

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA
ESCUELA DE BIOLOGIA



TRABAJO DE GRADUACION:

“DETECCION E IDENTIFICACION DE ESPECIES PATOGENAS DEL GENERO *Vibrio*
EN EL ESTERO DE JALTEPEQUE, UTILIZANDO COMO BIOACUMULADOR A
Anadara spp.”

PRESENTADO POR:
DOLORES DEL CARMEN CLAROS MARQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2007.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA
ESCUELA DE BIOLOGIA



TRABAJO DE GRADUACION:

“DETECCION E IDENTIFICACION DE ESPECIES PATOGENAS DEL GENERO *Vibrio*
EN EL ESTERO DE JALTEPEQUE, UTILIZANDO COMO BIOACUMULADOR A
Anadara spp.”

PRESENTADO POR:

DOLORES DEL CARMEN CLAROS MARQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

ASESOR: _____

DR. RIGOBERTO AYALA

ASESOR: _____

LICDA. ZANDRA JIMENEZ DE FUENTES

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2007.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA
ESCUELA DE BIOLOGIA



TRABAJO DE GRADUACION:

“DETECCION E IDENTIFICACION DE ESPECIES PATOGENAS DEL GENERO *Vibrio*
EN EL ESTERO DE JALTEPEQUE, UTILIZANDO COMO BIOACUMULADOR A
Anadara spp.”

PRESENTADO POR:
DOLORES DEL CARMEN CLAROS MARQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

JURADO: _____
MSC. VIRGINIA GUERRERO

JURADO: _____
LICDA. ANGELA GUEDELIA PORTILLO

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2007.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTORA:

DRA. MARIA ISABEL RODRIGUEZ

SECRETARIA GENERAL:

LICDA. ALICIA MARGARITA RIVAS

FISCAL:

LIC. PEDRO ROSALIO ESCOBAR

DECANO:

LIC. JOSE HECTOR ELIAS DIAZ

DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA:

MSC. ANA MARTHA ZETINO

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2007.



ASESORES Y JURADOS

ASESOR INTERNO:
DR. RIGOBERTO AYALA

ASESOR EXTERNO:
LICDA. ZANDRA JIMENEZ DE FUENTES

JURADO EVALUADOR:
MSC. VIRGINIA GUERRERO

JURADO EVALUADOR:
LICDA. ANGELA GUDELIA PORTILLO

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2007.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por prestarme vida, concederme serenidad, valor y sabiduría para alcanzar mis metas, y a San Francisco.

A mis padres José Alejandro Márquez y María del Carmen Claros por quererme, apoyarme, creer y confiar en mí en todo momento, a mis hermanos y demás familia que siempre han estado conmigo, a mi novio Marvin A. Muñoz Carrillo por acompañarme en esta etapa tan importante de mi vida, gracias por tu apoyo y sobre todo por tu amor.

Al Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del Ministerio de Salud y Asistencia Social por el apoyo para la realización de este trabajo.

A mis asesores Dr. Rigoberto Ayala y Licda. Zandra Jiménez de Fuentes por brindarme su desinteresada ayuda, su tiempo y orientación para el buen desarrollo de esta investigación; a mis jurados MSc. Virginia Guerrero y Licda. Ángela Gudelia Portillo por brindar sus oportunos comentarios para mejorar este trabajo.

Además quiero manifestar mi gratitud a los Ingenieros César Vanegas y Miguel Valle de CENDEPESCA por su valiosa colaboración para la colecta de muestras en la fase de campo, a la Licda. Elsy de Hernández, Hitamar Merino Clímaco y José Antonio Rodríguez de CENDEPESCA La Herradura por su colaboración incondicional, al igual que a la Sra. Wendy Rivas de Martínez Presidenta de la Cooperativa Caballitos de Mar de la Herradura.

A las Licenciadas: Amada Gloria de Baíres y María José Luna Boza del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social por su amistad y aporte profesional para el desarrollo de la fase de laboratorio.

A mis amigos del CSTJ, a los docentes, amigos y compañeros de la Escuela de Biología.

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, a mis hermanos, a mi novio y a la Licda. Zandra Jiménez de Fuentes del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del MSPAS; ya que sin su valiosa ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo. Dios la Bendiga.

RESUMEN

En el presente estudio se realizó la detección e identificación de especies patógenas del género *Vibrio* en El Estero de Jaltepeque utilizando como bioacumulador a los moluscos Bivalvos de la familia Arcidae: *Anadara* spp, comúnmente conocidos como "conchas o curiles".

Se realizaron dos muestreos en ocho puntos del Estero: Santo Domingo, Cantón Tasajera (punto 1); Santa Cruz, Cantón Tasajera (punto 2); Cañón El Quemado, Cantón La Calzada (punto 3); Tronconera, Cantón La Calzada (punto 4); El Escobal, Cantón El Escobal (punto 5); El Muelle, La Herradura (punto 6); El Conchal, La Herradura (punto 7) y Los Blancos, Cantón Los Blancos (punto 8); donde se colectó una muestra por cada punto de muestreo equivalente a 12 "curiles" por muestra, estas se llevaron al Laboratorio Central "Dr. Max Bloch" del MSPAS para ser procesadas. A todas las muestras se les realizó aislamiento y caracterización bioquímica de vibrios, obteniéndose 83 aislamientos, de los cuales se encontraron en mayor cantidad (15 aislamientos) en los puntos 1 y 2, y en menor cantidad (6 aislamientos) en los puntos 5 y 6. Se identificaron cuatro especies: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. damsela*, encontrándose en mayor porcentaje a *V. parahaemolyticus* (55.4%), agente causal de gastroenteritis. Además a los vibrios identificados se les realizó prueba de sensibilidad antimicrobiana para ver la reacción a los antibióticos.

Los parámetros físico-químicos estudiados: temperatura del agua, pH y salinidad se encontraron en los rangos óptimos para la sobrevivencia y estacionalidad de los vibrios.

INDICE

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCION	15
II. OBJETIVOS	17
III. FUNDAMENTO TEORICO	18
3.1. FAMILIA VIBRIONACEAE	18
3.1.1. Género <i>Vibrio</i>	18
3.1.2. Vibrios relacionados con patología humana	19
3.1.2.1. <i>Vibrio cholerae</i>	19
3.1.2.2. <i>Vibrio alginolyticus</i>	20
3.1.2.3. <i>Vibrio carchariae</i>	21
3.1.2.4. <i>Vibrio cincinnatiensis</i>	21
3.1.2.5. <i>Vibrio damsela</i>	21
3.1.2.6. <i>Vibrio fluvialis</i>	21
3.1.2.7. <i>Vibrio furnissii</i>	22
3.1.2.8. <i>Vibrio hollisae</i>	22
3.1.2.9. <i>Vibrio mimicus</i>	22
3.1.2.10. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22
3.1.2.11. <i>Vibrio vulnificus</i>	23
3.2. MOLUSCOS BIBALVOS	25
3.2.1. Anatomía	26
3.2.2. Las branquias y la alimentación	28
3.2.3. Clasificación taxonómica de los bivalvos en estudio	29
3.3. AISLAMIENTOS DE VIBRIOS A PARTIR DE MUESTRAS DE ALIMENTOS, SEDIMENTOS Y OTRAS MUESTRAS AMBIENTALES	30
3.3.1. Enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina (APA)	31
3.3.2. Medios selectivos en placa	31
3.3.3. Medios no selectivos en placa	32
3.3.4. Antiseros para tipificación serológica de <i>Vibrio cholerae</i> O1	32
3.3.5. Pruebas bioquímicas de selección	33

3.3.6. Sistemas de Identificación api	33
3.3.6.1. Api 20E	33
3.3.6.2. Api 20 NE	33
3.4. PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA O ANTIBIOGRAMA	34
3.4.1. Aplicaciones	34
3.4.2. ¿A que organismos realizar las pruebas de sensibilidad por difusión de discos?	35
3.4.3. Interpretación de los resultados del Antibiograma	35
3.4.3.1. Categorías de interpretación	35
IV. METODOLOGIA	36
4.1. UBICACIÓN GEOGRAFICA	36
4.2. DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO	37
4.3. DESCRIPCION DEL ESTUDIO	37
4.3.1. Fase de Campo	37
4.3.1.1. Toma y transporte de muestras	39
4.3.2. Fase de Laboratorio	40
4.3.2.1. Preparación de medios de cultivo	40
4.3.2.2. Preparación de reactivos	42
4.3.2.3. Análisis bacteriológico	42
4.3.2.3.1. Preparación de las muestras	43
4.3.2.3.2. Incubación en APA y TCBS	43
4.3.2.3.3. Detección de vibrios: Aislamiento e identificación	
Presuntiva	43
4.3.2.3.3.1. Lectura de TCBS	43
4.3.2.3.3.2. Agar gelatina	44
4.3.2.3.3.2. Tinción de Gram	45
4.3.2.3.3.3. Pruebas bioquímicas	45
4.3.2.3.3.3.1. Prueba de la oxidasa	45
4.3.2.3.3.3.2. Prueba del collar	45
4.3.2.3.3.3.3. Movilidad	46
4.3.2.3.3.3.4. Agar tres azúcares (TSI)	46
4.3.2.3.3.3.5. Reacciones de descarboxilasa	

	y dihidrolasa	47
4.3.2.3.4.	Pruebas serológicas para identificación de <i>Vibrio cholerae</i> O1	47
4.3.2.3.4.1.	Aglutinación en lámina	47
4.3.2.3.4.1.1.	Solución salina	47
4.3.2.3.4.1.2.	Antisuero polivalente para <i>V. cholerae</i> O1	48
4.3.2.3.4.1.3.	Antisuero para <i>V. cholerae</i> O139	48
4.3.2.3.5.	Identificación de especies de vibrios con api 20 E api 20 NE	48
4.3.2.4.	Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana o Antibiograma	49
4.3.2.5.	Almacenamiento de cepas	50
4.3.3.	Medición de parámetros físico-químicos	50
V.	ANALISIS ESTADISTICO	51
VI.	RESULTADOS	52
VII.	DISCUSIÓN	75
VIII.	CONCLUSIONES	81
IX.	RECOMENDACIONES	83
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85
	ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Morfología básica de las valvas en los bivalvos	26
2. Vista externa de valvas de <i>A. similis</i>	29
3. Valva derecha de <i>A. tuberculosa</i>	30
4. Colonias típicas de vibrios en agar TCBS	31
5. Zona de estudio	36
6. Ubicación de puntos de muestreo	38
7. Organigrama interpretativo para la obtención de las placas de TCBS y Agar Gelatina para cada muestra.	44
8. Número y porcentaje de cepas aisladas de vibrios en cada punto de muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.	68
9. Porcentaje de las especies identificadas del género <i>Vibrio</i> . Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.	70
10. Temperaturas del agua obtenidas en cada punto de muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.	72
11. pH obtenidos en cada punto de muestreo (en los dos muestreos). Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.	73
12. Concentración de salinidad (g/L) obtenidas en cada punto de Muestreo (en los dos muestreos). Estero de Jaltepeque. El Salvador noviembre y diciembre, 2006.	74

INDICE DE CUADROS

	Página
1. Parámetros Físico-químicos necesarios para la sobrevivencia de los vibrios	19
2. Especies del género <i>Vibrio</i> aisladas de muestras clínicas .	24
3. Pruebas claves para diferenciar los 6 grupos de <i>Vibrios</i> patógenos.	25
4. Puntos de muestreo georreferenciados.	39
5. Reacciones de los miembros del género <i>Vibrio</i> a la descarboxilasa y dihidrolasa.	47
6. Discos de sensibilidad antimicrobiana y carga recomendados por el CLSI para vibrios halófilos.	49
7. Lectura de placas de agar TCBS incubadas a 36 °C y 42 °C, del primer muestreo.	53
8. Lectura de placas de agar TCBS incubadas a 36 °C y 42 °C, en el segundo muestreo.	54
9. Resultados positivos de la prueba del collar en las muestras analizadas en los dos muestreos.	55
10. Resultados de las pruebas de movilidad, realizadas a las colonias positivas a la prueba del collar.	56
11-a. Lecturas de los tubos de TSI del primer muestreo incubados a 36 °C.	57
11-b. Lecturas de los tubos de TSI del primer muestreo incubados a 42°C.	58
11-c. Lecturas de los tubos de TSI del segundo muestreo incubados a 36°C.	59
11-d. Lecturas de los tubos de TSI del segundo muestreo incubados a 42°C.	60
12-a. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del primer muestreo incubados a 36 °C.	60
12-b. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del primer muestreo incubados a 42 °C.	61
12-c. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del segundo muestreo incubados a 36 °C.	62
12-d. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del segundo muestreo incubados a 42 °C.	63
13-a. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE del primer muestreo incubados a 36 °C.	64

13-b. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE en el primer muestreo incubados a 42 °C.	65
13-c. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE del segundo muestreo incubados a 36 °C.	66
13-d. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE del segundo muestreo incubados a 42 °C.	67
14. Número y porcentaje de cepas aisladas por cada punto de muestreo incubadas a las diferentes temperaturas.	68
15. Número y distribución por especie de cepas de Vibrios en cada punto de muestreo.	69
16. Número y porcentaje de especies del Género <i>Vibrio</i> aisladas en el total de las muestras.	70
17-a. Lectura de los diámetros de los halos de inhibición provocados por los discos de sensibilidad (antibióticos) aplicados a las especies identificadas.	71
17-b. Interpretación de los halos de los discos de sensibilidad del antibiograma realizado a cada cepa identificada.	71
18. Temperaturas del agua obtenidas en cada punto de muestreo.	72
19. pH obtenidos en cada punto de muestreo (en los dos muestreos).	73
20. Concentración de salinidad (g/L) obtenidas en cada punto de muestreo (en los dos muestreos).	74

I. INTRODUCCION

La familia Vibrionaceae fué propuesta por Véron en 1965, para agrupar aquellos géneros cuyas especies fueran oxidasa positiva y móviles por flagelo polar. La familia está constituida por los géneros *Enhydrobacter*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*. El género *Vibrio* incluye 37 especies de las cuales 12 se han identificado como agentes etiológicos de enfermedades en humanos, y de éstas, 10 se consideran halófilas (*V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*); siendo *Vibrio cholerae* (no halófila) una de las especies con mayor importancia clínica y epidemiológica, por ser el agente causal de una enfermedad conocida como Cólera. (Basualdo & Coto, 1996; [http://1](#)). Además, estos organismos están involucrados en enfermedades de animales, representando un peligro para la fauna acuática. (Lafourcade, 2005). Los vibrios son bacterias heterótrofas, cuyo hábitat primario son los ecosistemas acuáticos salobres y marinos, en donde ocupan una gran diversidad de nichos. Están presentes en la columna de agua y en el sedimento, por lo que se les puede encontrar como bacterias de vida libre, comensales, saprobias o parásitas. (Rosas *et al*, 2004).

Las bacterias de este género son bacilos cortos, rectos o curvados, con tendencia al pleomorfismo, pudiendo observarse formas cocobacilares e incluso cocoides, Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, móviles por flagelos polares y no esporulados. (Rosas *et al*, 2004). Casi todos los vibrios se asocian a infecciones del tracto gastrointestinal; no obstante, su implicación en infecciones extraintestinales es conocida, siendo las más frecuentes las de tejidos blandos (heridas y quemaduras), otitis, conjuntivitis y sepsis graves. ([http://1](#); Grau, *et al*, 2004). Los mecanismos de penetración de estas bacterias que ocasionalmente suceden, se deben a las mordeduras de peces u otros animales marinos, o a las picaduras por espinas o aletas; pero el vehículo portador, además del agua, es la ingesta de productos del mar, en especial los que se consumen crudos, como es el caso de los moluscos bivalvos. ([http://1](#); Grau, *et al*, 2004).

Los moluscos bivalvos son considerados como rubros estratégicos de gran importancia económica y social, sin embargo han sido señalados como vectores significativos de

toxiinfecciones alimentarias debido a su condición de filtradores, por lo que se consideran un riesgo en la transmisión de enfermedades gastrointestinales como las transmitidas por miembros del género *Vibrio*. (Grau *et al.*, 2004).

En El Salvador hay muy pocos estudios de estas bacterias, y los que existen sólo se limitan a *Vibrio cholerae*, dejando a un lado a otros vibrios como los halófilos que también producen enfermedades gastrointestinales, aunque de menor severidad; pero que pueden producir importantes brotes epidémicos; además causan otras enfermedades, como lesiones cutáneas.

Debido a los pocos estudios que se han desarrollado de estas bacterias en El Salvador y a las enfermedades que producen; se hacen necesarios estudios para la detección e identificación de vibrios patógenos que habitan en los diferentes ecosistemas acuáticos de nuestro país; más aún en los estuarios; ya que estos reúnen las condiciones ambientales idóneas para su sobrevivencia. En esta investigación se utilizó como bioacumulador a los moluscos bivalvos *Anadara* spp. procedentes del Estero de Jaltepeque para cumplir con el objetivo mencionado. Este estudio pretende brindar información científica y contribuir de alguna manera para que las entidades dedicadas a la salud pública y a la población en general tomen las medidas preventivas para evitar cualquier brote epidémico de enfermedades originadas por dichos microorganismos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Detectar e Identificar algunas especies patógenas del género *Vibrio*, presentes en el Estero de Jaltepeque, utilizando como bioacumulador a *Anadara* spp.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Detectar la presencia de Vibrios patógenos en *Anadara* spp.
- Identificar que especies del género *Vibrio* están presentes en *Anadara* spp.
- Identificar cual especie del género *Vibrio* es más abundante en el Estero de Jaltepeque.
- Realizar mediciones de algunos parámetros físico-químicos en los diferentes puntos de muestreo en el Estero de Jaltepeque.

III. FUNDAMENTO TEORICO

3. 1. FAMILIA VIBRIONACEAE

Según el Manual de Sistemática de Bergey, la familia Vibrionaceae, está integrada por los géneros: *Enhydrobacter*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio*, de los cuales los últimos son reconocidos como causantes de infecciones humanas y de animales. (Basualdo *et al.* 1996; [http//1](#)). Recientemente se ha propuesto la inclusión de dos nuevos géneros: *Listonella* y *Shewanella*, estos son autóctonos del medio marino; pero todavía se están estudiando. ([http//1](#)).

La familia Vibrionaceae incluye muchas especies, que son habitantes normales del ambiente acuático. (OPS & OMS, 1994; [http//1](#)). Están presentes en la columna de agua y en el sedimento, por lo que se les puede encontrar como bacterias de vida libre, comensales, saprobias o parásitas (Rosas *et al.*, 2004).

3.1.1 Género *Vibrio*

Los miembros del género *Vibrio* están constituidos por bacilos Gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados y móviles por presencia flagelar, que pueden presentar una morfología curvada o recta, generalmente halodependientes, es decir, que requieren para su crecimiento la presencia obligada, en mayor o menor concentración de cloruro sódico, poseen catalasa, oxidasa (a excepción de *V. metschnikovii*), nitratorreductasa y triptofanodesaminasa; fermentan la glucosa, al igual que *Aeromonas* y *Plesiomonas*, pero estos dos géneros no son halodependientes. (OPS & OMS, 1994).

La mayor parte de los vibrios aislados de muestras clínicas requieren para su crecimiento óptimo una concentración de cloruro de sodio (NaCl) no inferior al 1%, aunque algunos pueden crecer a concentraciones del 0,5%. Para su identificación es necesario suplementar los medios de cultivo que no contengan NaCl con un 1% de esta sal, pues los que contienen concentraciones bajas pueden dar lugar a que no se produzca crecimiento o a reacciones bioquímicas anómalas que conducen a una caracterización taxonómica errónea.

Los vibrios son autóctonos de hábitat marinos, salobres y estuarinos. Diversos factores biológicos y físico-químicos (ver cuadro 1), como el contenido de nutrientes, la salinidad, la temperatura y el pH, pueden influir en la multiplicación, supervivencia y distribución en los

diferentes ambientes acuáticos. Estos aparecen en grandes floraciones cuando las aguas se encuentran a temperatura de 30-37°C; a temperaturas bajas los vibrios permanecen en el sedimento de los fondos marinos y los recuentos arrojan normalmente cifras inferiores a las necesarias para producir infección. En países templados, los vibrios se encuentran presentes en el agua del mar durante todo el año, aunque su concentración experimenta un notable incremento en los meses cálidos, a causa de las favorables condiciones ecológicas y del plancton, aumentando su acumulación por moluscos filtradores y otros animales marinos. (Wachmuth K. *et al.* 1994; [http//1](#)).

Cuadro 1. Parámetros Físico-Químicos necesarios para la sobrevivencia de los *Vibrios*

Parámetros de crecimiento	Óptimo	Rango
Temperatura	30 a 37 °C	8 a 43 °C
pH	7.0 a 8.5	4.8 a 11
Condiciones atmosféricas	aeróbico	Aeróbico o anaeróbico
[] de NaCl	Varía para cada especie	0 a 10% (0 a 100 UPS*)
*UPS: Unidades Ponderadas de Sal		
Fuente: Lauforcade, 2005		

3.1.2 Vibrios relacionados con patología humana.

De las 37 especies del género *Vibrio* aceptadas, al menos 15 han sido aisladas de muestras clínicas, y 12 se consideran patógenas (ver cuadro 2), de las cuales 10 son halófilas: *V. cholerae* (no halófila), *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* (no halófila), *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. (OPS & OMS, 1994; Wachmuth K. *et al.*, 1994; [http//1](#); [http//2](#)).

3.1.2.1 *Vibrio cholerae*:

Existen más de 130 serogrupos de esta especie, de los cuales el serogrupo O1 puede ocasionar el cólera. Este serogrupo puede, por pruebas bioquímicas, diferenciarse aún más en dos biotipos: El *V. cholerae* Clásico y El Tor (denominado así por haberse aislado de peregrinos muertos en la estación de cuarentena de El Tor en Egipto). Cada biotipo tiene tres serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima. De acuerdo a estudios realizados en América latina han revelado que el 95 % de los casos de cólera son debidos al serotipo Ogawa. (Basualdo & Coto, 1996).

El biotipo El Tor es el responsable de casi todos los brotes de cólera recientes, aunque todavía en ciertas zonas endémicas sigue implicado el biotipo El Clásico (en Bangladesh). También es mayor la proporción de casos clínicos cuando las epidemias las origina el biotipo El Tor, debido a que este biotipo sobrevive más tiempo en el medio ambiente aún como organismo independiente sin que haya casos de cólera o portadores, aparentemente está asociado a plantas y animales acuáticos. Así mismo el serogrupo O1 se ha aislado a partir de heridas infectadas. El resto de serogrupos se han relacionado con cuadros gastrointestinales con diarrea o gastroenteritis y en formas clínicas extraintestinales como septicemias secundarias. (OPS & OMS, 1994; Basualdo & Coto.1996; [http//1](http://1)).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), por el grupo científico de trabajo del programa de enfermedades diarreicas, el *V. cholerae* se debe designar como:

- ***Vibrio cholerae* O1:**

Agente etiológico del cólera epidémico, ocasionado por microorganismos que aglutinan con antiseros dirigidos contra el antígeno O1 y que ocasionan la enfermedad por una enterotoxina.

- ***Vibrio cholerae* atípico:**

Es igual que el anterior, pero cuya diferencia es que no elaboran la clásica enterotoxina colérica.

- ***Vibrio cholerae* no O1:**

Son las cepas O2 a O138, indistinguible del tipo O1, sólo que no aglutinan en presencia de antiseros dirigidos contra el antígeno O1, se denominan vibriones no aglutinables o vibriones no coléricos. En un comunicado de prensa WHQ/47, 22 de junio de 1993 se notificó la existencia de un nuevo serotipo de *V. cholerae* no O1, denominado: *V. cholerae* O139, descubierto en la India. Desde el punto de vista clínico y epidemiológico la enfermedad que produce es idéntica a la causada por el tipo O1. (OPS & OMS, 1994; Basualdo & Coto, 1996).

3.1.2.2 *Vibrio alginolyticus*:

Es la especie más halotolerante, soporta una concentración del 10% de NaCl, y la más abundante en el agua de mar, muy común en el hábitat marino y de países templados. Causa infecciones gastrointestinales en el hombre y, ocasionalmente, extraintestinales.

Posee escasa virulencia y se asocia con frecuencia a otros patógenos, su poder invasivo

es bajo y las infecciones que origina suelen ser benignas y autolimitadas.

No fue considerado patógeno hasta 1973, pero desde entonces el número de procesos infecciosos en los que ha sido implicado ha ido en aumento.

Se le ha asociado con enteritis, infecciones de tejidos blandos, sobre todo en heridas y quemaduras, abscesos, bacteriemia, conjuntivitis, peritonitis, conjuntivitis externa y otitis externa. En el caso de las otitis, con frecuencia existe una patología ótica subyacente. La mayoría de estas infecciones se adquiere por exposición al medio marino o por contacto con productos derivados de éste. (OPS & OMS, 1994; Wachmuth K. *et al.* 1994; Basualdo *et al.* 1996; [http://1](#)).

3.1.2.3 *Vibrio carchariae*:

Es la especie más reciente descrita en patología humana.

Es un patógeno de tiburones, que ha sido relacionado con infecciones extraintestinales en el hombre, particularmente de heridas por mordedura de tiburón. Se distingue de *V. alginolyticus* por su menor halotolerancia y la resistencia a colimicina. (Wachmuth K. *et al.* 1994; [http://1](#)).

3.1.2.4 *Vibrio cincinnatiensis*:

Se distingue de otros vibrios por su capacidad para fermentar mioinositol. Patógeno humano ocasional, ha sido aislado del líquido cefalorraquídeo y de sangre. (Wachmuth K. *et al.* 1994; [http://1](#)).

3.1.2.5 *Vibrio damsela*:

Es un vibrio halófilo perteneciente, junto con *V. fluvialis* y *V. furnissii*, al grupo de los vibrios arginina deshidrolasa positiva (ver cuadro 3). Se ha reconocido como causa de enfermedad en el hombre. Es un patógeno extraintestinal responsable de infecciones de heridas. El papel del hierro en la patogenicidad experimental de *V. damsela* para peces y mamíferos ha sido estudiado recientemente. (Basualdo & Coto, 1996; [http://1](#)).

3.1.2.6 *Vibrio fluvialis*:

Especie halodependiente, presenta muchas similitudes con *V. damsela* y *V. furnissii*, y es mucho más común en el medio marino que dichos vibrios. Se ha implicado en casos esporádicos de infección gastrointestinal con cuadros de diarrea acuosa, vómitos, dolores

abdominales y deshidratación grave; se ha señalado que la enterotoxina que posee difiere de la toxina colérica en el receptor, modo de acción y antigenicidad. (Wachmuth K. *et al.* 1994; Basualdo & Coto, 1996).

3.1.2.7 *Vibrio furnissii*:

Esta especie se ha aislado de las heces de pacientes con diarrea tras la ingesta de productos marinos. (Mata, 1992; Basualdo & Coto, 1996).

3.1.2.8 *Vibrio hollisae*:

Esta especie ha sido aislada a partir de heces diarreicas tras la ingesta de peces crudos. (Basualdo & Coto, 1996).

3.1.2.9 *Vibrio mimicus*:

Considerado hasta 1981 dentro de la especie *Vibrio cholerae* no O1 sacarosa negativa, puede desarrollarse perfectamente en ausencia de NaCl. Se distinguen tres tipos de cepas: las que producen enterotoxina termolábil inmunológicamente similar a la colérica, las que producen enterotoxina termoestable y las que *in vivo* presentan alguna característica de actividad de toxina termolábil. Se considera menos frecuente que otros vibrios en infecciones humanas; se asocia con diarrea, infección de heridas, bacteriemia y otitis, consecuente al consumo de pescado crudo y moluscos bivalvos. (Basualdo & Coto, 1996; [http/1](#)).

3.1.2.10 *Vibrio parahaemolyticus*:

Ecológicamente, esta especie está ligada a la temperatura y salinidad de las aguas y a sus relaciones con animales marinos superiores.

Se encuentra en aguas costeras y estuarinas, y en los sedimentos, sobre plancton, peces, crustáceos y moluscos; pero no en aguas dulces, mar abierto u océanos.

V. parahaemolyticus ha sido descrito ampliamente en la literatura como agente causal de gastroenteritis con diarrea aguda, vómitos, fiebre moderada y dolores abdominales, relacionada con el consumo de alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar, especialmente en Japón por la ingestión de pescado crudo.

En 1950 fue reconocido como agente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Japón, en un brote epidémico asociado al consumo de sardinas. Desde entonces ha

adquirido un rol protagónico como agente causal de infecciones gastrointestinales. Además en EEUU es considerado como un problema en la salud pública.

Se ha demostrado la actividad hemolítica de la mayoría de las cepas de origen humano (toxina de Kanagawa), así como su capacidad de producción de enterotoxina y de inflamación de la mucosa intestinal. *V. parahaemolyticus* se ha implicado también en infecciones de tejidos blandos, panoftalmitis, sepsis y otitis. (OPS & OMS, 1994; Wachmuth K. *et al.* 1994; Basualdo & Coto, 1996; [http//1](http://1)).

3.1.2.11 *Vibrio vulnificus*:

Es la especie halófila más virulenta para el ser humano, especialmente para enfermos hepáticos con elevados niveles de hierro sérico. Otras afecciones del huésped como alcoholismo, cirrosis hepática, úlcera péptica, consumo de esteroides y talasemia, favorecen la infección. Las formas clínicas y epidemiológicas son dos: sepsis primaria por ingestión de ostras crudas, y las infecciones localizadas por exposición de heridas al agua de mar. En ambos síndromes existen lesiones cutáneas en tronco y extremidades (ver anexo1-A), representadas por bulas hemorrágicas (ver anexo 1-B). Se han descrito diversos mecanismos de patogenicidad: citolisina o hemolisina, colagenasa, elastasa, factor de permeabilidad vascular, fosfolipasa A2, lipofosfolipasa y sideróforos, además de una particular resistencia de esta especie a la actividad bactericida del suero y a la fagocitosis por polimorfonucleares y macrófagos, atribuida a la presencia de un antígeno capsular de superficie, con propiedad antifagocitaria. Las lesiones edematosas de piel se atribuyen a la secreción de una metaloproteasa que además tendría otras importantes acciones biológicas *in vivo*, como inhibidor de varias proteínas activas del plasma, como las vías clásica y alternativa del complemento, cortar las cadenas del fibrinógeno en fragmentos sin actividad coagulante, destruir los inhibidores plasmáticos de proteinasas, y posiblemente inducir otras propiedades nosogénicas. El polisacárido capsular se considera crítico para la virulencia, y ha sido propuesto como inmunógeno en una vacuna mixta con toxoide diftérico, que se ha mostrado efectivo experimentalmente en el ratón. En el ratón experimentalmente cirrótico, la letalidad por *V. vulnificus* es proporcional al grado de respuesta *in vivo* del factor alfa de necrosis tumoral. *V. vulnificus* ha sido aislado tanto del agua del mar como de animales marinos, sobre todo de moluscos bivalvos. *V. vulnificus*, un patógeno obligado de anguilas, en cuyo moco cutáneo sobreviven al menos 14 días. Los cuadros clínicos con los que se ha relacionado son,

principalmente, septicemia primaria e infecciones de heridas; con menor frecuencia, enfermedad gastrointestinal y, ocasionalmente, meningitis, osteomielitis, endometritis e infecciones pulmonares tras asfixia por inmersión. El tratamiento debe ser precoz en todos los casos, por la potencial letalidad de *V. vulnificus*, acompañado o no de cirugía. Respecto a la antibioterapia, en casos concretos, se han mostrado eficaces asociaciones como ciprofloxacina y pivampicilina o piperacilina con una cefalosporina de tercera generación. (OPS & OMS, 1994; Wachmuth K. *et al.*, 1994; Basualdo & Coto, 1996; [http//1](#); [http//2](#); [http//4](#); Lafourcade, M. 2005).

Cuadro 2. Especies del género *Vibrio* aisladas de muestras clínicas

Especies	Tipo de muestra ¹				
	Heces	Secreciones heridas	Secreciones oído	Espujo	Sangre
<i>V. cholerae</i> 01 ²	+++	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> No 01 ²	+++	++	+	-	+
<i>V. mimicus</i> ²	++		+		
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	++	++		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	+
<i>V. vulnificus</i>	(+)	++		(+)	++
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. hollisae</i>	++				+
<i>V. cincinnatiensis</i>					+
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			+
<i>V. metschnikovii</i>	(+)				+
<i>V. carchariae</i>		++			
¹ Símbolos: +++, descrito frecuentemente; ++, menos común; +, raro; (+), no establecido					
² especies no halófilas					
Fuente: García, s.a.					

Las 12 especies del género *Vibrio* que tienen importancia clínica, se pueden dividir en 6 grupos de acuerdo a pruebas diferenciales, los cuales se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Pruebas claves para diferenciar los 6 grupos de *Vibrios* patógenos

Grupo	Reacción de la especie en:	Crecimiento en caldo nutritivo		Oxidasa	Nitrato a Nitrito	Fermentación de Mio-inositol	Dihidrolasa de Arginina	Descarboxilasa de Lisina	Descarboxilasa de Ornitina
		0% NaCl	1% NaCl						
1	<i>V. cholerae</i>	+	+	+	+	-	-	+	+
	<i>V. mimicus</i>	+	+	+	+	-	-	+	+
2	<i>V. metschnikovii</i>	-	+	-	-	v	v	v	-
3	<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	+	+	+	-	v	-
4	<i>V. hollisae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
5	<i>V. damsela</i>	-	+	+	+	-	+	v	-
	<i>V. fluvialis</i>	-	+	+	+	-	+	-	-
	<i>V. furnissii</i>	-	+	+	+	-	+	-	-
6	<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	+	v
	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+
	<i>V. vulnificus</i>	-	+	+	+	-	-	+	v
	<i>V. carchariae</i>	-	+	+	+	-	-	+	-

Nota: + : ≥ 90% positivo; - : < 10% positivo; V (variable): 10 a 89% positivo

Fuente: OPS & OMS, 1994

3.2 MOLUSCOS BIVALVOS

Los moluscos bivalvos son invertebrados generalmente marinos, de cuerpo blando protegido por dos valvas o conchas calcáreas. Debido a esta característica se les denomina moluscos (poseen concha) bivalvos (dos valvas), también son conocidos como pelecípodos (tener pie en forma de pala o hacha excavadora) y lamelibranquios (por tener branquias de forma laminar). ([http//3](http://3); <http//6>).

Los bivalvos marinos viven próximos o en los fondos del mar o de los estuarios, en general fijos sobre un soporte de forma definitiva (ostra y mejillón) o enterrado en substratos

arenosos o fangosos (almejas, curiles), aunque algunos pueden llevar una vida más libre, como la vieira. ([http//3](http://3)).

3.2.1 Anatomía.

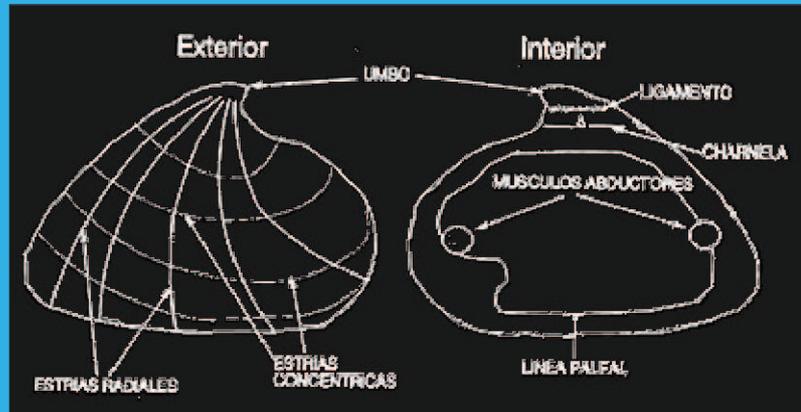


Figura 1. Morfología básica de las valvas en los bivalvos.

En la figura 1 se observa la morfología básica de las valvas, la cual consta de lo siguiente:

- **Umbo:** lugar de crecimiento.
- **Estrías:** ornamentación típica de los géneros, pueden estar presentes las de crecimiento (concéntricas) y las radiales, o sólo las de crecimiento.
- **Ligamento:** de carácter proteico y muy resistente, tiene como función unir fuertemente las dos valvas.
- **Charnela:** dientes que encajan en las dos valvas. Su número y forma son características de clasificación.
- **Músculos abductores:** músculos que abren y cierran las dos valvas. Pueden tener uno (monomiaris: ostra) o dos (dimiaris: almejas). Su inserción es tan fuerte que suelen dejar marcas en el interior de la valva.
- **Línea paleal:** marco redondeado que representa la inserción del manto en la cara interna. Puede tener un entrante o seno paleal ligado a la presencia de sifones (usados para entrar y sacar agua del interior; están en número de dos, uno inhalante y otro exhalante). ([http//6](http://6)).

En el cuerpo del organismo se aprecia el manto, éste es un repliegue laminar, que envuelve todo el animal. Sus células precipitan el CaCO_3 (carbonato cálcico) de la sangre para

hacer crecer la concha. El borde del manto puede ser liso o tener extensiones sensoriales e incluso ojos primitivos (ojos paleales). ([http//6](#)).

Algunos bivalvos tienen la capacidad de segregar cuerpos calcáreos ante agresiones causadas por cuerpos extraños que se introducen accidentalmente en el interior. El objeto de estas secreciones es pulir los ángulos punzantes del objeto que hieren al animal. Por este proceso se forman las perlas en algunas ostras. ([http//6](#)).

El pie es muy musculoso y extensible en animales que se entierran, en los demás está más bien poco desarrollado. Se asocia a una glándula llamada biso que forma filamentos adherentes con los que se unen al substrato (típicos "hilos" del mejillón). ([http//6](#)).

A nivel interno se encuentra:

- **Aparato digestivo:** formado por boca, esófago corto, estómago, intestino y ano. Las partículas alimenticias son filtradas por las branquias y captadas por unas extensiones que rodean la boca (palpos), de número variable (suelen ser 4). Estas partículas se mezclan con una mucosidad que segrega y van a parar al estómago. Si el tamaño de las partículas es grande pueden ser excretadas por el mismo esófago formando unas pseudoheces. El ano esta cerca de los sifones. ([http//6](#)).
- **Sistema circulatorio:** el corazón se encuentra en posición dorsal. La circulación es de tipo abierta y no tiene pigmentos respiratorios.
- **Sistema nervioso:** pueden tener extensiones sensoriales, ojos paleales, órganos de equilibrio y receptores sensibles a sustancias químicas (quimiorreceptores) con los que pueden detectar la calidad del agua.
- **Branquias:** con una doble misión, filtrar alimento y respiratoria. Están recorridas por vasos sanguíneos muy finos para permitir el intercambio de gases.
- **Aparato reproductor:** tienen un par de gónadas situadas sobre el tubo digestivo y, durante la época reproductora, ocupan todo el espacio disponible. Las especies de agua salada son dioicas (sexos separados en distintos organismos) mientras que las especies de agua dulce son hermafroditas (un solo organismo tiene los dos sexos). La fecundación es externa, aunque el hecho de que la madre retenga los huevos en el interior puede inducir al error de pensar que es interna. El desarrollo es indirecto, es decir, el bivalvo pasa por diversas etapas larvarias con una apariencia distinta del individuo adulto. ([http//6](#)).

3.2.2 Las branquias y la alimentación.

Los bivalvos se nutren de partículas orgánicas microscópicas, elementos del fitoplancton en general, menores de 20 milésimas de milímetro (micrómetro), que se encuentran suspendidas en el agua. Este tipo de partículas se puede dar en cantidades muy variables, desde menos de un millón por litro, que difícilmente pueden sostener población alguna de bivalvos, hasta 50 y 100 millones por litro, óptimas para el crecimiento de densos bancos.

Gracias a las células epiteliales ciliadas y mucosas que recubren la branquia, un complejo mecanismo de corrientes y contracorrientes en la cavidad paleal lleva las partículas seleccionadas, embebidas en moco, hasta los palpos labiales y la boca, que se encuentran en la parte anterior de la masa corporal (la opuesta a los sifones en la almeja, o la próxima a la parte puntiaguda en ostras y mejillones). ([http//3](#)).

Esta forma de alimentación hace que los bivalvos colonicen los estuarios o desembocaduras de los ríos en sus partes medias y bajas o las zonas marinas próximas, lugares en los que el aporte de nutrientes por el río y el tiempo de retención de estos en el estuario permiten que proliferen los citados elementos del fitoplancton. ([http//3](#)).

El hecho fundamental del tipo de alimentación condiciona sustancialmente los peligros relacionados con los bivalvos. Aún cuando el agua en el que crezcan sea significativamente limpia, para que el animal pueda crecer necesita materia orgánica en disolución. El animal hace pasar el agua reteniendo la materia orgánica que pasa a su sistema digestivo, siendo entonces digerida. La materia orgánica que llega al agua suele poseer una contaminación elevada que procede de efluentes (aguas) urbanos, industriales, agrícolas o ganaderos que se liberan al medio con una elevada contaminación. ([Http//7](#)).

Los contaminantes del agua, principalmente los de tipo microbiano; pero también de tipo químico, dependiendo de la contaminación del agua, llegan al tubo digestivo de los animales acumulándose en sus tejidos. Si los animales no son infectados o intoxicados, sobreviven, con lo que van a acumular microorganismos o tóxicos que van a transmitir a futuros consumidores, convirtiéndose en bioacumuladores ([http//7](#)).

3.2.3 Clasificación taxonómica de los bivalvos en estudio.

CLASE: **Bivalvia**

FAMILIA: **Arcidae**

NOMBRE CIENTIFICO: *Anadara similis* (ver figura 2).

(C. B. Adams, 1852)

NOMBRE COMÚN: **curil, curilía, concha.**

HÁBITAT: fondos lodosos de los manglares.

LUGARES DE OCURRENCIA EN EL PAÍS: Barra de Santiago, Estero de Jaltepeque, Bahía de Jiquilisco, Estero El Espino, Estero El Encantado, Estero El Tamarindo, Bahía de La Unión. (Barraza, 2006).



Figura 2. Vista externa de valvas de *A. similis*

Fuente: Barraza, 2006.

NOMBRE CIENTÍFICO:

Anadara tuberculosa (ver figura 3).

(Sowerby, 1833)

NOMBRE COMÚN: **concha negra, concha peluda.**

HÁBITAT: fondos lodosos de los manglares.

LUGARES DE OCURRENCIA EN EL PAÍS: Barra de Santiago, Estero de Jaltepeque, Bahía de Jiquilisco, Estero El Espino, Estero El Encantado, Estero El Tamarindo, Bahía de La Unión. (Barraza, 2006).



Figura 3. Valva derecha de *A. tuberculosa*

Fuente: Barraza, 2006.

3.3 AISLAMIENTOS DE VIBRIOS A PARTIR DE MUESTRAS DE ALIMENTOS, SEDIMENTOS Y OTRAS MUESTRAS AMBIENTALES.

Además del agua, los alimentos contaminados pueden servir de vehículo para la transmisión de vibrios. Los alimentos que por lo general se asocian con la transmisión de vibrios son: pescados, moluscos y crustáceos. Frecuentemente las ostras y los peces recién capturados se cultivan como muestras centinelas para fines de vigilancia epidemiológica. (OPS & OMS, 2004).

Las muestras deben mantenerse en refrigeración (4 °C) hasta que se cultiven. Observando las normas de asepsia. Se pesa una muestra de alimento de 25 g en un vaso de licuadora, se agrega una pequeña cantidad de agua peptonada alcalina (APA) al recipiente y se trituran por completo. Seguidamente, se agrega más APA para obtener una cantidad total de 225 mL de APA. En caso de sedimento y otras muestras ambientales que no requieran triturarse, se pesa una muestra de 25 g y se agregan a 225 mL de APA. Para hacer cultivos a partir de moluscos, se retira y se combina la carne de los moluscos, incluyendo el líquido de la concha. Se licua todo para mezclarlo muy bien, se agregan 25 g de esta mezcla a 225 mL de APA (dilución 10^{-1}), se preparan dos diluciones décuplas 10^{-2} y 10^{-3} de los moluscos en APA. (OPS & OMS, 2004).

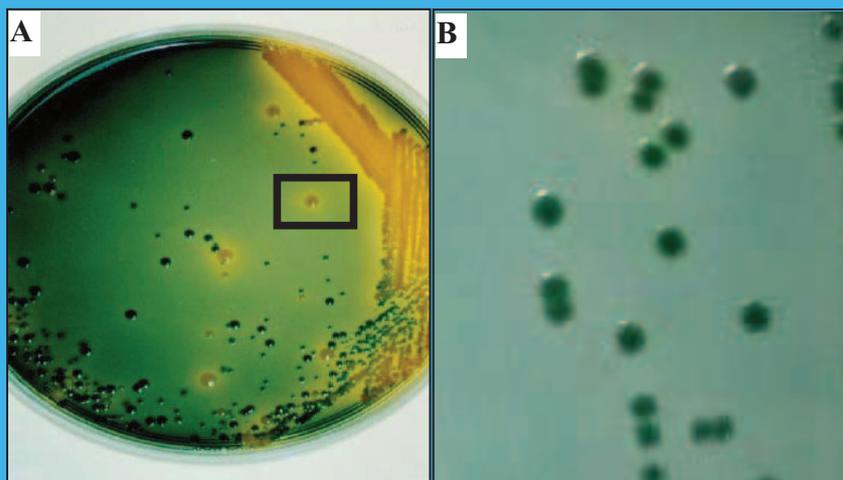
3.3.1 Enriquecimiento en Agua Peptonada Alcalina (APA)

Los *Vibrio* spp. crecen muy rápidamente en APA, y al cabo de 6 a 8 horas están presentes en mayor cantidad que otros microorganismos. El enriquecimiento en dicho medio favorece el aislamiento de vibrios. (OPS & OMS, 2004).

3.3.2 Medios selectivos en placa

▪ **Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS):** El TCBS es el medio que se prefiere para el aislamiento de vibrios y se utiliza ampliamente en todo el mundo. El agar TCBS se expende en el comercio y es fácil de preparar; no requiere esterilización en el autoclave, este es un medio de cultivo diferencial y selectivo. Dicho agar es verde cuando se prepara. El crecimiento de 18 a 24 horas en el caso de *Vibrio cholerae* produce colonias grandes de 2 a 4 mm de diámetro, ligeramente aplanadas, amarillas, con el centro opaco y la periferia traslúcida. El color amarillo se debe a la fermentación de la sacarosa en el medio (ver figura 4). Los microorganismos que no fermentan la sacarosa, como es el caso de *V. parahaemolyticus*, producen colonias de color verde a azul verde (ver figura 4). Las colonias sospechosas que se sometan a pruebas ulteriores deben sembrarse en un medio no inhibitorio como agar gelatina y agar hierro con tres azúcares (TSI). (OPS & OMS, 2004).

Figura 4. Colonias típicas de vibrios en agar TCBS. **A:** El color amarillo se debe a la fermentación de la sacarosa en el medio. **B:** Los microorganismos que no fermentan la sacarosa, producen colonias de color verde a azul verde.



Fuente: Lafourcade, 2005

3.3.3 Medios no selectivos en placa

▪ **Agar gelatina:** El agar gelatina es un buen medio no selectivo para el cultivo de vibrios. La producción de gelatinasa, característica de los vibrios en general, se puede determinar en el agar gelatina y se reconoce por la aparición de una zona opaca parecida a un halo alrededor de las colonias. El efecto del halo se puede observar mejor mediante la refrigeración breve (10 a 15 minutos) de la placa. Las colonias de vibrios en el agar gelatina son lisas, opacas, blancas y de 2 a 4 mm de diámetro tras la incubación de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Las colonias provenientes de este medio pueden someterse directamente a las pruebas de aglutinación con antisueros, a la prueba de oxidasa y a la prueba del collar. Se puede utilizar agar gelatina sin sal como un medio selectivo para diferenciar los vibrios marinos (halófilos), de los no halófilos que no requieren sal para su crecimiento. (OPS & OMS, 2004).

3.3.4 Antisueros para la tipificación serológica de *Vibrio cholerae* O1

La tipificación serológica de los aislamientos de la especie *V. cholerae* O1, se basa en la detección de los antígenos somáticos O, termoestables y de naturaleza lipopolisacárida, mediante pruebas de aglutinación en lámina. Basándose en los antígenos O se han identificado más de 130 serogrupos en esta especie, pero solamente los microorganismos que poseen los antígenos O del grupo 1 (cepas O1), que producen la toxina del cólera se han relacionado con cólera epidémico. Se sabe que las cepas de *V. cholerae* O1 contiene tres componentes antigénicos discernibles, los cuales se denominan por las letras A, B y C. el A es el antígeno específico común. Los aislamientos que carecen del antígeno A pertenecen a serogrupos diferentes de O1. En el grupo O1 hay dos serotipos: Ogawa (que contiene antígenos AB) e Inaba (que contiene antígenos AC). Se ha descrito un tercer serotipo, denominado Hikojima, del cual se dice que posee antígenos ABC. (OPS & OMS, 2004).

Para la identificación de *Vibrio cholerae* O1 se realiza la aglutinación con el antisuero polivalente, este contiene los serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima, al dar positiva la aglutinación en dicho antisuero, se prosigue a realizar la aglutinación con los antisueros monovalentes: Ogawa, Inaba. Cuando una cepa no aglutina con el antisuero polivalente se debe realizar la aglutinación con el antisuero O139; ya que en Asia se ha identificado una cepa que produce la misma toxina *Vibrio cholerae* O1, llamada: *Vibrio cholerae* O139. (OPS & OMS, 2004).

3.3.5 Pruebas bioquímicas de selección

La prueba del collar o del hilo mucoso, en la que se utiliza un cultivo fresco en agar no selectivo, es útil para descartar los microorganismos distintos de *Vibrio* spp., particularmente *Aeromonas* spp. También se puede utilizar la prueba de la oxidasa para seleccionar los microorganismos distintos de *Vibrio* spp., como los de la familia Enterobacteriaceae. Las pruebas de arginina, lisina y ornitina son importantes para identificar vibrios. (OPS & OMS, 2004). Las tapas de todos los tubos de las pruebas bioquímicas deben mantenerse poco apretadas antes de la incubación; esto tiene importancia particular para los tubos con medios: agar hierro con tres azúcares (TSI) con plano inclinado, puesto que si las tapas se dejan demasiado apretadas y existan condiciones anaerobias, no se producirán las reacciones características de los vibrios. (OPS & OMS, 2004).

3.3.6 Sistemas de identificación api

3.3.6.1 Api 20 E:

Es un sistema para la identificación de las Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos no exigentes que utiliza 23 tests bioquímicos estandarizados, miniaturizados y una base de datos. Api 20 E consta de 20 microtubos conteniendo sustratos deshidratados. Estos test se inoculan con una suspensión bacteriana la cual hidrata el medio. Durante la incubación se producen cambios de colores espontáneos o revelados por adición de reactivos. La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de lectura (ver anexo 2), y la identificación mediante el api 20 E Index.

3.3.6.2 Api 20 NE:

Es un micrométodo estandarizado que combina 8 tests convencionales y 12 tests de asimilación para la identificación de bacilos Gram negativos no exigentes y no enterobacterias como: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otras. La galería api 20 NE se compone de 20 cúpulas que contienen medios o sustratos deshidratados. Los test convencionales son inoculados con una suspensión bacteriana salina que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en variaciones de coloración espontánea o revelada mediante la adición de reactivos. Los tests de asimilación son inoculados con un medio mínimo y las bacterias se reproducen sólo si son

capaces de utilizar el sustrato correspondiente. La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la tabla de lectura (ver anexo 3) y la identificación se realiza con la ayuda del catálogo analítico.

3.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA O ANTIBIOGRAMA

Esta prueba se realiza por el método de Disco de Difusión, llamado Método de Kirby-Bauer, que es el recomendado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), esta es una organización multidisciplinaria norteamericana fundada en 1966, cuyos fines son los de promover el desarrollo y uso de normas necesarias para la unificación de criterios, y para el buen funcionamiento del laboratorio.

Este método se basa en el uso de una cantidad constante del antimicrobiano impregnado en un reservorio de papel filtro, el cual al ser aplicado sobre la superficie del agar en el que se ha sembrado el microorganismo en cuestión, formará por difusión un gradiente de concentración del antimicrobiano, cuya sensibilidad se indicará por el tamaño del halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco. (Trigoso, *et al*, 2003).

El medio de cultivo donde se realice el antibiograma debe ser estándar (generalmente Mueller-Hinton agar) y el inóculo debe estar asimismo estandarizado por medio de la escala de 0.5 Mc Farland (estándar de turbidez de sulfato de Bario). (Trigoso, *et al*, 2003).

3.4.1 Aplicaciones:

Útil para bacterias de rápido desarrollo como Enterobacterias, algunas *Pseudomonas*, *Acinetobacter* spp., *Enterococos* y *Vibrio* spp.

Puede usarse también para bacterias de crecimiento fastidioso como *Streptococcus* spp, *Haemophilus* spp y *Neisseria* spp.

La lectura e interpretación debe realizarse bajo Normas del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). (Trigoso, *et al*, 2003).

3.4.2 ¿A que organismos realizar las Pruebas de sensibilidad por Difusión de Discos?

- Trabajar con aislados bacteriológicamente identificados.
- Operar con microorganismos aeróbicos o anaerobios facultativos que exhiben desarrollo rápido en Agar Mueller Hinton.
- Se debe realizar a microorganismos que se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. (Trigoso, *et al*, 2003).

3.4.3 Interpretación de Resultados del Antibiograma

La interpretación de los halos resultantes por efecto de la acción que ejerce los discos antimicrobianos, se hace de acuerdo a las tablas del documento M100-S16 del CLSI que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los microorganismos a varios agentes antimicrobianos. Para el caso de *V. cholerae* la tabla de interpretación es la 2I. (Trigoso, 2003; CLSI, 2006).

3.4.3.1 Categorías de Interpretación

► Sensible (S):

Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones. Mientras mayor es el diámetro del halo de inhibición más sensible es la cepa al antimicrobiano o al antibiótico. (CLSI, 2006).

► Intermedio (I):

Esta categoría incluye cepas cuya concentración mínima inhibitoria (CIM) a un determinado antibiótico puede ser alcanzada en sangre y tejidos; por lo cual para lograrse eficacia clínica se debe aumentar la concentración del antibiótico. (CLSI, 2006).

► Resistente (R):

Esta categoría implica que la cepa en estudio es resistente al antibiótico colocado. Mientras menor es el diámetro del halo de inhibición más resistente es la cepa al antimicrobiano o al antibiótico. (CLSI, 2006).

IV. METODOLOGIA

4.1 UBICACION GEOGRAFICA

El Estero de Jaltepeque, se encuentra localizado entre la desembocadura de los ríos Jiboa y Lempa, al sur de los Departamentos de La Paz y San Vicente, entre los cantones: San Francisco El Porfiado, El Llano, Los Blancos, San Sebastián El Chingo, La Calzada, Guadalupe La Zorra, San José de La Montaña y San Rafael Tasajera. El estero se encuentra entre las coordenadas 13° 20' 33.4" Latitud Norte y 88° 56' 48.9" Longitud Oeste. ([http//8](http://8)).

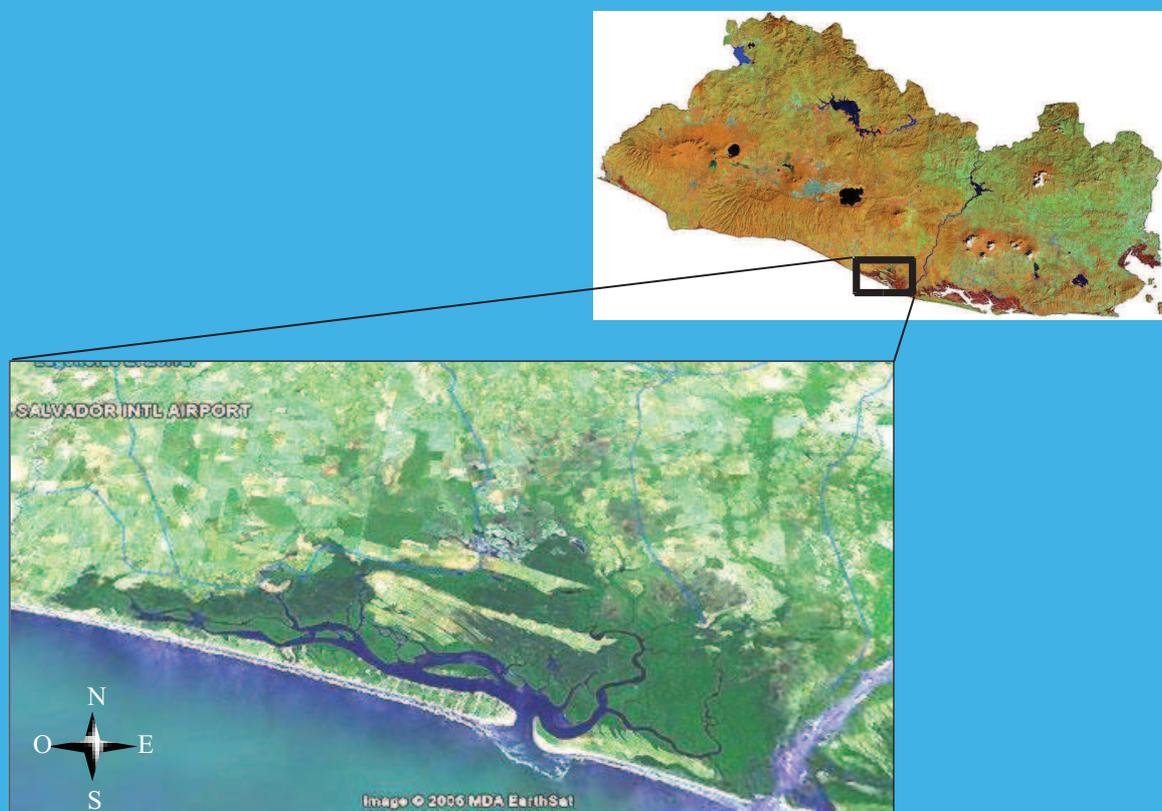


Figura 5. Zona de estudio

Fuente: <http://www.marn.gob>; google.com

4.2 DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO

El Estero de Jaltepeque es un estuario de 17 km de longitud por 1,500 metros de ancho, el cual forma parte del Complejo Jaltepeque y se extiende entre los 0 y 22 msnm; dicho Complejo forma parte del Corredor Biológico OMEGA abarcando un área de 282.560 ha. El estero se clasifica como Bosque Húmedo Subtropical, cuenta con una masa boscosa semi-densa en sus bosques aluviales y densa en las zonas de manglar. Presenta una vegetación típica de bosque de planicie costera, predominando las especies: “Maquilishuat” *Tabebuia rosea*, “Flor de mayo” *Plumeria rubra*, “Cojón” *Thevetia ovata*, “Conacaste” *Enterolobium cyclocarpum*, “Polvo de queso” *Albizia spp*, “Ceiba” o “Ceibón” *Ceiba pentandra*, “Bonete” *Luehea candida*, “Caulote” *Guazuma ulmifolia* y “Amates” *Ficus spp*. (Reyna *et al.*, 1996 citado por [http//8](#)); y posee una extensa zona de bosque de manglar presentando en las zonas externas del bosque y en las orillas de los canales las especies: “Mangle colorado” (*Rhizophora mangle*), “Mangle rojo” (*Rhizophora racemosa*), “Sincahuite” (*Laguncularia racemosa*) y “Mangle negro” (*Avicennia bicolor*), en las zonas internas del manglar, donde los suelos se encuentran más consolidados, se encuentra “Botoncillo” (*Conocarpus erectus*) y “Madre sal” (*Avicennia germinans*). (Tejada, 2004 citado por [http//8](#)). El bosque de manglar o bosque salado están conformados por una gran cantidad de sistemas de canales y playones inundables ([http//8](#)).

4.3 DESCRIPCION DEL ESTUDIO

El estudio es de tipo descriptivo y transeccional; es descriptivo debido a que no se manipulan deliberadamente ninguna variable, se observaron los fenómenos en su contexto natural para después ser analizados; y es transeccional, porque los datos se colectaron en un solo momento en un tiempo único.

4.3.1 Fase de Campo:

Durante la fase de campo se realizaron tres viajes de campo al Estero de Jaltepeque, el primero con el fin de identificar los puntos de muestreo, donde se establecieron ocho puntos (ver figura 6 y cuadro 4), los cuales fueron seleccionados con base a la mayor ocurrencia y

extracción de Bivalvos. El segundo (13 de noviembre de 2006) y el tercer viaje (11 de diciembre de 2006) se realizaron con el objetivo de tomar muestras; estos se realizaron por la mañana con marea baja, para su fácil extracción.

Se recolectó una muestra por cada punto de muestreo (8 muestras por muestreo, 16 en total), equivalente a 12 “curiles” (*Anadara* spp), cantidad requerida o necesaria según la OPS & OMS (1994) para el análisis bacteriológico; además se realizaron mediciones de algunos parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad y pH) para conocer si las condiciones son óptimas para el desarrollo de los vibrios. Para ello se recolectaron muestras de agua en cada punto de muestreo, esto en el caso de salinidad y pH; la temperatura fue tomada *in situ*.



Figura 6. Ubicación de puntos de muestreo.
Fuente: googleearth.com

Cuadro 4. Puntos de muestreo georreferenciados

Nº	Lugar de muestreo	Georreferencia**
1	Santo Domingo*, Cantón Tasajera (anexo21)	13°17'15.37"N 88°52'0.40"O
2	Santa Cruz*, Cantón Tasajera (anexo22)	13°18'29.30"N 88°52'58.74"O
3	Cañón El Quemado*, Cantón La Calzada (anexo23)	13°19'03.90"N 88°54'26.01"O
4	Tronconera*, Cantón La Calzada (anexo24)	13°19'37.72"N 88°55'25.81"O
5	Escobal*, Cantón El Escobal	13°20'06.02"N 88°55'47.63"O
6	El Muelle*, La Herradura (anexo25)	13°20'44.54"N 88°56'51.48"O
7	El Conchal*, La Herradura (anexo 26)	13°19'32.99"N 88°56'42.59"O
8	Los Blancos*, Cantón Los Blancos (anexo 27)	13°19'57.36"N 88°57'59.41"O
* Estos nombres son asignados por los “curileros” a los sitios de extracción de los “curiles o conchas”		
**Fuente: Google earth, agosto 2006		

4.3.1.1 Toma y transporte de las muestras:

La toma y el transporte de las muestras se realizaron bajo las condiciones de asepsia recomendadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas de cierres herméticos debidamente rotuladas con los siguientes datos: fecha de muestreo, zona de muestreo, número de muestra y hora de extracción de la muestra (ver anexo 4). Las muestras se transportaron en hieleras a 4 °C (debido a que los *Vibrios* sobreviven mejor a dicha temperatura) a la sección de Bacteriología del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (anexo 5); donde se procesaron inmediatamente.

4.3.2 Fase de laboratorio:

4.3.2.1 Preparación de medios de cultivo:

Los medios de cultivos se prepararon con anticipación a la toma de muestras, utilizando preparaciones deshidratadas que se obtienen comercialmente, siguiendo las respectivas instrucciones que trae cada frasco (anexo 6-A). Los medios que se utilizaron son los siguientes: Agua Peptonada Alcalina (APA); Agar Tiosulfato, Citrato, Sales biliares y Sacarosa (TCBS); Agar Tres Azúcares (TSI) de plano inclinado; Agar Sangre; Agar Gelatina con 0% de NaCl; Agar Gelatina con 1% de NaCl, medio para movilidad, caldos de descarboxilasa y dihidrolasa.

- **Agua Peptonada Alcalina (APA):** El APA o medio de enriquecimiento utilizado se elaboró con una preparación deshidratada de la marca Difco, este se modificó por el investigador, adicionándole 5 g de NaCl.

Para preparar 1000 mL de dicho medio se utilizaron los siguientes ingredientes: 10 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 1000 mL de agua destilada estéril. En un balón de fondo plano, con capacidad de 2000 mL (siempre que se prepara un medio de cultivo, se debe utilizar cristalería con una capacidad doble del medio que se esta preparando), se colocó el agua destilada, la peptona y el NaCl; luego se ajustó a un pH de 8.5 con solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 1 N, posteriormente se distribuyó en frascos estériles (225 mL) y en tubos de ensayo (9mL), para ser llevados al autoclave a 121 °C durante 15 minutos, cerciorándose que las tapas se encontraran un poco flojas; al salir del autoclave se apretaron las tapas de los frascos y los tubos para evitar que, disminuyera el pH, se evaporara la solución o se contaminara; luego se guardaron en refrigeración a 5 °C. (Anexo 6-B).

- **Agar Tiosulfato, Citrato, Sales biliares y Sacarosa (TCBS):** Para la preparación de este medio se siguieron las instrucciones del productor (casa Difco). En un balón de fondo plano se colocó, 1000 mL de agua destilada estéril y se le agregó 89 g de agar TCBS, se agitó y se llevó a ebullición (no se necesita llevar al autoclave), luego se dejó enfriar en baño de María a 49 °C para ser vertido en cajas petri, las cuales al enfriarse se guardaron a una temperatura de 5 °C. (Anexo 6-B).

- **Agar Gelatina (0% y 1% de NaCl):** Para la preparación del agar gelatina 1% de NaCl se utilizó lo siguiente: 1000 mL de agua destilada estéril, 15.0 g de agar-agar (casa Merck), 15.0 g de gelatina (casa Difco), 4.0 g de peptona (casa Difco), 1.0 g de levadura y 10.0 g de NaCl. En un balón de fondo plano se mezcló todo lo antes mencionado y se llevó a ebullición, agitándose constantemente; luego se ajustó a un pH de 7.3 con solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 1 N; posteriormente se llevó al autoclave a 121 °C por 15 minutos, al salir del autoclave se enfriaron en baño de maría a 49 °C y se vertieron en cajas petri hasta su solidificación para luego guardarse a una temperatura de 5 °C. (Anexo 6-B). En la preparación del agar gelatina sin sal no se agregó los 10.0 g de NaCl.

- **Agar Tres Azúcares (TSI) de plano inclinado:** Para elaborar un litro de este medio se pesaron 64.6 g (casa PRONADISA) de agar tres azúcares, se agregaron a un balón de fondo plano que previamente se le había colocado un litro de agua destilada estéril, se llevó a ebullición, luego se distribuyó en tubos de ensayo (con capacidad de 8.0 mL), la cantidad de 4.5 mL por tubo; posteriormente se llevaron al autoclave a una temperatura de 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos (con las taparrosas poco apretadas), inmediatamente al salir del autoclave se sellaron bien las tapas y se colocaron todos los tubos de ensayo en una posición inclinada para formar un bisel de aproximadamente unos 3 centímetros, se dejaron enfriar hasta solidificarse y se guardaron a una temperatura de 5 °C. (Anexo 6-B).

- **Agar Sangre:** Para elaborar este medio se utilizó como base: agar base sangre (casa Difco), además se utilizó sangre de carnero (marca SUMIBI) y un L de agua destilada estéril. Se pesaron 38 g de agar base sangre y se agregaron a un balón de fondo plano que contenía un litro de agua destilada estéril, se llevó a ebullición y luego se llevó al autoclave a una temperatura de 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos. Se dejó enfriar en baño de maría a una temperatura de 49 °C, posteriormente se le agregó 25 mL de sangre de carnero (cerca del mechero), se agitó con cuidado para evitar la formación de burbujas; luego se vertieron en cajas petri y se guardaron a una temperatura de 5 °C.

- **Agar Movilidad:** Para elaborar este medio se pesaron 20 g de agar movilidad (casa Difco), estos se agregaron a un litro de agua destilada estéril, se agitó y se llevó a ebullición; posteriormente se distribuyó en tubos de ensayo la cantidad de 4 mL por tubo (con capacidad

de 8 mL), se llevaron a ebullición; luego se llevaron al autoclave a una temperatura de 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos, se dejaron enfriar (solidificar) y se guardaron a una temperatura de 5 °C. (Anexo 6-B).

- **Caldos de descarboxilasa y dihidrolasa (aminoácidos: arginina, lisina y ornitina):** Para preparar los caldos de descarboxilasa y dihidrolasa se pesaron 10.5 g de base Möller (de la casa Difco) y se agregaron a un balón de fondo plano, que previamente se le había colocado 1,000 mL de agua destilada estéril, a este se le agregaron 10 g de Cloruro de Sodio, se agitaron para mezclar los ingredientes; esta mezcla se distribuyó en cuatro matraces (250 mL en cada uno), al primer matraz se le agregó 2.5 g de L-arginina (casa Difco), al segundo se le agregó 2.5 g de L-lisina (casa Sigma), al tercero 2.5 g de L-ornitina y al cuarto matraz no se le agregó ningún aminoácido (sirvió como control). Todos los matraces se llevaron al calor (suave) para su disolución y se ajustaron a un pH (con NaOH 1 N) de 6.0. Se vertieron 4 mL en cada tubo de ensayo con tapón de rosca debidamente rotulados para evitar confusión; luego se llevaron al autoclave durante 10 minutos a 121 °C y posteriormente se guardaron a una temperatura de 5° C. (Anexo 6-B).

4.3.2.2. Preparación de reactivos:

- **Oxidasa:** Este reactivo se preparó al instante en que se realizó la prueba; para ello se utilizó 10 mL de agua destilada y una pizca del reactivo Tetrametil-p-fenilendiamina; luego se llevó al vórtex para mezclar los componentes. El reactivo quedó incoloro o ligeramente violeta.

- **Desoxicolato de Sodio al 0.5%:** Este reactivo se preparó con anticipación a la prueba. En un matraz de 200mL se colocó 5.0g del reactivo desoxicolato de sodio, a este se le agregó 100 mL de agua destilada estéril y se agitó hasta mezclar los componentes; posteriormente se almacenó en frascos con goteros, y estos se guardaron a una temperatura de 5° C hasta su utilización.

4.3.2.3 Análisis bacteriológico:

Para realizar el análisis bacteriológico se siguió la metodología establecida por la OPS para el diagnóstico de vibrios partiendo de muestras de moluscos bivalvos. (OPS/OMS, 1994). (Ver anexo 7).

4.3.2.3.1 Preparación de las muestras:

Para la muestra obtenida de cada punto de muestreo se realizó lo siguiente: Se retiró y se combinó la carne de los 12 moluscos, incluyendo el líquido de la concha y se homogenizó en una licuadora convencional estéril, de ésta mezcla se agregaron 25 g a un frasco que previamente contenía 225 mL de agua peptonada alcalina (dilución 10^{-1}); luego se prepararon dos diluciones décuplas de 10^{-2} y 10^{-3} (3 diluciones de cada muestra) de las muestras en agua peptonada alcalina. De las diluciones mencionadas se prepararon duplicados, esto se realizó con el fin de incubar un lote a 36°C y el otro lote a 42°C ; este último se realizó para mejorar las probabilidades de aislar *Vibrio cholerae*, ya que según OPS & OMS (1994) crece perfectamente a esta temperatura. En general para cada una de las 8 muestras obtenidas de cada muestreo se prepararon 6 diluciones de cada muestra (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , más sus duplicados), es decir 48 diluciones por muestreo (24 incubadas a 36°C y 24 incubadas a 42°C), para hacer un total de 96 diluciones entre los dos muestreos (48 incubadas a 36°C y 48 incubadas a 42°C). (Ver figura 7)

4.3.2.3.2 Incubación en APA y en TCBS:

Se incubaron las muestras en el agua peptonada alcalina (APA) de todas las diluciones con las tapas de todos los frascos y tubos de dilución poco apretadas. El primer lote se incubó a una temperatura de 36°C , el segundo lote se incubó a 42°C , durante 6 horas.

Terminado el tiempo de incubación, se transfirió un inóculo tomado de la parte superior de cada frasco y de cada tubo a agar TCBS (contenidos en placas petri) mediante estriación, teniendo cuidado de no agitar los frascos y los tubos; ya que los vibrios migran preferentemente a la superficie del agua, formando una especie de nata en agua peptonada alcalina.

Las placas de TCBS se incubaron durante 18 a 24 horas a una temperatura de 36°C .

4.3.2.3.3 Detección de Vibrios: Aislamiento e identificación presuntiva

4.3.2.3.3.1 Lectura de TCBS:

Pasado el periodo de incubación de las placas de TCBS, se examinaron y se observó crecimiento bacteriano; pero sólo se seleccionaron las colonias con las características típicas de los vibrios en el agar, las cuales son: amarillas y verdes de 1.5 a 4 mm de diámetro, ligeramente aplanadas, con el centro opaco y la periferia traslúcida (anexo 8). Dicho medio es

inhibitorio para muchas bacterias; pero es excelente para la identificación presuntiva de los vibrios aunque la morfología se puede confundir con miembros del género *Aeromonas*, por lo que se contó con una cepa de *Vibrio cholerae* O1, serotipo Ogawa como cepa de referencia. El color amarillo se debe a la fermentación de la sacarosa en el medio (*V. cholerae*) y el color verde (que puede variar a azul-verde), se debe a que hay vibrios que no fermentan la sacarosa, como es el caso de *V. parahaemolyticus*.

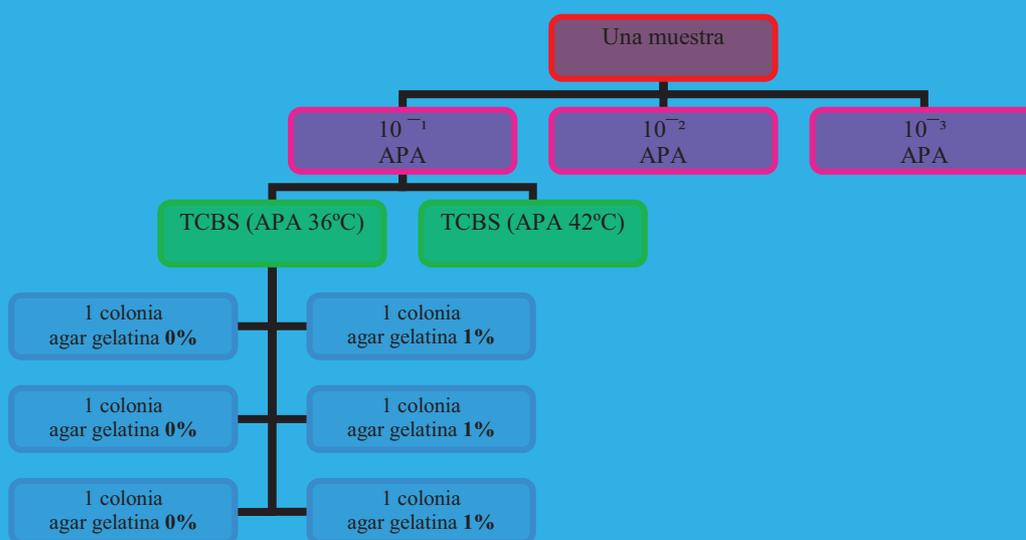
De las colonias presuntas se hicieron resiembra a los medios no inhibitorios: Agar gelatina con 0% de NaCl y 1% NaCl y agar tres azúcares (TSI).

4.3.2.3.3.2 Agar gelatina:

Se seleccionaron tres colonias presuntas de vibrios (cultivadas previamente en TCBS), cada una de estas se resembraron en dos placas de agar gelatina, una conteniendo 0 % de NaCl y la otra con 1 % de NaCl. Se incubaron a 36 °C por 18 a 24 horas. (Ver figura 7).

Transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento bacteriano de las dos placas, observándose que solo en el medio que contenía 1% de NaCl había crecimiento bacteriano. Además alrededor de las colonias, se observó una zona opaca parecida a un halo (anexo 9).

Figura 7. Organigrama interpretativo para la obtención de las placas de TCBS y Agar Gelatina para cada muestra. Para cada muestra se hicieron tres diluciones en APA y de estas se hicieron duplicados (una incubada a 36 °C y la otra incubada a 42 °C), para cada dilución se hicieron dos resiembras en placas de agar TCBS, de cada placa de TCBS se hizo resiembra a 3 placas de agar gelatina 0% de NaCl y a 3 placas de agar gelatina 1% de NaCl.



4.3.2.3.3.3 Tinción de Gram:

De las colonias presuntivas del género *Vibrio* obtenidas del medio de agar gelatina 1 % de NaCl, se preparó un frotis fijado al calor para realizar la técnica de Tinción de Gram, la cual se hizo de la siguiente manera:

1. Se cubrió el frotis con solución de cristal violeta por 60 segundos.
2. Se lavó con agua de chorro, luego se escurrió.
3. Se cubrió el frotis con solución de lugol para Gram por 60 segundos.
4. Se lavó con agua de chorro, luego se escurrió.
5. Se cubrió el frotis con solución de alcohol – acetona hasta decolorar el frotis.
6. Se lavó con agua de chorro, luego se escurrió.
7. Se cubrió con solución de safranina por 30 segundos.
8. Se lavó con agua de chorro y se dejó secar, para su posterior observación al microscopio a un aumento de 100 X.

Se observaron bacilos Gram negativos, bacilares, cocobacilares curvos y rectos.

4.3.2.3.3.4 Pruebas bioquímicas

4.3.2.3.3.4.1 Prueba de la oxidasa:

Para realizar esta prueba se colocó una tira de papel filtro en una placa petri y se añadió unas gotas de reactivo de oxidasa (tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1 %), luego con un palillo estéril se extrajo una colonia presuntiva del medio agar gelatina con 1% de NaCl y se frotó sobre el papel filtro impregnado del reactivo; las colonias presuntivas presentaron una reacción positiva; ya que se tornaron de color morado inmediatamente (ver anexo 10). Para realizar esta prueba se utilizaron dos microorganismos control: *Escherichia coli* 25922 que da la prueba negativa y *Pseudomonas aeruginosa* 27853 que da la prueba positiva, estos controles se utilizan para saber si esta funcionando correctamente el reactivo. Los vibrios dan positiva esta prueba, a excepción de *V. metschnikovii*, que da la prueba negativa.

4.3.2.3.3.4.2 Prueba del collar:

En un portaobjeto se colocó una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5 % y con un palillo estéril se extrajo una colonia del medio agar gelatina al 1 % de NaCl, esta se suspendió en la solución mencionada. En los resultados positivos, la mezcla se hizo viscosa; al retirar lentamente el palillo, se formó un hilo mucoide semejante a un collar de

perlas. En los resultados negativos la mezcla no se hizo viscosa por lo que no se formó el hilo mucoso. Los vibrios dan positiva esta prueba (ver anexo 11).

4.3.2.3.3.4.3 Movilidad:

Con un asa en aguja se tocó una colonia y se introdujo al medio por medio de picadura, teniendo cuidado de no mover el asa al sacarla del medio para evitar una falsa lectura. Se incubó a 35° C por 18 a 24 horas. La prueba es positiva si se observa turbidez alrededor de la picadura, si es negativa no hay turbidez (ver anexo 12).

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos. En el caso de los vibrios la prueba es positiva; ya que todos los vibrios son móviles.

4.3.2.3.3.4.4 Agar Tres Azúcares (TSI):

Para realizar esta prueba se utilizaron medios TSI de plano inclinado, estos se inocularon por medio de picadura y estriación. Con un asa en aguja se tocó una colonia y se introdujo al medio (sin llegar al fondo del tubo), e inmediatamente se sacó y se estrió la parte del bisel. Los tubos se incubaron a una temperatura de 35° C por 18 a 24 horas, teniendo cuidado de no apretar la tapa de los tubos, ya que se pueden crear condiciones de anaerobiosis y pueden ocurrir reacciones inapropiadas.

Esta prueba se utilizó para diferenciar a miembros del género vibrio de las enterobacterias, en la cual se observa lo siguiente:

- Si se observa una coloración amarilla en todo el medio se dice que es una reacción ácida sobre ácida (A/A); si da una coloración rosada sobre amarilla es una reacción alcalina sobre ácida (K/A).
- También sirve para observar la formación de gas: La prueba es positiva cuando hay ruptura o levantamiento de agar, en caso contrario es negativa.
- Formación de ácido sulfhídrico (H₂S): Si se observa una coloración negra en el medio, indica la presencia de producción de este compuesto.

Las muestras analizadas presentaron la siguiente reacción: A/A y K/A, no producción de gas, ni producción de H₂S (ver anexo 13), característico de los vibrios.

4.3.2.3.3.4.5 Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa:

Para realizar estas pruebas, se utilizaron caldos que contenían los aminoácidos: arginina, lisina y ornitina; modificados por la adición de 1% de NaCl. A cada tubo se inoculó ligeramente con un cultivo recién obtenido; luego se le agregó una capa de aceite mineral estéril de 4 a 5 mm de espesor y se incubó a una temperatura de 35 °C por 24 a 48 horas. Si la reacción es positiva (alcalina) se forma un color morado en todo el medio, si la reacción es negativa (ácida) se forma un color amarillo. Se utilizó un tubo testigo para validar la prueba (color amarillo). Las diferentes reacciones de los vibrios a éstas pruebas se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Reacciones de los miembros del género *Vibrio* a la descarboxilasa y dihidrolasa

Reacción de la especie	Dihidrolasa de arginina	Descarboxilasa de lisina	Descarboxilasa de ornitina
<i>V. cholerae</i>	-	+	+
<i>V. mimicus</i>	-	+	+
<i>V. metschnikovii</i>	v	v	-
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	v	-
<i>V. hollisae</i>	-	-	-
<i>V. damsela</i>	+	v	-
<i>V. fluvialis</i>	+	-	-
<i>V. furnissii</i>	+	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	v
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>V. vulnificus</i>	-	+	v
<i>V. carchariae</i>	-	+	-

Fuente: OPS & OMS, 1994

4.3.2.3.4 Pruebas serológicas para la identificación de *V. cholerae* O1

4.3.2.3.4.1 Aglutinación en lámina

4.3.2.3.4.1.1 Solución salina:

En un portaobjeto se colocó una gota de solución salina; con un palillo estéril se extrajo una colonia y se mezcló muy bien con la solución salina mediante movimientos de

balance de la lámina hacia adelante y hacia atrás durante 30 segundos; luego se examinó la suspensión cuidadosamente para comprobar que fuese uniforme y no tuviera grumos. Si se observa aglutinación, el cultivo se considera “rugoso” y por lo tanto no se puede serotipificar; cuando esto sucede se hacen tres resiembras en agar sangre, esto se realiza con la finalidad de volver lisa a la cepa, y así volver a realizar la aglutinación. Al no observarse aglutinación se realizó la aglutinación con antisuero polivalente.

4.3.2.3.4.1.2 Antisuero polivalente para *V. cholerae* O1:

Se colocó una gota de dicho antisuero en una lámina; con un palillo estéril se extrajo una colonia y se mezcló muy bien mediante movimientos de balance de la lámina hacia adelante y atrás durante 30 segundos. No se observó aglutinación, por lo que no fue necesario utilizar los antisueros monovalentes.

4.3.2.3.4.1.3 Antisuero para *V. cholerae* O139:

Al dar negativa la aglutinación del antisuero polivalente se procedió a la aglutinación con el antisuero O139; la cual fué negativa.

4.3.2.3.5 Identificación de las especies de vibrios con API 20 E y API 20 NE:

Para realizar estas pruebas se utilizaron test miniaturizados que se obtienen comercialmente, los cuales constan de 20 microtubos que contienen substratos deshidratados; estos tests se inocularon con una suspensión bacteriana la cual hidrató al medio (ver anexo 14); luego se incubaron por 18 a 24 horas a una temperatura de 35-37 °C. Durante la incubación se produjeron cambios de color espontáneos y también por adición de reactivos (ver anexo 15); en el caso del api 20 NE hay microtubos que se leen de acuerdo a la turbidez. La lectura de las reacciones se hizo de acuerdo con la tabla de lectura (ver anexo 2 y 3), obteniéndose con ésta una serie de números que al ser sumados dan un número específico llamado: bionúmero, éste bionúmero se buscó en el API 20 E Index y API 20 NE Index respectivamente para la identificación de los vibrios patógenos. Cada test trae una hoja para anotar los resultados (ver anexo 16).

4.3.2.4 Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana o Antibiograma:

Para realizar esta prueba se utilizó el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer); este es el método aceptado y recomendado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). (ASM & OPS 2005).

Se realizó una suspensión directa de la colonias previamente identificadas en solución salina al 0.85% a partir de un cultivo de agar no selectivo (Agar Sangre) de 18 a 24 horas de incubación, el cual se ajustó a una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. De la suspensión realizada, con un hisopo se inoculó las cajas petri de agar Mueller Hinton por medio de estriación, esta se realizó en tres direcciones a un ángulo de 60° entre cada estriado, para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Sacsquispe, 2002 & Trigos, 2003).

A los 5 minutos de la inoculación, se colocaron los discos de sensibilidad para vibrios halófilos que recomienda el CLSI para el antibiograma (ver cuadro 6) sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o un dispensador, presionando suavemente y uniformemente cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar, luego se incubaron a 35° C por 18 a 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se leyeron con un escalímetro los halos de inhibición que resultaron como efecto de la acción ejercida por los discos (ver anexo 17); y estos halos se interpretaron utilizando la tabla 14 del documento M45-P del CLSI (ver anexo 18) para medir la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos.

Cuadro 6. Discos de sensibilidad antimicrobiana y carga recomendados por el CLSI para vibrios halófilos

Antimicrobiano	Carga del disco
Ampicilina	10 µg
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10 µg
Piperacilina	100 µg
Cefotaxima	30 µg
Cefalotin	30 µg
Imipenem	10 µg
Gentamicina	30 µg

Tetraciclina	30 µg
Ciprofloxacina	30 µg
Cloranfenicol	30 µg
Trimetoprim-sulfametoxazol	1.25/23.75 µg

Fuente: CLSI, 2006

4.3.2.5 Almacenamiento de cepas:

Las cepas bacterianas identificadas se alícuotaron en viales llamados “crioviales o cryo bank”, estos viales contienen perlas de cerámica y una solución específica de preservación. El almacenamiento se realizó de la siguiente manera:

1º Se rotularon los crioviales con el nombre de la cepa, fecha de alicuotación y lugar de procedencia (ver anexo 19).

2º Con un hisopo estéril se extrajeron unas colonias (de una resiembra en agar TCBS) y se introdujeron al criovial, luego se agitaron para diluir la cepa, posteriormente se descartó el exceso del medio, teniendo cuidado de no descartar las perlas, inmediatamente se taparon los crioviales para evitar contaminación y se guardaron en el freezer a -70° C para su preservación.

4.3.3 Medición de parámetros físico-químicos.

En cada punto de muestreo se recolectaron muestras de agua en frascos estériles, estos se introdujeron al agua hasta obtener el volumen de un litro; luego se llevaron al Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” para conocer los parámetros de salinidad y pH. La temperatura fue tomada directamente en el agua del lugar de estudio. Los parámetros mencionados se realizaron con el objetivo de conocer si estos se encuentran en los rangos óptimos para la sobrevivencia de los vibrios

- **Temperatura:** Se utilizó un termómetro con capacidad de 60° C (ver anexo 20).
- **Salinidad:** Se determinó por el método Argentométrico para la determinación de cloruros en aguas.
- **pH:** Este dato se obtuvo mediante un pHmetro digital modelo Sension 4.

V. ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar el significado estadístico de los resultados que se obtuvieron de la identificación de vibrios, se realizaron las siguientes proporciones. (MSPAS, 2006).

- ▶ El porcentaje de positividad de la muestras.

$$\frac{\text{Muestras positivas} \times 100}{\text{Muestras totales}}$$

- ▶ El porcentaje de cepas aisladas por punto de muestreo.

$$\frac{\text{Cepas aisladas por punto de muestreo} \times 100}{\text{Total de cepas aisladas en todo el muestreo}}$$

- ▶ El porcentaje que presenta cada especie identificada en las muestras totales.

$$\frac{\text{Especie identificada} \times 100}{\text{Muestras totales}}$$

Los dos últimos se representaron en tablas y gráficos para su mayor comprensión; al igual que los parámetros físico-químicos.

VI. RESULTADOS

De las 16 muestras obtenidas y procesadas de los dos muestreos, incubadas en agar TCBS, se observó crecimiento bacteriano con la morfología típica de las colonias de vibrios en las 48 placas incubas a 36°C, obteniéndose en su mayoría colonias verdes “no fermentadoras de sacarosa” de aproximadamente 3 mm de diámetro; sin embargo en las que se incubaron a 42 °C, se obtuvo poco crecimiento bacteriano; ya que de las 48 placas sembradas, sólo crecieron en 15 placas (14 y 1 en el primer y segundo muestreo respectivamente). Resultando al final 63 placas con colonias presuntivas de vibrios (ver cuadro 7 y 8); de cada una de estas placas se seleccionaron 3 colonias para resiembra en agar gelatina 0% NaCl y agar gelatina 1% de NaCl. Obteniéndose un lote de 189 placas de agar gelatina 0% NaCl y un lote de 189 placas de agar gelatina 1% de NaCl.

Cuadro 7. Lectura de placas de agar TCBS incubadas a 36 °C y 42 °C, del primer muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	TCBS		
	Dilución	36 °C	Replica a 42 °C
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻³	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
2) Santa cruz	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻²	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
4) Tronconera	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
5) El Escobal	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
6) El Muelle	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
8) Los Blancos	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
Total		24 placas (24 colonias presuntivas)	24 placas (14 colonias presuntivas)
TOTAL= 48 PLACAS			
“-“ No hubo crecimiento bacteriano			

Cuadro 8. Lectura de placas de agar TCBS incubadas a 36 °C y 42 °C, del segundo muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	TCBS		
	Dilución	36 °C	42 °C
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
2) Santa cruz	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	Colonias verdes de 3mm de diámetro
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias amarillas de 3mm de diámetro	-
4) Tronconera	10 ⁻¹	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
5) El Escobal	10 ⁻¹	Colonias amarillas de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
6) El Muelle	10 ⁻¹	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias amarillas y verdes, cremosas de 3mm de diámetro	-
8) Los Blancos	10 ⁻¹	Colonias amarillas y verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻²	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
	10 ⁻³	Colonias verdes de 3mm de diámetro	-
Total		24 placas (24 colonias presuntivas)	24 placas (1 colonia presuntiva)
TOTAL= 48 PLACAS			
“-“ No hubo crecimiento bacteriano			

De un total de 189 placas resultantes de agar gelatina 0% de NaCl y 189 placas de agar gelatina 1% de NaCl, sólo se obtuvo crecimiento bacteriano en el medio que contenía 1% de NaCl. Alrededor de las colonias, se observó una zona opaca parecida a un halo, por lo

que se asumió la presencia de vibrios; ya que estos producen gelatinasa, una enzima que degrada la gelatina, produciendo la zona opaca mencionada.

Con respecto a la tinción de Gram de las colonias presuntas, se observaron bacilos cortos y curvos; además se identificaron algunos en forma cocoide, todos Gram negativos.

A las 189 placas que resultaron positivas al agar gelatina 1% de NaCl, se les realizó prueba de oxidasa, obteniéndose un 100% de positividad a esta prueba. A estas (oxidasa positivas), se les realizó prueba del collar, obteniéndose 83 placas positivas, haciendo una positividad del 43.9%. Es importante mencionar que los resultados positivos se dieron en los 8 puntos de muestreo; pero no en todas las diluciones (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados positivos de la prueba del collar en las muestras analizadas, en los dos muestreos. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	PRUEBA DEL COLLAR				
	Dilución*	Primer muestreo		Segundo muestreo	
		36 °C	42 °C	36 °C	42 °C
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	0	-	3	-
	10 ⁻²	3	3	3	-
	10 ⁻³	0	3	0	-
2) Santa cruz	10 ⁻¹	0	3	3	-
	10 ⁻²	0	3	0	3
	10 ⁻³	3	0	0	-
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	3	-	3	-
	10 ⁻²	0	-	0	-
	10 ⁻³	0	-	3	-
4) Tronconera	10 ⁻¹	0	0	0	-
	10 ⁻²	0	3	0	-
	10 ⁻³	3	0	3	-
5) El Escobal	10 ⁻¹	3	-	3	-
	10 ⁻²	0	-	0	-
	10 ⁻³	0	-	0	-
6) El Muelle	10 ⁻¹	0	-	3	-
	10 ⁻²	3	-	0	-
	10 ⁻³	0	-	0	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	0	3	3	-
	10 ⁻²	0	3	1	-
	10 ⁻³	0	0	3	-
8) Los Blancos	10 ⁻¹	2	0	3	-
	10 ⁻²	0	2	0	-
	10 ⁻³	0	0	3	-
Total		20	23	37	3
Total de positivos en todas las muestras= 83					
* Por cada dilución son 3 placas de agar gelatina incubadas, haciendo un total de 189 placas de agar gelatina 0% y 189 placas de agar gelatina 1%					
-: Los guiones significan que no se realizó la prueba por no haber crecimiento bacteriano, revisar cuadros 7 y 8					

Con respecto a la prueba de movilidad, el 100% resultaron positivas; ya que de las 83 placas positivas a la prueba del collar, todas resultaron mótils. Ver cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de movilidad, realizadas a las colonias positivas a la prueba del collar. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	PRUEBA DE MOVILIDAD				
	Dilución*	Primer muestreo		Segundo muestreo	
		36 °C	42 °C	36 °C	42 °C
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	0	-	3	-
	10 ⁻²	3	3	3	-
	10 ⁻³	0	3	0	-
2) Santa cruz	10 ⁻¹	0	3	3	-
	10 ⁻²	0	3	0	3
	10 ⁻³	3	0	0	-
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	3	-	3	-
	10 ⁻²	0	-	0	-
	10 ⁻³	0	-	3	-
4) Tronconera	10 ⁻¹	0	0	0	-
	10 ⁻²	0	3	0	-
	10 ⁻³	3	0	3	-
5) El Escobal	10 ⁻¹	3	-	3	-
	10 ⁻²	0	-	0	-
	10 ⁻³	0	-	0	-
6) El Muelle	10 ⁻¹	0	-	3	-
	10 ⁻²	3	-	0	-
	10 ⁻³	0	-	0	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	0	3	3	-
	10 ⁻²	0	3	1	-
	10 ⁻³	0	0	3	-
8) Los Blancos	10 ⁻¹	2	0	3	-
	10 ⁻²	0	2	0	-
	10 ⁻³	0	0	3	-
Total		20	23	37	3
Total de positivos en todas las muestras= 83					
-: Los guiones significan que no se realizó la prueba por no haber crecimiento bacteriano, revisar cuadros 7 y 8					

Los resultados de los tubos TSI se detallan los cuadros 11-a, 11-b, 11-c y 11-d; observándose en la mayoría, una reacción ácido sobre ácido “A/A” (coloración amarilla en todo el medio), aunque puede observarse una reacción alcalino sobre ácido (K/A) en algunos tubos. Además no se observó producción de gas, ni de ácido sulfhídrico (H₂S).

**Cuadro 11-a. Lecturas de los tubos de TSI del primer muestreo incubados a 36°C.
Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.**

Puntos de muestreo	TSI (36 °C)			
	Dilución	Fermentación de azúcares	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico
1) Santo Domingo	10 ⁻²	1	K/A	-
		2	A/A	-
		3	A/A	-
2) Santa cruz	10 ⁻³	1	A/A	-
		2	A/A	-
		3	A/A	-
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	1	A/A	-
		2	A/A	-
		3	A/A	-
4) Tronconera	10 ⁻³	1	K/A	-
		2	A/A	-
		3	A/A	-
5) El Escobal	10 ⁻¹	1	A/A	-
		2	A/A	-
		3	A/A	-
6) El Muelle	10 ⁻²	1	K/A	-
		2	A/A	-
		3	A/A	-
8) Los Blancos	10 ⁻¹	1	A/A	-
		2	A/A	-
-: Negativo				

**Cuadro 11-b. Lecturas de los tubos de TSI del primer muestreo incubados a 42°C.
Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.**

Puntos de muestreo	TSI (42 °C)				
	Dilución		Fermentación de azúcares	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico
1) Santo Domingo	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻³	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
2) Santa cruz	10 ⁻¹	1	K/A	-	-
		2	K/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
4) Tronconera	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
8) Los Blancos	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
-: Negativo					

**Cuadro 11-c. Lecturas de los tubos de TSI del segundo muestreo incubados a 36°C.
Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.**

Puntos de muestreo	TSI (36 °C)				
	Dilución		Fermentación de azúcares	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻²	1	K/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
2) Santa cruz	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻³	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
4) Tronconera	10 ⁻³	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
5) El Escobal	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
6) El Muelle	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	1	K/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻³	1	A/A	-	-
2		A/A	-	-	
3		A/A	-	-	
8) Los Blancos	10 ⁻¹	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
	10 ⁻³	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
-: Negativo					

**Cuadro 11-d. Lecturas de los tubos de TSI del segundo muestreo incubados a 42°C.
Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.**

Puntos de muestreo	TSI (42 °C)				
	Dilución	Fermentación de azucares	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	
2) Santa cruz	10 ⁻²	1	A/A	-	-
		2	A/A	-	-
		3	A/A	-	-
(-) NEGATIVO					

En los cuadros 12-a, 12-b, 12-c y 12-d, se muestran los resultados a las reacciones de Descarboxilasa y Dihidrolasa.

Cuadro 12-a. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del primer muestreo incubados a 36 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa				
	Dilución	Dihidrolasa de arginina	Descarboxilasa de lisina	Descarboxilasa de ornitina	
1) Santo Domingo	10 ⁻²	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
2) Santa cruz	10 ⁻³	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
4) Tronconera	10 ⁻³	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
5) El Escobal	10 ⁻¹	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
6) El Muelle	10 ⁻²	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
8) Los Blancos	10 ⁻¹	1	-	+	+
		2	-	+	+
POSITIVO: +; NEGATIVO:-					

Cuadro 12-b. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del primer muestreo incubados a 42 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa			
	Dilución	Dihidrolasa de arginina	Descarboxilasa de lisina	Descarboxilasa de ornitina
1) Santo Domingo	10^{-2}	1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
	10^{-3}	1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
2) Santa cruz	10^{-1}	1	-	+
		2	-	+
		3	-	+
	10^{-2}	1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
4) Tronconera	10^{-2}	1	-	-
		2	-	-
		3	-	+
7) El Conchal	10^{-1}	1	-	+
		2	-	+
		3	-	-
	10^{-2}	1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
8) Los Blancos	10^{-2}	1	-	-
		2	-	-
POSITIVO: +; NEGATIVO:-				

Cuadro 12-c. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del segundo muestreo incubados a 36 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa				
	Dilución		Dihidrolasa de arginina	Descarboxilasa de lisina	Descarboxilasa de ornitina
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	1	-	-	-
		2	-	+	+
		3	-	-	-
	10 ⁻²	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
2) Santa cruz	10 ⁻¹	1	-	+	-
		2	-	+	-
		3	-	+	-
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	1	+	-	-
		2	+	-	-
		3	+	-	-
	10 ⁻³	1	+	-	-
		2	+	-	-
		3	+	-	-
4) Tronconera	10 ⁻³	1	-	+	-
		2	-	+	-
		3	-	+	-
5) El Escobal	10 ⁻¹	1	-	+	-
		2	-	+	-
		3	-	+	-
6) El Muelle	10 ⁻¹	1	-	-	-
		2	-	-	-
		3	-	-	-
7) El Conchal	10 ⁻¹	1	+	+	-
		2	+	+	-
		3	+	+	-
	10 ⁻²	1	-	+	+
	10 ⁻³	1	-	+	+
		2	-	+	+
3		-	-	-	
8) Los Blancos	10 ⁻¹	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
	10 ⁻³	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+

POSITIVO: +; NEGATIVO:-

Cuadro 12-d. Lecturas de los tubos de Descarboxilasa y Dihidrolasa del segundo muestreo incubados a 42 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Reacciones de descarboxilasa y dihidrolasa				
	Dilución	Dihidrolasa de arginina	Descarboxilasa de lisina	Descarboxilasa de ornitina	
2) Santa cruz	10 ⁻²	1	-	+	+
		2	-	+	+
		3	-	+	+
POSITIVO: +; NEGATIVO: -					

En cuanto a las pruebas de aglutinación en lámina para la identificación de *Vibrio cholerae* del grupo O1: solución salina, antisuero polivalente y antisuero O139, resultaron negativas. Las aglutinaciones con antisueros monovalentes no se realizaron, debido a la no aglutinación de los vibrios con el antisuero polivalente.

De las 16 muestras analizadas (8 muestras por punto de muestreo) se aislaron cepas de vibrios patógenos en las 16 muestras (100%).

Se aislaron en total 83 cepas de vibrios cuya identificación realizada por las pruebas api 20 E y api 20 NE de cada muestra y de cada dilución de estas, se muestran en los cuadros 13-a, 13-b, 13-c y 13-d.

Cuadro 13-a. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE del primer muestreo incubados a 36 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Dilución	Identificación de las especies de vibrios con las Pruebas api 20 E y api 20 NE
1) Santo Domingo	10 ⁻²	1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
2) Santa cruz	10 ⁻³	1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	1 <i>Vibrio fluvialis</i>
		2 <i>Vibrio fluvialis</i>
		3 <i>Vibrio fluvialis</i>
4) Tronconera	10 ⁻³	1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
5) El Escobal	10 ⁻¹	1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
6) El Muelle	10 ⁻²	1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
8) Los Blancos	10 ⁻¹	1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Cuadro 13-b. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE en el primer muestreo incubados a 42 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Dilución		Identificación de las especies de vibrios con las Pruebas api 20 E y api 20
1) Santo Domingo	10 ⁻²	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	10 ⁻³	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
2) Santa cruz	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	10 ⁻²	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
4) Tronconera	10 ⁻²	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>
7) El Conchal	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>
	10 ⁻²	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>
8) Los Blancos	10 ⁻²	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Cuadro 13-c. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE del segundo muestreo incubados a 36 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Dilución		Identificación de las especies de vibrios con las Pruebas api 20 E y api 20
1) Santo Domingo	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	10 ⁻²	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
2) Santa cruz	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>
3) Cañón El Quemado	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio fluvialis</i>
		2	<i>Vibrio fluvialis</i>
		3	<i>Vibrio fluvialis</i>
	10 ⁻³	1	<i>Vibrio fluvialis</i>
		2	<i>Vibrio fluvialis</i>
		3	<i>Vibrio fluvialis</i>
4) Tronconera	10 ⁻³	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
5) El Escobal	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>
6) El Muelle	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>
7) El Conchal	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio damsela</i>
		2	<i>Vibrio damsela</i>
		3	<i>Vibrio damsela</i>
	10 ⁻²	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	10 ⁻³	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
8) Los Blancos	10 ⁻¹	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	10 ⁻³	1	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		2	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		3	<i>Vibrio alginolyticus</i>

Cuadro 13-d. Vibrios identificados con las Pruebas api 20 E y api 20 NE del segundo muestreo incubados a 42 °C. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

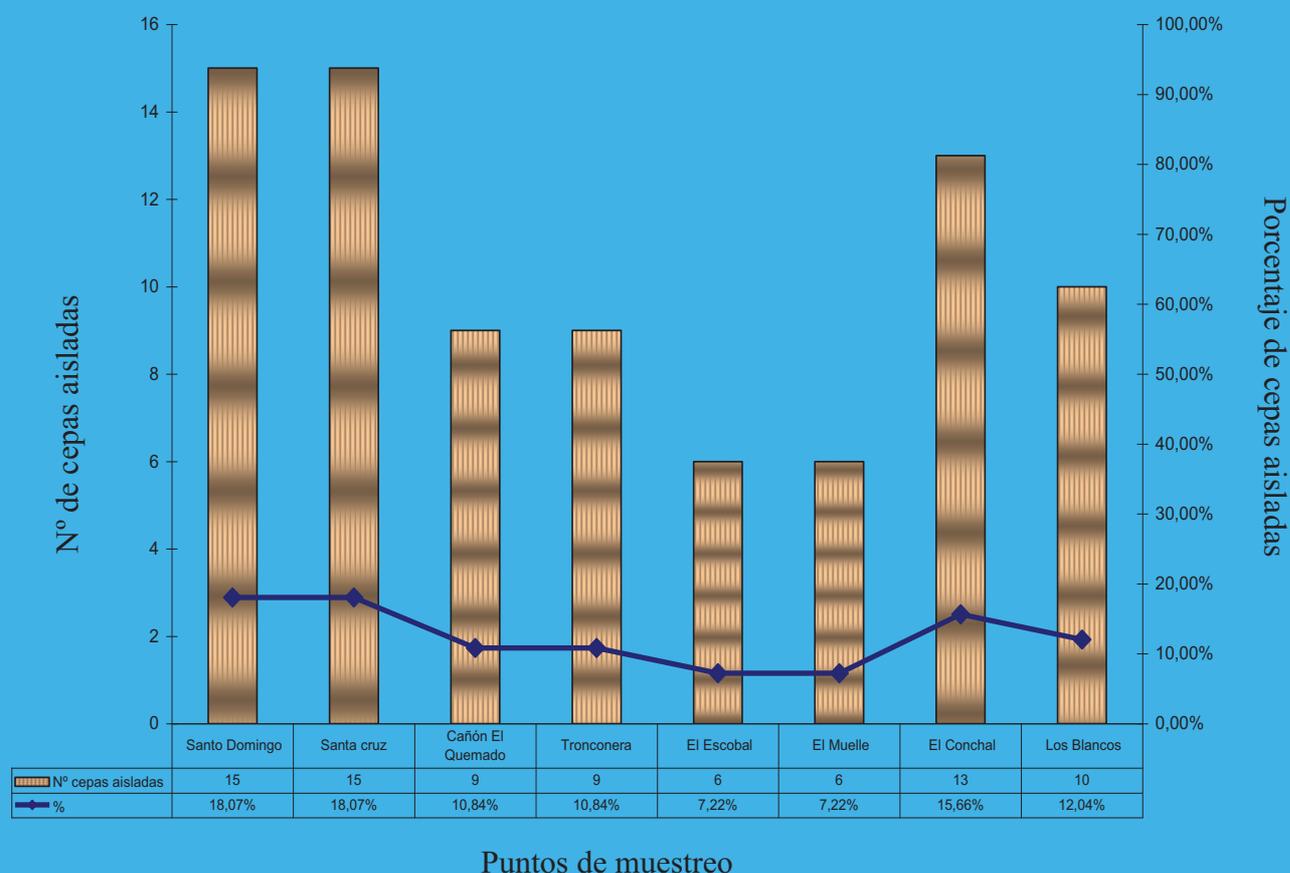
Puntos de muestreo	Dilución		Identificación de las especies de vibrios con las Pruebas api 20 E y api 20 NE
2) Santa cruz	10 ⁻³	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

En el cuadro 14 se presenta el número de cepas aisladas en los dos muestreos en sus diferentes incubaciones por cada punto de muestreo y con su respectivo porcentaje, observándose que en los puntos 1 y 2 correspondientes a Santo Domingo y a Santa Cruz respectivamente, se obtuvo el mayor aislamiento (15 cepas), y en los puntos 5 (El Escobal) y 6 (El Muelle) se aislaron menos cepas (6). Esto también se puede visualizar en la figura 6.

Cuadro 14. Número y porcentaje de cepas aisladas de vibrios por cada punto de muestreo incubadas a las diferentes temperaturas. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Puntos de muestreo	Primer muestreo		Segundo muestreo		N° cepas	%
	36 °C	42 °C	36 °C	42 °C		
1) Santo Domingo	3	6	6	-	15	18,07%
2) Santa cruz	3	6	3	3	15	18,07%
3) Cañón El Quemado	3	-	6	-	9	10,84%
4) Tronconera	3	3	3	-	9	10,84%
5) El Escobal	3	-	3	-	6	7,22%
6) El Muelle	3	-	3	-	6	7,22%
7) El Conchal	-	6	7	-	13	15,66%
8) Los Blancos	2	2	6	-	10	12,04%
TOTAL	20	23	37	3	83	100%

Figura 8. Número y porcentaje de cepas aisladas de vibrios en cada punto de muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.



En el cuadro 15 se puede observar el número y la distribución de especies en cada punto de muestreo. Observándose que el *Vibrio parahaemolyticus*, no sólo se encontró en casi todos los puntos de muestreo; si no que también se encontró en mayor cantidad con respecto a los otros vibrios.

Cuadro 15. Número y distribución por especie de cepas de Vibrios en cada punto de muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Especies identificadas	Puntos de muestreo*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15	12	0	5	3	3	1	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	3	0	4	3	3	9	3
<i>Vibrio fluvialis</i>	0	0	9	0	0	0	0	0
<i>Vibrio damsela</i>	0	0	0	0	0	0	3	0
Total	15	15	9	9	6	6	13	10

*

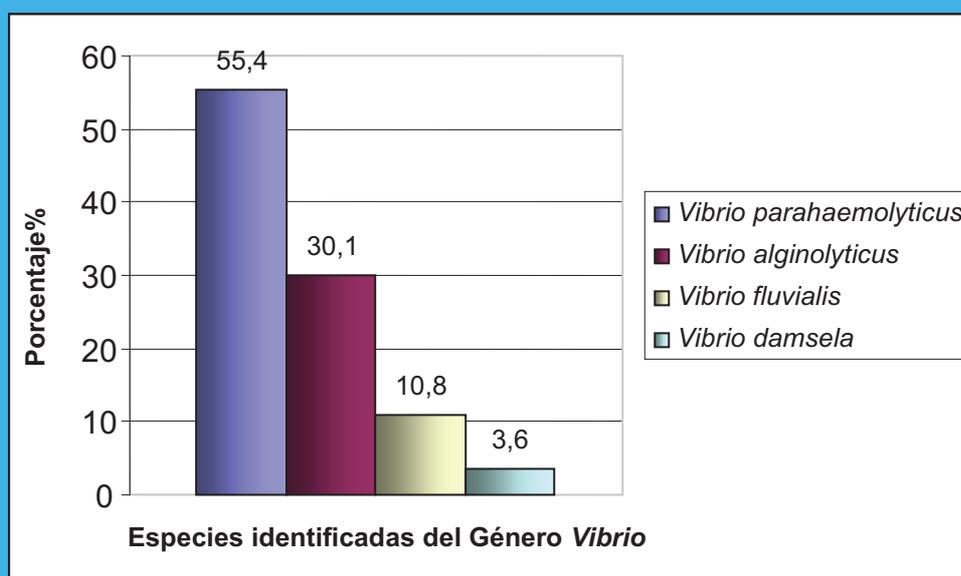
- 1 Santo Domingo
- 2 Santa Cruz
- 3 Cañón El Quemado
- 4 Tronconera
- 5 El Escobal
- 6 El Muelle
- 7 El Conchal
- 8 Los Blancos

El número de cepas por especie identificadas en todo el estudio se presenta en el cuadro 16 y en la figura 7. El mayor aislamiento se obtuvo para *Vibrio parahaemolyticus* con un 55.4 % y el menor aislamiento correspondió a *Vibrio damsela* con un 3.6%.

Cuadro 16. Número y porcentaje de especies del Género *Vibrio* aisladas en el total de las muestras. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Cepas	Nº	Porcentaje %
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46	55.4
<i>Vibrio alginolyticus</i>	25	30.1
<i>Vibrio fluvialis</i>	9	10.8
<i>Vibrio damsela</i>	3	3.6
TOTAL	83	100 %

Figura 9. Porcentaje de las especies identificadas del género *Vibrio*. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.



Los resultados de los antibiogramas se detallan en el cuadro 17-a y 17-b. En este último se puede observar que los vibrios halófilos (por su requerimiento de cloruro de sodio para su crecimiento) identificados son resistentes a la ampicilina y a la amoxicilina- ácido clavulánico. En el caso de la piperacilina, sólo el *Vibrio parahaemolyticus* se encontró en la categoría de intermedio, las demás especies resultaron resistentes; además el *V. parahaemolyticus* resultó ser resistente a la cefalotina. Para los restantes antibióticos se observó sensibilidad.

Cuadro 17-a. Lectura de los diámetros de los halos de inhibición provocados por los discos de sensibilidad (antibióticos) aplicados a las especies identificadas. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre de 2006.

Antibiótico	Carga (µg)	Lectura de los halos en milímetros (mm)			
		<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.fluvialis</i>	<i>V. damsela</i>
Ampicilina	10	6.0	6.0	6.0	6.0
Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	13.2	8.9	9.1	11.2
Piperacilina	100	20.5	14.8	15.1	15.9
Cefotaxima	30	27.4	27.2	26.3	28.1
Cefalotin	30	14.1	20.8	19.3	21.3
Imipenem	10	27.4	32.1	30.2	29.9
Gentamicina	10	16.7	19.4	19.7	18.8
Tetraciclina	30	23.6	22.0	23.5	24.2
Ciprofloxacina	5	24.3	25.4	26.2	27.0
Cloranfenicol	30	27.3	31.0	29.1	28.7
Trimetoprin/sulfametoxazol	1.25/23.75	21.1	21.8	22.2	23.4

Cuadro 17-b. Interpretación de los halos de los discos de sensibilidad del antibiograma realizado a cada cepa identificada. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre de 2006.

Antibiótico	Carga (µg)	Interpretación de los halos			
		<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. damsela</i>
Ampicilina	10	R	R	R	R
Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	R	R	R	R
Piperacilina	100	I	R	R	R
Cefotaxima	30	S	S	S	S
Cefalotin	30	R	S	S	S
Imipenem	10	S	S	S	S
Gentamicina	10	S	S	S	S
Tetraciclina	30	S	S	S	S
Ciprofloxacina	5	S	S	S	S
Cloranfenicol	30	S	S	S	S
Trimetoprin/sulfametoxazol	1.25/23.75	S	S	S	S

R: resistente; I: intermedio; S: sensible

En cuanto a los parámetros físico-químicos: la temperatura superficial del agua de los 8 puntos de muestreo osciló entre los 27 °C y 30 °C (ver cuadro 18 y figura 8); en el cuadro 19 y figura 9 se detallan las lecturas del pH, siendo la menor de 6.88 en el punto 4, conocido o llamado Tronconera y la mayor de 7.21 en el punto 1 (Santo Domingo). La salinidad registrada fue de 1.57 a 1.90% (cuadro 20 y figura 10). La lectura de dichos parámetros fue muy similar en todos los puntos.

Cuadro 18. Temperaturas del agua obtenidas en cada punto de muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Muestreo	Punto 1 Santo Domingo	Punto 2 Santa Cruz	Punto 3 Cañón El Quemado	Punto 4 Tronconera	Punto 5 El Escobal	Punto 6 El Muelle	Punto 7 El Conchal	Punto 8 Los Blancos
Primero	27 °C	28 °C	28 °C	29 °C	29 °C	30 °C	30 °C	29 °C
Segundo	27 °C	27 °C	29 °C	28 °C	30 °C	29 °C	29 °C	29 °C

Figura 10. Temperaturas del agua obtenidas en cada punto de muestreo. Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

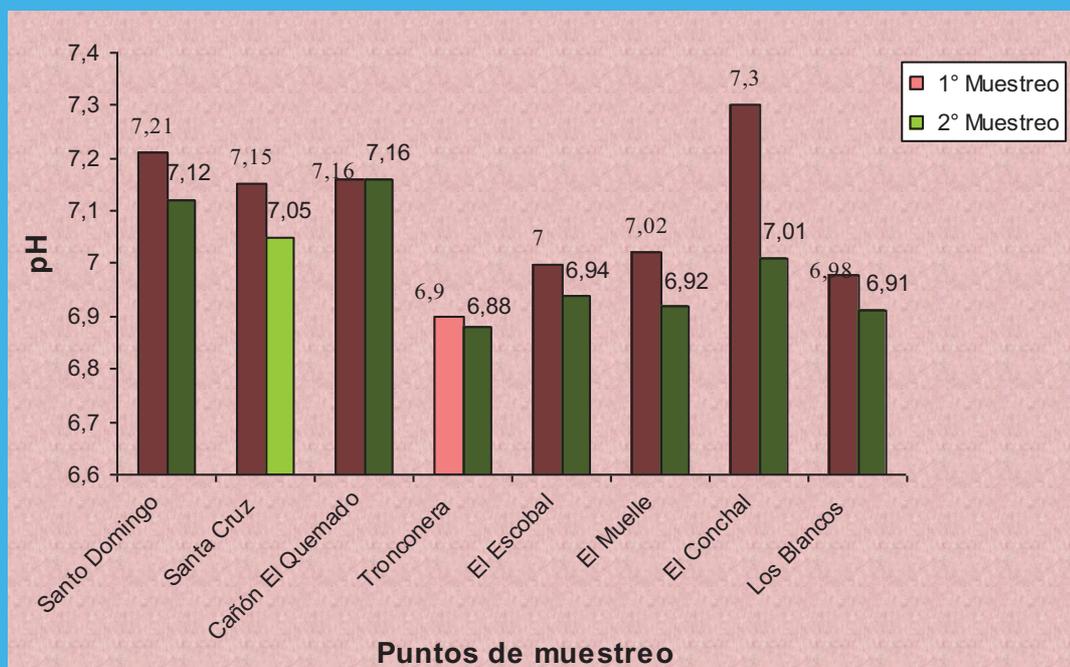


Cuadro 19. pH obtenidos en cada punto de muestreo (en los dos muestreos). Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Muestreo	Punto 1 Santo Domingo	Punto 2 Santa Cruz	Punto 3 Cañón El Quemado	Punto 4 Tronconera	Punto 5 El Escobal	Punto 6 El Muelle	Punto 7 El Conchal	Punto 8 Los Blancos
Primero	7.21	7.15	7.16	6.90	7.0	7.02	7.3	6.98
Segundo	7.12	7.05	7.16	6.88	6.94	6.92	7.01	6.91

Figura 11. pH obtenidos en cada punto de muestreo(en los dos muestreos). Estero de Jaltepeque.

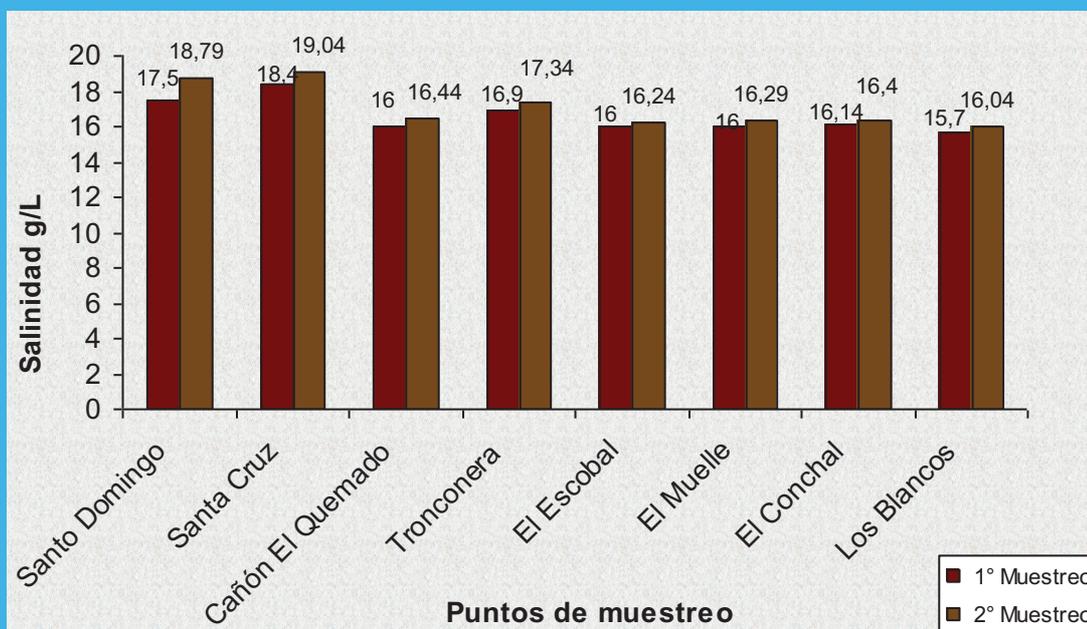
El Salvador, noviembre y diciembre 2006.



Cuadro 20. Concentración de salinidad (g/L) obtenidas en cada punto de muestreo (en los dos muestreos). Estero de Jaltepeque. El Salvador, noviembre y diciembre 2006.

Muestreo	Punto 1 Santo Domingo	Punto 2 Santa Cruz	Punto 3 Cañón El Quemado	Punto 4 Tronconera	Punto 5 El Escobal	Punto 6 El Muelle	Punto 7 El Conchal	Punto 8 Los Blancos
Primero	17.5	18.4	16.0	16.9	16.0	16.0	16.14	15.7
Segundo	18.79	19.0	16.44	17.34	16.24	16.29	16.4	16.04

Figura 12. Concentración de salinidad (g/L) obtenidas en cada punto de muestreo (en los dos muestreos). Estero de Jaltepeque. El Salvador noviembre y diciembre, 2006.



VII. DISCUSIÓN

El Estero de Jaltepeque es un ecosistema estuarino, que en sus manglares alberga a moluscos de interés comercial de la familia Arcidae como el género *Anadara*, comúnmente conocidos como “conchas o curiles”, los cuales constituyen una fuente de alimento, no solo para los pobladores de la zona; si no que también a personas que compran el producto en los diferentes establecimientos de ventas en el país. Dichos moluscos son uno de los organismos más impactados por la contaminación, debido a su condición de filtradores que bioacumulan a través del bombeo del agua metales pesados (como lo descrito por López & Azucena, 2005), coliformes fecales (Sosa V., 2006; Melara V., 2006) y miembros de la biota autóctona como los *Vibrio* spp. Por lo que representan un peligro para los consumidores de dichos moluscos.

El género *Vibrio* contiene más de 30 especies, 12 son patógenas para el hombre y de estas 10 son halófilas. El reservorio de estos microorganismos lo constituyen las aguas donde habitan y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar. La mayor parte de vibrios halófilos se asocian a infecciones del tracto gastrointestinal aunque también se ha descrito su implicación en patología extraintestinal, causando bacteremia, otitis, conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos entre otras. (García, s.a.).

En la presente investigación se detectó e identificó vibrios patógenos en El Estero de Jaltepeque, importante ecosistema estuarino, donde se da extracción de moluscos bivalvos (entre otros) como las “conchas o curiles” *Anadara* spp, siendo una fuente de alimento y de comercio para los lugareños. Además se realizó lectura de los parámetros físico-químicos: Temperatura, pH y salinidad de los puntos de muestreo.

Según la OPS & OMS (1994), el agar TCBS es un medio de cultivo selectivo y diferencial que se utiliza ampliamente en el mundo para la identificación “presuntiva” de miembros del género *Vibrio*; ya que este tiene inhibidores de crecimiento para otras bacterias; sin embargo en este pueden crecer otras bacterias de la familia Vibrionaceae como las *Aeromonas*, con las que presentan una morfología muy similar en dicho medio; pudiéndose dar una confusión entre estas; pero que pueden diferenciarse con otras pruebas (prueba del

collar). Esto explica el porque de las colonias aisladas en dicho agar seleccionadas por presentar las características morfológicas no fueron en su totalidad miembros del género *Vibrio*.

El género *Vibrio* está compuesto por microorganismos cuyo hábitat natural son los ecosistemas marinos y fluviales. Una particularidad de todas las especies de este género es su dependencia del ión sodio (a excepción de *V. cholerae* y *V. mimicus*, que pueden crecer en ausencia de este). Este catión estimula su crecimiento y favorece la rapidez del mismo (García, B. s.a.). Lo anteriormente descrito se pudo comprobar con el medio de agar gelatina; ya que de las placas resultantes de dicho agar conteniendo 0% y 1% de NaCl, únicamente se obtuvo crecimiento bacteriano en el medio que contenía 1% de NaCl. Constatándose de esta manera el carácter halófilo de dichas bacterias. Además alrededor de las colonias, se observó una zona opaca parecida a un halo, por lo que se asumió la presencia de vibrios; ya que estos producen gelatinasa, una enzima que degrada la gelatina, produciendo la zona opaca mencionada. Sin embargo todas las colonias aisladas presentaron dicha zona en su alrededor y no todas resultaron ser vibrios, lo cual podría deberse a que otros géneros de la familia Vibrionaceae presentan la misma enzima; aunque esto no se puede aseverar; ya que no se encontró literatura que lo afirmara.

En cuanto a la tinción de Gram se observaron formas cocobacilares e incluso cocoides, descrito por García, s.a. Por esta razón la forma curva bacilar no es diagnóstica al carecer el microorganismo de una morfología uniforme.

Todas las cepas aisladas dieron la prueba de la oxidasa positiva, ya que se pudo observar la coloración púrpura de inmediato, esto debido a la presencia del citocromo "C". Cumpliendo de esta manera otra característica de pertenecer al género *Vibrio*.

La prueba del collar es de gran importancia para la identificación de vibrios, con esta prueba se puede excluir la presencia de otros géneros diferentes a *Vibrio*; ya que sólo los miembros de este grupo la dan positiva. Esta prueba permite diferenciar particularmente a los *Vibrios* spp. de las *Aeromonas* spp. En total se obtuvieron 83 placas positivas de las 189 placas; es decir el 43.9% de las cepas aisladas pertenecieron al género *Vibrio*.

A partir de las cepas positivas a la prueba del collar se realizaron las pruebas ulteriores. En el caso de la prueba de movilidad el 100% de las cepas collar positivo resultaron también positivas. Que es otra característica de los vibrios, ya que estos presentan flagelos polares.

En lo concerniente a la prueba bioquímica del agar hierro triple azúcar (TSI); la mayoría presentó una reacción ácido sobre ácido (A/A), debido a un cambio de viraje en el medio, esto concuerda con la OPS & OMS (1994); aunque también pudo observarse una reacción alcalina sobre ácida (K/A) en algunos tubos. Además no se observó producción de gas (burbujas o levantamiento de agar), ni tampoco producción de ácido sulfhídrico (coloración negra). Como es característico de los vibrios.

En cuanto a las reacciones de descarboxilación y dihidrolación, que son pruebas claves para diferenciar a 6 grupos de los pertenecientes a las 12 especies de importancia clínica, se pudo observar claramente los resultados positivos (color morado) y negativos (color amarillo). Estos se compararon con los cuadros 3 y 5, agrupándose los vibrios identificados en los diferentes grupos: *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* en el grupo 6, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio damsela* en el grupo 5.

Con respecto a las pruebas serológicas en lámina para la identificación de *Vibrio cholerae* del grupo O1, solución salina (control) y antisuero polivalente O1; no mostraron aglutinación. Las aglutinaciones en antisueros monovalentes no se realizaron, debido a que no hubo aglutinación de los vibrios al antisuero polivalente O1; lo cual quiere decir que no se aisló *V. cholerae* O1. Tampoco se aisló *V. cholerae* O139; ya que no hubo aglutinación con el antisuero *V. cholerae* O139.

En los 8 puntos de muestreo se aislaron cepas de vibrios patógenos; es decir en el 100% de las muestras; aunque “no se aislaron en todas las diluciones”, lo cual no quiere decir que no estuvieran presentes.

El número de aislamientos por cada punto de muestreo fue mayor en los puntos 1 y 2 correspondientes a Santo Domingo y a Santa Cruz respectivamente, en este se dió el mayor aislamiento (15 cepas); según los resultados de Melara (2006) en esta zona se obtuvieron los valores menores de coliformes fecales, esto puede contribuir a que se desarrollen los

miembros de la biota autóctona. En los puntos 5 (El Escobal) y 6 (El Muelle) se aislaron menos cepas (6 cepas), según los datos de Melara (2006), en esta zona se obtuvieron los niveles más elevados de coliformes fecales (1100 NMP/g) debido a la actividad antropogénica que descargan sus aguas residuales directamente al estuario, de alguna manera esto podría influir en la distribución de los vibrios; por lo que dichos coliformes podrían estar compitiendo o eliminando a los vibrios.

También se pudo observar el número de cepas aisladas en el primer y segundo muestreo incubadas a las diferentes temperaturas (36 °C y 42 °C). En este sentido según la OPS & OMS (1994), la incubación a 42 °C mejora mucho las probabilidades de aislar *V. cholerae*, por tal motivo se hizo la replica de las diluciones para incubarse a dicha temperatura; sin embargo se aisló *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, aunque este último en menor frecuencia. Según [http//2](http://2) el *V. parahaemolyticus*, posee la característica de crecer a una temperatura de 42 °C al igual que *V. cholerae*, esto explica la gran cantidad de cepas de *V. parahaemolyticus* (con respecto a *V. alginolyticus*) aisladas. No se encontró literatura que mencionara el crecimiento de *V. alginolyticus* a la temperatura mencionada.

De los 83 aislamientos de vibrios que se obtuvieron, se identificaron cuatro especies: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio damsela*, esto concuerda con algunos aislamientos realizados en la sección de bacteriología del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del MSPAS a partir de muestras fecales. De los vibrios identificados el mayor aislamiento se obtuvo para *V. parahaemolyticus* en un 55.4 %. La alta frecuencia de vibrios aislados y el predominio de *V. parahaemolyticus* en las muestras analizadas demuestra la naturaleza autóctona de estos microorganismos en el ambiente estuarino, de esta manera se corresponde con lo informado por otros autores (OPS & OMS, 1994; García, B. s.a; Rosas *et al*, 2004).

El *Vibrio parahaemolyticus* se aisló en casi todos los puntos de muestreo a excepción del punto 3 (Cañón El Quemado), lo que demuestra la distribución de esta especie en todo el estero.

En cuanto a la prueba de susceptibilidad por difusión de discos a los antimicrobianos (antibiograma), el CLSI agregó a finales del año 2006 puntos de corte (lectura e interpretación

de los halos de inhibición de los antibióticos) para vibrios halófilos, debido al incremento de enfermedades asociadas a dichas bacterias; anteriormente solo se contaba con puntos de corte para *V. cholerae*. Los vibrios identificados presentaron resistencia a la ampicilina y a la amoxicilina- ácido clavulánico. Para la piperacilina, sólo *Vibrio parahaemolyticus* se encontró en la categoría de intermedio, las demás especies resultaron resistentes; además *V. parahaemolyticus* resultó ser resistente a la cefalotina a excepción de las demás especies. Para los restantes antibióticos: cefotaxima, imipenem, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol se observó sensibilidad en todas las cepas.

Lo anteriormente descrito indica que a un paciente diagnosticado con *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. damsela* no se le debe administrar ampicilina ni amoxicilina- ácido clavulánico, ya que son resistentes a dichos antibióticos al igual que a la piperacilina; sin embargo para este último antibiótico solamente para el caso de *V. parahaemolyticus*, el médico puede optar a recetarle piperacilina; pero con una concentración mayor a 100 µg, ya que a dicha concentración resultó ser intermedio o bien decidirse a recetarle otro antibiótico al cual la bacteria sea sensible. Además a una persona diagnosticada con *V. parahaemolyticus* no se le debe administrar cefalotina; ya que también presentó resistencia a dicho antibiótico. Si a un paciente se le aísla en una muestra clínica *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. damsela* queda a criterio del médico administrar: cefotaxima, imipenem, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, ya que dichas bacterias son sensibles a dichos antibióticos. En general según García, s.a., el tratamiento de elección es la tetraciclina que es el antimicrobiano que ha mostrado una mayor eficacia *in vivo* y el cloranfenicol como una alternativa.

Los parámetros físico-químicos del agua como la temperatura, el pH y la salinidad, pueden influir en la multiplicación, supervivencia y distribución de los vibrios. Con tal propósito se evaluó los parámetros mencionados.

Según Lafourcade (2005), la temperatura óptima del agua para la sobrevivencia y estacionalidad de los vibrios es de 30 a 37 °C y según Basualdo & Coto (1996) es de 18 a 37°C.

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron de 27 a 30 °C, concordando de esta manera con lo descrito por Basualdo & Coto (1996). De acuerdo a los datos de campo obtenidos en el Estero de Jaltepeque por Tejada, 2004 (citada por [http//8](http://8)), la temperatura

promedio del agua es de 31 °C, la cual difiere un poco con esta investigación, debido a que el promedio de esta investigación es de 28.6, la diferencia de esta podría ser; que los datos recopilados en esta investigación se realizaron en los meses más fríos del año (noviembre y diciembre) y por la mañana (7:00 a 11: am), cuando la marea se encontraba bajay los de Tejada, 2004 (citada por [http//8](#)), es un promedio de todo el año; además no se conoce la hora de la toma de dicho parámetro.

El pH óptimo para que se de el crecimiento de los vibrios según Lafourcade (2005), es de 7.0 a 8.5. En esta investigación oscilaron entre 6.88 y 7.21. Estos datos concuerdan con lo dicho por Tejada 2004 (citada por [http//8](#)), ya que sus resultados oscilaron entre 6.0 a 7.6.

En cuanto a la salinidad según Lafourcade (2005) la concentración varía para cada especie, la cual puede oscilar entre 0 a 10 ‰ mg/L (0 a 100 UPS- Unidades Ponderadas de Salinidad). Los resultados de esta investigación se encontraron entre 15.7 a 19.0 g de cloruro de sodio por litro de agua (15.7 a 19.0 UPS), los valores de Tejada 2004 (citada por [http//8](#)), oscilaron entre 18.0 a 33.6 UPS; además los datos obtenidos por López & Azucena (2005) realizados en El Estero de Jaltepeque (para época seca) oscilaron entre 16.5 y 22.5 UPS. Comparando los datos de esta investigación con estos últimos, se puede observar una pequeña disminución, esto podría deberse a, que esta investigación se realizó finalizando la época de transición: de estación lluviosa a estación seca.

En síntesis los ocho puntos de muestreo estudiados del Estero de Jaltepeque poseen la temperatura, pH y salinidad idónea para que se de el desarrollo y la estacionalidad de los vibrios, ya que todos los parámetros se encontraron dentro de los rangos óptimos para el crecimiento de este grupo.

VIII. CONCLUSIONES

En esta investigación se determinó que los moluscos bivalvos utilizados *Anadara* spp son bioacumuladores importantes que sirven como herramienta para el estudio de contaminación de microorganismos patógenos de la biota autóctona como los son los miembros del género *Vibrio*, por lo que representan un problema para la salud pública.

La tolerancia a la sal permitió evidenciar el carácter halófilo de los vibrios, debido a que estos, solamente crecieron en el medio que contenía 1 % de sal.

Los vibrios halófilos presentan morfología cocobacilar y cocoide, no solamente son bacilos curvos o rectos como son definidos en la mayoría de la literatura; por lo que no se debe descartar a un miembro del género *Vibrio*, si no se encuentran en la Tinción de Gram como bacilos curvos o rectos.

La prueba del collar es la prueba más útil o necesaria para la detección de los vibrios; ya que estos son los únicos que dan la prueba positiva.

En las muestras analizadas de los bivalvos *Anadara* spp procedentes del Estero de Jaltepeque se aislaron cuatro especies del género *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. damsela*, lo cual no significa que no haya presencia de otras especies patógenas de dicho género, ya que para afirmar lo descrito tendría que hacerse un monitoreo a largo plazo.

Según las muestras analizadas, la especie predominante es *V. parahaemolyticus*; debido a que este se aisló no sólo en mayor porcentaje; si no que también se aisló en la mayoría de los puntos de muestreo con la única excepción en el punto de muestreo número tres llamado Cañón El Quemado perteneciente al Cantón La Calzada; lo cual no significa que no se encuentre presente.

El *V. parahaemolyticus* crece perfectamente a una temperatura de 42 °C.

Los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado la presencia de especies del género *Vibrio* considerados como patógenos en todas las muestras de moluscos: *Anadara* spp, los cuales pudieran significativamente contribuir en la aparición de brotes de gastroenteritis y otras afecciones entéricas asociadas a su consumo en forma cruda.

V. parahaemolyticus y *V. alginolyticus* representan un peligro potencial, no solamente para el humano debido a su implicación en enfermedades como: gastroenteritis, infecciones en tejidos blandos (heridas y quemaduras), bacteriemia, conjuntivitis, otitis, entre otras; si no que también para el recurso pesquero de la zona, debido a su amplio señalamiento como agentes etiológicos de septicemias en peces y crustáceos en otras partes del mundo.

El Estero de Jaltepeque en su condición de ecosistema estuarino reúne las condiciones ambientales idóneas para que se de la sobrevivencia y estacionalidad de microorganismos patógenos para el humano como los miembros del género *Vibrio*; ya que la temperatura, pH y la salinidad se encuentran dentro del rango óptimo de sobrevivencia de dichos microorganismos.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar la investigación a lo largo del año para tener resultados estacionales y más completos, para identificar que otros vibrios patógenos se encuentran presentes en el estero.

Que las instituciones de salud que se encuentran en la zona, pongan énfasis en las enfermedades entéricas, por que estas pueden estar causadas por vibrios patógenos y no por enterobacterias.

Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) se recomienda realizar un permanente monitoreo de aguas, no solo en ecosistemas acuáticos de origen continental si no que también a ecosistemas marinos o salobres como los estuarios.

Se recomienda al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) darle la importancia debida a otros grupos de vibrios diferentes a *V. cholerae* O1; en especial a *V. parahaemolyticus*; ya que este también produce enfermedades gastrointestinales, aunque de menor severidad; pero que puede producir importantes brotes epidémicos.

Incentivar a los estudiantes, instituciones gubernamentales y no gubernamentales a seguir realizando trabajos de identificación de vibrios patógenos no sólo al Estero de Jaltepeque; si no que también a otros ecosistemas acuáticos similares con el fin de encontrar reservorios que favorecen su supervivencia y de esta manera evitar posibles brotes.

Para futuras investigaciones relacionadas con *Vibrio parahaemolyticus*, tomar en cuenta el crecimiento de esta bacteria a una temperatura de 42 °C, característico de esta especie.

Para las personas interesadas en realizar estudios en identificación de vibrios halófilos, no olvidar que estos no sólo se observan como bacilos curvos o rectos; si no que también pueden presentar otras morfologías (cocobacilos y cocoides).

Realizar estudios de identificación del género *Vibrio* en otros organismos como peces y crustáceos, ya que en otros países como México, Venezuela, Chile, entre otros han aislado vibrios patógenos con alto porcentaje en dichos organismos.

Realizar estudios de comparación entre vibrios y coliformes simultáneamente para determinar antibiosis entre ambos grupos.

A los acuicultores realizar estudios en sus granjas acuícolas ocupando bioacumuladores como *Anadara* spp para determinar la presencia de vibrios patógenos, y así; buscar medidas preventivas para evitar posibles pérdidas en sus cultivos provocadas por dichos vibrios.

Implementar programas de educación en las comunidades pesqueras dedicadas a la extracción y procesamiento artesanal de moluscos bivalvos, fomentándose mediante campañas divulgativas un manejo responsable del ambiente y del recurso.

Reducir el consumo de alimentos de origen marino crudos o semicocidos, para evitar una posible contaminación de microorganismos patógenos.

Manipular separadamente los alimentos crudos de origen marino del resto de los alimentos para evitar una contaminación cruzada.

Evitar el contacto de heridas abiertas con el agua contaminada.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barraza, J. E. 2006. Identificación de Moluscos Marinos Comestibles en El Salvador. Dirección de Patrimonio Natural. Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Basualdo, J. A., C.C. Coto.1996. Microbiología Biomedica. Editorial Atlante. Argentina.
- Brock, Tomas D., Michael Madigan.1993. Microbiología. 6ª Edición. Editorial Prentice Hall. México.
- Cardoza R.2001. Aislamiento e Identificación del *Vibrio cholerae* O1 en el Lago de Güija y sus principales afluentes.Tesis de Licenciatura en Biología. El Salvador. 107 pp.
- Centro Nacional de Registros. 2006. Almanaque de Mareas. El Salvador.
- Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). 2006. Documento M45-P.
- Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). 2006. Perfomance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Disk Diffusion volume 26 number 3.
- García B., Isabel. Sin año. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Servicio de Microbiología. Getafe, España. Documento.
- Grau, Cruz, A. La Barbera y otros. 2004. Aislamiento de *Vibrio spp.* y Evaluación de la condición Sanitaria de los Moluscos Bivalvos *Arca Zebra* y *Perna perna* Procedentes de la costa Nororiental del Edo Sucre, Venezuela. Venezuela. 22 pp.

- Heitmann Ingrid, L. Jofré & otros. 2004. Revisión y recomendaciones para el Manejo de Diarreas por *Vibrio parahaemolyticus*. Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago de Chile. Chile. Boletín Informativo.
- Jawetz E., J. Melnick & E. Adelberg. 1999. Microbiología Médica. 16° edición. Editorial El Manual Moderno. México. 899 pp.
- Koneman, Elmer W. 1997. Diagnostic Microbiology. 5° edición. Editorial Lippin William & Wilkins. USA.
- Lafourcade, Mónica. 2005. Novedades: *Vibrio parahaemolyticus*. Chile. Disco compacto.
- López Carlos. E., Carlos E. Azúccena. 2005. Niveles de Arsénico, Mercurio y Plomo en Sedimento y Tejido Blando de *Anadara* spp. En el Estero de Jaltepeque, Departamento de La Paz, El Salvador. Tesis de Licenciatura en Biología. El Salvador. 102 pp.
- Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. USA. Disco compacto.
- Mata, L. 1992. El cólera; Historia, Prevención y control. Universidad Costa Rica. 270 pp.
- Melara, Verónica. 2006. Contaminación por Coliformes Fecales en *Anadara similis* y *A. tuberculosa* en los Estuarios Barra de Santiago, Jaltepeque y El Tamarindo. Tesis de Licenciatura en Biología. El Salvador.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA). Unidad de Pesquerías. 2003. Evaluación de algunos aspectos biológicos de la captura de peces y camarones obtenida con redes de enmalle número nueve en el Estero de Jaltepeque, El Salvador.

- Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2004. Estudio Básico y Preliminar en el Área de Conservación de Jaltepeque dentro del proceso de la Propuesta de Corredor Biológico Mesoamericano en El Salvador. Disco compacto.
- Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2003. Actividades Habilitadoras de La Biodiversidad. El Salvador. Disco compacto.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 1991. Manual de Procedimientos Técnicos del Cólera. Departamento de epidemiología. El Salvador. 64 pp.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2000. Boletín Informativo de Refuerzo sobre *Vibrio cholerae* 01. El Salvador.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2006. Curso Básico de Epidemiología de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia, USA. Introducción a la Epidemiología y a la Bioestadística. Disco compacto.
- Organización de las Naciones Unidas (FAO) & Organización Mundial de la Salud (OMS). 2001. Identificación de peligros, evaluación de exposición y caracterización de peligros de *campilobacter spp.* en pollos para asar y *Vibrios spp.* en mariscos. 2001. Suiza. 54 pp.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) & Organización Mundial de la Salud (OMS). 1994. Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de *Vibrio cholerae*. USA. 146 pp.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). La situación del Cólera en América. Boletín informativo N° 15. Washington. D.C. USA.
- PREPAC. 2006. Caracterización del Estero de Jaltepeque con Énfasis en la Pesca y la Acuicultura. Documento no publicado.

Prescott L., John Harley & D. Klain. 1996. Microbiology. Third Edition. WCB Editorial. USA. 934 pp.

Rosas, I., Alejandro Cravioto & Ezequiel Ezcurra. 2004. Instituto Nacional de Ecología. Microbiología Ambiental. 1ª edición. México. 47-66 pp.

Sacsquispe, Rosa E. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30. Ministerio de Salud del Perú. Lima, Perú. 2002.

Sosa, Daisy V. 2006. Determinación de Contaminación por Bacterias Coliformes Fecales en la Bahía de Jiquilisco, Usulután, utilizando como Biomonitor a *A. similis* y *A. tuberculosa*. Tesis de Licenciatura en Biología. El Salvador.

Trigoso, Christian, E. Torrico, E. Riera & S. Aguilar. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Sensibilidad y Resistencia Antimicrobiana. Instituto Nacional de Laboratorios en Salud. 1ª Edición. Editores. OPS/OMS. Bolivia. 2003.

Wachmuth, K. Paula Blake & Ørjan Olsvik. 1994. *Vibrio cholera* an Cholera: Molecular to Global Perspectives. ASM PRESS. Whashington, DC. USA. 455 pp.

Http://1: *Vibrios* de origen marino en patología humana <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art201/vibrios.htm>. Consultado el 2 de junio de 2006. 4: 00 pm.

Http://2: Familia Vibrionaceae. <http://www.genaltruista.com/notas2/00000497.htm>. Consultado el 10 de junio de 2006. 2:00 pm

Http://3: moluscos bivalvos <http://www.mispecies.com/estudios/2002/moluscos-fgg/moluscos-fgg.asp>. Consultado el 12 de junio de 2006. 5:00 pm.

Http//:4: Calidad Sanitaria de alimentos Disponibles al Público de Ciudad Obregón, Sonora, México. http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm.

Consultado el 12 de junio de 2006. 6:00 pm.

Http//:5: Aislamientos de vibrios patógenos y valoración de la calidad sanitaria de ostiones frescos cosechados en Cuba

Http//:6: Los Bivalvos. <Http://www.losbivalvos.htm>.

Http//:7: Riesgos asociados a los moluscos bivalvos. Http://www.consumaseguridad_com.

Http//:8: Lagunas costeras. <Http://www.mific.gob>.

Http//:9: <Http://www.marn.gob>.

Http//:10: <Http://www.googleearth.com>

ANEXO 1-A

Lesiones asociadas a *V. vulnificus*

Lesión provocada por *V. vulnificus* a un paciente de 75 años con cirrosis hepática



Fuente: <http://www.visualdx.com/vibrio>

ANEXO 1-B

Bulas provocadas por *V. vulnificus*



Fuente: <http://www.visualdx.com/vibrio>

Anexo 2

Tabla de lectura de api 20 E. Se leen los test inoculados de acuerdo a la coloración resultante, este se interpreta como positivo o negativo y se colocan en la hoja de resultados que trae cada test.

api 20 E		07584 C - 09/2000			
TABLA DE LECTURA					
TESTS	SUBSTRATOS	CANT	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG)	0,23 mg 7,6 µg	beta-galactosidasa	incoloro	amarillo (1)
ADH	arginina	1,9 mg	arginina dehidrolasa	amarillo	rojo / naranja (2)
LDC	lisina	1,9 mg	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo / naranja (2)
ODC	ornitina	1,9 mg	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo / naranja (2)
CIT	citrato sódico	0,83 mg	utilización del citrato	verde pálido / amarillo	azul-verdoso / azul (3)
H ₂ S	tiosulfato sódico	76,0 µg	producción de H ₂ S	incoloro / grisáceo	depósito negro / línea sutil
URE	urea	0,76 mg	ureasa	amarillo	rojo / naranja (2)
TDA	triptofano	0,38 mg	triptofano desaminasa	TDA / inmediato amarillo marrón-rojizo	
IND	triptofano	0,19 mg	producción del indol	JAMES / inmediato incoloro rosa verde pálido / amarillo	
VP	creatina piruvato sódico	0,38 mg 1,9 mg	producción de acetoina	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloro rosa / rojo (5)	
GEL	gelatina de Kohn	0,17 mg	gelatinasa	no hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo / amarillo gris
MAN	manitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
INO	inositol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
MEL	melibiosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	0,57 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
OX	(ver ficha del test de oxidasa)		citocromo-oxidasa	(ver ficha del test de oxidasa)	
Reducción de los nitratos tubo GLU	nitrate potásico	76,0 µg	producción de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min amarillo rojo	
			reducción a gas N ₂	Zn / 5 min naranja rojo amarillo	
MOB	API M Medium o microscopia		movilidad	inmovil	movil
McC	medio MacConkey		crecimiento	ausencia	presencia
OF-F OF-O	glucosa (API OF Medium)		cerrado: fermentación abierto: oxidación	verde verde	amarillo amarillo

(1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.
(2) Un color naranja que aparece después de 36-48 H de incubación debe considerarse como negativo.
(3) La lectura debe hacerse en la cúpula (zona de aerobiosis).
(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula.
(5) La aparición de una coloración rosa pálido después de 10 minutos debe considerarse como negativa.

Fabricante : bioMérieux sa

	bioMérieux sa au capital de 77 421 420 F 673 620 399 RCS LYON 69280 Marcy-l'Étoile / France tél. (33) 04 78 87 20 00 / fax (33) 04 78 87 20 90 http://www.biomerieux.com	bioMérieux, Inc. 595 Anglum Road, Hazelwood, Missouri 63042-2320 / USA tel. (1) 314.731 8500 / fax (1) 314.731 8700
---	--	---

Impreso en Francia

Anexo 3

Tabla de lectura de api 20 NE. Se leen los test inoculados de acuerdo a la coloración y a la turbidez resultante, este se interpreta como positivo o negativo y se colocan en la hoja de resultados que trae cada test.

TABLA DE LECTURA				
TESTS	SUSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
NO ₃	nitrato de potasio	reducción de los nitratos en nitritos	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			incolore	rosado-rojizo
		reducción de los nitratos en nitrógeno	Zn / 5 min	
			rosado	incolore
TRP	triptofano	formación de indol	JAMES / inmediato	
			incolore verde pálido/amarillo	rosado
GLU	glucosa	fermentación	azul a verde	amarillo
ADH	arginina	arginina dihidrolasa	amarillo	naranja/rosado/rojo
URE	urea	ureasa	amarillo	naranja/rosado/rojo
ESC	esculina	hidrólisis (β-glucosidasa)	amarillo	gris/marrón/negro
GEL	gelatina (con tinta china)	hidrólisis (proteasa)	sin difusión de pigmento	difusión del pigmento negro
PNPG	p-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido	β-galactosidasa	incolore	amarillo
[GLU]	glucosa	asimilación	transparencia	turbio
[ARA]	arabinosa	asimilación	transparencia	turbio
[MNE]	manosa	asimilación	transparencia	turbio
[MAN]	manitol	asimilación	transparencia	turbio
[NAG]	N-acetil-glucosamina	asimilación	transparencia	turbio
[MAL]	maltosa	asimilación	transparencia	turbio
[GNT]	gluconato	asimilación	transparencia	turbio
[CAP]	caprato	asimilación	transparencia	turbio
[ADI]	adipato	asimilación	transparencia	turbio
[MLT]	malato	asimilación	transparencia	turbio
[CIT]	citrato	asimilación	transparencia	turbio
[PAC]	fenil-acetato	asimilación	transparencia	turbio
OX	tetrametil-p-fenil diamina	citocromo-oxidasi	OX / 1-2 min	
			incolore	violeta

TECNICA p. I
 TABLA DE IDENTIFICACION p. II
 BIBLIOGRAFIA p. III

Español-5 bioMérieux sa

Anexo 4
Muestra colectada e identificada



Anexo 5
Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). Lugar donde se procesaron las muestras.



Anexo 6-A

Elaboración de medios de cultivo en la sección de Bacteriología del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch”.



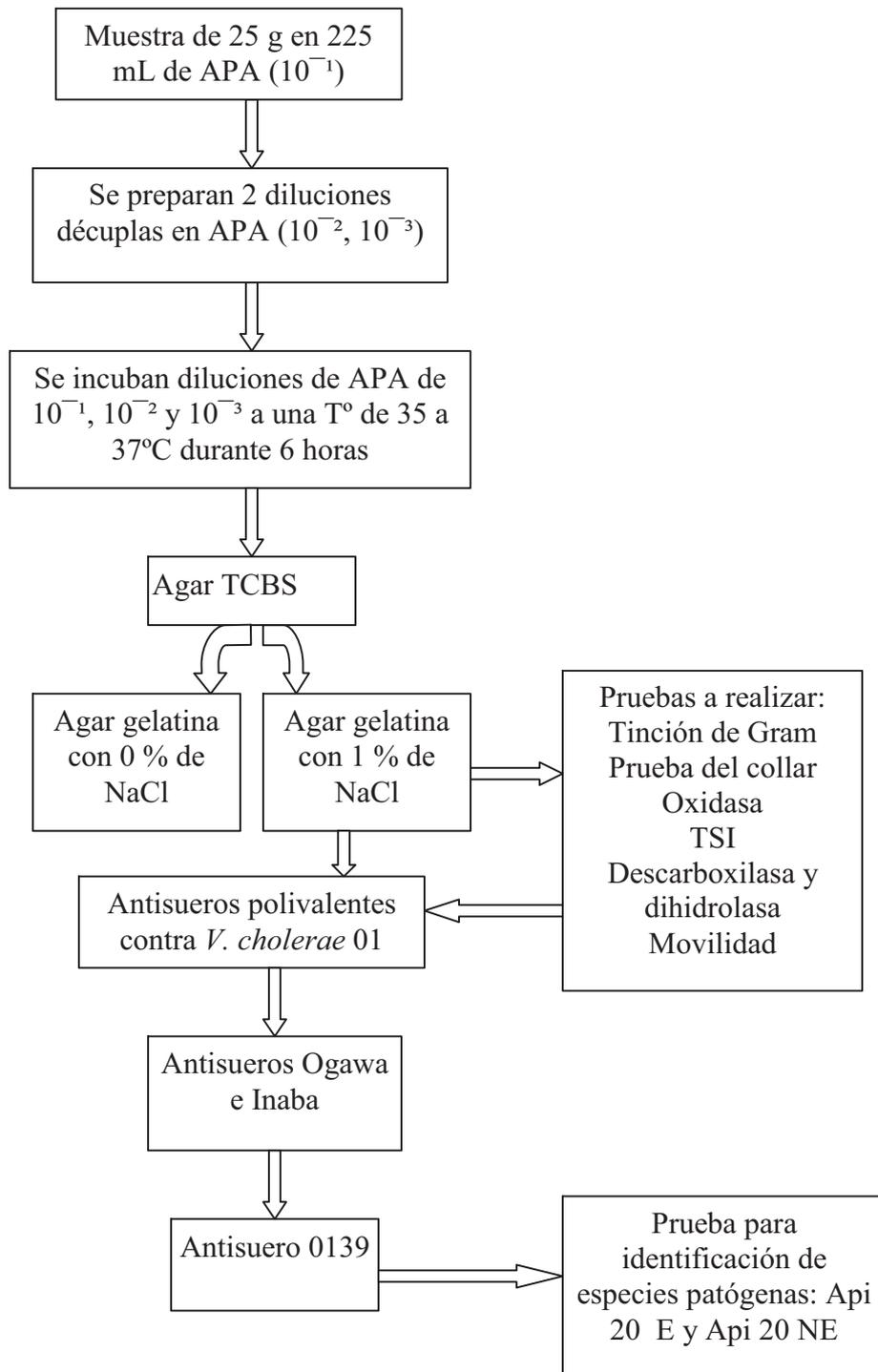
Anexo 6-B

Algunos medios preparados con anticipación a la toma de las muestras.



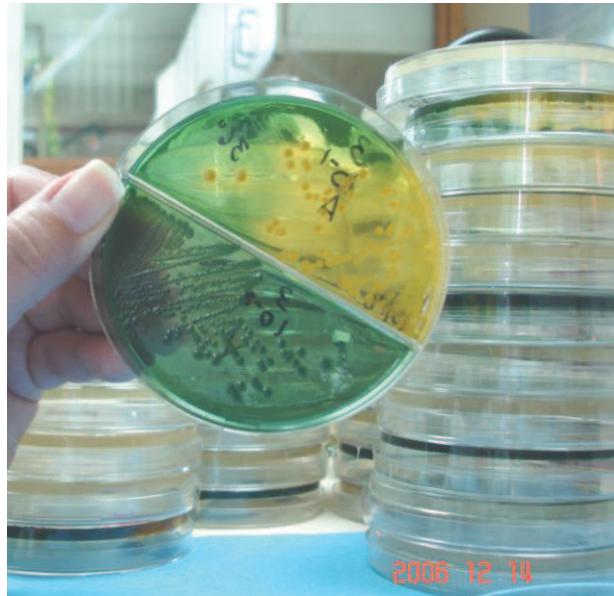
Anexo 7

Procedimientos para aislar *Vibrio cholerae* y otros vibrios establecido por la OPS & OMS, 1994



Anexo 8

TCBS: Aislamiento de colonias fermentadoras de sacarosa (amarillas) y no fermentadoras (verdes).



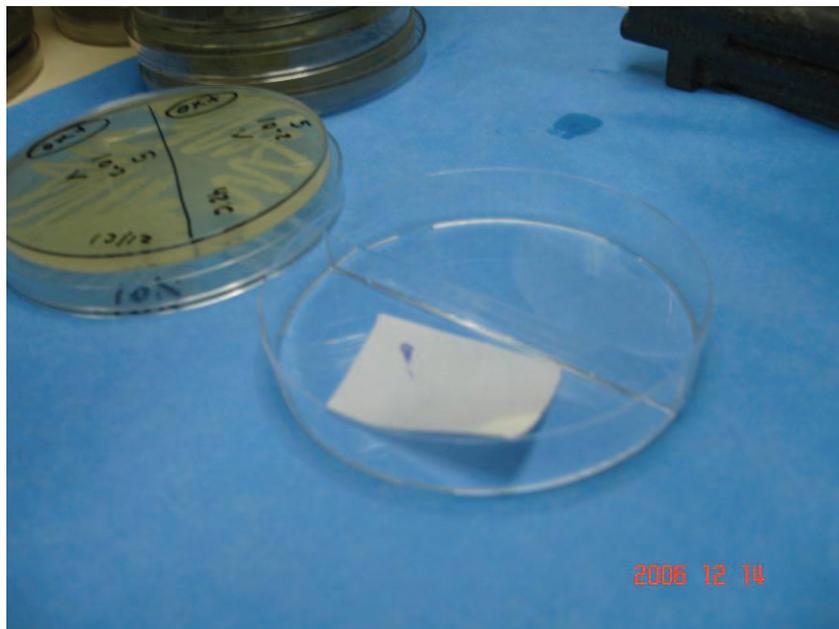
Anexo 9

Colonias aisladas en agar gelatina 1% de NaCl. Obsérvese zona opaca alrededor de las colonias.



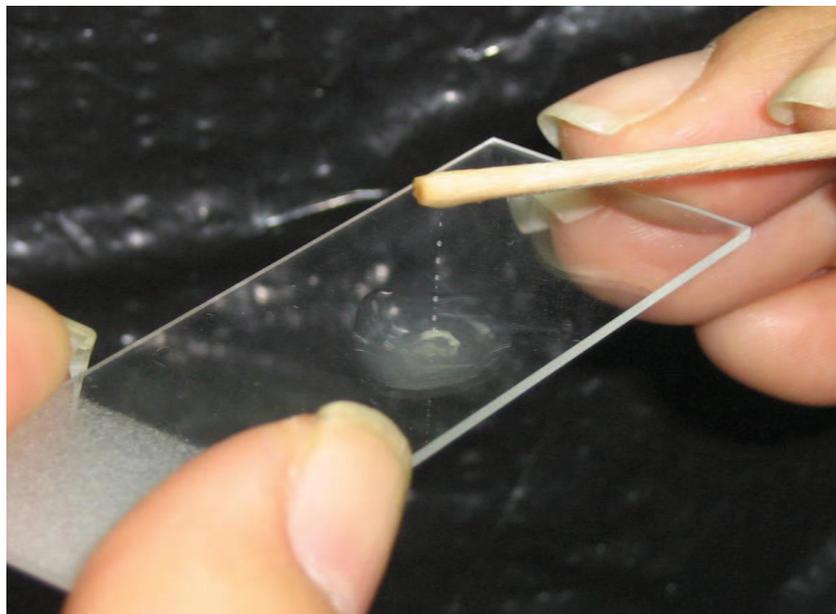
Anexo 10

Prueba de oxidasa positiva, coloración morada en el papel filtro



Anexo 11

Prueba del collar positiva



Anexo 12

Prueba de movilidad. Tubo izquierdo negativo, tubo derecho positivo



Anexo 13

Prueba del TSI. A/A: reacción amarilla en todo el tubo, K/A: reacción rosada en la parte del bisel y amarilla en el cuerpo del tubo.



Anexo 14
Inoculación de la galería de api 20 E



Anexo 15
Resultado de api 20 E después de inoculación a las 18 horas y adición de reactivos



Anexo 16

Hojas de resultados de api 20E y api 20 NE, para una sola muestra.

api 20 E REF: 1) 10⁻² v 2,0,0,0 / 1,2, / 2,0

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
ONPG	ADH	LDH	DISC	LGIT	H ₂ S	UBE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	MCC	DF-O	DF-F							
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4			1			4			6			1			0			+															

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :
V. parahaemolyticus 99.9%

api 20 NE REF: 1) 10⁻² v 2,0,0,5 / 1,2, / 2,0

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

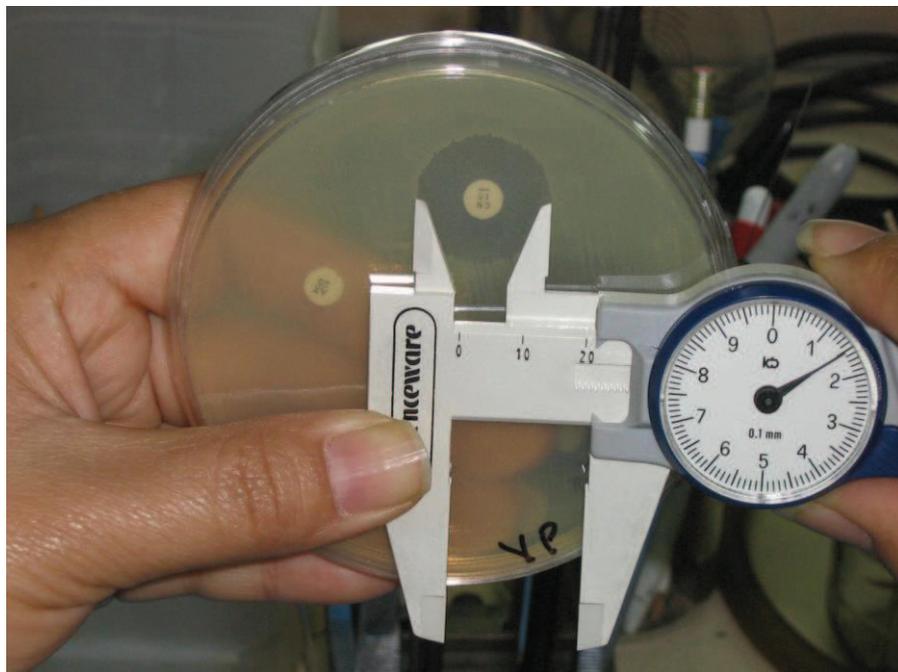
24 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₂	TRP	GLU	ADH	UBE	ESC	GEL	PNG	IGLU	LARA	IMNEI	IMANI	INAGI	IMALI	IGNTI	IGAP	LADLI	IMLI	LCIT	LPAC	OX														
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7					0			7			+			7			4			4														

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :
V. parahaemolyticus 99.1%

Anexo 17

Lectura de halos de inhibición con el escalímetro



Anexo 18

Tabla de lectura del CLSI para la interpretación de los halos de inhibición resultantes del antibiograma para *Vibrio* spp.

Table 14. *Vibrio* spp. (Not *V. cholerae*)—Information and Interpretive Criteria for Broth Microdilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing

Testing Conditions	Minimal QC Recommendations	Agents to Consider for Primary Testing
Medium: Cation-adjusted Mueller-Hinton broth for microdilution; Mueller-Hinton agar for disk diffusion Inoculum: Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard. Prepare inoculum in 0.85% NaCl (normal saline). Incubation: 35 °C, ambient air; 16-20 hours	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 <i>E. coli</i> ATCC® 35218 (for beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations)	Tetracycline Cefotaxime Cefazidime Fluoroquinolones

General Comments

(1) Growth characteristics on routine media:
Halophilic; grows well on BAP, ambient air; 20-24 hours

NOTE: Information in boldface type is considered tentative for one year.

Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	Disk Diffusion	Zone diam (mm) Interpretive Criteria			MIC (µg/mL) Interpretive Criteria			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS AND BETA-LACTAM/BETA-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
	Ampicillin	10 µg	≥17	14-16	≤13	≤8	16	≥32	
	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥18	14-17	≤13	≤8/4	16/8	≥32/16	
	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12-14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
	Piperacillin	100 µg	≥21	18-20	≤17	≤16	32-64	≥128	
	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18-20	≤17	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2	
CEPHEMS									
	Cefazolin	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
	Cefepime	30 µg	≥13	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
	Cefotaxime	30 µg	≥23	15-22	≤14	≤8	16-32	≥64	
	Cefoxitin	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
	Ceftazidime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
	Cefuroxime sodium (parenteral)	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
	Cephalothin	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32	
CARBAPENEMS									
	Imipenem	10 µg	≥16	14-15	≤13	≤4	8	≥16	
	Meropenem	10 µg	≥16	14-15	≤13	≤4	8	≥16	

Table 14. (Continued)

Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone diam (mm) Interpretive Criteria			MIC (µg/mL) Interpretive Criteria			Comments
			S	I	R	S	I	R	
AMINOGLYCOSIDES									
	Amikacin	30 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64	
	Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16	
TETRACYCLINES									
	Tetracycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16	
QUINOLONES									
	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4	
	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8	
	Ofloxacin	5 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8	
OTHERS									
	Chloramphenicol	30 µg	≥18	13-17	≤12	≤8	16	≥32	
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76	

Supplemental Information

Resistance:
Halophilic *Vibrio* spp. are usually resistant to sulfonamides, penicillins, and older cephalosporins (cephalothin, cefuroxime).

Reasons for Testing/Not Testing:
Testing is most often limited to isolates from extraintestinal sites.

Derivation of Interpretive Criteria:
Interpretive criteria are adapted from those for *Enterobacteriaceae* as published in the current edition of CLSI document M100.

Testing Notes:
See Tables 16 and 17 for disk contents.
Inoculum suspension should be prepared in 0.85% NaCl (normal saline). This will allow most isolates of *Vibrio* spp. to grow satisfactorily on MHA and CAMHB without adding supplemental NaCl to these test media.

Anexo 19

Identificación de los crioviales para ser guardados a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la sección de Bacteriología del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch”



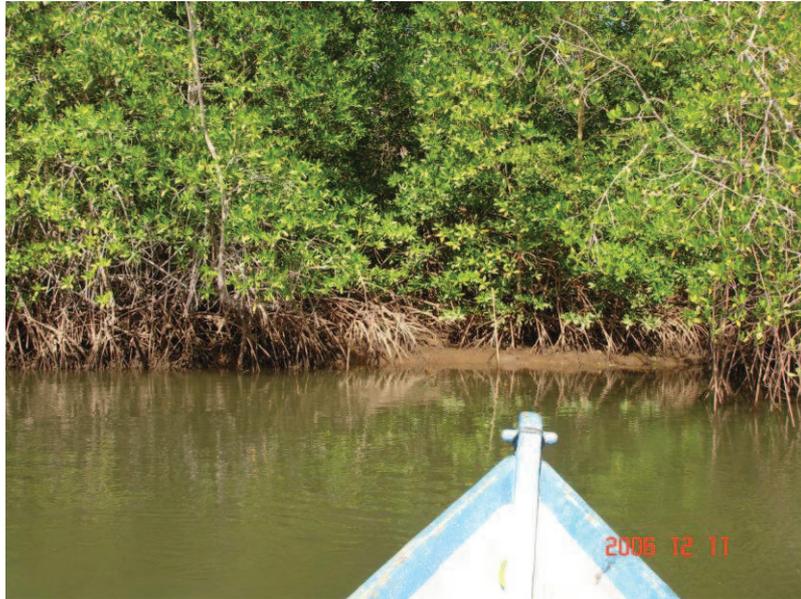
Anexo 20

Toma de temperatura superficial del agua en El Estero de Jaltepeque



Anexo 21

Punto 1. Santo Domingo en El Estero de Jaltepeque



Anexo 22

Punto 2. Santa Cruz en el Estero de Jaltepeque



Anexo 23

Punto 3. Cañón El Quemado en el Estero de Jaltepeque



Anexo 24

Punto 4. Tronconera en el Estero de Jaltepeque



Anexo 25

Punto 6. El Muelle en el Estero de Jaltepeque



Anexo 26

Punto 7. El Conchal en el Estero de Jaltepeque



Anexo 27

Punto 8. Los Blancos en el Estero de Jaltepeque

