



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) EN MILIGRAMOS POR LITRO (MG/L) DE FURAZOLIDONA Y CLORANFENICOL EN VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS EN LAS AGUAS DE DESCARGAS DE CAMARONERAS UBICADAS EN UNA MISMA ZONA (ZONA DE CHURUTE)”

TESIS DE GRADO

Previa a la Obtención del Título de:

ACUACULTOR

Presentada por:

Barry Lindao Borja

Guayaquil - Ecuador

Febrero 1994

AGRADECIMIENTO



BIBLIOTECA
FAC. ING.
BARCELONA

A la Dra. NELLY CAMBA, Directora
de Tesis, por su ayuda y colaboración
para la realización de este trabajo

DEDICATORIA



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARIKINA

A DIOS, MI TODO

A MI MADRE, MI INSPIRACION



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL".


A handwritten signature in dark ink, enclosed within a large, hand-drawn oval.

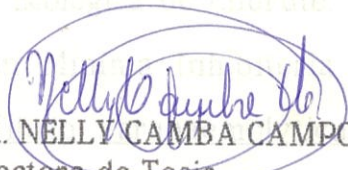
Barry Robert Lindao Borja

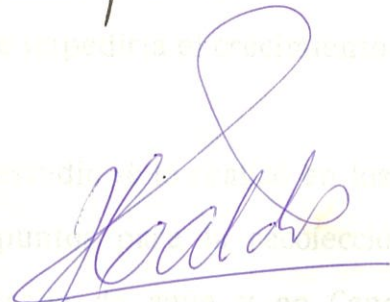
MIEMBROS DEL TRIBUNAL CALIFICADOR




BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA


Ing. RAUL COELLO FERNANDEZ
Presidente Tribunal


Dra. NELLY CAMBA CAMPOS
Directora de Tesis


Dr. JORGE CALDERON VELASQUEZ
Miembro Principal


Ac. HARRY AVILES MACIAS
Miembro Principal



RESUMEN

BIBLIOTECA
TAC. ING.
MAQUINA

Este trabajo se realizó en tres importantes grupos de camaroneras localizadas en la zona de Churute, cerca a la Reserva Ecológica de Churute. El objetivo principal era determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.) del Cloranfenicol y Furazolidona frente a Vibrio Parahaemolyticus, en otros términos: Cual es la menor concentración de cada uno de estos antibióticos que impediría el crecimiento de esta especie de bacteria?

El estudio se lo realizó en los meses de Septiembre y Octubre. Se escogieron 7 puntos para la recolección de las muestras de agua (una muestra en Entrada de agua y en Canal de Drenaje de Camaronera No. 1, No.2; en Camaronera No. 3 una muestra en Entrada de agua y dos muestras en canal de drenaje) pero solo en 3 puntos se pudo aislar el V. parahaemolyticus.

En el mes de Septiembre, el día (3) en que se recolectaron las muestras, el día fue nublado en la mañana y soleado en la tarde; el muestreo se inició a las 11h00 y culminó a las 15h00. De las 7 muestras analizadas; la salinidad fluctuó entre 2,0 ppt y 14,0 ppt., la temperatura entre 24,0°C a 26,0°C y el pH fluctuó entre 7,0 a 8,0.



PARAMETROS FISICOS DE LAS MUESTRAS DE AGUA ANALIZADAS

MUESTREO DE SEPTIEMBRE

	HORA	DIA	SALINIDAD	TEMPERATURA	pH
MINIMO	11H00	Nublado	2	24,0	7,0
MAXIMO	15H00	Soleado	14	26,0	8,0

Luego de la recolección de las muestras se procedió a aislar e identificar por pruebas bioquímicas al V. parahaemolyticus. Una vez obtenidas las cepas puras de esta bacteria, se realizaban las Pruebas de Antibiograma y (C.M.I.). En ambas pruebas se utilizó una población de bacterias que originaba una turbidez comparable a la turbidez del Mac Farland 0,5; según esta escala el estándar 0,5 equivale a 10^8 Unidades Formadoras de Colonia (U.F.C.).

Los antibiogramas fueron para Furazolidona y Cloranfenicol, se utilizaron discos de sensibilidad de (500, 250 y 125) ug/ml o ppm.

En la furazolidona los discos de 500 ppm nos dió un halo de 2,2 cm (media) de diámetro; en los discos de 250 ppm y 125 ppm el diámetro de los halos fue de 1,9 cm (media); de estas tres concentraciones, solo en los discos de 500 ppm, sus halos no presentaron crecimiento de colonias de bacteria mientras que en los discos de 250 ppm y 125 ppm hubo el crecimiento de por lo menos una colonia dentro de la formación de los halos; por lo tanto se puede

VIII

considerar que el V. parahaemolyticus es sensible a la Furazolidona en discos de 500 ppm y que presenta una resistencia intermedia a los discos de 250 ppm y 125 ppm.

ANTIBIOGRAMA FURAZOLIDONA

CONCENTRACION DISCOS (ppm)	DIAMETRO DE HALO (cm)	SENSIBILIDAD
500,0 ppm	2,2	SENSIBLE
250,0ppm	1,9	RESISTENCIA INTERMEDIA
125,0 ppm	1,9	RESISTENCIA

El antibiograma Cloranfenicol dió los siguientes resultados: los discos de 500 ppm, 250 ppm originaron halos con diámetro de 2,6 cm (media) y los discos de 125 ppm originaron halos de 2,4 cm de diámetro (media). Dentro de los halos formados por estos discos no se observó presencia de colonias bacterianas. De acuerdo a estos antibiogramas, el V. parahaemolyticus es sensible al Cloranfenicol en estas tres concentraciones.

**ANTIBIOGRAMA
CLORANFENICOL**

CONCENTRACION DISCOS (ppm)	DIAMETRO DE HALO (cm)	SENSIBILIDAD
500,0 ppm	2,6	SENSIBLE
250,0 ppm	2,6	SENSIBLE
125,0 ppm	2,4	SENSIBLE

Con los resultados obtenidos en los antibiogramas se procedió a determinar la (C.M.I.), utilizándose en ambos antibióticos, las siguientes concentraciones: (500,0; 250,0; 125,0; 62,5 y 31,2) ug/ml o ppm. Con la Furazolidona las concentraciones desde los (31,2 hasta 250,0) ppm presentaron crecimiento bacteriano, siendo este crecimiento en la concentración de 250 ppm, tenue. En la concentración 500 ppm no se presencié crecimiento.

**C.M.I.
FURAZOLIDONA**

CONCENTRACION TUBOS (ppm)	CRECIMIENTO BACTERIANO
500,0 ppm	NEGATIVO
250,0 ppm	POSITIVO
125,0 ppm	POSITIVO
26,5 ppm	POSITIVO
31,2 ppm	POSITIVO

Con el cloranfenicol, la técnica de C.M.I. permitió observar el crecimiento bacteriano en los tubos que presentaban concentraciones de 31,2 ppm, 62,5 ppm y a partir de las concentraciones de 125,0 ppm no se observó crecimiento bacteriano.

CMI CLORANFENICOL

CONCENTRACION TUBOS (ppm)	CRECIMIENTO BACTERIANO
500,0 ppm	NEGATIVO
250,0 ppm	NEGATIVO
125,0 ppm	NEGATIVO
62,5 ppm	POSITIVO
31,2 ppm	POSITIVO

En el mes de Octubre se realizó un segundo muestreo, en este muestreo se trató de realizar todos los procedimientos, de igual forma como el primer muestreo (hora, fecha en pleamar, etc.)

El día fue seminublado en la mañana y soleado durante la tarde. Las condiciones físicas de las muestras de agua fueron las siguientes: La salinidad fluctuó entre 11,0 ppt y 18,0 ppt; la temperatura entre 24,0°C a 26°C y el pH fluctuó entre 7,0 a 8,0.

PARAMETROS FISICOS DE LAS MUESTRAS DE AGUA ANALIZADAS

	HORA	DIA	SALINIDAD ppt	TEMPERAT. °C	pH
MINIMO	11h00	Semi nublado	11,0	24,0	7,0
MAXIMO	15h00	Soleado	18,0	26,0	8,0

Este segundo muestreo nos reafirmó los resultados obtenidos en el primer muestreo, tanto en los antibiogramas como en concentración mínima inhibitoria. Por lo que podemos concluir:

Que para la Furazolidona, la Concentración Mínima Inhibitoria de V. parahemolyticus es de 500 ug/ml y para el Cloranfenicol la C.M.I. es 125 ug/ml.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	VI
INDICE GENERAL.....	XII
INDICE DE FIGURAS.....	XVI
INDICE DE TABLAS.....	XVII
INTRODUCCION.....	19
CAPITULO I.....	24
BIOLOGIA DEL VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS.....	24
1.1. Taxonomía.....	24
1.2. Generalidades.....	24
CAPITULO II.....	26
CULTIVO DEL VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS.....	26
2.1. Aislamiento y recuento del V. parahaemolyticus.....	26
2.1.1. Materiales y Aparatos.....	26
2.1.1. Técnica.....	27
2.2. Pruebas Bioquímicas para Identificación del V. parahaemolyticus.....	29
2.2.1. Materiales y Aparatos.....	29
2.2.2. Técnica.....	31



CAPITULO III	42
RESISTENCIA BACTERIANA.....	42
3.1. Introducción y Concepto.....	42
3.2. Forma de resistencia	43
3.3. Antibiogramas	44
3.3.1. Medio de Agar	45
3.3.2. Inoculación de las Placas de Ensayo.....	46
3.3.3. Lectura e Interpretación	47
3.3.4. Límite del Método y Precauciones especiales	48
3.3.5. Fuentes frecuente de Error	48
3.4. Almacenamiento de los Discos con Antibióticos.....	50
3.5. Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.).....	51
3.5.1. Introducción y Generalidades.....	51
3.5.2. Procedencia, preparaciones y soluciones. Patrón de los Antibióticos.....	52
3.5.3. Medios.....	53
3.5.4. Inóculo	54
3.5.5. Resultados	55
3.5.6. Modalidades de acción de un antibiótico.....	56
3.5.7. Influencia de las variaciones técnicas sobre los resultados de las pruebas de sensibilidad.....	59

CAPITULO IV	61
FURAZOLIDONA.....	61
4.1. Estructura química y modo de acción.....	62
4.2. Uso y principio activo.....	62
4.3. Farmacocinética y estudios de residuo.....	63
4.4. Espectro de acción y mecanismo antimicro- biano.....	64
4.5. Dosis de referencias antimicrobiana.....	65
CAPITULO V	66
CLORANFENICOL.....	66
5.1. Composición química.....	66
5.2. Modo de acción.....	67
5.3. Uso y principio activo.....	68
5.4. Farmacocinética y estudio de residuos.....	69
5.5. Espectro de acción y mecanismo antimicro- biano.....	70
5.6. Dosis de referencias.....	70
CAPITULO VI	75
METODOLOGIA.....	75
6.1. Recolección de muestras.....	75
6.2. Aislamiento, pruebas bioquímicas e identificación de bacterias.....	76
6.3. Antibiogramas.....	79
6.3.1. Preparación de solución antibiótico y discos de sensibilidad.....	79
6.3.2. Siembra de <i>V. parahaemolyticus</i> en el agar Mueller Hinton.....	80
6.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	87



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Pág.

6.4.1. Preparación de la solución madre de antibiótico.....	90
CAPITULO VII	93
RESULTADOS	93
APENDICES	97
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	122
BIBLIOGRAFIA	126

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Pruebas Bioquímicas	39
FIGURA 2 Furazolidona: Estructura Química.....	61
FIGURA 3 Cloranfenicol: Estructura Química	66
FIGURA 4 Siembra de Bacterias en Agar Mueller - Hinton	86
FIGURA 5 Concentración Mínima Inhibitoria	88
FIGURA 6 Concentración Mínima Inhibitoria para Cloranfenicol y Furazolidona.....	96

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA I	38
Diferencias Bioquímicas entre los Principales Componentes de la Bacterioflora del V. parahaemolyticus.....	38
TABLA II	40
Características Bioquímicas del v. parahaemolyticus	40
TABLA III	41
Diferencias Bioquímicas entre los Vibrios	41
TABLA IV	72
Escala de Mac Farland	72
TABLA V	72
Solventes y Diluyentes para las Soluciones de Reservas de Algunos Antibióticos.....	72
TABLA VI	73
Dosis para el Tratamiento de Vibrios	73
TABLA VII	74
Antibiograma de V. parahaemolyticus Aislado en Camaronera de Sr. Gilberto Escobar	74
TABLA VIII	82
Características Físicas de las Muestras de Agua, mes de Septiembre	82
TABLA IX	83
Características Físicas de las Muestras de Agua, mes de Octubre	83
TABLA X	84
Características Químicas de las Muestras de Agua, mes de Septiembre.....	84
TABLA XI	85
Características Químicas de las Muestras de Agua, mes de Octubre	85

TABLA XII	Antibiograma, mes de Septiembre	91
TABLA XIII	Antibiograma, mes de Octubre	92
TABLA XIV	C.M.I., mes de Septiembre	94
TABLA XV	C.M.I., mes de Octubre	95



BIBLIOTECA
FAC. MED.
TABASCO

INTRODUCCION

En el Ecuador, el crecimiento del sector camaronero, en su mayoría, se ha desarrollado con mínimas técnicas de manejo, pocas metodologías de optimización de las producciones y poco cuidado del habitat. Estas faltas originaron que las características favorables iniciales para la cría del camarón disminuyeran significativamente, y por lo contrario provocaron polifерación de organismos patógenos que ocasionaron pobre crecimiento, mortalidades y por lo tanto bajas producciones, entre estos agentes patógenos tenemos: Virus (Baculovirus penaei, IHNV) Bacterias (Vibrios spp. Pseudomona sp.), Endoparásitos (Gregarinas, Microsporidios).

Esta situación provocó la desesperación del sector. Frente a esta circunstancia este sector planteó algunas soluciones, y una de las más comunes fue el uso de antibióticos (como medida terapéutica). En la mayoría de los casos el empleo de estos químicos fue realizado sin las mínimas contemplaciones técnicas del diagnóstico, terapia o dosificación.

El sector de las camaroneras transfirió la responsabilidad del diagnóstico, terapia y dosificación a las fábricas de alimento balanceado. Estas respondieron a esta demanda con los "alimentos medicados".

La formulación de los alimentos medicados fue realizada en base a las observaciones de estas fábricas, a continuación señalo las más comunes:

a) Algunas fábricas emplearon la terapia - dosificación utilizada en otros animales (Bovinos, porcinos, aves, etc.); por ejemplo, para los endoparásitos de género *Coccidia* en aves, la teoría recomienda con buenos resultados el uso del Maxiban y Elancoban (conocidos como Anticoccidias). Esta terapia fue adaptada para el sector camaronero para eliminar las Gregarinas (endoparásitos protozoarios) e inclusive se los empleaban como bacteriostáticos.

b) Algunas fábricas dosificaron antibióticos y parasiticida por medio del error y acierto. Esto conllevó en algunos casos a subdosificación y en otros a sobredosificación. En la subdosificación el perjuicio fue solo a nivel económico mientras que la sobredosificación perjudicó a la ecología con la creación de patógenos altamente resistentes.

Este uso sin control de los antibióticos y químicos (no determinando las concentraciones adecuadas) creó resistencias bacterianas. Esto originó que el máximo organismo de control de alimentos importados en los U.S.A. realizara una comunicación preventiva al sector (Capex, 1992), en la que se señalaba: "el rechazo que sufriría el producto que contenga residuo de antibióticos y con mayor énfasis en la FURAZOLIDONA".

Ante esta advertencia de la F.D.A., y por lo necesario en algunos casos de la terapia a base de antibióticos era imprescindible una investigación teórica que nos permitiera determinar una técnica práctica de dosificación para el sector camaronero. Esta técnica nos ayudaría a determinar la real situación de los antibióticos en cuanto a las resistencias o concentraciones mínimas de inhibición de crecimiento bacteriano.

En el país una de las especies de bacterias que mayor incidencia ha tenido en el camarón P. vannamei, es el Vibrio parahaemolyticus, por lo que los tratamientos con antibióticos para bacterias han sido dirigidos mayormente a esta especie.

Por las razones antepuestas, el presente estudio se lo dirigió a determinar el nivel de la resistencia del V. parahaemolyticus frente al Antibiótico Furazolidona (mayor restricción por F.D.A.) y Cloranfenicol (de frecuente uso en laboratorio de larvas).

En el sitio escogido para la realización del presente trabajo están localizadas camaroneras líderes en producción y de mayor tiempo en esta actividad. Este sector está situado a 35 Km de Guayaquil, conocido como Zona de Churute. Esta zona se alimenta con agua de esteros del Golfo de Guayaquil, la salinidad fluctúa desde 0 ppt (época lluviosa) a 20 ppt (época seca).

Siendo el V. parahaemolyticus una especie halofila era conveniente realizar la investigación durante la estación seca (Septiembre, Octubre), en razón, de una mayor probabilidad de aislamiento de esta bacteria.

El aislamiento de la bacteria se lo realizó a partir de muestras de agua recolectadas en la estación de bombeo (entrada de agua) y en los canales de drenaje de cada camaronera. Las muestras de los canales de drenajes estaban conformadas por lo menos de 10 submuestras. Estas muestras de agua eran refrigeradas y transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Fábrica de Balanceado L'IRIS que está diseñado para la microbiología de la materia prima, del producto terminado y para microbiología marina. La refrigeración de las muestras se la realizaba en hieleras, en estas, la temperatura media era de 4°C. El tiempo que se empleaba desde la recolección de las muestras hasta la siembra en los medios de cultivos era de 5 horas promedio.

Las muestras de agua fueron recolectadas en las Camaroneras del Grupo Quirofa, Huracán y Aquamar.

Una vez aislado e identificado el V. parahaemolyticus, se procedió a realizar las pruebas de sensibilidad con discos de varias concentraciones de furazolidona y cloranfenicol. Estas pruebas nos indicarían el rango o concentración de antibiótico en que esta bacteria es resistente.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARTINA

Con un conocimiento básico de la resistencia de la bacteria se procedió a realizar la etapa definitiva del estudio que consistía en la determinación cuantitativa de la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.) de estos antibióticos para V. parahaemolyticus.

CAPITULO I

BIOLOGIA DEL VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

1.1. TAXONOMIA (JOSEHP P. TRUANT, 1978):

REINO:	PROCARIOTA
DIVISION II:	BACTERIAS
SECCION 8:	BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBICOS FACULTATIVOS
FAMILIA II:	VIBRIONACEAS
GENERO I:	VIBRIO
ESPECIE:	PARAHAEMOLYTICUS

1.2. GENERALIDADES

V. parahaemolyticus fué descubierto en el Japón como producto de una intoxicación alimentaria originada por el consumo de pescado y molusco crudos (Fujino y Col., 1953).

V. parahaemolyticus es un bacilo halófilo, gram negativo, polimorfo, móvil que en medios líquidos presenta un único flagelo polar, en tanto que en medios sólidos aparece con flagelos peritricos. Es anaerobio

facultativo de crecimiento rápido, pudiendo hacerlo entre 15 y 43°C con un rango de pH de 5 - 9 y una concentración de NaCl de 0,5 y 8,0%. Las cepas causantes de la enfermedad en el hombre son generalmente Kanagawa (+) producción de hemólisis en un agar-sangre especialmente con alta concentración salina), y de los productos de la pesca son casi siempre Kanagawa (-). En una placa de agar sangre normal, ambos tipos presentan algún grado de hemólisis.

Son microorganismos que habitan en los estuarios de todo el mundo, no necesitan requerimiento nutricionales exigentes para su desarrollo, tienen metabolismo respiratorio fermentativo. Tienen afinidad por la sal, es decir son Halófila ya que requieren por lo menos 2% de cloruro de sodio para su crecimiento y tienen un tiempo de generación entre los 9 y 15 mnt (Carvaca, 1990).

En Pennaeus vannamei cultivados en estanques, en Texas se determinó que el 5% de su bacterioflora corresponde a los Vibrios, un 30% a las Pseudomonas y un 65% a las Aeromonas (Vanderzant, Cobb, Thompson y Parker, 1973). En la Tabla I se establecen las diferencias bioquímicas entre estos grupos bacteriales.



BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DE CHILE

CAPITULO II

CULTIVO DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

2.1. AISLAMIENTO Y RECUENTO DE V. PARAHAEMOLYTICUS

2.1.1. Materiales y Aparatos

1. Placas de Petri de vidrio de (100 x 15) mm ó de plásticos de (90 x 15) mm.
2. Estufa a 35 - 37°C
3. Baño de agua o estufa de aire para mantener el medio con agar templado a 44 - 46°C.
4. Aguja de inoculación con asa de 3 mm, preferentemente de nícrón o de platino - iridio.
5. Agua de peptona para diluciones con 3% de NaCl, en matraces o botellas con 450 ml de capacidad.
6. Caldo salino - polimixina B (medio 4), en tubos de (150 x 15)mm con 10ml cada uno.

7. Caldo Bismuto Sulfito Sal (medio 2), en tubos de (150 x 15) mm con 10 ml cada uno.
8. Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (agar TCBS, medio 7), para placas.

2.1.2. Técnica

1. Preparar las muestras de alimento usando agua de peptona para diluciones con 3% de NaCl como medio de dilución en vez de agua de peptona o agua de peptona salina.
2. Preparar tubos de caldo salino Polimixina B para el método del número más probable (N.M.P.), tres tubos por dilución, inoculando alícuotas de 1 ml. de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Incubar los tubos a 35 -37°C durante una noche (15 - 24) horas.
3. A partir de las 3 diluciones más altas de caldo salino polimixina B (presentan crecimiento) se sembrara con el asa, en estría, el agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (T.C.B.S.). Si se duda acerca del crecimiento, sembrar las tres primeras diluciones. Incubar las placas a 35 - 37°C durante 18 horas.
4. En agar T.C.B.S: Las colonias de V. parahaemolyticus son

redondas de (2 - 3) mm. de diámetro, con centro azul o verde; las colonias de V. alginolyticus aparecen mayores y amarillas; los coliformes, proteus y estreptococos aparecen como colonias pequeñas y translúcidas.

5. Cuando las colonias azul-verdosas en las placas del agar T.C.B.S. han sido identificadas como V. parahaemolyticus, aplicar la tabla de N.M.P. para el cálculo final del número de microorganismos.

6. Cuando se sospeche que el número de células de V. parahaemolyticus en la muestra va a ser pequeño, enriquecer pasando 5 ml. de la dilución 10^{-1} a 10 ml de caldo bismuto sal e incubar a 35 - 37°C durante 16 horas.

7. Agítese el cultivo (caldo bismuto sal) y siémbrese con el asa en forma de estría la superficie de placas con agar T.C.B.S. Incubar las placas a 35 - 37°C durante 18 y 24 horas. Examinar las colonias sospechosas bioquímicamente tal como se describe en la identificación de V. parahaemolyticus, más adelante, y si es necesario realizar la tipificación serológica.

8. El cultivo de enriquecimiento no es necesario para el aislamiento de V. parahaemolyticus a partir de muestras fecales tomadas de pacientes aún ante el estado de diarrea aguda.

2.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACION DEL V. PARAHAEMOLYTICUS.

Para una mejor comprensión de las características bioquímicas del V. parahaemolyticus, estas se las presentan en forma resumida en la tabla II y en un diagrama en la figura 1.

En la tabla III se presentan las diferencias bioquímicas entre los V. anguillarum, V. alginolyticus y V. parahaemolyticus que me permitió una plena seguridad en la identificación del Vibrio en estudio.

2.2.1. Materiales y aparatos

1. Placas de petri de vidrio de (100 x 15) mm ó de plástico de (90 x 15) mm.
2. Aguja de inoculación preferiblemente de alambre de nícrón o de platino de iridio.
3. Baño de agua o de estufa de aire para mantener el agua templada a 44 o 46°C.
4. Estufas de incubación a 27 -29°C y a 35 - 37°C y baño de agua a 41 - 43°C.

5. Frigorífico a 3 - 5°C.
6. Caldo Tripticasa Soja (TSA) con 3% del NaCl (medio 9) distribuidos en tubos de (150 x 15) mm, (7 - 10) ml. en cada una.
7. Caldo salino (3% NaCl) arginina dihidrolasa y lisina decarboxilada (Medio 1) en tubo de (100 x 13) mm, 3 ml. en cada tubo.
8. Caldo salino (con 3% de NaCl) control para arginina dihidrolasa y lisina decarboxilasa (Medio 1) en tubos de (100 x 13) mm, con un mililitro en cada tubo.
9. Caldo Tripticasa sal con 0%, 6%, 8% y 10% de NaCl, en tubos de (150 x 15) mm. con (7 - 10) ml. cada uno.
10. Caldo RM-VP (rojo metilo - voges proskauer) con 3% de NaCl (Medio 5), en tubos de (100 x 13) mm con un ml en cada tubo 11. Caldo sales carbohidratos (medio 13), en tubos diferentes para sacarosa y manitol, en tubos de (150 x 15) mm con 5 ml en cada uno.
12. Agar hierro triple azúcar sal (Medio 8), distribuidos en tubos hasta alcanzar una altura de (7 - 8) cm por tubo.
13. Agar tripticasa Soja con 3% de NaCl (Medio 10) en placas e inclinado en tubos.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
SANTIAGO

14. Agar para la prueba de movilidad con 3% de NaCl (Medio 11) en tubos de (150 x 15) mm en cada tubo.
15. Medio salino de Hugh Leifson (medio 3), en tubo de (100 x 13) mm con 3 ml cada uno.
16. Agar de Wagatsuma, modificado (Medio 14), para placas
17. Reactivos para la citocromo-oxidosa (reactivo 2).
18. Reactivos para la prueba de Voges-proskauer (reactivo 4)
19. Aceite mineral, estéril (reactivo 1).

2.2.2. Técnica

1. Inocular células de dos o mas colonias típicas o sospechosas, que hayan crecido en placas de Agar T.C.B.S., en los siguientes medios:

a) Agar hierro triple azúcar con 3% de NaCl

b) En tubos con caldo tripticasa soja con 3% de NaCl y agar tripticasa soja con 3% de NaCl inclinado.

c) Medio para la prueba de movilidad con 3% de NaCl

a) Agar hierro triple azúcar con 3% de NaCl. El tubo con el medio es sembrado en su superficie inclinada por estría y en su columna por picadura. Incubar una noche a 35 - 37°C. V. parahaemolyticus produce una parte inclinada alcalina (rojo) y una columna de medio ácido (amarilla). No produce gas (no se ven burbujas en el agar) y tampoco produce SH₂ (no hay ennegrecimiento del medio).

b) Incubar tubos de caldo tripticasa soja con 3% de NaCl y agar tripticasa soja con 3% de NaCl inclinado e incubar durante una noche a 35 - 37°C. Estos cultivos sirven como inóculos para otras pruebas, para la tinción de gram y para el examen microscópico.

El V. parahaemolyticus cultivado en el caldo tripticasa soja con 3% de NaCl es un bacilo gram negativo con un flagelo polar.

c) Medio para la prueba de movilidad con 3% de NaCl. Inocular un tubo por picadura hasta una profundidad de (5 - 10) mm. Incubar a 35 - 37°C durante 24 horas. Un crecimiento circular a partir de la línea de picadura es indicativo de positividad, ya que el V. parahaemolyticus da reacción positiva.

2. Los organismos que son móviles, gram negativos, que producen

columna de medio ácido y parte inclinada alcalina en Agar hierro triple azúcar con 3% de NaCl, y no producen gas ni SH₂, se someten a las siguientes pruebas:

- a) Prueba en agar tripticasa soja con 3% de NaCl
- b) Prueba de la arginina dehidrolasa de la lisina descarboxilasa.
- c) Prueba del halofismo
- d) Inocular caldo RM-VP conteniendo 3% de NaCl
- e) Prueba de la glucosa de Hugh Leifson
- f) Fermentación de carbohidratos
- g) Crecimiento a 42oC
- a) Sembrar en forma de estría en agar tripticasa soja con 3% de NaCl inclinado e incubar a 35 - 37oC durante 24 horas.

Realizar la prueba de la citocroma-oxidasa. V. parahaemolyticus es positivo en esta prueba.

b) Prueba de la arginina dihidrolasa de la Lisina descarboxilasa. A partir de agar tripticasa soja con una asa inocular tubos: con caldo salino al 3% NaCl de arginina dihidrolasa, con caldo lisina descarboxilasa y en medio base silicio con 3% de NaCl (control). No tapar los tubos herméticamente e incubar a 35 - 37°C durante 24 horas. El medio se vuelve amarillo debido a la producción de ácido a partir de la glucosa. Cuando se produce descarboxilación, el medio se vuelve alcalino o purpura. El tubo control permanece amarillo (ácido). V. parahaemolyticus es negativo para la descarboxilación de la arginina y positivo para la descarboxilación de la Lisina.

c) Prueba del halofismo. Desde agar tripticasa soja con 3% de NaCl tomar las colonias e inocular en un tubo de caldo tripticasa sal para cada una de las cuatro concentraciones de sal (0%, 6%, 8% y 10% de NaCl) e incubar a 35 - 37°C durante 24 horas. V. parahaemolyticus crece bien en NaCl al 6% y 8% pero no lo hace o muy pobremente en concentraciones del 0% y 10% de NaCl.

d) Inocular caldo RM-VP al 3% de NaCl con una asa conteniendo colonias procedente de un cultivo de agar tripticasa soja con 3% de ensayo y llevar a cabo la prueba de Voges - Proskauer. V. parahaemolyticus de reacción negativa.

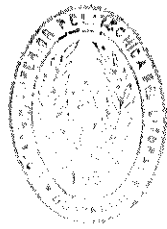
e) Prueba de la glucosa de Hugh Leifson. Inocular por picadura dos

tubos con medio salino de Hugh-Leifson a partir de un cultivo de agar tripticasa soja con 3% de NaCl. Cubrir un tubo con una capa de aceite mineral estéril e incubar ambos tubos durante una noche a 35 - 37°C. Un cambio de color amarillo en ambos tubos es indicativo de que el organismo fermenta la glucosa, pero si solamente el tubo abierto se vuelve amarillo, el organismo oxida la glucosa. V. parahaemolyticus fermenta la glucosa sin producción de gas.

f) Fermentación de carbohidratos: Inocular un tubo de cada uno de los caldos sal carbohidratos (Manitol y Sacarosa) a partir de un cultivo en agar tripticasa soja con 3% NaCl e incubar a 35 - 37°C durante 24 horas. Una reacción ácida (prueba de pigmentación positiva) producirá un cambio de color del medio, de verde al amarillo. V. parahaemolyticus fermenta el manitol pero no la sacarosa.

g) Crecimiento a 42°C a partir de un cultivo de 24 horas en caldo tripticasa soja con 3% de NaCl inocular un tubo de caldo tripticasa soja con 3% de NaCl e incubar a 41 - 43°C en baño de agua durante 24 horas. El crecimiento profuso es indicativo de positividad. V. parahaemolyticus da reacción

3. La enteropatogenicidad de V. parahaemolyticus está estrechamente correlacionada con una reacción específica de hemolisis en el agar de Wagatsuma (una prueba Kanagawa positiva).



BIBLIOTECA
FAC. MED.
MAR DEL PLATA

Para realizar la prueba, colocar varias asas en círculo a partir de un cultivo en caldo tripticosa soja con 3% de NaCl en una placa de agar de Wagatsuma bien seca. Incubar de (35 - 37)°C y observar los resultados a las (18- 24) horas.

La presencia de zonas claras transparentes alrededor de las colonias es indicativo de positividad.

4. Prueba de Citocromo Oxidasa: Sembrar un tubo inclinado de medio base para agar sangre. Incubar de (35 - 37)°C durante 18 horas. Añadir 2 o 3 gotas de alfa naftol al 1% y dejarla deslizarse por la superficie del cultivo. A continuación, añadir 2 o 4 gotas de solución de fenil diamina y agitar vigorosamente. La formación de un color azul en unos 2 minutos es indicativo de positividad. También puede ser usado para esta prueba tiras de papel o discos impregnados.

5. Prueba de Voges Proskauer:

a) Inocular tubos de caldo glucosa tamponado o de caldo sal peptona glucosa a partir de cultivos puros e incubarlos a (35 - 37)°C durante 48 horas.

b) Pipitear un mililitro de cada cultivo en varios tubos y añadir a cada uno de ellos 0,6 ml de la solución de alfa naftol y 0,2 ml de la solución de KOH.

c) Agitar los tubos y dejarlos en reposo durante (2 - 4) horas observar los resultados. La aparición en la mezcla de un color rosa o carmesí se anota como prueba positiva.

DIFERENCIAS BIOQUIMICAS ENTRE LOS PRINCIPALES COMPONENTES

DE LA BACTERIOFLOFA DE PENNAEUS VANNAMEI

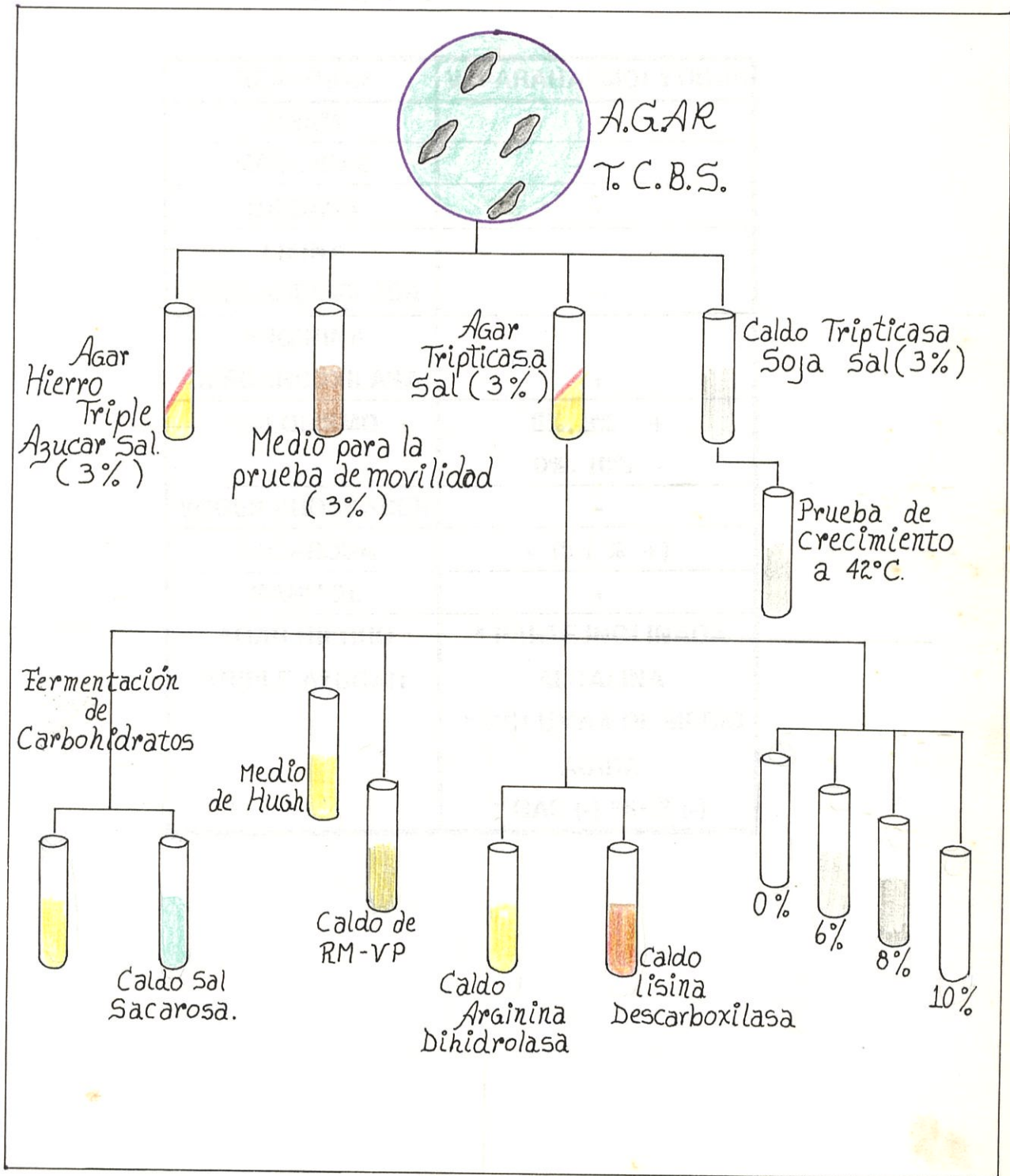
T A B L A I

REACCION	V. ALGINOLYTICUS	V. PARAHAEVOLYTICUS	PSEUDOMONAS	AEROMONAS
GRAM	-	-	-	-
MOTILIDAD	+	+	+	+
OXIDASA	+	+	+	+
METAB. DE GLUCOSA FERM. OXIDAT.	F	F	O	F
ACIDO GLUCOSA	+	+	+ / -	+
ACIDO LACTOSA	-	-	+ / -	+ / -
ACIDO SUCROSA	+	-	+ / -	+ / -
INDOL	+	+	-	+
REDUCCION NO3	+ / -	+ / -	+ / -	+
DESCARBOX. ARGININA	-	-	+ / -	+
USO CITRATO	+ / -	+ / -	+	+ / -
MEDIO TCBS	AMARILLO	AZUL	NO COLOR	NO COLOR
REQUIERE DE NaCl	+	+	-	-

FUENTES: JAMES BROCK, 1986

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Figura No. 1



CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

TABLA II



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

REACCION	V. PARAHAEMOLYTICUS
GRAM	-
MOTILIDAD	+
OXIDASA	+
LISINA DESCARBOXILASA	+
ARGININA DESCARBOXILASA	+
HALOFISMO	6%, 8% + 0%, 10% -
VOGES PROSKAUER	-
SACAROSA	- (5-7 % +)
MANITOL	+
AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR	* PARTE INCLINADA ALCALINA * COLUMNA DE MEDIO ACIDA * GAS (-) *SH ₂ (-)

DIFERENCIAS BIOQUIMICAS ENTRE *V. ALGINOLYTICUS*,
V. PARAHAEMOLYTICUS Y *V. ANGUILLARUM*

T A B L A III

REACCION	<i>V. ALGINOLYTICUS</i>	<i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i>	<i>V. ANGUILLARUM</i>
NaCl 8 %	+	+	-
NaCl 10 %	+	-	-
42 oC	+	+	-
VOGES PROSKAUER	+	-	+
SACAROSA	+	-	+
MEDIO TCBS	+	+	+

FUENTE: MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS (ICMSF)

CAPITULO III

RESISTENCIA BACTERIA

3.1. INTRODUCCION.- CONCEPTO

Como consecuencia de la presión ecológica y de una amplia utilización de los antibióticos añadidos a los piensos para animales y en el tratamiento de las enfermedades humanas y de animales, han surgido cepas resistentes a los antibióticos, cepas que se encuentran muy diseminadas. El cambio mas importante de la sensibilidad a los antibióticos es mediado por factores R contenidos en el material genético de la célula bacteriana. Estos factores se transmiten de unos a otros miembros de la familia Enterobacteriaceae y entre algunas otras especies. Este fenómeno fue primeramente descubierto en el Japón en 1959 (Watanabe, 1963).

Por lo tanto, la Resistencia es la inmunidad adquirida por determinadas bacterias frente a determinados antibióticos resultado de una exposición prolongada a estos químicos y a cambios en la ecología.

La aplicación de antibióticos ha sido un problema frecuente en sistemas de crianzas acuícolas, donde cierto tipo de compuestos son



BIBLIOTECA
NACIONAL DE
MEDICINA

rutinariamente e indiscriminadamente suministrados. En muchos casos el uso de una terapia con antibióticos no es producto de un trabajo de diagnóstico para el problema.

En otros casos el antibiótico es aplicado a bajo niveles como medida de precaución para el control de la bacteria. Mientras que estas estrategias de manejo pueden funcionar a corto plazo no exceptúa un potencial que guía el desarrollo de cadenas resistentes de flora bacterial dentro de los sistemas integrados.

3.2. FORMA DE RESISTENCIA: (JAMES BROCK, 1990)

La resistencia a las drogas puede ser de orden genético y no genético. Ejemplos de mecanismos de resistencia a drogas de orden no genéticas incluyen:

- a) Ausencia de multiplicación
- b) Pérdida de la estructura objetiva específica

Ejemplos de resistencia a drogas de orden genéticos son:

- a) Resistencia de cromosomas

b) Resistencia extracromosomal (Plasmidio)

Un número de diferentes mecanismos por los cuales los microorganismos podrían exhibir resistencia a drogas son las siguientes:

- a) Nuevas enzimas
- b) Cambio de permeabilidad
- c) Estructuras alteradas
- d) Cursos metabólicos alterados
- e) Enzimas alteradas

3.3. ANTIBIOGRAMAS

Las pruebas de susceptibilidad sobre las bacterias patógenas principales presentes en el sistema de cultivo de especies marinas, son útiles como parte de un programa integral de vigilancia de infecciones bacterianas.

El antibiograma es una técnica que nos permite determinar la sensibilidad de una bacteria aislada en clínica frente a un antibiótico en

un medio de difusión (agar).

En general esta técnica de sensibilidad consiste en la siembra de una determinada especie de bacteria (inóculo) en un medio de difusión (medio de agar), donde se va a determinar su sensibilidad frente a concentraciones de antibióticos, estas concentraciones están impregnadas en pequeños discos.

3.3.1. Medio de Agar

Se recomienda el agar Mueller-Hinton (Medio 6) para las bacterias de rápido crecimiento aeróbicas y anaeróbicas facultativas. Aunque este medio es capaz de permitir el crecimiento de muchos patógenos, suele ser necesario suplementarlo para los patógenos con requerimientos especiales, con sangre desfibrinada de oveja, caballo u otro animal y al 5%.

Las placas de Petri de 9 cm. de diámetro deben ser rellenas con 25 ml. del medio Muller Hinton y placas de 14 cm. de diámetro a rellenas con 60 ml. del medio. La profundidad del agar debe ser de 4 mm. Las placas se pueden secar 30 minutos a 37°C antes de su empleo.

3.3.2. Inoculación de las Placas de Ensayo

Mediante un asa de cultivo se tocan (4 - 5) colonias aisladas de iguales características, y se inoculan en (4 - 5) ml de caldo de cultivo nutritivo como medio con caseína y soja. Se incuban los cultivos a 35°C hasta que aparezca una ligera turbidez visible (normalmente, 2 -5) horas. Se ajusta entonces la turbidez de los cultivos en crecimiento activo con solución salina o caldo hasta obtener una turbidez comparable visualmente, con la del estándar de McFarland 0,5 (tabla IV).

Dentro de los 15 minutos después de inocular las placas se aplican los discos con antibióticos sobre la superficie de las placas inoculadas bien sea por medio de un distribuidor mecánico o bien manualmente con pinzas estériles. Todos los discos se presionan suavemente sobre el agar con las pinzas para asegurar el contacto completo sobre la superficie del agar, la disposición espacial de los discos deben, ser de tal forma que no estén situados mas cerca de los 15 mm de los bordes de la placa y suficientemente separados entre sí para que no se produzca un solapamiento de las zonas de inhibición. Generalmente este limita el número de discos que pueden colocarse sobre cada placa a (12 - 13) en las de 150 mm de diámetro o bien solo (4 - 4) en las de 100 mm. Al cabo de 15 minutos de aplicar los discos se invierten las placas y se depositan en un incubador a 35°C. Un retraso mayor en la incubación puede producir un exceso de predifusión del agente



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

antimicrobiano.

John Matsen y A. Barry (1978) nos indican que cuando se aplican los discos de papel filtro con cantidades precisas de antibióticos sobre placas de agar húmedo, éstos difunden en el medio que los rodea, y presentan un gradiente en cambio constante de las concentraciones de las sustancias antimicrobianas a distintas distancias del extremo del disco. Al mismo tiempo, los microorganismos se están multiplicando logarítmicamente sobre la superficie del agar.

3.3.3. Lectura e Interpretación

Al cabo de (16 - 18) horas de incubación se examinan las placas y se miden los diámetros de las zonas de inhibición completa aproximando al milímetro mediante unas pinzas calibradas, una regla o mediante un modelo dibujado y calibrado. Cuando se utilicen medios sin suplementar (sin sangre) la medida se efectúa por fuera de la placa petri, que se ilumina mediante luz reflejada.

El punto escogido debe ser la detención del crecimiento visible, despreciando las pequeñas colonias observadas con ciertas iluminaciones. Cuando el borde no es neto, leer en un punto que corresponda aproximadamente al 80 x 100 de inhibición (cloranfenicol, tetraciclina).

Carvaca (Manual de Bacteriología, 1990) nos indica que la lectura en la determinación de una sensibilidad (S) está dada por la observación de una zona clara y transparente alrededor del disco, lo que nos indica que esa bacteria es sensible a la acción de ese antibiótico, mientras que una sensibilidad intermedia (I) es cuando la zona transparente es pequeña o en el caso que aunque siendo grande el diámetro no es bien definida y aún quedan pequeñas colonias cerca del disco, la resistencia (R) está dada por el crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica que ese antibiótico no ejerce ningún efecto terapéutico al microorganismo en estudio.

3.3.4. Límite del Método y Precauciones Especiales

No se deben analizar mediante el método de difusión con discos los microorganismos de crecimiento lento, anaerobios estrictos, y carpoofilos, ya que este método ha sido estandarizado para los microorganismos de crecimiento rápido, aerobio y facultativos.

*3.3.5. Fuentes frecuentes de error

Aunque el método de difusión en discos no es un procedimiento fácil de olvidar los errores técnicos pueden comprometer la exactitud y fiabilidad; un error puede incluso neutralizar o aumentar, el efecto de otro tipo de error. A continuación se presenta una lista de algunas de

las fuentes mas frecuentes de error que aparecen:

1. Omisión en el uso de medio de agar Mueller-Hinton
2. Mala preparación del agar Mueller-Hinton especialmente al medir el pH en el momento de la preparación.
3. Uso de medios caducados o placas almacenadas incorrectamente
4. Conservación incorrecta de los discos
5. Estandarización inadecuada de la densidad del caldo de cultivo
6. Preparación o conservación incorrecta del standard de turbidez
7. Retraso excesivo entre la estandarización del cultivo e inoculación de las placas.
8. Lectura prematura de los resultados de las pruebas antes de las (16 - 18) horas.
9. No efectuar una cuidadosa medida de los bordes de la zona de inhibición.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

10. Pruebas sobre cultivo mixto
11. Pruebas sobre microorganismos con crecimiento lento o sobre anaerobios.
12. Errores de transcripción al anotar los resultados de las pruebas individuales. X

3.4. ALMACENAMIENTO DE LOS DISCOS CON ANTIBIOTICOS

Generalmente, las cajas con los discos de sustancias antimicrobianas específicamente certificadas para las pruebas de sensibilidad se sirven en grupos con su correspondiente desecador. Deben almacenarse refrigerados ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) o bien congelados a -14°C hasta el momento de su uso. Los discos que contengan antibióticos de las familias de penicilinas o bien cefalosporinas deben mantener siempre congelados con el fin de asegurar la conservación de su potencia; sin embargo, se pueden mantener como máximo durante una semana, una pequeña cantidad para su uso normal bajo refrigeración a ($2 - 8^{\circ}\text{C}$). Los envases sin abrir deben ser retirados del refrigerador o congelador 1 ó 2 horas antes que los discos vayan a ser usados, con el fin de equilibrar su temperatura a la ambiental antes de ser abiertos.

Esto se realiza para disminuir la condensación que se produce al abrir

un envase frío en aire más caliente. En el caso de que se utilice un distribuidor de discos, debe cerrarse herméticamente y colocar un desecador. También debe dejarse calentar a la temperatura ambiente antes de ser abierto. Mientras no se use, el aparato distribuidor debe mantenerse siempre cubierto y refrigerado. Por otra parte, deben emplearse solamente aquellos discos que no hayan caducado.

3.5. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (C.M.I.)

3.5.1. Introducción y generalidades (John Washington y Arthur Barry, 1978):

Las pruebas de dilución se usan para determinar las concentraciones mínimas de un agente antimicrobiano, requeridos para inhibir o destruir a un microorganismo. Se efectúan diluciones seriadas seriadas de la sustancia antimicrobiana, se inoculan con microorganismos y se incuban. La Concentración Inhibitoria Mínima (C.M.I.) es la menor concentración sin crecimiento aparente. El término caldo (o tubo) y agar (o placa) se añade al término prueba por dilución - dependiendo de si la prueba se efectúa en medio líquido ó agar respectivamente. Ambos términos son nombres equivocados porque es, en realidad, el agente antimicrobiano el que se diluye y no el caldo o agar.

El fin primordial de las pruebas por dilución es la obtención de

resultados cuantitativos de la sensibilidad ya que son importantes o necesarios para el tratamiento adecuado de la enfermedad. Aunque los datos cualitativos derivados de las pruebas de difusión con discos son normalmente correctos para orientar la terapéutica de la mayoría de infecciones, los datos cuantitativos suelen ser imprescindibles cuando debe controlarse la dosificación de las sustancias antimicrobianas o bajo condiciones en las que no sean aplicables los resultados de la difusión con discos, o bien sean equívocas o inseguras.

En el punto de la C.M.I., la inhibición del crecimiento es normalmente reversible y es posible aislar microorganismos viables cuando la concentración de la sustancia activa se reduce a niveles subinhibitorios mediante dilución. Sin embargo en el caso de muchas sustancias antimicrobianas, concentración ligeramente superiores a la C.M.I., provocan inhibición irreversible del crecimiento (efecto letal) de la mayoría de microorganismos.

3.5.2. Procedencia, preparaciones y soluciones patrón de los antibióticos.

Aunque muchos antibióticos pueden disolverse en agua destilada, algunos requieren disolventes especiales o un ajuste de pH para la solubilización inicial (tabla V) las diluciones pueden efectuarse en agua destilada, normalmente no es necesario esterilizar las soluciones patrón



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

con una alta concentración de antibióticos, no obstante si es necesario tal esterilización se debe usar filtración por membrana.

La solución patrón se diluye hasta la mitad de la concentración final superior deseada. Usar tubos estériles de 13 por 100 mm, roscados o bien tapados con algodón. Normalmente para un número pequeño de pruebas, las diluciones a la mitad pueden prepararse directamente en los tubos. Se añaden al primer tubo 2 ml de solución con el antibiótico. Se añade al resto de tubos 1 ml de caldo. Transferir con una pipeta estéril 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido, transferir de nuevo con otra pipeta (cada vez distinta) 1 ml al tercer tubo. Este proceso se repite hasta el penúltimo tubo, del que se toma 1 ml y se desecha. Al último tubo no se le añade solución antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de las sustancias antimicrobianas en esta prueba son la mitad de las diluciones iniciales debido a la adición de una concentración de inóculo en caldo.

3.5.3. Medios

El medio debe convenir al crecimiento de la mayoría de microorganismos y no contener sustancias que inhiban ciertos antibióticos.

Ya que el medio Tripticasa soja ha mostrado una actividad inhibitoria sobre las tetraciclinas y los aminoácidos. Un estudio profundo (Jay y Sherris, 1966) ha mostrado que el medio de referencia más conveniente seria el medio de Mueller Hinton.

Veremos que el método de difusión permite determinar la C.M.I. obtenida por dilución en agar y el diámetro de las zonas de inhibición. Las curvas de concordancia actuales han sido establecidas sobre el medio de Muller Hinton.

Se recomienda el caldo Muller - Hinton para probar, bacterias aerobias o anaerobias facultativas de crecimiento rápido; sin embargo, los organismos con requerimientos nutritivos, incluyendo algunos estreptococos, es posible que crezcan mal en este medio. En tales casos se puede usar un caldo de peptona, soja y caseína como soja tripticasa o soja triptica, o incluso medio Le Vinthal.

3.5.4. Inóculo

A partir de un cultivo en caldo en fase exponencial o recién alcanzada la fase estacionaria de su crecimiento, preparar una dilución en caldo de forma que obtengamos 10^5 - 10^6 unidades viables por ml.

Añadir a cada tubo 1 ml de inóculo y mezclar.

La preparación del inóculo comprende los siguientes pasos (Francisco García, comunicación personal):

1. Empleando una asa de alambre recoger 4 a 5 colonias desde un cultivo puro de cepa a investigar.
2. Transferir las colonias a 5 ml de un caldo Muller Hinton o Caldo Triticase soja.
3. Incubar la suspensión a 35°C por un período entre (2 - 8) horas, hasta obtener una turbidez relativa. Diluir hasta el estándar Mc Farland 0,5 (Tabla IV) empleando para ello suero fisiológico.
4. El Mc Farland 0,5 se prepara agregando 0,05 ml de solución de 1,175% BaCl₂.2H₂O a 9,95 ml de ácido sulfúrico (0,36 N) (1%). Guardar a temperatura ambiente en la oscuridad, esta solución es estable por seis meses.

3.5.5. Resultados

La menor concentración del agente antimicrobiano que produzca la inhibición completa de crecimiento visible representa la C.M.I., generalmente no se considera una evidencia de que la sustancia es incapaz de inhibir el crecimiento completamente a esta concentración.

3.5.6. Modalidades de acción de un antibiótico

La Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.) varía según un cierto número de factores que influye sobre la acción de los antibióticos: tiempo de observación, número y estado de las bacterias, medio, etc.

El conjunto de estas variaciones han sido agrupados a menudo bajo el nombre de Modalidades de Acción de un Antibiótico. Es absolutamente primordial precisar que nosotros consideramos aquí solo las poblaciones científicamente homólogas; no se tratará, pues, mas que de modificaciones fenotípicas.

- Tiempo de observación:

La C.M.I. evoluciona bastante sensiblemente durante la fase de crecimiento exponencial de las bacterias: a partir del momento en que las bacterias sembradas en los tubos sin antibióticos alcanza una fase estacionaria, la C.M.I., evoluciona cada vez más lentamente.

En las condiciones usuales de observación, es decir después del cultivo durante una noche (16 - 24) horas es relativamente estable en la mayoría de los casos para la puesta en evidencia de ciertos fenómenos, podrá ser necesaria una observación más larga de 48 horas por ejemplo.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Si el antibiótico es particularmente hábil, podremos vernos obligados a cortar el tiempo de observación, este caso se presenta raramente en la práctica.

- Bacterias:

En una población genéticamente homogénea, la C.M.I. varía dentro de unos límites, importante según el número de bacterias sembradas, es decir según el inóculo. La C.M.I. será más elevada para una población de 10^7 bacterias por ml que para una población de 10^4 bacterias por ml. La magnitud de esta variación es de alrededor de 1.8. La variación no es lineal, es más frecuente para los inóculos elevados que para los inóculos débiles.

Toda técnica que quiera ser reproducible tendrá que precisar lo mejor posible el inóculo.

Tosa heterogeneidad de la población se traducirá en una variación todavía mas elevada de la C.M.I. El hecho de que una población pequeña aparezca inhibida a una concentración débil y que una población fuerte sea inhibida a tasas más elevadas se llama efecto inóculo. Este efecto traduce fenómeno de resistencia.

Las fases del crecimiento son capaces de influir directamente sobre la

C.M.I. en la medida de que la acción de los antibióticos está ligada a un cierto estado del metabolismo de las bacterias.

- Medio

La variación de la Concentración Mínima Inhibitoria según las condiciones fisicoquímicas del medio constituyente propiamente, las modalidades de acción. La lista de factores susceptibles de actuar cubre prácticamente toda la lista de las condiciones físicas posibles y de las constituyentes de los medios, desde las sales más simples hasta las más grandes moléculas proteicas.

- Anaerobiosis

La estreptomycinina y los átomos aminocidos no actúan en anaerobiosis o en presencia de reductores. El efecto secundario de este producto sobre la respiración es muy débil en anaerobiosis.

- pH

Antibióticos más activos en medios ácidos: B-Laptaminas, NovoBiocina, Tetraciclinas.

- Glucidos

Actúan mucho en los medios mal tamponados por la fermentación.

- Proteínas

El efecto de todos los antibióticos es según la constitución del medio

Si se hacen variar las peptonas, las distintas digestiones enzimáticas hidrolizadas de caseína, extracto de carne, de proteínas vegetales, etc. Es decir, si se usan los diferentes medios (ordinarios) puestos a la disposición del Laboratorio (Caldo nutritivo, medio tripticosa soja, infusión corazón - cerebro, medio de Mueller Hinton, etc.), la C.M.I. puede variar en varias decenas de veces.

Los líquidos orgánicos y particularmente el suero tiene un efecto bien conocido. Todos los antibióticos son susceptibles a ligarse a las proteínas del suero.

El efecto bacteriostático de un antibiótico se expresa habitualmente por la C.M.I. en (ug/ml), que es la más baja concentración que inhibe el crecimiento visible.

3.5.7. Influencia de las variaciones técnicas sobre los resultados de las pruebas de sensibilidad.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad por dilución o bien por difusión pueden ser influidos claramente por los reactivos y las condiciones de las pruebas; esto ha sido la causa, en el pasado, de bastantes confusiones. El tamaño del inóculo (especialmente importante), el tiempo de incubación, temperatura, composición del medio y pH, atmósfera y estabilidad del antibiótico son factores que

pueden influir en los resultados finales obtenidos. Además las técnicas de difusión están influenciadas por la velocidad de crecimiento de organismos y por el tipo, profundidad y concentración del agar usado.

3.6. MANTENIMIENTO DE LAS SOLUCIONES DE ANTIBIOTICOS

Las soluciones patrón deben ser conservadas a -20°C o incluso a temperatura inferior. Debe tenerse presente que a -20°C la retención del 90% de la potencia por parte de la ampicilina es relativamente breve. Muchas soluciones patrón de sustancias antimicrobianas permanecen estables por lo menos durante 6 meses a concentraciones de 1000 ug/ml o superiores. Las concentraciones aconsejables de muchas soluciones patrón de la mayoría de antibióticos están entre 2000 ó 1280 ug/ml ó UI/ml.

CAPITULO IV



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

FURAZOLIDONA

ESTRUCTURA QUIMICA

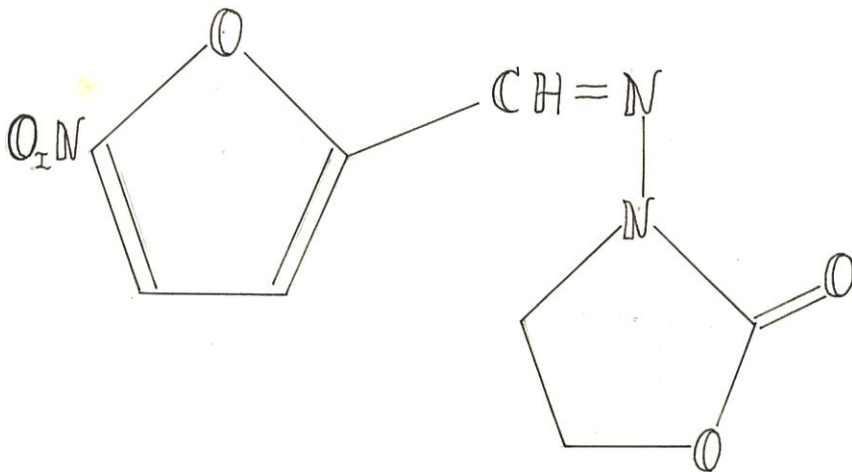


Figura No. 2 (Alderman, 1989)

4.1. ESTRUCTURA QUIMICA Y MODO DE ACCION

Los nitrofuranos son Nitroheterocíclicos, el primero de los cuales, Nitrofurazolidona fue introducido dentro de la medicina humana en 1944. El modo de acción antibacterial de este compuesto ha sido atribuido (Wolff, 1979) a un bloqueo de la iniciación de la traslación de enzimas inducible y a la inhibición de reparaciones enzimáticas de lesiones en el ADN originada por los nitrofuranos. Este modo de acción antibacterial está íntimamente relacionado en el nivel de una actividad mutagenética de compuestos nitroheterocíclicos (Bamburly, 1979), los cuales fueron reconocidos como resultado de un estudio toxicológico llevado a cabo en 1960.

4.2. USO Y PRINCIPIO ACTIVO

Si bien los primeros ensayos con Nitrofurazolidona fueron realizados con Trucha arcoiris por Gutsell en 1946, los iniciales éxitos de las Sulfanoamidas seguidas por la oxitetraciclina y la ineficacia comparativa de Nitrofurazolidona en contra de la Furunculosis resultó en un pequeño interés en el grupo de estas drogas. Wolf y Dunbar (1959) encontraron que si bien eran altamente efectivas en laboratorio, las nitrofurazolidonas no fueron efectivas *in vivo* y realmente su uso fue acompañado por un incremento de mortalidad en peces.

Post (1959) reportó preliminares éxitos con furazolidona (gráfico 2) en ensayos de laboratorio contra la furunculosis en Trucha Brook con 100 mg/Kg por 14 días. Estas indicaciones fueron confirmadas en una serie de estudios en el futuro.

Post y Keiss (1962) usaron solo dos animales por nivel de dosis, no encontraron efectos tóxicos en Trucha arcoiris ni en Trucha brook alimentadas con una dosis sobre 500 mg/Kg durante 14 días.

Por este tiempo la furazolidona fue sometida a ensayos en varios laboratorios de peces, la mayoría tuvieron problemas, pero algunos reportaron problemas de toxicidad en peces los cuales influyeron en el resultado. En el mismo estudio, Post y Keiss encontraron que dosis tan baja como 10 mg/Kg durante 14 días debería ser efectiva para el control de la furunculosis en trucha, pero para ser totalmente efectiva y prevenir reinfección, un regimen de 75 mg/Kg durante 14 días fue necesario. Un estudio publicado por Post en 1962 fue mas cauteloso, recomendando 25 mg/Kg durante 20 días.

4.3. FARMACOCINETICA Y ESTUDIOS DE RESIDUO

Heaton y Post (1968) dentro de un estudio intentaron ayudar en el registro de Nitrofurazolidona con la US Food and Drug Administration para uso en Hatchery de peces, examinaron la absorción y excreción de

furazolidona desde músculo de Truchas arcoiris, cutthroat, brook y café. Usando un Método de Detección espectrofotométrica reportaron límite de 0,1 ppm para peces de (75 - 150) g mantenidos en (8 - 14)°C alimentados con alimentos medicados con furazolidona en 35 mg/Kg durante 20 días y luego alimentados con una dieta no medicada. La furazolidona acumulada en todas las especies de truchas durante los 20 días de medicación, alcanzaron un pico de 0,482 ppm en el décimo día de Trucha café. Durante el período de retiro de la medicación, la detección de residuos decayeron rápidamente alcanzando niveles promedios menores que 0,075 ppm después de 10 días.

4.4. ESPECTRO DE ACCION Y MECANISMO ANTIMICROBIANO

- ESPECTRO DE ACTIVIDAD: Amplio espectro

- MODO DE ACCION: Bacteriostático y bactericida dependiendo de la dosis. El mecanismo de acción está pensado para llevar a fin un antagonismo competitivo en el metabolismo bacteriano de los carbohidratos.

- POTENCIAL PARA DESARROLLO DE RESISTENCIA BACTERIANO: Bajo, no hay resistencia cruzada entre nitrofuranos y otras drogas antimicrobios.

CAPÍTULO V

- SOLUBILIDAD EN AGUA: Pobremente soluble en agua y mas activo en pH ácido (5,5 o menor).

COMPUUESTOS RELACIONADOS

- COMPUESTOS RELACIONADOS: Nitrofurantoina, Furanace, Nitrofurazona.

4.5. DOSIS DE REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Observar las tablas VI y VII.



CAPITULO V

CLORANFENICOL:

ESTRUCTURA QUIMICA

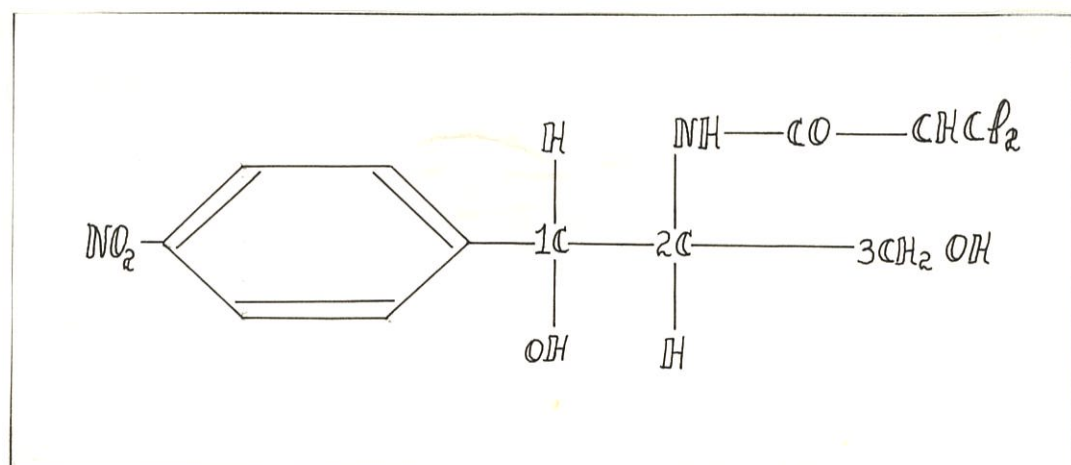


Figura No. 3 (Alderman, 1989)

5.1. COMPOSICION QUIMICA

Este antibiótico comprende en su fórmula 2 átomos de carbono asimétricos. Existen pues, 4 estereoisómeros de los cuales solo uno, el derivado D-treo, es activo.



CAPITULO VI

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

METODOLOGIA

El presente estudio se lo realizó en la zona de Churute, localizada en la vía a Machala a 35 Km. de Guayaquil, se eligieron para las tomas de las muestras tres camaroneras del sector con una área promedio de 500 has cada una: Quirola, Huracán y Aquamar.

El estudio se lo realizó en los meses de Septiembre - Octubre de 1992, donde las tomas de las muestras fueron:

Primera Toma	Septiembre 3
Segunda Toma	Octubre 1ro.

Las muestras eran trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la fábrica de Balanceado L'IRIS S.A. (foto 1 - 2), donde se aisló el V. parahaemolyticus, se realizaban los antibiogramas y C.M.I.

6.1. RECOLECCION DE MUESTRAS

Las muestras de agua por camaronera fueron recolectadas en la estación de bombeo -entrada de agua- (foto 3 - 4) y en los canales de

drenajes (foto 5 - 6 y 7). En la camaronera No. 1 y No. 2 se recolectaron dos muestras, una en la entrada de agua y la otra en el canal de drenaje mientras que en la camaronera No. 3 se recolectaron dos muestras en el canal de drenaje (por la forma irregular del canal de drenaje) y una muestra en la entrada de agua. Esta nos da un total de 7 puntos muestreados.

Debido a que el presente estudio se fundamentaba en el aislamiento del V. parahaemolyticus en las aguas de descarga o de drenaje, las muestras recolectadas en el canal de drenaje estaban conformadas de varias submuestras en tanto que la muestra de la estación de bombeo se conformaba de un solo punto.

La muestra del canal de drenaje estaba conformada de por lo menos diez submuestras, esto dependía de la longitud del canal.

Las muestras eran recolectadas a una profundidad de 50 cm. de columna de agua y en recipientes de vidrio esterilizados en autoclave (121°C, a 15 at. de presión por 15 minutos.) selladas fuertemente con papel de aluminio y cinta adhesiva (foto 8), luego las muestras eran almacenadas en una hielera (foto 9) que mantenía una temperatura entre (4 - 10)°C.

El tiempo desde la recolección de las muestras hasta la siembra de la bacteria no debía exceder las 6 horas, para que los datos obtenidos sean confiables.

Adicionalmente a la recolección de las muestras para el estudio se tomaban otras muestras de agua para realizar el análisis de algunos parámetros químicos (tabla X y XI).

Antes de la recolección de las muestras se determinaban en la entrada de agua y canal de drenaje los siguientes parámetros: la salinidad (por refractómetro), temperatura (por termómetro de mercurio) y pH; (ver tabla VIII y IX).

6.2. AISLAMIENTO, PRUEBAS BIOQUIMICAS E IDENTIFICACION DE BACTERIAS.

De cada una de las 7 muestras de agua se tomó 1 ml y se lo inoculó en agua de peptona sal al 3% y se incubó a 35°C por 24 horas. El crecimiento se lo determinaba por la turbidez que presentaba los tubos. Todos los tubos presentaron crecimiento.

A partir de los inóculos de los tubos se procedió a sembrar con una asa de platino - iridio de agar T.C.B.S. (2 placas por muestras, esto nos da un total de 14 placas de agar T.C.B.S.) y se incubó a 35°C por 24 horas.

En los dos muestreos (Septiembre y Octubre) se aisló las siguientes bacterias (con características morfológicas definidas):

- * Colonias de bacterias grandes, bien formadas de color amarillo.
Presumiblemente V. anguillarum.
- * Colonias de bacterias pequeñas, de color verde. Presumiblemente V. parahaemolyticus.
- * Colonias de bacterias muy pequeñas, de color negro. No determinadas.

Visualmente (foto 10), por lo general las colonias negras eran mas abundantes, luego eran las colonias amarillas.

Aisladas las bacterias sospechosas de V. parahaemolyticus (en agar T.C.B.S. colonias de color verde) se realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación de estas bacterias (Ver capítulo II y figura 1).

En el primer muestreo, se aisló V. parahaemolyticus de la entrada de agua y drenajes de la camaronera No. 3 y en la entrada de agua de la camaronera 2. En el segundo muestreo, se aisló V. parahaemolyticus en mayor número de punto de muestreo pero se realizaron las pruebas bioquímicas solo en las muestras en la que se aisló esta bacteria en el

primer muestreo, en razón, de que este segundo muestreo me serviría para confirmar o rechazar los datos obtenidos en el primer muestreo.

6.3 ANTIBIOGRAMAS

Identificado el V. parahaemolyticus se procedió a sembrar estas bacterias en agar Mueller Hinton para realizar las pruebas de sensibilidad con discos de 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm de Furazolidona y Cloranfenicol. Estos discos no existían en el mercado nacional, por lo tanto se procedió a elaborar estos discos en el laboratorio de acuerdo a la técnica recomendada por Carvaca (Manual de Bacteriología, ESPOL, 1990).

6.3.1. Reparación de la solución antibiótico y discos de sensibilidad

Con la ayuda de una perforadora se hacen los discos a partir de papel filtro Whatman * 2 o 3 (Carvaca, 1990), luego son colocados en la solución antibiótico para que adquieran la concentración deseada.

Los discos de papel filtro dedarán ser esterilizados en una caja petri a 180°C por dos horas.

La solución antibiótico se preparaba disolviendo 1g (pesado en balanza analítica de 10 dígitos de precisión, foto 11) del químico en 1 litro de

agua destilada, esta solución conocida como solución madre tenía una concentración de 1 ppt. Como deseamos obtener discos de 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm se procedió a tomar de la solución madre 500 ml, 250 ml y 125 ml para ser diluido con agua destilada en Matracas aforado hasta 1 litro, obteniéndose finalmente soluciones de concentraciones de 0,500 ppt, 0,250 y 0,125 ppt o soluciones de 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm que eran las requeridas.

Con una pinza estéril se embebían los discos en la solución del antibiótico de madera que estos se absorbían. Se colocaron los discos en una caja petri y fueron llevados a una estufa; el tiempo necesario para esto, depende del solvente empleado, de tal forma que se dejarán de 1 a 2 horas cuando se haya utilizado agua, de 15 a 30 minutos para acetona o alcohol, además la temperatura no deberá ser mayor a 35°C para evitar la degradación de los antibióticos (Carvaca, 1990).

La técnica recomienda guardar los discos en temperatura menor a -14°C, pero en el presente trabajo se procedió a la elaboración inmediata de los discos evitando el almaceamiento, esto con el objetivo de asegurar la concentración deseada.

6.3.2. Siembra del *V. parahaemolyticus* en el agar Mueller Hinton

De un medio que contenga cepa pura de *V. parahaemolyticus*

(cualquier medio de la prueba bioquímica) inocular en caldo nutritivo de peptona 4 o 5 colonias e incubarlo por unos 15 minutos o hasta que se obtenga turbidez de Mac Farland 0,5 (equivale a 10^8 unidades formadoras de colonias por ml). De este cultivo se procede a sembrar con un cotonete esterilizado a 121°C por 15 minutos en el agar Mueller Hinton como lo podemos observar en la figura 4.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS MUESTRAS DE AGUA

TABLA VIII

MUESTREO: SEPTIEMBRE 3 DE 1993

CAMARONERA	DÍA	HORA	MUESTRA	SALINIDAD ppt	TEMPERATURA ToC	pH
No. 3	Nublado	11h20	Reservorio	5.0	24.0	7.0
	Nublado	11h35	Drenaje A	2.0	26.0	7.0
	Nublado	11h50	Drenaje B	4.0	26.0	7.0
No. 2	Seminublado	12h30	Reservorio	11.0	25.0	7.0
	Seminublado	12h50	Drenaje	7.0	26.0	7.0
No. 1	Soleado	14h15	Reservorio	12.0	25.0	8.0
	Soleado	14h30	Drenaje	14.0	26.0	8.0



CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS MUESTRAS DE AGUA

TABLA IX

MUESTREO: OCTUBRE 1ro. DE 1992

CAMARONERA	DIA	HORA	MUESTRA	SALINIDAD ppt	TEMPERATURA ToC	PH
No. 3	Nublado	12h30	Reservorio	8.0	25.0	7.0
	Nublado	12h45	Drenaje A	11.0	24.0	8.0
	Nublado	13h05	Drenaje B	15.0	25.0	7.0
No. 2	Seminublado	14h00	Reservorio	16.0	25.0	7.0
	Seminublado	14h10	Drenaje	17.0	25.0	7.0
No. 1	Soledado	15h15	Reservorio	17.0	25.0	7.0
	Soledado	15h30	Drenaje	18.0	26.0	7.0

CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LAS MUESTRAS DE AGUA

TABLA X

MUESTREO: SEPTIEMBRE 3. DE 1992

CAMARONERA	MUESTRA	ALCALINIDAD TOTAL ppm	NITRATOS ppm	NITRITOS ppm	AMONIACO ppm	FOSFORO ppm
No. 3	Reservorio	150.00	0.15	0.01	0.21	0.41
	Drenaje A	125.00	0.21	0.01	0.13	0.56
	Drenaje B	115.00	1.01	0.02	0.15	0.61
No. 2	Reservorio	103.00	0.21	0.08	0.22	0.54
	Drenaje	158.00	0.05	0.01	0.18	0.19
No. 1	Reservorio	108.00	0.29	0.07	0.10	0.55
	Drenaje	103.00	0.09	0.02	0.22	0.08



CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LAS MUESTRAS DE AGUA

TABLA XI

MUESTREO: OCTUBRE 1ro. DE 1992

CAMARONERA	MUESTRA	ALCALINIDAD TOTAL ppm	NITRATOS ppm	NITRITOS ppm	AMONIACO ppm	FOSFORO ppm
No. 3	Reservorio	167.00	0.18	0.02	0.23	1.38
	Drenaje A	123.00	1.68	0.02	0.11	0.19
	Drenaje B	128.00	1.41	0.01	0.30	0.19
No. 2	Reservorio	133.00	2.52	0.09	0.29	0.86
	Drenaje	138.00	1.10	0.01	0.22	0.11
No. 1	Reservorio	89.00	1.11	0.06	0.11	0.78
	Drenaje	128.00	0.26	0.02	0.23	0.47

Se admite que el Cloranfenicol detiene la síntesis proteica fijándose sobre la fracción 50S de los ribosomas bacteriano (70S). Los ribosomas 80S de las células de los organismos superiores no lo fijan y la acción tóxica en los mamíferos estaría ligada a la fijación del cloranfenicol en las mitocondrias. El mecanismo exacto de la acción sobre la síntesis proteica permanece en discusión.

Otro efecto del cloranfenicol, consiste en la acumulación de ARN en las bacterias (ARN ribosómico y ARN mensajero).

5.2. MODO DE ACCION

Cloranfenicol (figura 3), es un antibiótico producido por Streptomyces venezuela posee un amplio espectro antimicrobial, pero es ampliamente bacteriostático que bactericida. En bacterias actúa primeramente sobre las subunidades del Ribosoma 50S (Hollstein, 1979) apareciendo un ribosoma no apareado trasladando la síntesis de los lazos peptidos. Rápidamente después de su introducción en la medicina las resistencias fueron encontradas y su uso se asoció con anormalidades fatales en la sangre, las cuales también pueden ser debido a la inhibición de la síntesis de proteínas. En el Reino Unido, su uso ha sido severamente restringido con la intención de mantenerlo disponible en la medicina.

5.3. USO Y PRINCIPIO ACTIVO

El cloranfenicol fue aprobado como eficaz contra Pseudomonas hydrophila y Aeromonas liquifaiens por Smith (1950), después de 3 años de su descubrimiento. Solesko et al (1952) encontraron que el cloranfenicol (cloromicetina) era altamente efectivo, tanto in vitro y in vivo contra Haemophilus piscium y Aeromonas salmonicida, particularmente eliminando infecciones latentes. Si bien los efectos adversos del cloranfenicol sobre la hematopoyesis fueron reconocidos rápidamente, investigaciones de posibles efectos en peces no fueron dedicados hasta que Kreutzmann (1977) reportó grandes desordenes en la eritropoyesis en anguilla después de una aplicación de cloranfenicol. En los Estados Unidos el más bajo costo de la Oxitetraciclina determinó que fuera relativamente mínimo el uso del cloranfenicol, pero en Europa, particularmente en cultivo de carpa, el cloranfenicol se hizo popular y altamente usado (Evelyn, 1968).

Schaperclaus (1958) en un estudio extensivo sobre el control de Aeromonas liquifaciens, en las infecciones edema en la carpa, recomendó el uso del cloranfenicol tanto por vía oral o por baño en vez de otros antibióticos, tales como estreptomycin y cloratetraciclina. Las dosis en rango de (50 - 100) mg/Kg de pez /día durante (5 -10) días han sido recomendadas así como también tener una rutina profiláctica



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARIÍTIMA

de inyecciones intraperitoneal en una sola dosis de 12 mg/Kg del peso del cuerpo.

5.4. FARMACOCINETICA Y ESTUDIO DE RESIDUOS

Varios estudios dentro de la farmacocinética de cloranfenicol en peces han sido publicados. Kozlowski (1964) reportó una máxima concentración de suero en carpa, 16 horas después de la inyección y encontró residuos detectables por lo menos 120 horas después de la inyección en (12 -14)°C. Evelyn (1968) encontró eficiencia en la absorción del cloranfenicol suministrado oralmente (50 mg/Kg en una sola comida) en salmón coho y chinook, los niveles máximos determinados fueron en el hígado (52 ug/g), riñón (26,2 ug/g) y músculo (20 ug/g) en (3 - 12) horas después del tratamiento (en 13 - 15°C) decayendo rápidamente de aquí en adelante. Lasserre (1972) demostró similar modelo en los tejidos de trucha arcoiris con solo dosis orales de 100 mg/Kg usando un analizador espectrofotométrico (límite de detección de 0,6 ug/g) y encontró significativos residuos de cloranfenicol en hígado y riñones y residuos detectables en músculo y sangre sobre las 96 horas después del tratamiento. Con tratamientos diarios de cloranfenicol se probó que era acumulado en músculo sobre los primeros 6 días de un tratamiento de 8 días y los niveles acumulados incrementaron con el aumento de la dosis diaria.

El pequeño estudio comparativo realizado por McCracken et al (1976) no detectaron cloranfenicol en musculo de trucha más allá de 8 días después de una única inyección intraperitoneal en 5°C, pero estos autores no establecieron la sensibilidad del método de sus bioensayos o el límite de detección.

5.5. ESPECTRO DE ACCION Y MECANISMO ANTIMICROBIANO

- Espectro de actividad: amplio espectro
- Modo de acción: bacteriostático por inhibición de síntesis proteica.
- Potencial para desarrollo de resistencia bacteriana: Bajo. No hay resistencia cruzada entre cloranfenicol y otras drogas.
- Solubilidad en agua: solo el succinato de cloranfenicol es altamente soluble; otras formas son difícilmente solubles en agua.
- Dosis: 0.2 a 10 mg/litro

5.1.1. Dosis de referencias bibliográficas

Observar las tablas VI y VII.

ESCALA MAC FARLAND

TABLA IV

REACTIVO	ESCALA									
	5	1	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	10.0
CLORURO DE BARIO (ml)	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	1.00
ACIDO SULFURICO (ml)	9.95	9.90	9.80	9.70	9.60	9.50	9.40	9.30	9.20	9.00
CELULAS DENSIDAD (X10 8)/ml	1.00	3.00	6.00	9.00	12.00	15.00	18.00	21.00	24.00	30.00

FUENTE: FRANCISCO GARCIA, INFORMACION PERSONAL



SOLVENTES Y DILUYENTES PARA LAS SOLUCIONES DE RESERVA DE ALGUNOS ANTIBIOTICOS

TABLA V

ANTIBIOTICO	SOLVENTE	DILUYENTE
CLORANFENICOL	ETANOL	AGUA
FURAZOLIDONA	AGUA	AGUA
NITROFURANTOINA	DIMETILFORMAMID	AGUA
ACIDO NALIDIXICO	NaOH, 1N	AGUA
AMPICILINA	TAMPON FOSFATO pH 8; 0,1M	TAMPON FOSFATO pH 6; 0,1M
GENTAMICINA	TAMPON FOSFATO pH 8; 0,1M	AGUA
PENICILINA	AGUA	AGUA
SULFAMIDAS	AGUA CALIENTE + NaOH 10%, DISOLV.	AGUA
OXITETRACICLINA	AGUA	AGUA
ERITROMICINA	ETANOL	AGUA
KANAMICINA	TAMPON FOSFATO pH 8; 0,1M	AGUA
TETRACICLINA	AGUA	AGUA

FUENTE: JAMES BROCK, 1986

DOSIS PARA EL TRATAMIENTO DE VIBRIOS

TABLA VI

ANTIBIOTICO	ESTADIOS	DOSIS
FURAZOLIDONA	L/LP J/A	1.0 - 5.0 ppm 500ppm en Alimento por 10-14 días
CLORANFENICOL	L/LP	1.0 - 5.0 ppm
ERITROMICINA	L/LP	0.5 - 2.0 ppm
OXITETRACICLINA	L/LP	1.0 - 5.0 ppm

L = LARVAS

PL = POSTLARVA

J = JUVENIL

A = ADULTO

FUENTE: Manual de Enfermedades (James Brock, 1986)

ANTIBIOGRAMA DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AISLADO EN CAMARON

DE "SR. ESOBAR"

TABLA VII

BACTERIA	CH	NA	OA	RO	129
V.PARAHAEMOLYTICUS	S	S	S	S	S
V.PARAHAEMOLYTICUS (lodo)	S	I	S	I	S

CH = CLORANFENICOL

NA = ACIDO NALIDIXICO

RO = ROMET

OA = ACIDO OXOLINIC

S = SENSIBLE

R = RESISTENTE

I = INTERMEDIO

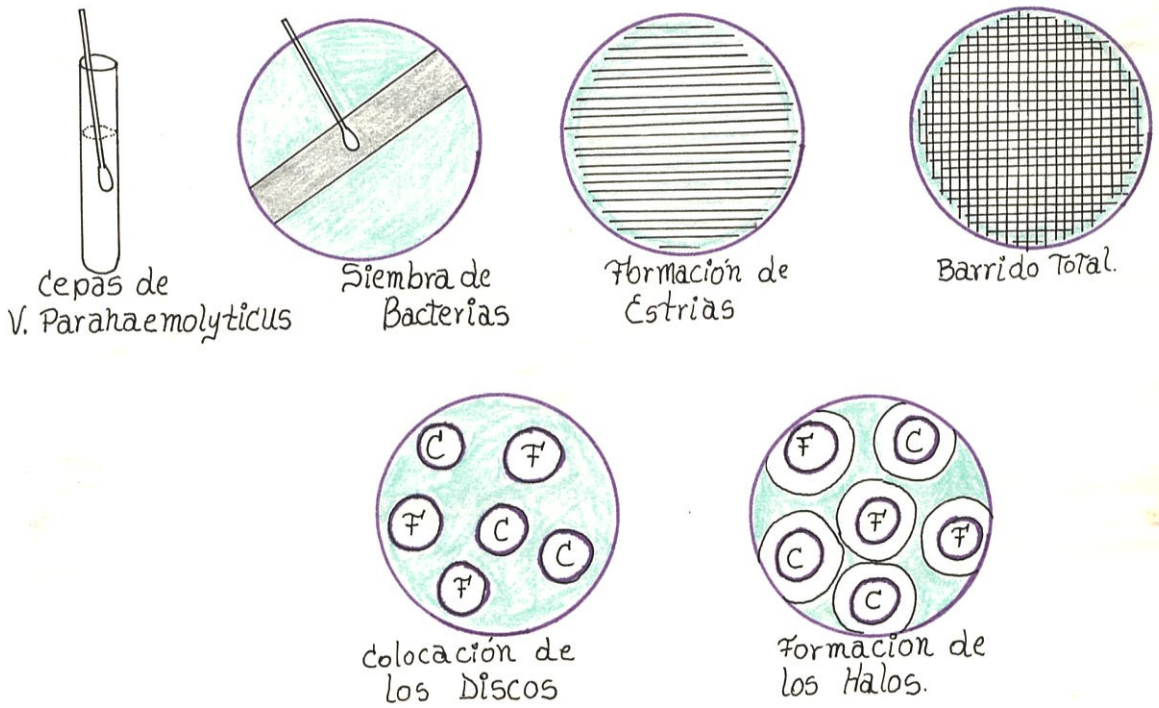
FUENTE: Fax de resultado de visita a camaronera (Lightner, 1988)



SIEMBRA DE BACTERIA EN AGAR MUELLER - HINTON

BIBLIOTECA
IAC, ING,
MARITIMA

Figura No. 4



Inoculado toda la superficie del agar Mueller Hinton, se dejó secar el inóculo de 10 a 15 minutos para luego aplicar los discos de antibióticos apropiados, en cada caja se colocaban 2 discos de cada concentración,

por lo que cada disco tenía 6 réplicas en razón de que se realizó 1 antibiograma - 1 réplica por muestra. Los discos eran colocados en una distancia de (1,5 a 2,0)cm entre disco y disco con la ayuda de unas pinzas desinfectadas y flameadas a la llama del mechero, se presionaban suavemente los discos sobre la superficie del medio e incubaban las placas en forma invertida a 35°C y realizando las primeras lecturas a las 18 horas de incubación.

Los resultados obtenidos lo podemos observar en las tablas (XII - XIII), en base a estas tablas podemos concluir:

- a. Que el V. parahaemolyticus es sensible para la Furazolidona en concentraciones mayores de 500 ppm.
- b. Que el V. parahaemolyticus es sensible para el Cloranfenicol en concentraciones mayores de 125 ppm.

6.4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (C.M.I.)

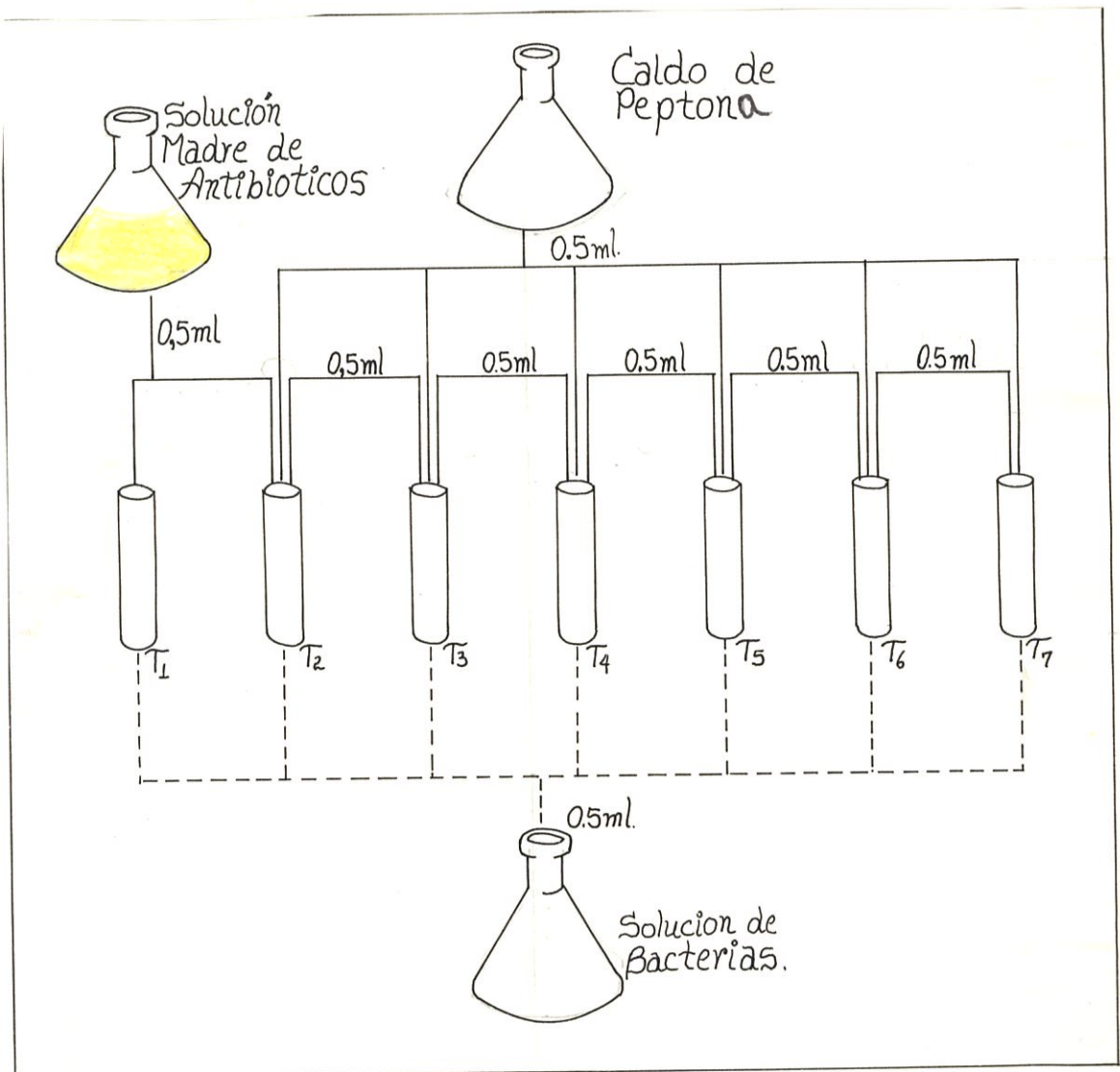
Con los resultados obtenidos en los antibiogramas me pude orientar sobre, cual sería la C.M.I. tanto para Furazolidona como para la Cloranfenicol; por lo que procedí a realizar el siguiente formato para determinar la concentración exacta (figura 5).



CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

Figura No. 5



A continuación describo el procedimiento (diagramado en la figura No. 5) utilizado para determinar la C.M.I.

- a. Se adicionó 0,5 ml de caldo de peptona estéril desde el tubo 2 hasta el tubo 7.
- b. Se adicionó 0,5 ml de la solución antibiótico en el tubo 1 y tubo 2. Se mezcló el tubo 2 y de este tubo extraímos 0,5 ml y lo transferimos al tubo 3, de esta forma procedimos hasta llegar al tubo 6, donde los 0,5 ml extraído se lo desechó y no lo apliqué en el tubo 7.
- c. Adicioné 0,5 ml de solución bacteriana con una turbidez de Mac Farland 0,5 en todos los tubos.
- d. Como podemos observar el tubo 1 es el control para el antibiótico y el tubo 7 es el control para la bacteria (no contiene antibiótico).

La transferencia de cada 0,5 ml sea de solución antibiótico, solución bacteriana, o caldo nutritivo se lo realizó con una pipeta de 200 u landa de precisión (foto 12); cada 1 ml es igual a 1000 u landa.

Por medio de estos pasos se determinó la concentración mínima de antibiótico para la inhibición del crecimiento bacteriano.

6.4.1. Preparación de la solución madre de antibiótico

Se disolvió en agua destilada 0,1 g de Furazolidona y de Cloranfenicol en un litro respectivamente, llamándoselas a cada una de estas soluciones como "Solución Madre". Esta Solución Madre era de 0,1 ppt o 1000 ppm. De esta solución se tomó 0,5 ml y fue transferido al tubo de C.M.I.

ANTIBIOGRAMA

TABLA XII

MUESTREO: SEPTIEMBRE 3 DE 1992

ANTIBIOTICO	CONCENTRACIONES DE DISCO	DIAMETRO DE DISCOS EN CENTIMETRO		
		CAMARONERA ENTRADA	CAMARONERA DRENAJE	CAMARONERA ENTRADA
CLORANFENICOL	500 ug/ml	2.6	2.6	2.6
	250 ug/ml	2.5	2.8	2.5
	125 ug/ml	2.4	2.5	2.4
FURAZOLIDONA	500 ug/ml	2.2	2.4	2.1
	250 ug/ml	1.9	2.0	1.8
	125 ug/ml	2.0	1.9	1.8

ANTIBIOGRAMA

TABLA XIII

MUESTREO: OCTUBRE 1^o. DE 1992

ANTIBIOTICO	CONCENTRACIONES DE DISCO	DIAMETRO DE DISCOS EN CENTIMETRO		
		CAMARONERA ENTRADA	CAMARONERA DRENAJE	CAMARONERA ENTRADA
CLORANFENICOL	500 ug/ml	2.6	2.6	2.6
	250 ug/ml	2.6	2.7	2.4
	125 ug/ml	2.3	2.4	2.4
FURAZOLIDONA	500 ug/ml	2.1	2.3	2.1
	250 ug/ml	1.9	2.1	1.8
	125 ug/ml	2.0	1.9	1.7

CAPITULO VII

RESULTADOS

Los resultados obtenidos lo podemos observar en las tablas XIV y XV y en la figura 6, en base a estos resultados pude concluir:

- a. Que la C.M.I. de la Furazolidona para el V. parahaemolyticus es de 500 ppm.
- b. Que la C.M.I. del Cloranfenicol para el V. parahaemolyticus es de 125 ppm.
- c. Que los resultados obtenidos en los antibiogramas fueron confirmados con el método de C.M.I.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

TABLA XIV



BIBLIOTECA
FAC. INC.
MARITIMA

MUESTREO: SEPTIEMBRE 3 DE 1992

ANTIBIOTICO	SOLUCION CONCENTRACION	CRECIMIENTO EN LAS SOLUCIONES		
		CAMARONERA ENTRADA	CAMARONERA DRENAJE	CAMARONERA ENTRADA
CLORANFENICOL	500,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	250,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	125,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	62,5 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	31,2 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	15,6 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	0,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
FURAZOLIDONA	500,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	250,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	125,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	62,5 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	31,2 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	15,6 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	0,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

TABLA XV

MUESTREO: OCTUBRE 1ro. DE 1992

ANTIBIOTICO	SOLUCION CONCENTRACION	CRECIMIENTO EN LAS SOLUCIONES		
		CAMARONERA ENTRADA	CAMARONERA DRENAJE	CAMARONERA ENTRADA
CLORANFENICOL	500,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	250,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	125,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	62,5 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	31,2 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	15,6 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	0,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
FURAZOLIDONA	500,0 ug/ml	Negativo	Negativo	Negativo
	250,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	125,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	62,5 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	31,2 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	15,6 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo
	0,0 ug/ml	Positivo	Positivo	Positivo

Concentración
Mínima
Inhibitoria

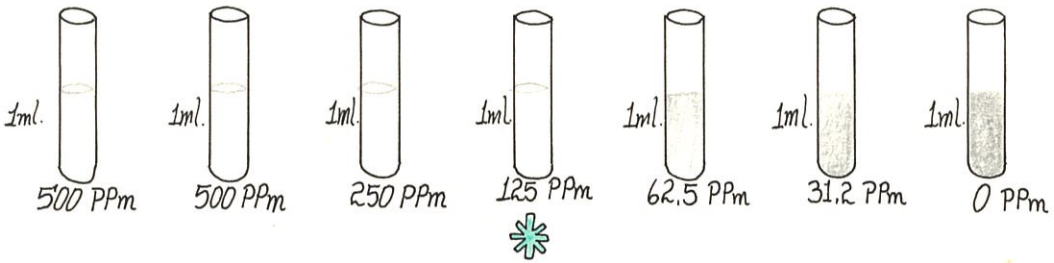
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA PARA FURAZOLIDONA -
CLORANFENICOL



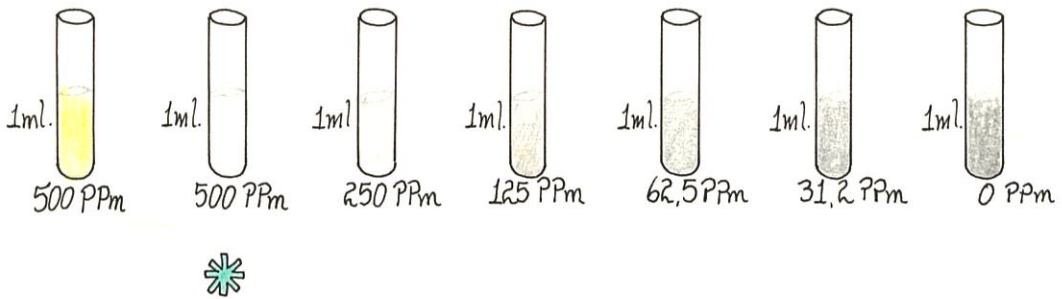
Figura No. 6

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

CLORANFENICOL



FURAZOLIDONA



* Concentración
Minima
Inhibitoria

APPENDICE A

COLLETTA DEL MONDO (1900-1910)

ALTO DI TUTTI I PAESI - NUMERO DI ANNI DI VITA
MEDIAMENTE IN UNO STATO UNITO, ANNO 1900

ANNO

APPENDICES

1. THE WORLD AS A WHOLE

2. THE WORLD AS A WHOLE

3. THE WORLD AS A WHOLE

APPENDICES

1. THE WORLD AS A WHOLE
2. THE WORLD AS A WHOLE
3. THE WORLD AS A WHOLE
4. THE WORLD AS A WHOLE
5. THE WORLD AS A WHOLE
6. THE WORLD AS A WHOLE
7. THE WORLD AS A WHOLE
8. THE WORLD AS A WHOLE
9. THE WORLD AS A WHOLE
10. THE WORLD AS A WHOLE

APENDICE A**FORMULA DE MEDIOS (AGAR Y CALDO)****CALDOS SALINOS ARGININA - DIHIDROLASA Y LISINA
DECARBOXILASA Y MEDIO BASE CONTROL (MEDIO 1)*****FORMULA:**

-	Extracto de levadura	3,0 g.
-	Cloruro sódico	30,0 g.
-	Glucosa	1,0 g.
-	Púrpura Bromonesol (Solc. al 1%)	1,6 ml.

***INSTRUCCIONES**

Disolver todos los ingredientes en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH a un valor de 6,8. Añadir a la primera 1 arginina en una proporción del 0,5% y 1 lisina a la segunda también al 0,5%, la tercera porción es el caldo base control. Distribuir en tubos en cantidades de 3 ml y esterilizar a 121°C durante 10 minutos.

CALDO BISMUTO SULFITO SAL (MEDIO 2)

*FORMULA

-	Peptona	10,0 g.
-	Cloruro Sódico	25,0 g.
-	Cloruro Potásico	0,7 g.
-	Cloruro Magnésico Hexahidratado	5,0 g.

*INSTRUCCIONES

Para la preparación del medio completo, disolver los componentes mencionados, en 950 ml de agua destilada y ajustar el pH a 9,1 por adición de una solución acuosa al 10% de Na_2CO_3 . Esterilizan en autoclave a 121°C durante 16 minutos, enfriar a temperatura ambiente y añadir de modo aséptico 100 ml de solución Bismuto sulfito y 1 ml de alcohol etílico del 95%. Mezclar y distribuir asépticamente en volúmenes de 10 ml en tubos de cultivos estériles. No calentar.

Solución Bismuto Sulfito. Disolver: (a) 20 g de Sulfito Sódico en 100 ml de agua hirviendo, (b) 0,1 g de citrato de bismuto y amonio en 100 ml de agua hirviendo y (c) 20 g de manitol en 100 ml de agua hirviendo.

Mezclar las soluciones (a) y (b) hervir la mezcla durante un minuto y añadir

la solución (c). La mezcla final es de color blanco y aparece turbio: mezclar bien antes de utilizarla. El reactivo se conserva en buenas reacciones durante un mes en el refrigerador.

**MEDIO SALINO DE HUGH - LEIFSON (Hugh y Leifson, 1953)
(MEDIO 3)**

***FORMULA**

-	Peptona	2.0 g
-	Glucosa	10.0 g
-	Na Cl	30.0 g
-	Fosfato dipotásico	0,3 g
-	Azul de Bromotimol	
	Soluc. al 0.2%	15,0 ml
-	Agar	3.0 g

***INSTRUCCIONES**

Añadir los ingredientes a 985 ml de agua destilada y calentar hasta la ebullición para conseguir una completa disolución, enfriar a 50°C, ajustar el pH a 7,1 +/-0,1. Distribuir en cantidades de 3 ml en tubos pequeños y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

CALDO SALINO POLIMIXINA B (MEDIO 4)***FORMULA**

-	Extracto de levadura	3.0 g
-	Peptona	10.0 g
-	Na Cl	20.0 g
-	Polimexina B	0,25 g

***INSTRUCCIONES**

Disolver todos los ingredientes (excepto la Polimixina B) en 900 ml de agua destilada. Calentar hasta la completa disolución, enfriar y añadir la Polimixina B previamente disuelta en 100 ml de agua destilada y esterilizada por filtración. Distribuir en volúmenes de 10 ml y utilizar el mismo día de su preparación.

CALDO RM - VP CON 3% DE Na Cl (MEDIO 5)***FORMULA**

-	Proteosa Peptona	5.0 g
-	Glucosa	5.0 g

- | | | |
|---|--------------------|--------|
| - | Fosfato Dipotásico | 5.0 g |
| - | Na Cl | 30.0 g |

***INSTRUCCIONES**

Disolver todos los ingredientes en un litro de agua destilada, calentando y agitando suavemente. Enfriar a 20°C y distribuir en volúmenes de 1 ml en tubos pequeños. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos.

AGAR DE MUELLER - HINTON (MEDIO 6)***FORMULA**

- | | | |
|---|-------------------|----------|
| - | Infusión de carne | 300.0 ml |
| - | Casa aminoácidos | 17.5 g |
| - | Almidón | 1.5 g |
| - | Agar | 17.0 g |

***INSTRUCCIONES**

Añadir la difusión de carne a 700 ml de agua destilada, a continuación los restantes ingredientes y calentar hasta la ebullición, agitando hasta que la disolución sea completa. Ajustar el pH de modo que después de la

esterilización en autoclave sea 7,2 +/-01. Esterilizar a 115°C durante 10 minutos.

AGAR TIOSULFATO CITRATO SALES BILIARES SACAROSA (MEDIO 7)

***FORMULA**

-	Extracto de levadura	5.0 g
-	Peptona	10.0 g
-	Citrato sódico (2H ₂ O)	10.0 g
-	Tiosulfato sódico (5H ₂ O)	10.0 g
-	Cloruro sódico	10.0 g
-	Ox-Gall	5.0 g
-	Sacarosa	20.0 g
-	Citrato férrico	1.0 g
-	Colato sódico	3.0 g
-	Soluc. al 1% azul timol	4.0 ml
-	Soluc. al 0.2% azul bromitimol	20.0 ml
-	Agar	15.0 g

***INSTRUCCIONES**

Añadir los ingredientes a 980 ml de agua destilada, calentar hasta la ebullición agitando para conseguir la completa solución, enfriar a (45 - 50)°C,

ajustar el pH a 8.6 y repartir en volúmenes de (15 - 20) ml, en placas de petri. No debe esterilizarse en autoclave.

Se dispone en el comercio de este medio en forma deshidratada. Prepararlo siguiendo las instrucciones del envase.

AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR (MEDIO 8)

***FORMULA 1**

-	Triptona o polipeptona	20.0 g
-	Cloruro sódico	5.0 g
-	Lactosa	10.0 g
-	Sacarosa	10.0 g
-	Glucosa	1.0 g
-	Sulfato armónico ferroso	0,2 g
-	Tiosulfato sódico	0,2 g
-	R rojo fenol (soluc. al 0.2%)	12.0 ml
-	Agar	13.0 g

***FORMULA 2**

	Extracto de carne	3.0 g
-	Extracto de levadura	3.0 g

-	Peptona	15.0 g
-	Proteosa peptona	5.0 g
-	Glucosa	1.0 g
-	Lactosa	10.0 g
-	Sacarosa	10.0 g
-	Sulfato ferroso	0.2 g
-	Cloruro sódico	5.0 g
-	Tiosulfato sódico	0.03 g
-	Agar	12.0 g
-	Rojo fenol (soluc. al 0.2%)	12.0 ml

***INSTRUCCIONES**

Suspender los componentes en 988 ml de agua destilada mezclar y calentar hasta la ebullición agitando de vez en cuando para conseguir la completa solución. Enfriar a (50 -60)°C y ajustar la reacción si es necesario para que el pH después de la esterilización sea de 7,3 +/- 0,1. Repartir en tubos llenando un tercio de los mismos y tapar de tal modo que se mantengan condicionados de aerobiosis durante su utilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 12 minutos. Enfriar los tubos en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas contiguas de medio de 2,5 cm de longitud y partes inclinadas de 5 cm (aproximadamente).

Para agar hierro triple azúcar, sal, añadir 25 g. de NaCl, para obtener una concentración final de sal del 3%.

***FORMULA**

CALDO TRIPTICASA SOJA CON 3% NaCl (MEDIO 9)

- Fitona	5.0 g
- Cloruro sódico	30.0 g
*FORMULA Fosfato dipotásico	2.5 g
- Glucosa	2.5 g
- Tripticasa	15.0 g
- Fitona	5.0 g
- Fosfato dipotásico	2.0 g
- Glucosa	2.5 g
- Cloruro sódico	30.0 g

Disolver todos los ingredientes en un litro de agua destilada, calentar hasta la ebullición para conseguir la disolución completa, enfriar a 45 - 55°C ajustar

***INSTRUCCIONES** esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Utilizar en placas o en forma de agar inclinado.

Disolver todos los ingredientes en un litro de agua destilada. Distribuir en cantidades de (7 - 10) ml y esterilizar a 121°C durante 15 minutos pH final, 7,3.

***FORMULA**

Extracto de carne 30 g

AGAR TRIPTICASA SOJA CON 3% NaCl (MEDIO 10)***FORMULA**

-	Tripticasa	15.0 g
-	Fitona	5.0 g
-	Cloruro sódico	30.0 g
-	Fosfato dipotásico	2.5 g
-	Glucosa	2.5 g
-	Agar	15.0 g



BIBLIOTECA
INIA, S.A.
MADRID

***INSTRUCCIONES**

Añadir los ingredientes a un litro de agua destilada, calentar hasta la ebullición para conseguir la disolución completa, enfriar a (50 - 55)°C ajustar el pH a 7,3 y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Utilizar en placas o en forma de agar inclinado.

MEDIO PARA LA PRUEBA DE MOVILIDAD CON 3% DE CINA (MEDIO**11)*****FORMULA**

-	Extracto de carne	3.0 g
---	-------------------	-------

-	Peptona	10.0 g
-	Cloruro de sodio	30.0 g
-	Agar	4.0 g

***INSTRUCCIONES**

Disolver todos los ingredientes en un litro de agua destilada, calentando suavemente y agitando de vez en cuando. Distribuir en volúmenes de aproximadamente 8 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, pH final 7,4.

CALDO TRIPTICADA SAL (0%, 6%, 8%, 10% de NaCl) (MEDIO 12)***FORMULA**

-	Trypticasa	10.0 g
-	Extracto de levadura	3.0 g

***INSTRUCCIONES**

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Añadir (0, 6, 8 y 10) gramos de NaCl por cada 100 ml para obtener, respectivamente, un caldo

tripticosa con (0, 6, 8 y 10)% de NaCl. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, pH final, 7,5.

CALDO SALES CARBOHIDRATO (MEDIO 13)

*FORMULA DEL MEDIO BASE

-	Peptona	2.0 g
-	Sulfato sódico	2.5 g
-	Cloruro amónico	5.0 g
-	Fosfato monopotásico	0.5 g
-	Fosfato disódico	1,5 g
-	Azul de bromotimol	
	(solución acuosa al 0,2)	12.0 ml

*INSTRUCCIONES

Para la preparación del medio completo. Disolver los ingredientes en un litro de agua de mar sintética (ver la fórmula más adelante), repartir en volúmenes de 5 ml en tubos de cultivo y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar y añadir 0,5 ml de una solución acuosa al 10% del carbohidrato deseado (adonitol, arabinosa, celobiosa, dulcitol, glucosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, rhamnosa, salicina, almidón, sacarosa,



trehalosa o xilosa). Esterilizar las soluciones, de carbohidratos por filtración o en autoclave a 115°C. Durante 10 minutos.

*AGUA DE MAR SINTETICA

Para prepararla, disolver los siguientes componentes en 1 litro de agua destilada:

-	Cloruro sódico	23.40 g
-	Cloruro potásico	0.66 g
-	Sulfato sódico	3.91 g
-	Bicarbonato sódico	0.19 g
-	Cloruro magnésico	4.96 g

AGAR DE WAGATSUMA, MODIFICADO (MEDIO 14)

*FORMULA

-	Extracto de levadura	5.0 g
-	Peptona	10.0 g
-	Cloruro sódico	70.0 g
-	Manitol	5.0 g
-	Cristal violeta (solución al 0.1% p/v en alcohol etílico).	1.0 g

- Agar 15.0 g

***INSTRUCCIONES**

Disolver todos los ingredientes en un litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,5. Calentar hasta la ebullición durante varios minutos a fin de obtener la disolución completa. No esterilizar. Enfriar a 50°C y añadir 100 ml de una suspensión al 20% de eritrocitos humanos lavados; mezclar y dejar solidificar ya distribuido en placas. Secar estas antes de utilizarlas.

Para preparar la solución de eritrocitos humanos lavados, centrifugar sangre humana desfibrinada, lavar los eritrocitos con solución salina estéril al 0,85% tres veces consecutivas y mezclar una parte del sedimento de eritrocitos de la última centrifugación con cuatro partes de solución salina. El medio base de Wagatsuma (modificado) es preparado en forma deshidratada por la firma japonesa Eiken Co. Ltd.

APENDICE B

COMPOSICION DE REACTIVOS

ACEITE MINERAL ESTERIL (REACTIVO 1)

Esterilizar con calor seco a unos 180°C durante 6 horas.

REACTIVOS CITOCROMO OXIDASA (REACTIVO 2)

- a) Solución al 1% de naftol. Disolver 1 gramo de naftol en 100 ml de alcohol absoluto.

- b) Solución fenileno-diamina. Disolver 1 gramo de N,N-dimetil-p-fenileno-diamina en un litro de agua destilada. Distribuir en pequeñas cantidades en tubos y conservar en el congelador.

TINCION POR EL METODO DE GRAM (MODIFICACION DE HUCKER) (REACTIVO 3)

La modificación de Hucker tiene un valor especial en el examen de extensiones de cultivos puros.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

a) Solución de Cristal Violeta

***FORMULA**

-	Cristal violeta (cont.colorante 85-90%)	2.0 g
-	Alcohol etílico (95%)	20.0 ml
-	Oxalato amónico	0.8 g.
-	Agua destilada	80.0 ml

***INSTRUCCIONES**

Disolver el cristal violeta en el alcohol y el oxalato amónico en el agua destilada. Mezclar las 2 soluciones y esperar 24 horas antes de utilizar la mezcla.

b) Solución de Yodo - Yodurada (BURKE, 1921)

***FORMULA**

-	Yodo	1.0 g
-	Yoduro potásico	2.0 g
-	Agua destilada	100.0 ml

***INSTRUCCIONES**

Triturar el yoduro potásico y el yodo juntos en un mortero añadiendo sucesivamente pequeñas cantidades de agua durante la operación. Pasar la solución a un matraz volumétrico y enjuagar el mortero completando el volumen a 100 ml.

c) Colorante de Contraste

***FORMULA**

- Safranina O	0.25 g
- Alcohol etílico	10.0 ml
- Agua destilada	100.0 ml

***INSTRUCCIONES**

Disolver la safranina en el alcohol etílico y mezclar la solución resultante con el agua destilada.

d) Técnica de Tinción

1. Teñir la extensión 1 minuto con cristal violeta

2. Lavar la preparación cuidadosamente con agua durante algunos segundos.
3. Cubrir la preparación con la solución de yodo hasta que se derrame, mantenerla durante 1 minuto.
4. Lavar cuidadosamente con agua
5. Dejar secar
6. Lavar varias veces con alcohol etílico del 95% hasta que deje de desprenderse el colorante (por lo general, son suficientes tres aplicaciones); tiempo total, de 30 segundos a 1 minuto.
7. Lavar con agua
8. Colorear con el colorante de contraste durante 10 segundos
9. Secar con papel filtro y examinar

Los microorganismos gram positivos se tiñen azul y los gram negativos en rojo.

**REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE VOGES - PROSKAUER (REACTIVO
4)**

- a. Solución de 5% de naftol. Disolver 5 gramos de naftol en 100 ml de alcohol absoluto.
- b. Solución al 40% de creatina-KOH. Disolver 40 gramos de hidróxido potásico y 0,3 gramos de creatina en 100 ml de agua destilada.

La solución de naftol debe prepararse diariamente, la creatina puede omitirse en la solución en la solución de KOH. Para llevar a cabo la prueba de Voges-Proskauer añadir 0,6 ml de la solución de naftol y 0,2 ml del reactivo KOH a 1 ml de cultivo.



APENDICE C

FOTOGRAFIAS DE LA INVESTIGACION

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
"FABRICA DE BALANCEADO L'IRIS S.A."

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

FOTO 1 - 2



PUNTOS DE MUESTREOS EN CAMARONERAS
ENTRADA DE AGUA "ESTACION DE BOMBEO"

FOTO 3 - 4



BIBLIOTECA
C. ING.
MARITIMA





PUNTOS DE MUESTREOS EN CAMARONERAS

"CANAL DE DRENAJE"

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

FOTO 6 - 7



MANIPULACION DE LAS MUESTRAS ESTERILIZADAS

FOTO 8



FOTO 9



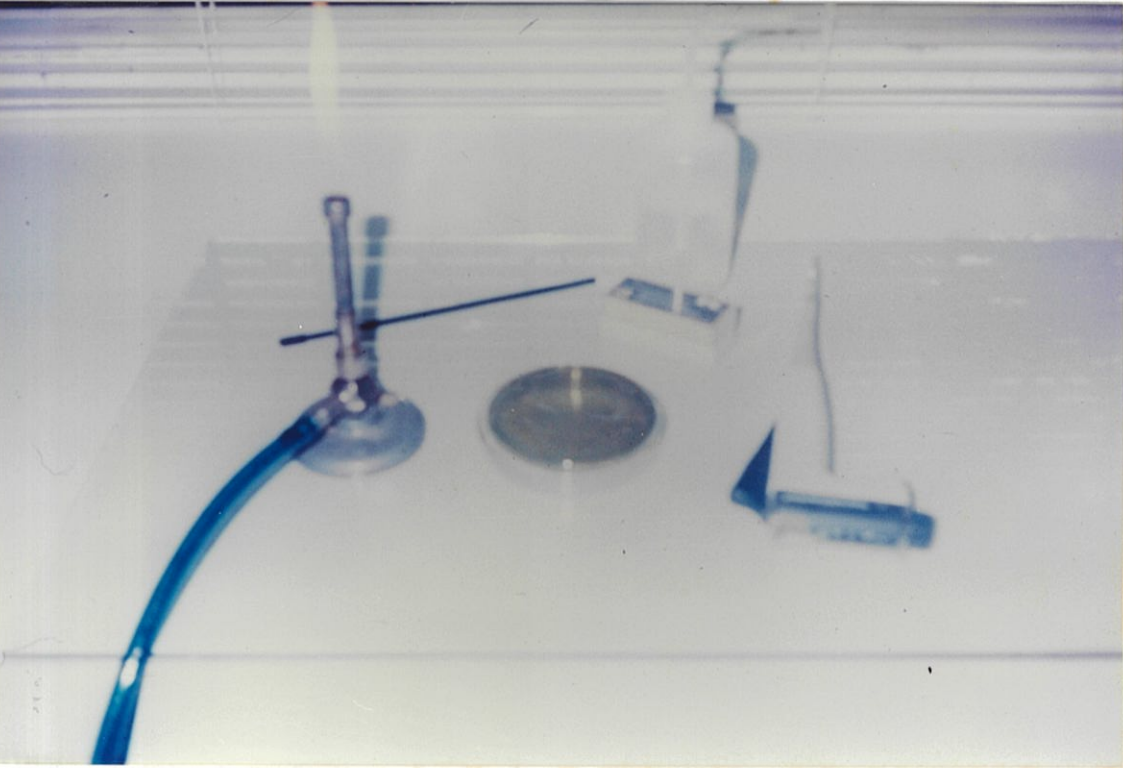
BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA



**AGAR T.C.B.S. CON COLONIAS SOSPECHOSAS DE
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS**

FOTO 10

BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA



BALANZA ANALITICA

FOTO 11

CONJUNTO DE EQUIPOS DE LABORATORIO

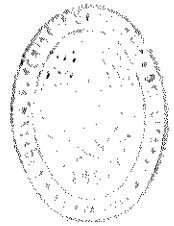


BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

PIPETA MICROLANDA

FOTO 11





BIBLIOTECA
FAC. ING.
MANILA

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. En el primer muestreo, Septiembre 3 de 1992, sólo se aisló el V. parahaemolyticus en tres puntos de un total de 7: En la entrada de agua en la Camaronera No. 2, en la entrada d agua y en el canal de drenaje de la Camaronera No. 3.
2. En el segundo muestreo, Octubre 1ro. de 1992, se aisló esta especie de bacteria en 5 puntos de muestreo pero solo se realizó el estudio con las especies aisladas en los puntos señalados en el numeral uno. El factor que mayormente pudo influir en el aislamiento de esta especie en mas puntos en este segundo muestreo, es la salinidad, en razón, de que el V. parahaemolyticus es una especie halófila y el parámetro salinidad varió desde 7,9 ppt (media) en el primer muestreo a 14,6 (media) en el segundo muestreo.
3. En el primero y segundo muestreo los antibiogramas para Cloranfenicol dieron los siguientes resultados: los discos de 500 ppm formaron halos con un diámetro de 2,6 cm (media); los discos de 250 ppm formaron halos con diámetro de 2,6 cm (media) y los discos de 125 ppm formaron halos con diámetro de 2,4 cm.

En la formación de los halos de cada uno de estos discos no se encontraron colonias de bacterias por lo que he concluído que el V. PARAHAEMOLYTICUS ES SENSIBLE AL CLORANFENICOL EN CONCENTRACION DE 500 PPM, 250 PPM y 125 PPM.

4. De igual forma para la Furazolidona, tanto en el primer y segundo muestreo en los antibiogramas se observaron: formación de halos con diámetros de 2,2 cm (media) alrededor de los discos de 500 ppm; en los discos de 250 ppm los halos tenían un diámetro de 1,9 cm (media) y en los discos de 125 ppm los halos formados tenían diámetros de 1,9 cm (media).

Dentro de los halos formados por los discos de 500 ppm no se encontraron colonias de bacterias, en tanto, que dentro de los halos formados por los discos de 250 ppm y 125 ppm por lo menos una colonia se observó. Por lo tanto el V. PARAHAEMOLYTICUS ES SENSIBLE A LA FURAZOLIDONA DE CONCENTRACION DE 500 PPM Y PRESENTA UNA RESISTENCIA DE CARACTER INTERMEDIA EN CONCENTRACIONES DE 250 PPM Y 125 PPM.

5. En el primero y segundo muestreo la Concentración Mínima Inhibitoria del Cloranfenicol para V. parahaemolyticus con una población de 10^8 u.f.c./ml fue de 125,0 ug/ml, en razón, de que en esta concentración no se observó ninguna turbidez (crecimiento bacteriano), en tanto, que en una concentración de 62,5 ppm se observó una tenue turbidez. Por lo tanto la



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARTINA

C.M.I. DEL CLORANFENICOL PARA UNA POBLACION DE 10 δ U.F.C./ML DE V. PARAHAEMOLYTICUS ES DE 125,0 UG/ML.

6. Con la Furazolidona, tanto en el primero y segundo muestreo la Concentración Mínima Inhibitoria para V. parahaemolyticus en una población de 10 δ u.f.c./ml fue de 500,0 ug/ml, en tazón, de que en esta concentración no se observó turbidez (crecimiento bacteriano), en tanto, que en los 250,0 ppm se observó una tenue turbidez. Por lo que concluyó: La C.M.I. DE LA FURAZOLIDONA PARA UNA POBLACION DE 10 δ U.F.C./ML DE V. PARAHAEMOLYTICUS ES DE 500,0 UG/ML.

7. De acuerdo a los resultados obtenidos en los antibiogramas y C.M.I., se concluye: "de que existe una semejanza entre los datos obtenidos en los antibiogramas y C.M.I. por esta razón, los antibiogramas nos sirven como orientación en la determinación de la C.M.I".

Entre las recomendaciones podemos señalar:

1. Para futuros estudios en esta zona o lugares con baja salinidad es recomendable realizarlo en los meses de la estación seca, donde la salinidad es mayor y las probabilidades de aislamiento del V. parahaemolyticus son mayores.

2. Es recomendable para las camaroneras localizadas en lugares con características físicas similares a la del presente estudio tener un mayor control microbiológico sobre los Vibrios spp., en los meses de época seca, en razón al alto riesgo de infección debido al aumento de las poblaciones de estas bacterias.

3. No utilizar la Furazolidona para el tratamiento de infecciones ocasionadas por el V. parahaemolyticus, en razón a la resistencia adquirida por esta bacteria frente a este antibiótico.

4. Realizar un estudio de mayor alcance. En este futuro trabajo se debe determinar cuales son las concentraciones mínimas de inhibición de los antibióticos de mayor uso en terapia de camarones frente a las bacterias que mayormente afectan al camarón P. vannamei. De esta forma determinaríamos cuales antibióticos se pueden usar y cuales no, además en que concentraciones, evitando de esta forma las sobredosificaciones y subdosificaciones.

Este estudio no solo beneficiaría al sector camaronero sino al hombre mismo, en razón, de que muchos de estos antibióticos también son usados en la terapia humana y con un control técnico de su uso evitaríamos alteraciones en la ecología que nos conllevarían a crear resistencias bacterianas.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOTECA
14C, ING.
MARITIMA

1. FISHERIES CHEMOTHERAPY: A REVIEW (DAVID J. ALDERMAN)
2. ANTIBIOTICS: THEIR USE AND ABUSE IN AQUACULTURE: BY JANET H. BROWN.
3. MANUAL DE ENFERMEDADES: JAMES A. BROCK, 1986 (PAG. 8, 9, 10 Y 11).
4. MANUAL DE PATOLOGIA DE LOS CAMARONES PENNEIDOS: POR CONROY, Ph.D. Y GINA CONROY, M.Sc.; 1989.
5. MANUAL PRACTICO DE BACTERIOLOGIA MARINA: Q.F. FERNANDO CARVACA CASTRO, 1990 (PAG. 63, 64 Y 65).
6. TECNICAS DE BACTERIOLOGIA: VOLUMEN III, DAGUET Y CHABBERT (1977).
7. MANUAL PRACTICO DE ESTADISTICA BASICA Y DISEÑO EXPERIMENTAL APLICADOS A LA ACUACULTURA (ESPOL, 1992).
8. DISPOSICIONES PARA LA ELABORACION DE TESIS DE GRADO (ESPOL, 1981).
9. MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS 1: TECNICAS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICOS (ICMSF, EDITORIAL ACRIBIA, ESPAÑA) PAG. 204-211.
10. MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA. E.H. LENNETE; E. H. SPANLDINGS; J.P. TRUANT; SALVAT.
11. INFORME SOBRE VISITA A CAMARONERA SR. GILBERTO ESCOBAR, LIGHTNER (1989).

12. DISEASES OF CULTURED PENEID SHRIMP, LIGHTNER 1989)
13. COMPENDIO DE FARMACOLOGIA: MANUEL LITTER (1972); EDITORIAL EL ATENEO, BUENOS AIRES (PAG. 595, 596).
14. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA. JEAN F. MAC FADDIN.
15. COMPENDIO DE BACTERIOLOGIA MEDICA VETERINARIA: JACQUES NCCOLET.
16. DETERMINACION DE PRINCIPALES TIPOS DE BACTERIAS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE LARVAS DE PENAEUS VANNAMEI EN SUS DIFERENTES ESTADIOS LARVARIOS: (MARIA DE LOURDES NEDER M., 1989).
17. DEGRADATION OF OXYTETRACYCLINE IN SEAWATER AT TWO DIFFERENT TEMPERATURES AND LIGHT INTENSITIES, AND THE PERSISTANCE OF OXYTETRACYCLINE IN THE SEDIMENTS FROM A FISH FARM. O.B. SAMNELSEN.
18. MICROBIOLOGIA GENERAL: HANS G. SCHLEGEL