamada *Vibrio cholerae*. En Guatemala se ha aislado el Biotipo El Tor, serotipo Inaba toxigénico (1-4).

3.1.2. Agente Etiológico: *V. cholerae*

3.1.2.1. Características generales

La familia vibrionacea, agrupa bacterias acuáticas, tanto de agua salada como de agua dulce. Incluye tres géneros de importancia médica, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (1).

Existen muchas especies del género *Vibrio*, la mayoría de ellas habitan en plantas y animales marinos, y no causan daño al hombre. Casi todas las especies de *Vibrio* son halófilas, con excepción de *V. cholerae* y *V. mimicus*, que son halotolerantes, por lo que son denominados no halófilos (5).

Las especies asociadas a diarrea son *V. cholerae* serotipo O1 y no O1, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. holisae* y *V. furnisii* (6).

3.1.2.2. Morfología

En 1854, Pacini fue el primero en observar a *V. cholerae* que luego Koch llamó kummabacillus, puesto que en cultivo primario se observan con la forma de coma. Estos vibrios son bastones cortos de 0.5 por 1.5 a 3 micrómetros que poseen un flagelo polar

por lo que son móviles (5,7-10).

3.1.2.3. Fisiología

El *V. cholerae* es un microorganismo anaerobio facultativo, no esporoformador, Gram negativo, oxidasa positivo, psicrófilo, aunque presenta un amplio rango de crecimiento, desde 0 °C hasta 42 °C, con una temperatura óptima de 36 °C (8,10-13).

Soporta concentraciones de sal entre 0.25-3% con una óptima de 2% (14).

Su metabolismo es respiratorio y fermentativo, tolera condiciones alcalinas, creciendo a pH de 8.6 hasta 11. Sin embargo, a pH menores o igual a 5.0, como el pH del jugo gástrico, muere en minutos. Muchas especies clínicamente significativas, toleran las sales biliares, telurito, tiosulfato y citrato, por lo que son usados como ingredientes selectivos en medios de cultivo. Así, para el aislamiento primario de muestras clínicas y alimentos, se emplea el agar tiosulfato, citrato, sales biliares y sucrosa (TCBS), como también el agar telurito (TTGA), gelatina y taurocolato (1,5,10-12).

Estas bacterias presentan requerimientos nutricionales simples, para producir un amplio rango de macromoléculas extracelulares degradantes como proteasas, nucleasas, lipasas y quitinasas. Además, algunas son capaces de crecer rápidamente, de 10-15 minutos en condiciones óptimas (15).

3.1.2.4. División serológica

El antígeno somático llamado "O", constituye el antígeno de mayor importancia en el agrupamiento serológico de *V. cholerae*. Todas las especies parecen compartir un mismo antígeno H, por lo que su detección es de poco valor práctico (1).

Un mínimo de 83 O-grupos, son ahora reconocidos y referidos como O serogrupos o serovariedades. Este antígeno es de particular significancia, puesto que todas las cepas aisladas de casos de la epidemia del cólera poseen este antígeno. Por eso es práctica simple y común, dividir todas las cepas en *V. cholerae* serovar O1 y *V. cholerae* no O1. Se tiene que enfatizar que no todas las cepas de *V. cholerae* O1 son capaces de causar enfermedad, ya que pueden ser subdivididas en serotipos Ogawa, Inaba e Hikojima (anexo 1). Las cepas de Ogawa e Inaba aglutinan con su antígeno específico. Cepas de Hikojima que son muy raras, aglutinan con ambos antisueros Ogawa e Inaba (1,5,13,16-19).

3.1.2.5. Biotipos

Existen dos biotipos de *V. cholerae* O1, el Clásico y El Tor, diferenciados entre sí por las pruebas de Voges-Proskauer, hemólisis de eritrocitos de carnero y zona de inhibición con disco de polimixina-B 50 UI (anexo 2) (1,5,16-18).

3.1.2.6. Determinantes de patogenicidad

La toxina colérica responsable de la característica diarrea líquida, es el principal determinante de patogenicidad de *V. cholerae*. Es una proteína polimérica, que puede ser

inactivada por calentamiento a 56 °C por 30 minutos. Está compuesta por una subunidad A y una B, con un peso molecular total de unos 84,000 daltons. Su composición es de 98% proteína, 1% lípidos y 1% carbohidratos (1,19-22).

La subunidad A es responsable de la actividad de la toxina, mientras que la subunidad B se une específicamente sobre la superficie celular del intestino delgado (1,19,23).

El efecto final de esta enzima es un aumento en la secreción de electrolitos hacia la luz del intestino delgado. Se cree que ésta, es causada por un incremento de la secreción de cloro dependiente de sodio y la falta de absorción de éstos a través del ribete de cepillo (microvellosidades) por el mecanismo de transporte sodio-cloro. El resultado es la secreción de un líquido isotónico con una concentración plasmática normal y una concentración de potasio cuatro a ocho veces mayor que la concentración plasmática, conteniendo además pequeñas proteínas y bicarbonato; en resumen la característica diarrea líquida del cólera asiático. Además de la producción de enterotoxina el V. cholerae patógeno debe ser capaz de adherirse a la superficie intestinal. Estudios sobre adherencia demuestran que los V. cholerae patógenos penetran el moco intestinal y se adhieren a las microvellosidades en el ribete en cepillo de las células epiteliales (1,5,7,11,20,21,23,24).

3.1.3. Epidemiología

Estudios realizados en casos de la actual pandemia han demostrado que el agente etiológico es V. cholerae O1 serotipo

Inaba, Biotipo El Tor.

Las infecciones del cólera producen un 75% de casos asintomáticos y sólo del 15% al 23% presentan síntomas moderados. En situaciones epidémicas, solamente el 2% de las infecciones ponen en peligro la vida del paciente. Esta infección afecta más a adultos y niños mayores de 12 años (25,26).

El reservorio para esta enfermedad es el hombre, convirtiéndose así en portador. Existen dos tipos de portador: el convaleciente y el crónico. El portador convaleciente o que se está recuperando de la enfermedad elimina entre 10^7 - 10^8 bacterias/mililitro de heces durante varios meses hasta años. El portador crónico parece transportar el microorganismo en la vesícula biliar y sólo lo elimina en forma intermitente entre 10^1 - 10^3 bacterias/gramo de heces (1,3,23,27,28).

La transmisión del cólera, ocurre por la ingesta de agua o alimentos contaminados con heces o vómitos de portadores. Presenta un período de incubación de pocos días a 5 días, usualmente de 1 a 3 días (3,6,11,23,24).

Se ha demostrado que se requieren dosis altas para infectar a voluntarios humanos (entre 10^8 - 10^{10} bacterias vivas por gramo), para causar infección, puesto que el pH ácido del estómago podría neutralizar a la mayoría de microorganismos antes de llegar al intestino delgado; sin embargo, en casos de aclorhidria o alcalinización gástrica se producen infecciones con 10^5 microorganismos (6,13,22,25,27).

3.1.4. Fisiología y manifestaciones clínicas

Después de superar la barrera gástrica el *V. cholerae* coloniza el intestino delgado, partiendo del duodeno y progresando hacia el ileon; el microorganismo no penetra el epitelio del tracto intestinal, su efecto es causado por su potente enterotoxina que se une a la membrana de las células epiteliales del intestino delgado (6,27).

Debido a la acción que ejerce la enterotoxina, esta enfermedad se caracteriza por un principio brusco, diarrea acuosa y profusa, blanquecina como agua de arroz, vómitos y la fiebre que es muy frecuente en los niños, es rara en los adultos. La máxima pérdida de heces usualmente ocurre en las primeras 24 horas, con aspecto de agua de arroz y excede de 1 lt/hora en adultos y 8-10 ml/Kg/hora en niños pequeños. Después de 24 horas la tasa de eliminación declina (2-4,23,25,29,30).

La persona infectada presenta deshidratación rápida, puede perder 1 a 2 litros de agua por hora en las deposiciones. El primer síntoma es la sed, que comienza cuando la pérdida de agua es igual a 20-30 ml/kg. Una pérdida de 50-80 ml/kg causa debilidad, letargo y signos de hipotensión postural, como desmayo o síncope sin que se puedan sostener en pie. Si el déficit aumenta por encima de 80 ml/kg, la sed es más intensa, disminuye el flujo renal, resultando oliguria seguida de anuria, si excede de 100-120 ml/kg usualmente es mortal (31).

La respiración del paciente aumenta, la voz se hace débil y algunos pacientes desarrollan afonía, el turgor de la piel disminuye, las uñas presentan cianosis, la piel de los dedos se

arruga dando el aspecto de "manos de lavandera", los ojos se hundén y en los niños menores la fontanela anterior se deprime (31).

El efecto final es depleción de líquidos extracelulares, con consiguiente choque hipovolémico, acidosis por déficit de bases y depleción progresiva de potasio; finalmente colapso circulatorio, pudiendo sobrevenir la muerte en horas si no son tratados con sales de rehidratación, sueros caseros o intravenosos y antibióticos (2,3,5,6,22,24,31).

3.1.5. Tratamiento

Al igual que en cualquier otro cuadro diarreico, la base del tratamiento es la reposición rápida de líquidos en relación a las pérdidas (23,24,29,31).

El uso de antibióticos ha demostrado cierta utilidad durante el curso de la enfermedad, ya que disminuye el cuadro diarreico en un 50%. Entre los antibióticos usados en el tratamiento del cólera se tienen los siguientes: de elección Tetraciclina y Doxiciclina y como alternativa Furozolidona y Trimetoprim o Trimetoprim-Sulfametoxazol. (16,23,24,29).

Las vacunas no proporcionan una protección significativa contra la enfermedad especialmente si se ingiere gran cantidad de microorganismos (1,6).

La defensa primaria en el control del cólera es el mantenimiento de un adecuado tratamiento de las "aguas negras" (agua utilizada por la población) y sistemas de purificación de agua, junto a la rápida detección y tratamiento de portadores (1).

3.1.6. Transmisión de la enfermedad

América latina, en donde se incluye Guatemala, alberga grandes núcleos de población que vive en condiciones marginales por factores técnicos y económicos (26,32-34).

El rápido y descontrolado incremento de la población, el deterioro del saneamiento ambiental, la pobreza e ignorancia de la población, se agregan a los factores que propician la propagación del cólera en los países en desarrollo. (34).

La mayoría de las ciudades y muchos de los pueblos de América Latina tienen sistemas de alcantarillado para la recolección de las "aguas negras". Sin embargo pocas tienen tratamiento, lo que no garantiza la extracción y destrucción de V. cholerae (23).

En Guatemala, como resultado de un análisis de agua, tanto de pozos rurales como municipales, se evidenció que todos estaban contaminados con E. coli (72.60%), E. aglomerans (19.18%), E. aerógenes (8.22%). La fuente de contaminación la constituyeron excreciones humanas o de animales, debido a una evacuación desordenada e insalubre de las mismas. También, a la existencia de letrinas defectuosas y mal ubicadas, así como a las aguas servidas que se encuentran a flor de tierra. Esta contaminación es peligrosa para la salud del hombre, ya que podría ser una fuente para aumentar las infecciones gastrointestinales y otras enfermedades diarreicas que constituyen la causa más común de mortalidad infantil (35).

Así como éste, muchos estudios más destacan el deterioro de la situación del abastecimiento de agua potable en las zonas afectadas por el cólera, por lo que han llegado a la conclusión

que la vía principal de transmisión del cólera es el agua sin tratamiento, el hielo, los utensilios para comer, alimentos contaminados después de ser cocidos o pasteurizados y alimentos lavados con aguas que contienen aguas residuales antes de ser comercializados y comidos (9,13,16,24,25,36).

Los crustáceos pueden bioacumular ciertos contaminantes químicos en el hepatopáncreas y acumular bacterias potencialmente patógenas en la superficie de las conchas, las branquias y en el estómago. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) no tiene pruebas en la presente epidemia de un brote de cólera que se haya dado como resultado del consumo de productos pesqueros importados. Hasta la fecha, en más de 700 muestras de producto procedente de los países afectados, no ha sido posible aislar *V. cholerae* 01 El Tor. Al igual que en Perú, de 2,393 muestras de producto pesquero analizado, no ha habido una sola positiva (13,26,37,38).

En Perú no se ha detectado *V. cholerae* en el mar territorial ni en las aguas interiores y hay escasa posibilidad de contaminación de esas aguas, por lo que la principal actividad está enfocada a vigilar la manipulación de los productos en las plantas. Esto ha llevado a tratar el agua en las plantas industriales mediante la floculación, sedimentación y filtración que contribuyen a eliminar el microorganismo del cólera (9,26).

La organización encargada del control de la administración de drogas y alimentos (FDA), reduce o elimina el muestreo de vigilancia si se demuestra control de calidad durante el procesamiento, como por ejemplo control microbiológico del agua

empleada, cloración aplicada y buena manipulación de los productos al ser despachados. En Guatemala los camarones recién cosechados y destinados a exportación, según estudios realizados (39), cumplen con las normas de calidad requeridas por organismos internacionales. Sin embargo, los camarones que se adquieren en los mercados populares de la ciudad capital, se les determinó contaminación fecal, ya que los servicios oficiales de inspección son prácticamente inexistentes. Esto demuestra que el manipuleo del camarón es la fuente de contaminación bacteriana, así como el transporte y expendio del mismo (25,26,39).

La deficiente higiene personal de los vendedores, el escaso o inexistente adiestramiento en higiene de los alimentos, el uso de utensilios inapropiados, la falta de agua potable y servicios sanitarios y la acumulación de basura, demuestra que estas prácticas, además de causar brotes de enfermedades pueden ser fuente de contaminación ambiental y proliferación de roedores y moscas (13,23,26,40).

La mosca como está bien demostrado, puede ser transmisor de enfermedades feco-orales, ya que se han encontrado microorganismos fecales tanto en la superficie externa como en el tracto intestinal de este animal. Así la posibilidad de graves brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos debido a la contaminación microbiológica se ve aumentada (3,4,10,13,16).

3.1.7. Sobrevivencia de *V. cholerae* en los alimentos

Un factor importantísimo a considerar es el referido a la estructura biológica del alimento, para predecir la supervivencia

o multiplicación del microorganismo: generalmente cuando aquella se mantiene intacta en el alimento, se le hace muy difícil a V. cholerae sobrevivir o multiplicarse, mientras que por ejemplo, en vegetales o frutas dañadas el pH se incrementa, permitiendo la actividad fisiológica del Vibrio que puede de esta manera contaminarlos (26).

El tratamiento por calor es lo más efectivo para reducir o eliminar la contaminación por Vibrio a pesar de ello, debe tenerse en cuenta que la resistencia del microorganismo es muy variable dependiendo del medio en que esté suspendido. Rice efectuó ensayos que lo llevaron a concluir que el microorganismo podría destruirse luego de un calentamiento durante 30 segundos, a 99.5°C, por lo cual se recomienda en la práctica, hervir el agua durante un minuto a nivel del mar y durante tres minutos en lugares de gran altura. Otros autores como Makukutu y Guthrie hallaron que el microorganismo El Tor-Inaba es capaz de sobrevivir durante una hora en alimentos mantenidos a 60°C, concluyendo que son más termorresistentes de lo que usualmente se cree (26).

La alta salinidad del mar en aguas profundas no permite la sobrevivencia del microorganismo, sin embargo, en aguas litorales cuya salinidad es mucho menor éste podría permanecer viable hasta 10 días a temperatura ambiente y hasta 60 días en refrigeración. Por otra parte el microorganismo sobrevive mejor en esta agua de mar que en pescado y mariscos (13,25,37).

El pescado, moluscos y crustáceos, han sido con frecuencia incriminados en los brotes de cólera, ya que la supervivencia de V. cholerae es de 2 a 5 días a temperatura ambiente y de 7 a 14

días en refrigeración (13,37).

Estudios realizados han demostrado que la inmersión de alimentos y hortalizas contaminadas durante 30 segundos en agua hirviendo mató invariablemente todas las especies de Vibrio (13,25,41,42).

Los efectos de las temperaturas bajas en la supervivencia del V. cholerae podrían ser variables. Como las especies del género Vibrio son psicofílicas, tienen la capacidad para crecer a 0°C, aunque las condiciones no sean óptimas (13,28).

Se ha encontrado V. cholerae patógeno en el cacao, cubos de hielo, bebidas dulces sin efervescencia y té por largo tiempo después de la contaminación; productos curados desecados, condimentos, carne y pescados se vuelven estériles después de algunos días (13,14).

El cocer camarones ofrece que éstos estén exentos de microorganismos vivos, la recontaminación comienza durante el enfriamiento y aumenta durante la manipulación posterior. Los camarones deberán ser bien lavados antes de su cocción. La cocción es una operación crítica que influye en la textura, color y sabor; pueden ser cocidos en vapor o en agua, con o sin adición de sal. Para especies como Pandulus, el tiempo total de cocción no deberá pasar de 3 a 4 minutos a la temperatura de 99°C a 100°C si se quiere evitar cambios en la textura y pérdidas de peso (13,25,42,43).

3.1.8. Aislamiento de V. cholerae de alimentos

La muestra debe de ser representativa, recolectada y

manipulada asépticamente (44).

La muestra se debe mantener refrigerada (4°C) hasta que se hagan los cultivos de ella. Generalmente se usa el caldo APA (agua peptonada alcalina) como un enriquecedor para V. cholerae en alimentos, ya que es el diluyente que ofrece mayor protección a las bacterias, además proporciona un enriquecimiento apropiado para periodos de incubación relativamente cortos de 6-8 horas. Este periodo de incubación no debe de exceder de las 8 horas, ya que de lo contrario la microbiota competidora puede crecer más que V. cholerae (13,45).

Después de la incubación y sin agitar, se transfiere un inóculo a uno de los medios de cultivo selectivos: agar TCBS (agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa) o agar mCPC (agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina) (13,45).

Luego de la incubación se examinan las placas para determinar la presencia de V. cholerae según características coloniales. En agar TCBS las colonias de V. cholerae (El Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sucrosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos. Mientras que en agar mCPC las colonias de V. cholerae El Tor son púrpura (negativas para la fermentación de la celobiosa). La mayoría de las demás especies de Vibrio no crecen fácilmente en este agar (13).

3.1.9. Identificación de V. cholerae en el laboratorio

Se debe de tener en cuenta la capacidad de cada laboratorio al seleccionar los métodos de identificación a usar.

Entre las pruebas que ayudan a la identificación de V. cholerae se tienen las siguientes:

3.1.9.1. Serotipificación de V. cholerae

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos de identificar V. cholerae del serogrupo O1 (anexo 1). Si bien la identificación del serogrupo, serotipo y biotipo de las muestras aisladas no se necesita para el tratamiento del cólera, sí es de suma importancia epidemiológica, en bien de la salud pública, (45).

3.1.9.2. Identificación bioquímica de V. cholerae

3.1.9.2.1. Pruebas de selección

3.1.9.2.1.1. Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa se realiza a partir de un crecimiento fresco de un medio que no contenga azúcar. No debe utilizarse el crecimiento del agar de TCBS.

Los microorganismos de los géneros Pseudomonas, Neisseria, Campylobacter, Aeromonas, Vibrio, Plesiomonas, y Alcaligenes son positivos a la oxidasa; todas las enterobacteriáceas son negativas a la oxidasa (45).

3.1.9.2.1.2. Prueba del cordón

La prueba del "cordón" se realiza a partir de un cultivo de 18 a 24 horas del microorganismo sospechoso en un medio no inhibitorio. La prueba es positiva cuando las células bacterianas son lisadas por el deoxicolato de sodio y la

suspensión pierde turbidez, debido a la liberación del ADN de las células lisadas, haciendo que la mezcla se vuelva mucóide. La mayoría de Vibrios son positivos, mientras que las especies de Aeromonas generalmente son negativas (45).

3.1.9.2.1.3. Agar hierro de Kligler (KIA) o agar tres azúcares y hierro (TSI)

El KIA o el TSI son medios de selección que contienen carbohidratos y que se utilizan ampliamente en la microbiología de diagnóstico. Aunque son de uso similar, los dos medios varían en los carbohidratos que contienen. Las reacciones de V. cholerae en KIA son similares a las de los enteropatógenos no fermentadores de lactosa (K/A, sin gas, sin H₂S). El TSI contiene sucrosa, que es fermentada por V. cholerae dando reacciones de A/A, sin gas y sin H₂S (45).

3.1.9.2.2. Pruebas bioquímicas para detectar V. cholerae

El laboratorio de referencia de Vibrio del CDC emplea la serie corta de pruebas bioquímicas (anexo 2) para la confirmación de muestras aisladas de V. cholerae. Si los resultados de las pruebas con una muestra aislada son iguales a los obtenidos por el CDC, la identidad de la muestra aislada se confirma como V. cholerae. Sin embargo, si la muestra aislada no da los mismos resultados, se necesitarán más pruebas para la identificación (45).

3.1.9.3. Pruebas para determinar biotipos de *V. cholerae* O1

Las pruebas que se muestran en el anexo 3, son empleadas por lo general, para determinar el biotipo. Se deben usar por lo menos dos o más de estas pruebas para determinar el biotipo, ya que los resultados pueden variar de una muestra aislada a otra (45).

3.1.9.4. Prueba de sensibilidad a antimicrobianos (método de difusión de disco de agar)

Dado que la resistencia a los antimicrobianos ha sido un problema creciente en algunas partes del mundo, la sensibilidad de algunas cepas de *V. cholerae* O1 a los antimicrobianos debe vigilarse periódicamente.

La organización Mundial de la Salud ha recomendado una serie de antimicrobianos que deben de probarse, así como su respectiva interpretación, ésta se muestra en el anexo 4 (45).

3.2. EL CAMARON

3.2.1. Generalidades

Los camarones pertenecen al reino animal y se clasifican de la siguiente manera: subfilum mandibulata, clase crustácea, subclase malacostraca, superorden hoplocárida, orden estomatopoda (46,47).

Aunque se conocen cerca de 2,500 especies, solamente menos de 300 son un valioso alimento humano y de interés económico, sin embargo, 100 constituyen la pesca de camarón mundial anual (40,48-50).

La mayoría de especies marinas ocupan aguas poco o moderadamente profunda, se han encontrado algunas a profundidades cerca de 5.700 metros, sin embargo casi todo el camarón comercial es capturado en los esteros continentales a profundidades menores de 100 metros (40).

El cuerpo de los camarones es alargado y aplanado en sentido dorsoventral. Viven entre las algas, pastos marinos, debajo de las rocas y conchas, en agujeros, grietas de corales y rocas. Muchos toleran ambientes con 35.75 - 36.50% de salinidad, temperatura de 16-31°C y fondos de fango y arena (49,51-54).

Todos los camarones adultos son rapaces y se alimentan de pequeños peces, crustáceos y de otros invertebrados. La digestión es rápida, cumpliéndose antes de las 6 horas de ingerido el alimento. La arena está siempre presente y parece ser que es dirigida conjuntamente con el alimento (48,49,55).

Las camaroneras más grandes del mundo son las explotadas por los pescadores cubanos, mexicanos y norteamericanos en el Golfo de México. Las especies más frecuentemente capturadas en las playas de Guatemala son: el camarón café (*Penaeus aztecus*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*), camarón blanco (*Penaeus vannamei*) y el camarón rosado (*Penaeus occidentalis*) (39,48).

3.2.2. Microbiota del camarón

Los camarones contienen los microorganismos del medio en que viven, además de los contaminantes que se les agrega al capturarlos y manipularlos (39,56,57).

La mayor parte de la carga bacteriana normal se cree que se

encuentra en la cabeza o cefalotórax. La parte exterior de los camarones, contienen poblaciones de bacterias psicotróficas Gram negativo, en una proporción aproximadamente de 10^2 a 10^5 bacterias por centímetro cuadrado. En el canal alimentario, este número puede llegar a 10 bacterias por gramo de contenido intestinal. Los tejidos internos y el sistema sanguíneo son estériles (40,43,56,58,59).

Las especies bacterianas Gram negativo predominantes pertenecen a los géneros Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Flavobacterium y Vibrio. Entre las bacterias Gram positivo está el género Micrococcus y Corynebacterium (48,56,58-60).

Las bacterias enteropatógenas como E. coli, Shigella sp., Salmonella sp. no deberían estar presentes en las carnes de mariscos por no ser parte de la microbiota del medio ambiente acuático o marino. Su presencia se debe al mal manejo del producto durante su procesamiento o por contaminación de las aguas costeras de donde son extraídos. Sin embargo se ha demostrado que las especies de Salmonella no tienen capacidad de vivir mucho tiempo en el agua de mar y a los pocos días de haberla contaminado, ésta se autopurifica en base principalmente a la dilución que sufre, a las corrientes marinas, la sedimentación, oxidación y actividades ejercidas por la temperatura y la luz, así como por la acción de otros microorganismos (40,61,62).

Algunas bacterias adaptadas al ambiente marino potencialmente patógenas son: Clostridium botulinum, Vibrio parahaemolyticus y Vibrio cholerae (21,58).

Muchos de los microorganismos encontrados en los camarones, tales como *E. coli* y *Enterococcus faecales*, que no forma parte de la microbiota de mariscos, son clasificados como contaminantes bacterianos y utilizados como indicadores de falta de higiene de los alimentos, con la posible presencia de algún patógeno (51,56).

Los mariscos de buena calidad deben contener menos de 10^5 bacterias por centímetro cuadrado o por gramo de tejido a la temperatura de 20 °C, menos de 10 por gramo de coliformes fecales y menos de 100 por gramo de estafilococos, así como de *V. parahemolyticus*. No deben contener patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella*, *V. cholerae* u otro (60).

3.3. BLANQUEADO O ESCALDADO

El escaldado es un tipo de pasteurización que se emplea generalmente en frutas y hortalizas, sin embargo se recomienda utilizarla como un método en el control de calidad de camarones. Esta práctica es común en los casos en que los productos van a ser congelados, ya que inactiva enzimas naturales que la congelación no detendría completamente (43,61).

El escaldado no es un calentamiento sencillo, si es demasiado débil es inefectivo y si es demasiado fuerte puede dañar las hortalizas debido a un cocimiento excesivo (61).

Según el grado en que el escaldado sea aplicado destruye bacterias, mohos y levaduras. El escaldado usualmente entre 86°C y 98 °C aplicado por algunos minutos, reduce cargas microbianas desde 1,000 a 10,000 veces la inicial (61).

4. JUSTIFICACION

El consumo de camarones en todo el mundo y en América Latina está ampliamente difundido, sin embargo con la presente pandemia del cólera éste se ha visto disminuido, ya que los alimentos, incluyendo en éstos al camarón, han sido incriminados en la transmisión de dicha enfermedad.

Los camarones difícilmente pueden ser contaminados en su hábitat por V. cholerae O1, ya que las aguas marinas están en constante autopurificación.

En Perú no se ha detectado V. cholerae O1 en el mar territorial, así como en muestras de producto pesquero analizado. Esto podría indicar que la contaminación del camarón o producto pesquero no está en su hábitat, sino después de ser cosechado.

En Guatemala, según estudios realizados, los camarones de exportación cumplen perfectamente con las normas de control de calidad; sin embargo aquellos destinados para el consumo local no cumplen ni con las normas de higiene mínimas, mucho menos con un control de calidad bien estipulado por las autoridades de salud.

Este punto se considera que es el más importante en la transmisión del cólera, ya que esta enfermedad origina un 75% aproximadamente de portadores sanos. Una de éstas personas puede ser la que, con poca higiene, despache en un mercado local.

Si los camarones son contaminados por una gran cantidad de microorganismos, incluyendo a V. cholerae O1, debido a la manipulación de los vendedores, la contaminación se encontraría sobre todo en la superficie del animal y podría ser eliminada por

un tratamiento de blanqueado en un tiempo determinado, como indica el código internacional recomendado de prácticas para los camarones, aunque no específica para *V. cholerae* O1 en particular.

Es por ello que en esta investigación se determinó si se elimina o no a *V. cholerae* O1 serotipo Inaba biotipo El tor como contaminante en dosis infectivas en camarones *Penaeus* spp, al ser tratados con blanqueado a diferentes tiempos.

Estos resultados dados a conocer a la población, pueden contribuir a incrementar el consumo de camarones, así como los ingresos de los pequeños vendedores y distribuidores de dicho producto, que por temor al cólera han disminuido.

5. O B J E T I V O S

- 5.1. *Determinar si el tratamiento de blanqueado es efectivo para eliminar Vibrio cholerae O1 Inaba El Tor, de camarones contaminados con dosis infectiva.*

- 5.2. *Determinar el tiempo necesario del blanqueado para eliminar V. cholerae O1 Inaba El Tor, de camarones contaminados en dosis infectivas.*

6. HIPOTESIS

El procedimiento de blanqueado por 4 minutos de camarón *Penaeus spp.* contaminado con Vibrio cholerae O1 Inaba Biotipo El Tor en dosis infectivas, elimina completamente dicha contaminación y por lo tanto permite su utilización en la elaboración de alimentos de consumo humano.

1 caja de portaobjetos de 75 X 25 mm
6 pipetas serológicas de 10 ml
40 pipetas serológicas de 1 ml
1 probeta de 500 ml
200 cajas de petri descartables 15 X 100mm
6 frascos mason de 300 ml
2 beakers de 1000 ml

7.2.3.2. Equipo

1 piseta de 250 ml
6 cuchillas para licuadora marca Oster
2 asas de nicromo en punta
2 asas de nicromo en argolla de 3-5mm de diámetro
1 espectrofotómetro, Spectronic-20
1 mechero Bunsen
6 coladores de alambre
6 beacker pyrex de 1000 ml
1 balanza semianalítica
1 motor de licuadora marca Oster
1 estufa eléctrica
1 incubadora marca Environ-room
1 cronómetro

7.2.3.3. Medios de cultivo

Agar Müller Hinton
Peptona
Agar base para enriquecimiento para V. cholerae
Agar TCBS
Agar TSI

7.2.3.4. *Reactivos*

Cloruro de sodio

Hidróxido de sodio

Desoxicolato de sodio

Oxidasa

Antisuero polivalente de V. cholerae

7.2.3.5. *Otros*

Jabón desinfectante para manos

Desinfectante ambiental

1 galón de cloro

2 baños plásticos grandes

10 bolsas canguro medianas

1 rollo de papel encerado

1 rollo de papel mayordomo

1 rollo de maskingtape 1/2 pulgada

10 pares de guantes quirúrgicos

7.3. *PROCEDIMIENTO*

7.3.1. *Suspensión 1×10^8 de V. cholerae O1 Inaba El Tor/ml.*

Se preparó en solución salina una suspensión de varias colonias de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor. Esta suspensión se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm, utilizando solución salina como blanco. Al alcanzar la suspensión en el espectrofotómetro una transmitancia de 80% se obtuvo la concentración de 1×10^8 bacterias/ml (Cano F, comunicación personal).

7.3.2. Contaminación del camarón.

Previo a la contaminación de las muestras éstas fueron analizadas para verificar que se encontraban libres de V. cholera O1 serotipo Inaba biotipo El tor. Luego a un beacker que contenía 500 ml de solución salina con 1×10^8 bacterias/ml de V. cholerae O1 Inaba El Tor se adicionó 200 g de camarón con caparazón de quitina o "cáscara" y se dejó ahí por un lapso de 15 minutos (Cano F, comunicación personal).

7.3.3. Tratamiento del camarón.

Al camarón luego de ser contaminado se le quitó la "cáscara", pues así es como se trata domésticamente, esto se hizo utilizando guantes plásticos para evitar infectarse.

Se pesaron cuatro grupos de 35 g de camarón cada uno y se depositaron en diferentes coladores de metal, para su posterior tratamiento de blanqueado a diferentes tiempos, siendo éstos 1, 2, 4 y 5 minutos, respectivamente. Otros 35 g de camarón contaminado fueron pesados y no recibieron el tratamiento de blanqueado, únicamente sirvieron de control para verificar que si hubo contaminación (Cano F, comunicación personal).

7.3.4. Enriquecimiento y aislamiento de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor.

Luego de ser tratada cada muestra se depositó exactamente 25 g en diferentes fracos masson conteniendo 225 ml de agua peptonada alcalina cada uno y se licuó por un tiempo de 2 minutos a velocidad máxima. De esta dilución (1:10) se realizaron en

tubos de ensayo con tapón de rosca y agua peptonada diluciones de 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 y 1:1,000,000. Todas estas diluciones se dejaron incubando a 37°C por 6 horas (13,45).

Luego de las 6 horas, se tomó de la superficie de cada tubo y sin agitar, una asada (aproximadamente de 3-5 mm de diámetro) de cada dilución para ser sembradas en diferentes cajas que contenían medio de TCBS para aislar colonias, se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Posteriormente se analizaron las cajas y en las que hubo crecimiento positivo se marcaron las colonias sospechosas y se transfirieron a cajas de petri con medio Müller-Hinton para su posterior identificación (13,45).

Cuando no se obtuvo crecimiento en las cajas que contenían las muestras tratadas, se realizó la técnica del doble enriquecimiento. Esta consistió en reincubar por 24 horas la dilución original de 1:10, realizar diluciones, resembrar y continuar como se indicó anteriormente (13,45).

7.3.5. Identificación de *V. cholerae* O1 Inaba El Tor

A partir del medio de cultivo Müller-Hinton se realizaron las siguientes pruebas.

7.3.5.1. Prueba del cordón

Se suspendió una asada del cultivo en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5% en un portaobjetos. En las reacciones positivas la suspensión inmediatamente se puso turbia y al levantar el asa lentamente se formó un hilo mucoso (45).

7.3.5.2. Prueba de oxidasa

Se puso de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa sobre un pedazo de papel filtro en una caja de petri. Se extendió sobre el papel húmedo, con un asa de platino o un aplicador de madera limpio, una pequeña porción del crecimiento bacteriano. En las reacciones positivas apareció un color púrpura oscuro en 10 segundos. (45).

7.3.5.3. Serotipificación de *V. cholerae* O1 Inaba El Tor

Se colocó en una caja de petri una gota de antisuero O1 y se depositó un poco de crecimiento bacteriano, hasta hacer una suspensión homogénea. Al cabo de pocos segundos, en las reacciones positivas se pudo observar aglutinación (45).

7.4. DISEÑO ESTADÍSTICO

Para verificar si la técnica de blanqueado a diferentes tiempos (1, 2, 4 y 5 minutos), tuvo efecto sobre camarones *Penaeus spp* contaminados previamente con *V. cholerae* biotipo El Tor, serovar O1, serotipo Inaba; se utilizó el diseño de bloques completos al azar, en donde los tratamientos fueron los diferentes tiempos de la técnica de blanqueado y los bloques fueron el número de veces que se contaminaron las muestras a tratar. En cada bloque se utilizaron 125 gramos de camarón *Penaeus spp* distribuidos en 25 gramos para cada tratamiento y 25 gramos para confirmar que las muestras contaminadas *in vitro* realmente estaban contaminadas (control positivo).

A los bloques completos al azar se les hizo un análisis

estadístico utilizando la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia de 0.01 (62).

8. RESULTADOS

En la presente investigación camarones *Penaeus spp* contaminados *in vitro* con *V. cholerae* O1 serotipo Inaba biotipo El Tor fueron tratados con la técnica de blanqueado.

Las muestras luego de ser contaminadas *in vitro* eran sometidas al tratamiento de blanqueado, el cual consistía en colocar en agua hirviendo las muestras durante un tiempo determinado (1, 2, 4, 5 minutos).

Se analizaron un total de 45 muestras cada una de 25 gramos, éstas fueron divididas en dos grupos. El grupo No. 1 contenía nueve muestras contaminadas con *V. cholerae* O1 serotipo Inaba biotipo El tor, este grupo sirvió como control positivo ya que únicamente fue contaminado y no recibió tratamiento de blanqueado. El grupo No. 2 fue contaminado y dividido en cuatro grupos para ser tratados cada uno por diferentes tiempos de blanqueado (1, 2, 4, 5 minutos).

Como resultado se obtuvo que del grupo No. 1 fue posible recuperar en todas las muestras, a *V. cholerae* O1 serotipo Inaba biotipo El tor. Sin embargo en el grupo No. 2 en donde todas las muestras estaban contaminadas y que posteriormente recibieron tratamiento de blanqueado en cuatro diferentes tiempos (1, 2, 4, 5 minutos), no fue posible recuperar a dicha bacteria (Tabla No. 8.1).

Por otra parte cabe mencionar que los camarones tratado por la técnica de blanqueado en los cuatro tiempos anteriormente mencionados conservan sus características organolépticas.

TABLA No. 8.1

Resultados de la eliminación de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El Tor, de camarones Penaeus spp por la técnica de blanqueado

No. de ensayo	Grupo		Grupo No. 2			
	No. 1	Tratamiento de blanqueado				
	Control	1 min.	2 min.	4 min.	5 min.	
1	+	-	-	-	-	
2	+	-	-	-	-	
3	+	-	-	-	-	
4	+	-	-	-	-	
5	+	-	-	-	-	
6	+	-	-	-	-	
7	+	-	-	-	-	
8	+	-	-	-	-	
9	+	-	-	-	-	

+: crecimiento e identificación positivo para V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El Tor.

-: No hubo crecimiento de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El Tor en el agar de aislamiento (TCBS).

9. D I S C U S I O N

En el presente trabajo se empleó un diseño de bloques completos al azar. Los tratamientos correspondieron a cuatro tiempos diferentes de blanqueado (1, 2, 4 y 5 minutos) y los bloques consistieron en el número de contaminaciones que se realizaron (62).

Así mismo como las muestras de camarón fueron contaminadas in vitro, fue necesario confirmar su contaminación en cada ensayo, por lo que luego de contaminar las muestras se tomó una y se analizó sin tratamiento, estas muestras constituyeron controles positivos. La recuperación de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor de los controles positivos fue abundante en las primeras diluciones y aislable en las últimas, ésto indica que los controles y las muestras posteriormente tratadas con la técnica de blanqueado realmente estaban contaminadas con dicha bacteria. Esta recuperación de bacterias fue indentificada mediante su morfología colonial en el medio de TCBS, su reacción positiva a la oxidasa, cordón y suero polivalente para V. cholerae O1 (1, 45, 58).

Por otro lado en las muestras tratadas con la técnica de blanqueado en los cuatro diferentes tiempos no se obtuvo crecimiento alguno. Las cajas de TCBS para la recuperación inicial de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El Tor permanecieron sin ningún crecimiento luego de 24 horas de incubación, así como también luego de un doble enriquecimiento que se realizó (13,45).

Estos resultados concuerdan con la literatura, ya que ésta indica que V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor es un microorganismo psicrófilo, y que por lo tanto no soporta temperaturas más altas de 42 °C (1, 19, 22). Además otros estudios realizados han demostrado que la inmersión de alimentos y hortalizas contaminadas en agua hirviendo mata invariablemente todas las especies de Vibrio, sin embargo, no especifica qué alimentos y la concentración de la contaminación que poseían, así como se indica en la presente investigación (13).

Los camarones al recibir el tratamiento de blanqueado no cambian sus características organolépticas, tal y como lo indica el código internacional recomendado de prácticas para los camarones. Aunque aquí, recomiendan cocción de 3 a 4 minutos a 100 °C para la especie de camarones Pandulus, resulta aplicable a la especie Penaeus spp utilizados en esta investigación (43).

Estos resultados fueron estadísticamente analizados por una prueba binomial, la cual mostró que el tratamiento de blanqueado aplicado en cualquiera de los cuatro tiempos (1,2,4 y 5 minutos) es efectivo para eliminar V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El Tor de camarones Penaeus spp previamente contaminados en dosis infectivas, con una probabilidad (p) menor de 0.001 (62).

10. CONCLUSIONES

- 10.1. El tratamiento de blanqueado aplicado en cualquiera de los tiempos 1, 2, 4 ó 5 minutos es efectivo, para eliminar a *V. cholerae* O1 serotipo Inaba biotipo El Tor de camarones *Penaeus* spp previamente contaminados.

- 10.2. El tratamiento de blanqueado en cualquiera de los cuatro tiempos aplicados (1, 2, 4, 5 minutos) no altera las características organolépticas del camarón *Penaeus* spp.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Educar a la población sobre la eliminación de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor, mediante la técnica de blanqueado en un tiempo mínimo de 1 minuto.
- 11.2. Evitar tratar los camarones con agua hirviendo en un tiempo menor de 1 minuto, ya que ello podría llevar a lamentables consecuencias.
- 11.3. Realizar otras investigaciones que determinen el tiempo mínimo de eliminación de V. cholerae O1 serotipo Inaba biotipo El tor mediante la técnica de blanqueado.

12. REFERENCIAS

- 12.1. Joklik J. *Microbiología de Zinsser*. 18 ed. Meeroff, trad. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 1987. 810p.
- 12.2. Cerezo S G, Gutierrez L, Hinojosa A. *Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de Vibrio cholerae O1*. México: Interamericana 1988. 305p.
- 12.3. *Boletín Epidemiológico Nacional. El cólera*. Guatemala: Ministerio de Salud y Asistencia Social, Dirección General de Servicios de Salud, División de vigilancia y control de enfermedades, Doc. Tec., 1991, vol No.5, 37p.
- 12.4. Ministerio de salud pública y asistencia social. *Juntos contra el cólera, Manual de información y medidas prácticas*. Guatemala: UNICEF, Doc. Tec., julio 1992. 20p.
- 12.5. Baumann P, Furniss A L, Lee J V. *The genus Vibrio*. In: Holt Bergey's Manual of sistematic bacteriology. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 1984:518-538.
- 12.6. Nicoletti G, Nicolosi V W. *Diccionario de bacteriología humana*. Barcelona: Ediciones Doyma 1989. 295p.
- 12.7. Koneman E W. *Diagnostic microbiologi*. 3a. Ed. Philadelphia: JE. Lippincott 1988. 840p.
- 12.8. Skinner F A, Shewan J M. *Aquatic microbiologi. The society for applied Bacteriology Simposium Series No. 6: Academic Press 1977. 369p.*
- 12.9. Organización panamericana de la salud. *Boletín epidemiológico. Salud ambiental, prevención y control del cólera*. OPS: Doc. TEc., 1991. Vol. 12, No.1. 24p.
- 12.10. De Leon Herrera L F. *Hallasgos bacteriológicos en dos poblaciones de moscas*. Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, (Tesis de graduación, Facultad de Medicina) 1987. 38p.
- 12.11. Spira W M, Ahmed Q S. *Gauza filtration and enrichment procedures for recovery of Vibrio cholerae in chesapeake bay*. Appl. Env. Microbiol. 1979;145:1018-1024.
- 12.12. Speak M L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. United States of America: American Public Healt Association, Inc, 1986. 701p.

- 12.13. Organización panamericana de la salud. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington: Organización mundial de la salud. Doc. Tec., 1991. 67p.
- 12.14. West P A. The ecology and survival of *V. cholerae*. *PHLS Microbiol Dig* 1992;337:883-84.
- 12.15. Ceczuga D. Gierasimow M. Aminoacid content in the protein of fish and salt wates crustaceans. *Bull. Acas. Polo. Sci. Biol.* 1976;24(11):663-666.
- 12.16. Organización Panamericana de la Salud. Pautas para el control del cólera. OPS OMS Programa regional de control de enfermedades diarreicas. Vol. No. 4, Doc. Tec., 1991. 32p.
- 12.17. Barua D. Supervivencia del vibrión colérico en los alimentos el agua y los fomites. En principios y práctica de la lucha contra el cólera. Organización Mundial de la Salud. Doc. Tec., Ginebra 1991. 28p.
- 12.18. Torres M F, et al. Etiología y diagnóstico de cólera. Guatemala: Edición. Doc. Tec., 1990. 21p.
- 12.19. Kaper J, et al. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in chesapeake bay. *Appl. Env. Microbiol.* 1979;37:91-103.
- 12.20. A Publicattion of the international commisions on Microbiological Specifications for foods (ICMSF) of the international asociation of Microbiological societies. *Microorganisms in foods, thin significance and methods of enumeration.* University of Toronto Press. 2da. ed. 1985. 115p.
- 12.21. Cruz J R. Aspectos microbiológicos de las enfermedades diarreicas. *Rev. Col. Méd. (Guatemala)*, 1986; 37(1-7):14-22
- 12.22. Burke V, Gracey M. Bacterial diarrheas. In: Gracey M, editor *Diarrhea.* Florida: CRC Press Inc, 1991;29-66.
- 12.23. Ministerio de salud pública y asistencia social, Dirección general de servicios de salud, Manual de normas y procedimientos para la vigilancia y control del cólera. Versión actualizada, Guatemala: INCAP, OPS/OMS, Doc. Tec., julio 1992. 49p.
- 12.24. Barrios L, Caet A, 'F de' Matta. El cólera en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, Centro de investigaciones de las ciencias de la salud -CIC5-1991. 28p.

- 12.25. Organización Panamericana de la Salud. Boletín Internacional sobre el control de enfermedades diarreicas. Diálogo sobre la Diarrea. Cólera afecta a las Américas. No.35. Doc. Tec., 1991, 35p.
- 12.26. FAO/OPS/OMS. Informe final. El cólera en las Américas. epidemiología del cólera en Latinoamérica. Consulta Técnica FAO/OPS/OMS en inocuidad y comercialización de alimentos frente a la epidemia del cólera en las Américas. Buenos Aires: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Doc. Tec., 1992. 36p.
- 12.27. Organización Panamericana de la Salud. Boletín epidemiológico. La situación del cólera en las Américas. Doc. Tec., 1991;24:1-3.
- 12.28. Kelley T S, Parker C D. Identification and preliminary characterization of Vibrio cholerae outer membrana proteins. J. Bact. 1981;145:1018-1024.
- 12.29. Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico. Diagnóstico y tratamiento de casos de cólera. Doc. Tec., 1991, Vol.12, No.1. 24p.
- 12.30. Organización Panamericana de la Salud. Boletín internacional sobre el control de enfermedades diarreicas. Diálogo sobre la diarrea. Actualidades sobre el cólera. Doc. Tec., 1990. No.32. 8p.
- 12.31. Organización Panamericana de la Salud. Boletín epidemiológico. Diagnóstico y tratamiento de casos de cólera. Doc. Tec., 1991, Vol. 12, No.1. 24p.
- 12.32. Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico. Vigilancia de la situación de salud según condiciones de vida. Doc. Tec., 1991, Vol. 12, No. 3. 16p.
- 12.33. Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico. Medidas de salud ambiental en la prevención y control del cólera. Doc. Tec., 1991, Vol 12, No.3, 16p.
- 12.34. Boletín Epidemiológico Nacional. Lineamientos para la vigilancia y control del cólera. Doc.Tec.,1991. Vol.4.32p.
- 12.35. Reyes Prera de Portillo I A. Calidad bacteriológica del agua que abastece a la población del municipio de Champerico. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 59p.

- 12.36. Organizació Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico. Condiciones de la salud ambiental y la vulnerabilidad al cólera en América Latina y el Caribe. Doc. Tec., 1991, Vol. 12, No.3. 16P.
- 12.37. Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico. Riesgo de transmisión del cólera por alimentos. Doc. Tec., 1991, Vol. 12, No. 1, 16p.
- 12.38. Boletín internacional sobre el control de enfermedades diarreicas, Diálogo sobre la diarrea. El riesgo de transmisión del cólera por alimentos importados es escaso. Doc. Tec., 1991, No. 35. 43p.
- 12.39. Massanet de Ramirez I, Estudio comparativo entre camarones de exportación y camarones de consumo local. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 72p.
- 12.40. Ubico S R, Control microbiológico de algunos mariscos destinados al consumo humano en la ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1980. 83p.
- 12.41. Green J H, Kaylor J D. Variations in the microbiology reduction curves of irradiated cod fillets, shrimps, and their respective homogenates. App. Env. Microb., 1977;33(2):323-327.
- 12.42. Lee J S, Pfeiter D K. Microbiological characteristics of pacific shrimps. (*Pandalus jordani*). App. Env. Microbiol., 1977;33(4):853-859.
- 12.43. Organización de las Naciones para la agricultura y la alimentación -OMS-. Código internacional recomendado de prácticas para los camarones. Codex Alimentarius. 2a. ed Roma: OMS 1984. 48p.
- 12.44. Facultad de ciencias Químicas y Farmacia. Manual de prácticas de laboratorio. Control de calidad microbiológica de alimentos y medicamentos. Universidad de San Carlos de Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Doc. Tec., 1991. 95p.
- 12.45. Organización Panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud CDC/NCID y el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Manual para el curso internacional de capacitación en "Aislamiento e identificación de *V. cholerae*". Doc. Tec., Octubre de 1982. 63p.

- 12.46. Barnes R D. *Zoología de los invertebrados*. 3a. Ed. México DF: Interamericana 1977. 493p.
- 12.47. Cockrum L D, McCanley W. *Zoología*. México: Interamericana 1965. 713p.
- 12.48. Bardach J E, Ryther J H, McLaren W O. *Acuicultura, crianza y cultivos de organismos marinos y de agua dulce*. México: AGT. 1986. 643p.
- 12.49. Barnes R D. *Zoología de los invertebrados*. 3a. Ed. México: Interamericana 1977. 826p.
- 12.50. Gatt. *Los principales mercados de langostinos y camarones en Europa occidental*. Ginebra: Gatt 1967. 159p.
- 12.51. Bertullo V. *Tecnología de los productos y subproductos de pescado, moluscos y crustáceos*. Buenos Aires: Hemisferio Sur 1975. 539p.
- 12.52. Mock C R. *Sistemas de cultivo del camarón, en simposio sobre acuicultura en América latina, Montivideo, Uruguay, 26 Nov. a 2 Dic. de 1974*. Roma: FAO. 1977. V.I. FAO Informe de Pesca No. 159.
- 12.53. Barnes R D. *Zoología de los invertebrados*. 3a. Ed. México: Interamericana 1985. 1157p.
- 12.54. Lockwood A P. *Aspectos of the physiology of crustacea*. Great Britain: Aberdeen University 1967. 328p.
- 12.55. Akman MS, Ceylan S, Sanly Y. *Degree of contamination with organochlorine insecticides in different species of fish and in shrimps from the tenkish mediterranean coast*. Ank. Univ. Vet. Fak. Derg. 1978;25(1):723-731.
- 12.56. Organización de Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. *Manual para el control de calidad de los alimentos, análisis microbiológico*. FAO Roma. Doc. Tec., 1981. 65p.
- 12.57. Thampson R H. *Halogenatid metabolites from marine animals and plants*. J. Ind. Chem. Soc. 1978;55(1):1209-1215.
- 12.58. Edward P R, Erwing W H. *Identification of enterobacteriaceae*. 3a Ed. Georgia: Burgess Publishing Company 1972. 362p.
- 12.59. Grantham G J. *La utilización del Krill, programa de reconocimiento pesquero en los mares australes*. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma: Doc. Tec., 1979. 63p.

- 12.60. Organización de Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. *Higiene de los pescados y mariscos. informe de un comite de expertos de OMS convocado en cooperación con la FAO.* Roma. Doc. Tec. 1975. 58p.
- 12.61. Potter N. *La ciencia de los alimentos.* México: Edutex, S.A. 1973. 749p.
- 12.62. Siegel S, Castellan N. *Nonparametric statistics for the behavioral sciencies.* Second ed. E.E.U.U.: McGraw-hill Boock Company, 1988. 401p.

13. A N E X O S

A N E X O 1

TABLA No. 1
DIFERENCIACION DE V. cholerae O1 EN SEROTIPOS

Serotipo	Tipos de antígenos somáticos	Aglutinación anti-suero absorbido	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A,B	Positivo	Negativo
Inaba	A,C	Negativo	Positivo
Hikojima	A,B,C	Positivo	Positivo

(45) Organización Panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud CDC/NCID y el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Manual para el curso internacional de capacitación en "aislamiento e identificación d. V. cholerae". Doc. Tec., Octubre de 1992. 63p.

A N E X O 2

TABLA No. 3
 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE CEPAS TÍPICAS DE *V. cholerae*

P R U E B A	R E A C C I O N E S
Oxidasa	100 % positivo
Prueba del cordón	100 % positivo
Agar hierro de Kligler	K/A, sin gas, sin H ₂ S
Agar hierro de azúcar triple	A/A, sin gas, sin H ₂ S
Glucosa (producción de ácido)	100 % positivo
Glucosa (producción de gas)	0 % positivo
Sucrosa (producción de ácido)	100 % positivo
Lisina	99 % positivo
Arginina	0 % positivo
Ornitina	99 % positivo
0% NaCl	100 % positivo
1% NaCl	100 % positivo
Voges-Proskauer (modificada y con 1% NaCl)	75 % positivo

(45) Organización Panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud CDC/NCID y el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Manual para el curso internacional de capacitación en "aislamiento e identificación d. *V. cholerae*". Doc. Tec., Octubre de 1992. 63p.

A N E X O 3

TABLA No. 4
DIFERENCIACION DE LOS BIOTIPOS CLASICO Y EL TOR
DEL SEROGRUPO O1 DE *V. cholerae*

P R O P I E D A D	B I O T I P O	
	CLASICO	EL TOR
Voges-Proskauer (modificado, con 1% NaCl)	-	+
Zona en torno a polimixina B (50 U)	+	-
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Lisis por bacteriófago:		
a. Clásico IV	+	-
b. El Tor 5	-	+

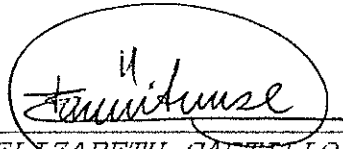
(45) Organización Panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud CDC/NCID y el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Manual para el curso internacional de capacitación en "aislamiento e identificación d. *V. cholerae*". Doc. Tec., Octubre de 1992. 63p.

A N E X O 4

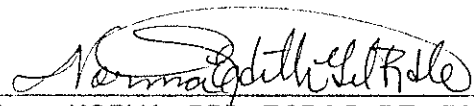
TABLA No. 5
NORMAS PARA LA INTERPRETACION
DE LAS ZONAS DE INHIBICION

AGENTE ANTIMICROBIANO	POTENCIA DEL DISCO (ug)	DIAMETRO DE LA ZONA (mm)		
		RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
<i>Cloranfenicol</i>	30	<12	13-17	>18
<i>Doxiciclina</i>	30	<12	13-15	>16
<i>Eritromicina</i>	15	<13	14-22	>23
<i>Furasolidona</i>	100	<13	14-17	>1
<i>Trimetoprim/ sulfametoxazol</i>	1.25/ 23.75	<10	11-15	>16
<i>Tetraciclina</i>	30	<14	15-18	>19

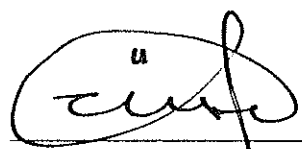
(45) Organización Panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud CDC/NCID y el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Manual para el curso internacional de capacitación en "aislamiento e identificación d. *V. cholerae*". Doc. Tec., Octubre de 1992. 63p.



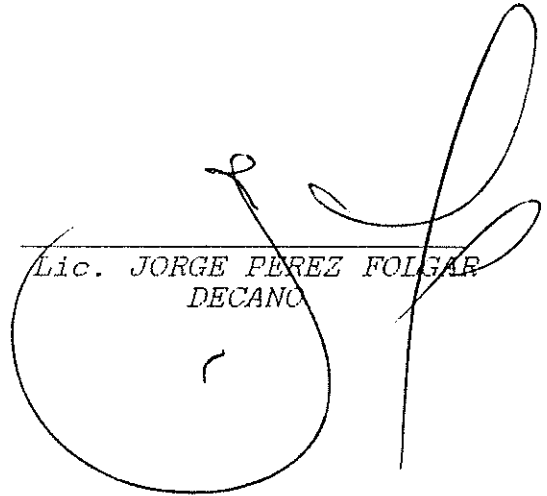
NORMA ELIZABETH CASTILLO DIAN
TESISTA



Lic. NORMA GIL RODAS DE CASTILLO
ASESORA



Lic. GERARDO ARROYO
DIRECTOR



Lic. JORGE PEREZ FOLGAR
DECANO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central