

ENTEROPATOGENICIDAD DE BACTERIAS AISLADAS DE PECES, DEL AGUA Y PLANCTON DE SU ENTORNO EN VENEZUELA

Enteropathogenicity of Bacteria Isolated from Fish, Water and Plancton from their Environment in Venezuela

Yubiry Leal, Mayra Reyes, Julia D. Álvarez, José Obregón y Xiomara Viña

Laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos (LMPC). Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras. Venezuela, estado Aragua, Maracay 2101.

Fax: 00-58-243-2377964. E-mail: jdarivera@cantv.net

RESUMEN

Las enfermedades de transmisión alimentaria asociadas al consumo de pescado, constituyen en la actualidad un grave problema sanitario en Venezuela, ya que la aparición de patologías gastrointestinales se ha hecho cada vez más frecuente, quizás originada directamente por miembros de la bacterioflora de peces dulceacuícolas. En tal sentido, el objetivo de esta investigación se centró en la determinación de la enteropatogenicidad, específicamente la citotoxicidad y enterotoxigenidad de cepas bacterianas aisladas de tilapias, truchas arco iris y cachamas, provenientes de granjas y del medio silvestre. Para ello, se emplearon un total de 12 cepas, dos por cada especie bacteriana: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides* y *Vibrio cholerae*, empleando la línea celular Vero y a través del modelo de inoculación en ratones lactantes. La producción de enterotoxinas resultó positiva para el 42% de las cepas, observándose distensión abdominal con fluido intestinal de color blanquecino en ratones inoculados con *A. hydrophila*, *K. pneumoniae* y *V. cholerae*, mientras que en aquellos inoculados con *E. coli*, el fluido se observó hemorrágico. El 100% de las cepas resultaron citotóxicas en el ensayo con células Vero, produciendo alteraciones intra (granulaciones tóxicas) y extra-celulares (disgregación y cambios en la morfología celular). Estos resultados permiten inferir sobre la existencia de un vínculo entre el consumo de pescado y la aparición de enfermedades en el humano.

Palabras clave: Peces, bacterias, enteropatogenicidad, citotoxicidad, enterotoxigenidad.

ABSTRACT

Diseases transmitted through food products associated to fish consumption, actually constitute a serious sanitary problem in Venezuela, because gastrointestinal pathologies are more frequent, maybe originated directly from members of freshwater fish bacterioflora. For this, the objective of this research was focused in the enteropathogenicity determination, specifically cytotoxicity and enterotoxigenicity of strains isolated from tilapias, rainbow trouts and cachamas, captured from farms and natural environments. In that sense, 12 strains were used, two of each of the following species: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides* and *Vibrio cholerae*, using a Vero cellular line and the suckling mouse model. The enterotoxin production resulted positive for 42% of the strains, observing abdominal distension with a whitish intestinal fluid in mice inoculated with *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* and *Vibrio cholerae*, while in those inoculated with *E. coli* the fluid was hemorrhagic. All the strains resulted cytotoxic in the trial with Vero cells, producing intracellular (toxic granulations) and extra cellular alterations (desegregation and changes in the cellular morphology). These results allow the inference that there is a relation between fish consumption and the appearance of disease in humans.

Key words: Fish, bacteria, enteropathogenicity, cytotoxicity, enterotoxigenicity.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela existe una cultura de consumo de pescado marino y dulceacuícola, silvestre o de cultivo, debido a que se cuenta con extensos recursos acuáticos. Adicionalmente a esto, es mundialmente aceptado como una de las principales

fuentes de proteínas de origen animal, además de ser considerado uno de los recursos alimenticios más sanos, sin embargo, a través de él son ingeridas bacterias y toxinas que pueden ocasionar graves problemas alimentarios. Esto ocurre porque en la superficie externa y en los órganos internos de los peces, se encuentran como parte de su bacterioflora, especies bacterianas capaces de ocasionar infecciones, tanto en los organismos acuáticos como en el hombre.

Desde hace varias décadas se cultivan en Venezuela diversas especies de peces [1, 2], entre las que cabe mencionar la tilapia roja (tetrahíbrido de *Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum* x *O. niloticus* x *O. aureus*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), cachama (*Colossoma macropomum*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Actualmente en el laboratorio se realizan estudios de la bacterioflora (miembros de la flora normal) de peces silvestres y bajo cultivo en granjas del país, ya que las posibilidades de que sean afectados por una patología ocasionada por éstas, especialmente las infecto-contagiosas, aumentan considerablemente cuando estos animales pasan a un estado de estrés. Estas bacterias constituyen una fuente potencial de infección para el hombre, produciendo patologías como: gastroenteritis, diarreas espontáneas e infecciones extraintestinales en el mismo [14]. Como resultado de estos estudios se han aislado bacterias de importancia sanitaria, tanto para especies ícticas como para la salud pública, resaltando bacilos Gram negativos móviles, ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos, suelo, agua y plancton [2].

Ante esta situación y considerando que los peces han constituido durante muchos años un importante recurso alimenticio, se propuso una investigación dirigida a detectar los posibles efectos enteropatógenos, específicamente citotóxico y enterotóxico, producido por bacterias de las especies *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Plesiomonas shigelloides*,

Pseudomonas fluorescens y *Vibrio cholerae*, a través de la inoculación de estas cepas en células Vero (mono verde africano) y de la aplicación del método de inoculación de ratones (*Mus musculus*) lactantes, pudiendo de esta manera hacer inferencia sobre la existencia de un vínculo entre el consumo de pescado y la aparición de enfermedades en el humano [16].

Tomando en cuenta que, si una determinada cepa en estudio induce consistentemente reacciones citotóxicas fuertes en cultivos de células de animales homeotermos, es muy probable entonces que también ejerza efectos citotóxicos sobre tejidos vivos; esto permite determinar la capacidad de estas bacterias de infectar al hombre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y Muestra

La población estuvo constituida por cepas bacterianas aisladas de especies ícticas dulceacuícolas, silvestres y de cultivo, así como, de su entorno acuático (plancton, agua de estanques, lagunas de cultivo y medio silvestre), que forman parte de la colección de cepas del laboratorio. Para este estudio se tomaron dos cepas bacterianas Gram negativas de: *E. coli*, *P. shigelloides*, *K. pneumoniae*, *Ps. fluorescens*, *V. cholerae* y *A. hydrophila*, cuyo origen se detalla en la TABLA I, aisladas de peces aparentemente sanos.

MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Para determinar la enterotoxigenidad se aplicó el método de inoculación en ratones lactantes [7], empleando ratones de uno a cuatro días de nacidos, obtenidos del bioterio del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay.

TABLA I
PROCEDENCIA DE LAS CEPAS BACTERIANAS/ ORIGIN OF BACTERIAL STRAINS

Cepa	Código Interno	Procedencia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 Sal Acuafín 1999	Tetrahíbrido de tilapia
	98E Guanapito 2003	Cachama
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1F Santo Domingo 2003	Agua de entrada
	7F Santo Domingo 2003	Plancton
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	48 Acuafín 2002	Tetrahíbrido de tilapia
	70 San Fernando 2003	Cachama
<i>Vibrio cholerae</i>	31 Lago de Valencia 2000	Tilapia de Mozambique
<i>Escherichia coli</i>	149 Lago de Valencia 2000	Tetrahíbrido de tilapia
	72E Acuafín 2001	Tetrahíbrido de tilapia
	77E Acuafín 2001	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	K-88+	Cerditos diarreicos
	217 Mucuy 2003	Trucha arco iris
	11 Mucuy 2003	

Para evaluar la citotoxicidad se empleó el método de cultivo celular *in vitro* empleando la línea de células Vero [3, 20, 23], subcultivadas en el laboratorio (INIA-CENIAP, Maracay).

Los controles empleados para ambos tipos de pruebas fueron:

- **Control positivo:** Cepa de *Escherichia coli* K-88+ aislada de cerditos diarreicos (cedida por el laboratorio de Bacteriología del INIA-CENIAP, Maracay), productora de enterotoxinas y citotoxinas.
- **Control negativo:** solución salina estéril (0,85% p/v).

Obtención de cultivos frescos de las cepas bacterianas

Para asegurar la utilización de cultivos puros, el repique de las cepas se realizó en agar tripticosa soya (ATS) [5] y se incubó a 37°C (incubadora Lab-Line, modelo 310, EUA), posteriormente se efectuó el sembrado de las cepas en medios diferenciales: Inositol verde brillante sales biliares (IBB) [22], colistina polimixina cellobiosa (CPC) [17], agar *Pseudomonas* F o en su defecto agar Mueller-Hinton (AM-H SIGMA), agar Ampicilina Dextrina (AAD) [13], agar Eosin Methylen Blue (EMB) [15], para las cepas de *P. shigelloides*, *V. cholerae*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

Posteriormente, se comprobó la identificación de las cepas bacterianas obtenidas a partir de los cultivos, mediante el empleo de pruebas fenotípicas básicas según Austin y Austin [4], Austin y Lee [5] y Koneman y col. [15].

Modelo del ratón lactante

Obtención de los inóculos bacterianos empleados en el modelo del ratón lactante: Del cultivo bacteriano puro, se tomó una porción de la colonia y se sembró en dos mL de caldo tripticosa soya (CTS, SIGMA), el cual fue incubado a 35°C, durante 18-24 horas; luego se sembraron tres gotas de este cultivo puro en cinco mL de CTS, incubándose a una temperatura de 30-35°C durante la noche [7]. Posteriormente se tomaron dos mL de este cultivo y se adicionaron a 5 mL de CTS, y se agitó durante toda la noche. Después el cultivo fue centrifugado en el equipo MultiRF Refrigerante Termo IEC, a 3000 rpm, EUA, a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se utilizó para preparar el inóculo, adicionándole dos gotas de azul de metileno al 2% (p/v). Esta solución se empleó para la inoculación de los ratones lactantes [7].

Inoculaciones: Se tomaron al azar cuatro ratones lactantes, la inoculación se realizó vía intragástrica con 0,1 mL de la solución final. Los ratones fueron mantenidos a 28°C por 4 horas [7]. Una vez transcurrido este tiempo, fueron sacrificados utilizando para ello cloroformo (SIGMA). La necropsia fue realizada fijando los ratones en posición ventral, efectuando la incisión a lo largo de la línea media ventral, quedando de esta manera expuestas las vísceras.

La masa intestinal de los cuatro ratones fue removida, desde el píloro hasta el ano. Por cada cepa, los intestinos de

los cuatro ratones fueron colocados y pesados simultáneamente, así como también los cuerpos de los cuatro ratones sin intestino, y se realizó el cálculo de la relación:

$$\text{Relación peso} = \frac{\text{Peso de los intestinos}}{\text{Peso del resto del cuerpo}}$$

Las relaciones menores o iguales de 0,07 se consideraron negativas, las mayores de 0,07 y menores o iguales a 0,083 positivos débil y las mayores de 0,083 positivas [7].

Ensayo de capa de agar sobre monocapa celular [20, 23].

Obtención del inóculo bacteriano [3]: A partir de la cepa bacteriana se sembraron dos mL de CTS incubándolo a 30°C durante 18 horas. A partir de este caldo, se procedió a preparar el inóculo utilizando solución salina estéril al 0,85% (p/v), ajustando a una concentración de 9×10^8 cel mL⁻¹ por comparación con el tubo número 3 del Nefelómetro de MacFarland [6].

Formación de la monocapa celular [20, 21, 23]: Se cultivó la línea celular Vero en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM; SIGMA), suplementado con suero fetal bovino (SFB; SIGMA) al 10%, empleando microplacas de 24 pocillos (CELLSTAR), en las cuales se inocularon 0,5 mL de cultivo celular por pocillo, a una concentración de 2×10^5 células mL⁻¹. Para la formación de la monocapa celular en las microplacas, se requería el uso de una incubadora con atmósfera de CO₂ al 5%, sin embargo, como no se contó con este equipo al momento del ensayo, se creó dicha atmósfera de forma artificial sellando las microplacas con papel parafinado (PARAFILM), posteriormente las microplacas fueron incubadas a 37°C por 48 horas.

Inoculación de la monocapa [3]: Una vez obtenida la monocapa celular confluyente se removió el medio de crecimiento, y se lavó la línea celular con MEM al 10% SFB. Luego se cubrió la monocapa con 0,8 mL de una solución compuesta por MEM 2X al 10% SFB y agar Noble (DIFCO) al 1% (p/v) a una temperatura de 45°C [20, 23]. Una vez solidificada y enfriada la capa de agar a temperatura ambiente, se sembró la monocapa con 1 µL (por cada pocillo) del inóculo (9×10^8 cel mL⁻¹) la microplaca fue incubada a 37°C durante 72 horas, tiempo durante el cual se observaron las células cada 24 horas con un microscopio invertido (Leica modelo DMIL, Alemania), determinando así la presencia o no de lesiones en las mismas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La etapa más temprana en el proceso de la enfermedad es la ingesta del alimento contaminado con la bacteria, posteriormente se produce la colonización del intestino por parte de la misma. A este nivel, la bacteria libera toxinas (citotoxinas y enterotoxinas), las cuales son capaces de provocar una serie de alteraciones en el metabolismo de las células de la mucosa intestinal, incrementando en muchos casos la secreción de agua, sodio, potasio, cloro y bicarbonato en el lumen del intes-

tino delgado; de esta manera, el efecto de la bacteria sobre el intestino se expresa por la emisión de evacuaciones líquidas con o sin sangre, de naturaleza autolimitada o de prolongada duración hasta causar severas deshidrataciones [14, 18].

Prueba de enterotoxicidad

Transcurrida una hora de exposición a las toxinas se observaron evacuaciones de consistencia líquida y de color amarillo en aquellos ratones infectados con las cepas *A. hydrophila* 217 La Mucuy 2003, *E. coli* 72E Acuaflin 2001, *K. pneumoniae* 98E Guanapito 2003 y ambas cepas de *V. cholerae*; se presentó además, distensión abdominal en todos los ratones siendo más acentuada en los inoculados con *V. cholerae*, los cuales se mostraron muy intranquilos.

Al realizar la extracción de los intestinos, se notó que la mayoría de éstos (8 de 12) se encontraban llenos de materia fecal pastosa y de color amarillo. Los intestinos de aquellos ratones inoculados con las cepas: *A. hydrophila* 217 La Mucuy 2003, ambas *V. cholerae*, *E. coli* 72E Acuaflin 2001 y *E. coli* K-88 + se observaron inflamados, con aspecto brillante, edematosos y llenos de un fluido mucoso de color blanquecino y en el caso particular de las *E. coli* se notaron muy hemorrágicos (FIG. 1).

De acuerdo al rango establecido por Dean y col. [7], los valores de las relaciones entre el peso de los intestinos y el peso de los cuerpos de los ratones sin intestinos, indicaron que el 42% de las cepas resultaron enterotóxicas, mientras que en el 58% las toxinas no causaron un efecto patógeno (TABLA II).

Varios factores de virulencia han sido estudiados para determinar el mecanismo patogénico de las bacterias, tales como: la producción de citolisinas, hemolisinas, enterotoxinas, adhesinas y enzimas elastolíticas [8]. La presencia de estos factores de virulencia en *P. shigelloides* aislada de diversos am-

bientes, fue estudiada por González-Rey [8], demostrando la capacidad de esta especie de sintetizarlos. Entre estos factores resaltan la producción de enterotoxinas (a través del modelo de inoculación intragástrica en ratones lactantes) y de enzimas elastolíticas capaces de degradar el tejido conectivo. Resultados similares fueron obtenidos en este estudio, pues la cepa *P. shigelloides* 70 San Fernando 2003 presentó actividad elastinasa positiva, demostrada por la degradación de gránulos de elastina en ATS [5] y enterotóxica, evidenciada por la acumulación de líquido en el lumen intestinal de los ratones.

La patogenicidad de *A. hydrophila* también fue estudiada por Hostacka [11], quien demostró la presencia de enterotoxinas, hemolisinas y factores citotóxicos en filtrados de esta bacteria, empleando el método del asa ligada de conejos (*Orytolagus cuniculus*) y el cultivo de células Vero. En el ensayo que compete, se comprueba el efecto enterotóxico de esta especie, ya que *A. hydrophila* 217 La Mucuy 2003, dio resultado positivo en la prueba de ratones lactantes y en la producción de enzimas elastolíticas.

Un caso excepcional es *P. fluorescens*, de la cual hasta el momento en la literatura no se registra que esta especie produzca un efecto enterotóxico, sin embargo, *P. fluorescens* 1F Santo Domingo 2003, empleada aquí en la prueba de enterotoxicidad, resultó debilmente positiva en tres ocasiones que se repitió la prueba.

En la actualidad se reconocen seis categorías de *E. coli*: la enteropatógena, la enterotóxica (ECET), la enterohemorrágica, la enteroinvasiva, la enteroagregativa y la adherente difusa [18]. De ellas, la ECET ha cobrado gran importancia en la salud pública, ya que ha sido reconocida como agente causal de diarrea en niños y viajeros en países subdesarrollados [12].

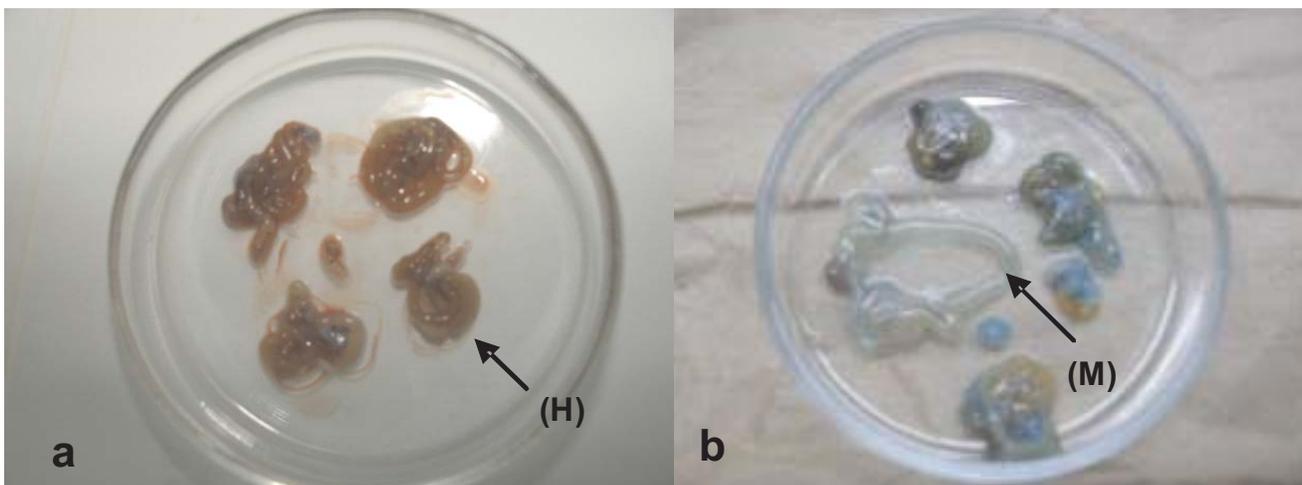


FIGURA 1. (A). *E. coli* 72E ACUAFÍN 2002, PRODUJO DISTENSIÓN ABDOMINAL ACENTUADA CON CONTENIDO INTESTINAL ABUNDANTE Y HEMORRÁGICO (H); (B). *V. cholerae* 149 LV 2000, PRODUJO DISTENSIÓN ABDOMINAL ACENTUADA CON CONTENIDO INTESTINAL BLANQUECINO MUCOSO (M) Y ABUNDANTE/ *E. coli* 72E ACUAFÍN 2002, PRODUCED MARKED ABDOMINAL DISTENSION WITH ABUNDANT HEMORRAGIC NTESTINAL CONTENT (H); (B). *V. cholerae* 149 LV 2000, PRODUCED MARKED ABDOMINAL DISTENSION WITH ABUNDANT WHTISH MUCOID CONTENT (M).

Por lo antes planteado, se incluyeron en este estudio de enterotoxicidad dos cepas de *E. coli*, de las cuales *E. coli* 72E Acuafin 2001, fue positiva a la prueba. Este resultado coincide con los obtenidos por Gianella [8] quien demostró la capacidad de *E. coli* de producir toxinas termoestables (ST), dando óptimos resultados en la prueba del ratón lactante. Sin embargo, de las cepas de *E. coli* aquí ensayadas, *E. coli* 77E Acuafin 2001 fue negativa a la prueba; esto concuerda con el estudio realizado por Hassan y col. [10], en el cual cepas de *E. coli* aisladas de la bacteri flora de peces, resultaron negativas en el ensayo del ratón lactante. Esto permite inferir que la variabilidad de los resultados obtenidos pudiera deberse a una diferencia en los serotipos de las cepas aquí probadas.

Por otra parte, algunas cepas de *V. cholerae* producen una enterotoxina termoestable muy parecida a la de *E. coli*, en este estudio sobre la capacidad enterotoxigénica de dos cepas de *V. cholerae* resultaron positivas; esto difiere de los resultados obtenidos por Hassan y col. [10], en el que las cepas de *Vibrio* spp. empleadas, identificadas solo a nivel de género, arrojaron resultados negativos, lo que puede deberse a la diferencia de especies entre las cepas estudiadas. Es preciso tomar en cuenta que de ambas cepas, *V. cholerae* 31 Lago de Valencia 2003 enterotóxica, resultó negativa a la producción de enzimas elastolíticas; sin embargo, la ausencia de este factor de forma aislada no permite clasificar a una cepa como no enteropatógena pues debe estar asociado al resto de éstos [9].

Prueba de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad sobre células Vero, se tomaron las cepas que resultaron enterotóxicas en ratones

lactantes, con el fin de evaluar la presencia de citotoxinas en las mismas.

La atmósfera artificial de CO₂ creada dio óptimos resultados, permitiendo disminuir la posibilidad de contaminación, conservando la humedad, facilitando la formación de una monocapa que fue confluyente en tan sólo 48 horas de incubación a 37°C.

La observación final de este ensayo se realizó a las 72 horas de incubación, ya que los cambios celulares se fueron profundizando para finalmente visualizarse el desprendimiento de la monocapa, a excepción del control negativo, el cual no presentó cambios en su morfología celular normal. En la TABLA III se detallan los cambios morfológicos observados a las 24 y 48 horas de incubación, una vez inoculadas las cepas bacterianas.

De las cepas ensayadas, el 100% resultaron tóxicas produciendo alteraciones intra y extracelulares, entre las cuales la presencia de vacuolas, granulaciones citoplasmáticas y redondeamiento celular fueron las más resaltantes (FIGS. 2 y 3).

La citotoxicidad también juega un rol importante en la patogenicidad de una cepa bacteriana [8], la misma viene dada por la capacidad de ésta de sintetizar distintas toxinas que provocan alteraciones letales en las células del hospedero, de acuerdo al grado de susceptibilidad de la misma a la acción de dicha toxina [19]. Estas alteraciones son evidenciadas por el daño estructural y morfológico que sufre la célula, induciendo en muchos casos la muerte de ésta.

Considerando que son varios los factores de virulencia implicados en la enteropatogenicidad de una bacteria, en este estudio se evaluó como un factor adicional, la producción de citotoxinas de las cepas enterotóxicas.

TABLA III

CAMBIOS MORFOLÓGICOS A LAS 24-48 HORAS DE INCUBACIÓN/ MORPHOLOGICAL CHANGES AT 24 - 48 HOURS OF INCUBATION

Cepas	Características de la monocapa	
	A las 24 horas de incubación	A las 48 horas de incubación
Control negativo	Monocapa normal, refringente. Células escasas en suspensión.	No hubo cambios en la morfología celular.
Control positivo <i>E. coli</i> K88+	Destrucción de monocapa. Presencia de cúmulos celulares. Células filamentosas aisladas. Gránulos citoplasmáticos abundantes.	No hay presencia de cúmulos celulares. Células filamentosas abundantes en suspensión.
<i>E. coli</i> 72E Acuafin 2001	Destrucción de la monocapa. Presencia de cúmulos celulares y gránulos citoplasmáticos abundantes.	Presencia de cúmulos celulares. Células puntiformes. Detritos celulares abundantes.
<i>P. shigelloides</i> 70 San Fernando 2003	Destrucción parcial de la monocapa. Células redondas aisladas. Presencia de gránulos citoplasmáticos. Acidificación del medio. Vacuolas citoplasmáticas.	Células redondeadas escasas. Células filamentosas en suspensión abundantes. Presencia de gránulos.
<i>V. cholerae</i> 31 Lago de Valencia 2000	Destrucción de la monocapa. Presencia de células filamentosas con gránulos.	Cúmulos celulares. Presencia de células filamentosas en suspensión abundantes.
<i>V. cholerae</i> 149 Lago de Valencia 2000	Destrucción de la monocapa. Presencia de células filamentosas aisladas con gránulos citoplasmáticos.	Cúmulos celulares. Presencia de células filamentosas en suspensión abundantes
<i>A. hydrophila</i> 217 La Mucuy 2003	Destrucción parcial de la monocapa. Presencia de cúmulos celulares con gránulos citoplasmáticos. Células redondeadas aisladas. Acidificación del medio.	Células redondeadas en suspensión abundantes. Presencia de células redondas y oscuras adheridas. Cúmulos celulares. Detritos celulares.

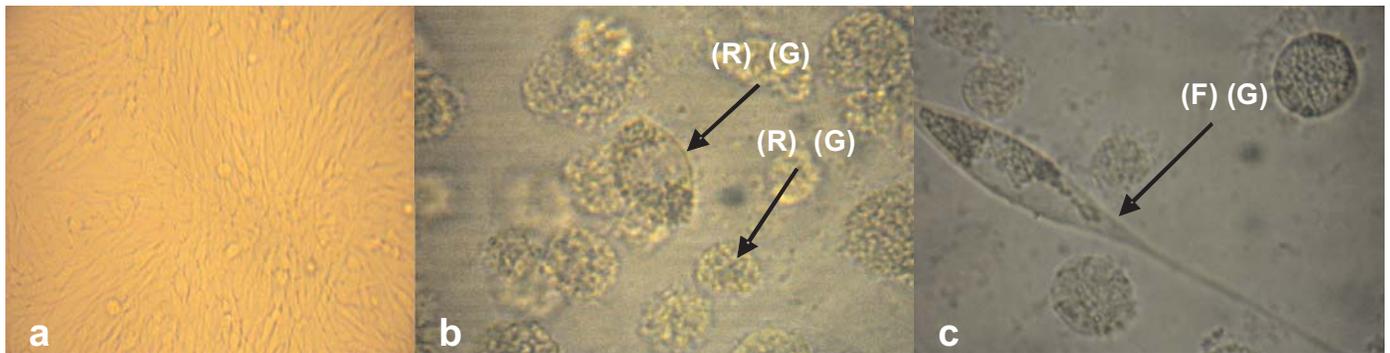


FIGURA 2. A LAS 24 HORAS INCUBACIÓN. A. CONTROL NEGATIVO, B. CONTROL POSITIVO *E. coli* K-88+ PRESENCIA DE CÉLULAS REDONDEADAS (R) CON GRÁNULOS CITOPASMÁTICOS (G), C. *V. cholerae* 149 1° LV 2000 CÉLULAS FILAMENTOSAS (F) CON GRÁNULOS CITOPASMÁTICOS (G). (320X)/ AT 24 HORAS OF INCUBATION. A. NEGATIVE CONTROL, B. POSITIVE CONTROL *E. coli* K-88+, ROUNDED CELLS PRESENT (R) WITH CYTOPLASMIC GRANULES (G), C. *V. cholerae* 149 1° LV 2000 FILAMENTOUS CELLS (F) WITH CYTOPLASMIC GRANULES (G). (320X).

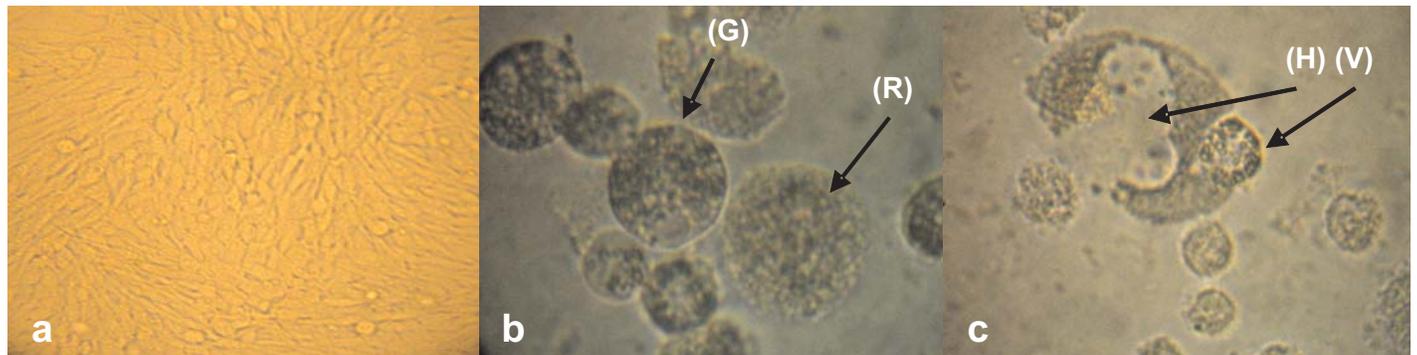


FIGURA 3 A. A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN. A. CONTROL NEGATIVO, B. *E. coli* 72E 1° ACUAFÍN 2002, PRESENCIA DE CÉLULAS REDONDEADAS (R) CON GRÁNULOS CITOPASMÁTICOS (G), C. *P. shigelloides* 48 1° ACUAFIN 2002 CÉLULAS HIPERTROFIADAS (H) CON VACUOLAS (V) Y GRANULACIONES CITOPASMÁTICAS (G). (320X)/ AT 48 HORAS OF INCUBATION. A. NEGATIVE CONTROL, B. *E. coli* 72E 1° ACUAFÍN 2002, ROUNDED CELLS PRESENT (R) WITH CYTOPLASMIC GRANULES (G), C. *P. shigelloides* 48 1° ACUAFIN 2002 HYPERTHROFIED CELLS (H) WITH VACUOLS (V) AND CYTOPLASMIC GRANULATIONS (G). (320X).

La técnica de inoculación de la monocapa celular empleada por Parreira y col. [20] y Zamora y col. [23] aplicada al principio en este ensayo, no permitió determinar la concentración bacteriana del inóculo, siendo el desarrollo muy abundante, lo cual dificultó la observación de los cambios morfológicos celulares de forma gradual y provocó la muerte celular en muy poco tiempo.

Es por ello que surgió la necesidad de realizar variaciones en el modo de inoculación de la monocapa, logrando ajustar el inóculo a una concentración adecuada, lo que permitió la producción en forma gradual de los cambios degenerativos sobre las células, debido a la acción de las toxinas bacterianas, así como también la reproducibilidad del experimento.

A pesar que la técnica de Zamora y col. [23] aquí empleada, contempla un tiempo máximo de incubación de 96 horas para determinar la presencia de lesiones en las células, la observación final en este ensayo se realizó a las 72 horas, tiempo en el cual los cambios morfológicos se acentuaron a un grado tal, que sólo quedaban remanentes de la monocapa, siendo además la visibilidad bastante limitada, debido al abun-

dante crecimiento bacteriano en todos los casos. Parreira y col. [20] emplearon un período de incubación aún menor, observando los cambios morfológicos en las células Vero hasta las 48 horas de incubación.

La citotoxicidad de cepas de *E. coli*, aisladas de cerditos diarreicos, fue evaluada sobre células Vero por Zamora y col. [23], demostrando la capacidad de las mismas de producir un efecto citotónico, caracterizado por el aumento de tamaño y engrosamiento de las células, las cuales se observaron refráctiles y con prolongaciones filamentosas, y un efecto citotóxico en el que las células se redondean con notables cambios destructivos.

Características similares fueron aquí observadas en las células inoculadas con la cepa enterotoxigénica *E. coli* 72E Acuaafín 2001, que indujo la formación de granulaciones citoplasmáticas y finalmente la destrucción de la monocapa celular, tratándose por ello de una cepa citotóxica.

Así mismo, González-Rey [9] demostró el efecto citotóxico de *P. shigelloides* en varias líneas celulares, las cuales fueron fuertemente afectadas por las toxinas liberadas por cepas

AGRADECIMIENTO

Al FONACIT por el financiamiento económico aportado a través de los Proyectos de Investigación: a) Agenda Pesca y Acuicultura No. 20020001218 del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología, y b) S1-2002000525 del INIA adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ÁLVAREZ, J.; AGURTO, C. Estudios virológicos y bacteriológicos en Acuicultura. Trabajo presentado en el ciclo de Seminarios CENIAP, Maracay, Venezuela. 5-7pp. 2003.
- [2] ÁLVAREZ, J.; AGURTO, C. Estudio epidemiológico de parásitos y bacterias predominantes en peces de interés comercial para Venezuela. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Venezuela; 2000. En línea: <http://www.ceniap.gov.ve/digital/congresos/jornadas/web/jalvarez.htm>. 16/Abril 2004.
- [3] ÁLVAREZ, J.D.; AGURTO, C.; ÁLVAREZ, A.M.; OBREGÓN, J. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. **Rev Científ. FCV-LUZ**. XIV (6):491-499 pp. 2004.
- [4] AUSTIN, D.; AUSTIN, D. A. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish, **Aeromonadaceae representatives**. Ellis Horwood Lim, Chichester, England: John Wiley and Sons. 171-187 pp. 1993.
- [5] AUSTIN, D.; LEE, J. Aeromonadaceae and Vibrionaceae. **Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology**. Technical Series of the Society for Applied Bacteriology. 171-94 pp. 1992.
- [6] BRANSON, D. Métodos de bacteriología clínica. Manual de test y procedimientos. Buenos Aires Argentina: Editorial S.A Médica Panamericana, 256 pp. 1974.
- [7] DEAN, A.; CHING, Y.; WILLIAMS, R.; HARDEN, L. Test for *Escherichia coli* enterotoxin Using Infant Mice: Application in a Study of Diarrhea in Children in Honolulu. **J infect Dis**. 125(4): 407-411. 1972.
- [8] GIANELLA, R. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. **Infect Immun**. 14(1):95-9. 1976.
- [9] GONZÁLEZ-REY, C. Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Doctoral thesis. 10-27 pp. 2003.
- [10] HASSAN, M.; RAHMAN, K.; TZIPORI, S. Studies on the bacterial flora of fish which are potential pathogens for human. Virulence factors of potential human pathogen isolated. **Bangladesh Med Res Counc Bull**. 20(3):86-98. 1994.

de esta especie, provocando fuertes cambios en las monocapas, desde variación en la morfología hasta la destrucción total de las mismas. Este efecto fue observado en el ensayo de citotoxicidad de la cepa *P. shigelloides* 70 San Fernando 2003, donde la monocapa de células Vero experimentó cambios degenerativos importantes.

Las cepas ensayadas restantes: *V. cholerae* 31 Lago de Valencia 2000, *V. cholerae* 149 Lago de Valencia 2000 y *A. hydrophila* 217 La Mucuy 2003, mostraron un efecto citotónico, caracterizado por el aumento de tamaño, engrosamiento, redondeamiento y prolongaciones citoplasmáticas, así como, citotóxico, evidenciado por la presencia de granulaciones citoplasmáticas y cambios degenerativos en las células, causando en todos los casos la muerte de las mismas. Al igual que en este estudio, Hassan y col. [9] demostraron la actividad citotóxica de cepas de *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. En células HeLa, donde la producción de citotoxinas fue de 61 y 100%, respectivamente.

En el caso particular de los pozos inoculados con *A. hydrophila* 217 La Mucuy 2003, se produjo la acidificación del medio, a lo cual no se atribuyen los cambios observados en las células, ya que en el trabajo rutinario del cultivo celular, donde se ha observado este fenómeno debido a una sobrepoblación de células, no se apreciaron cambios en la morfología celular.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, permiten presumir que, independientemente de la procedencia geográfica de las cepas bacterianas, el efecto citopático de las mismas es reproducible en distintas experiencias.

Anteriormente, la determinación de citotoxinas se realizaba empleando extractos de bacterias, en las cuales era necesario el uso de equipos especializados, así como el empleo de antibióticos que permitieran una mayor permeabilidad de la membrana celular de la bacteria, o por el contrario se debía lisar la cepa con ultrasonido y luego esterilizar el extracto por filtración [20]. Sin embargo, el método de capa de agar sobre líneas celulares, permite evaluar el mismo efecto en un período de tiempo más corto, con una menor inversión económica y con la ventaja de ensayar un mayor número de cepas, disminuyendo la posibilidad de contaminación [23].

CONCLUSIÓN

La enterotoxigenidad y citotoxicidad de una cepa bacteriana constituyen factores importantes capaces de desencadenar en el humano patologías gastrointestinales, permitiendo establecer una posible relación entre el consumo de la carne de pescado y la aparición de brotes de enfermedad, provocados por la inadecuada manipulación y cocción de la misma al momento de ser consumida, representando así un riesgo para la salud pública.

- [11] HOSTACKA, A. Toxic factors of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]**. 252(4): 525 -34. 1982.
- [12] HUAPAYA, B.; HUGUET., J.; SUÁREZ, V.; TORRES, Y.; MONTROYA, Y.; SALAZAR, E.; SAKURAY, S.; TEJADA, C.; GAMBIRAZIO, C.; GÓMEZ, J. Primer aislamiento de *Escherichia coli* 0157:H7 Enterohemorrágica en el Perú. **Rev. Méd. Exp.** 18:1-2. 2001.
- [13] HANDFIELD, M.; SIMARD, P.; LETARTE, R. Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environm Microbiol** 62(9):3544-3547. 1996.
- [14] JOKLIK, W.; WILLET, H.; AMOS, D.; WILFERT, C.; ZINSSER, N. Bacterias aerobias Gram negativas. **Microbiología**. 20ma Ed, Buenos Aires: Panamericana. 1234-1236 pp.1998.
- [15] KONEMAN, E.; ALLEN, S.; WILLIAM, J.; SHECKENBERGER, P.; WINN, W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ta Ed, Philadelphia, Pennsylvania: Lipincott. 678-680 pp. 1997.
- [16] LEAL, Y.; REYES, M. Efecto citotóxico y enterotóxico de bacterias de importancia para la salud íctica y pública aisladas de peces y del entorno acuático. Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela, Trabajo de Investigación. 43-65 pp. 2004.
- [17] MASSAD, G.; OLIVER, J.D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. **Appl Environ Microbiol**. 53(9):2262-2264. 1987.
- [18] MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; KOBAYASKI, G.; PFFALLER, M. *Escherichia coli*. **Microbiología Médica**. 4ta Ed. Madrid, España: Elsevier. 2012-2016. 2003.
- [19] THE PANAMERICAN HEALTH ORGANITATION (PAHO). El síndrome urémico hemolítico (SUH) y la *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). Washington D.C E.U.A; 2002. En línea: [http:// www.paho.org/Spanish/HCP/HCT/EER/paraguay-red-junio-2001-5.suh.pdf](http://www.paho.org/Spanish/HCP/HCT/EER/paraguay-red-junio-2001-5.suh.pdf). 3 de diciembre 2003.
- [20] PARREIRA, V.; WEIS, C.; YANO, T. An agar-overlay method for detection of toxins produced by *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett** 120: 303 -306. 1994.
- [21] REINA, M. Técnicas de cultivo celular. 2003. Universidad de Barcelona, España: En línea: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/tecnicas-d-cultivo-celular.htm>. 24 de julio 2003.
- [22] VON GRAEVENITZ, A.; BUSER, C. Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. **J. Clin. Microbiol**. 17(1):16-21p. 1983.
- [23] ZAMORA, J.; REINHARDT, G.; POLETTE, M.; MACIAS, P. Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productora de LT y VT. *Archivo de Medicina Veterinaria* 2000. 32(1): 83-87. En línea: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=so31-732x2000000100010&610&ing=es&nm=ison0301-732x. 23 de febrero 2003.