

Incidencia de *Plesiomonas shigelloides* en tetrahíbridos de Tilapia (*Oreochromis* sp.)

Clever Mendoza H., Pilar Hernández S.

Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas

RESUMEN. *Plesiomonas shigelloides* es un miembro de la familia *Vibrionaceae*, es un bacilo Gram negativo asociado a gran número de brotes de gastroenteritis, especialmente en países tropicales y subtropicales. De igual manera se ha involucrado en casos de septicemia, meningitis y colecistitis. El microorganismo se encuentra normalmente en aguas dulces, peces y aves. El presente trabajo se hizo con el propósito de estudiar la incidencia de *Plesiomonas shigelloides* en tetrahíbridos de *Oreochromis* sp. (Tilapia rosada) cultivados en una laguna artificial en la zona central de Venezuela. Para el aislamiento del microorganismo se utilizaron en forma simultánea las técnicas de siembra directa y enriquecimiento luego del homogeneizado de las muestras. En las muestras de Tilapia analizadas se determinó una alta incidencia (73%) de *P. shigelloides* siendo mayor en el tracto intestinal (60%), seguido de la piel (36,67%) y por último las branquias (26,67%), sin existir correlación alguna entre ellos. En el agua de la laguna de cultivo el microorganismo se aisló con una frecuencia de 41,67%. La siembra directa presentó los mayores valores de aislamiento (60%) en los diversos tejidos de Tilapia así como en el agua de cultivo (41,60%). No se observó diferencias significativas en la efectividad de los agares selectivos utilizados para el aislamiento de *P. shigelloides* (Agar *Plesiomonas* y Agar Inositol Verde Brillante Sales Biliares). Se observó una correlación positiva entre la incidencia del microorganismo y los niveles de pluviosidad. Se apreció una alta incidencia de *E. coli* en las muestras de los tejidos de Tilapia y el agua de la laguna de cultivo. No se observó correlación entre la incidencia de *P. shigelloides* y la de *E. coli*. Debido a la alta incidencia de *P. shigelloides* encontrada en este estudio es importante asegurar una adecuada evisceración, lavado, almacenamiento a temperaturas inferiores a 8°C y una apropiada cocción del producto con el fin de disminuir los riesgos al consumidor.

Palabras clave: *Plesiomonas shigelloides*, Tilapia, *Oreochromis* sp.

INTRODUCCION

Plesiomonas shigelloides es un bacilo Gram negativo recto, delgado y largo o filamentosos, de extremos redondeados, con dimensiones de 0,8 - 1 por 3,0 µm; crece como células aisladas o en pares, móviles debido a la presencia de flagelos lofotricos (1), anaerobio facultativo y posee un crecimiento óptimo a 30°C. No crece en caldo nutritivo que contenga 7,5% de NaCl. Muchas cepas son sensibles a los agentes vibriostáticos como el 2,4-diamino-6,7 diisopropil pteridina (0/129) (2). Es

SUMMARY. Incidence of *Plesiomonas shigelloides* in Tilapia tetrahíbridos (*Oreochromis* sp.). *Plesiomonas shigelloides*, a member of the family *Vibrionaceae*, is a Gram negative rod associated with several gastroenteritis outbreaks, especially in tropical and subtropical countries. In same way, it has been related to some septicemia, meningitis and cholecistitis cases. The microorganism is normally found in water, fish and birds. The aim of this work was to study the incidence of *Plesiomonas shigelloides* in tetrahíbridos of *Oreochromis* sp. (Pink Tilapia) located at the central region of Venezuela. Once the samples were homogenized, the techniques of enrichment and direct streaking were used simultaneously for the isolation of the microorganism. A high incidence of *P. shigelloides* was determined (73%), being higher in the intestinal tract (60%), followed by the skin (36.7%) and the gills (26.67%), without any correlation among them. In the fish pond, the microorganism isolation frequency was 41.67%. The direct streaking technique presented the highest isolation values in the different Tilapia tissues (60%) and in the water as well (41.60%). No significant differences were observed on the effectiveness of the selective agars used for the isolation of *P. shigelloides* (*Plesiomonas* Agar and Inositol-Brilliant Green-Bile Salts Agar). A positive correlation was observed between the microorganism incidence and the pluviosity levels. A high incidence of *E. coli* was observed in the samples of Tilapia tissues and the water pond. No correlation was observed between incidence of *P. shigelloides* and *E. coli*. Due to the high prevalence of *P. shigelloides* found in the present study, it is important to assure a proper evisceration, washing and storage at temperatures lower than 8°C, and a proper product cooking to diminish the customer's risk.

Key words: *Plesiomonas shigelloides*, Tilapia, *Oreochromis* sp.

un patógeno emergente, oportunista que está distribuido por todo el mundo y al cual se le han atribuido infecciones clínicamente importantes en infantes, ancianos y pacientes inmunocomprometidos (1-3). Existen muchas evidencias que señalan el papel de *P. shigelloides* como patógeno entérico y su aislamiento en heces de personas con diarrea (1). Gran número de epidemias de diarrea se le han atribuido a *P. shigelloides* habiéndose aislado en todo el mundo principalmente en África, India y Japón (4). Diversas investigaciones que versan sobre la etiología de las enfermedades entéricas

producidas por *P. shigelloides* han determinado que su transmisión se realiza a través del agua, sin embargo, su incidencia en alimentos ha sugerido que puede representar un nuevo patógeno causante de enfermedades transmitidas por los mismos. Estudios de ecología y epidemiología de *P. shigelloides* han demostrado que la incidencia de este microorganismo en animales acuáticos y en las heces de pacientes con diarrea muestran un repunte en la estación lluviosa para las zonas tropicales y durante el verano en los climas templados. Esto se confirmó con un estudio sistemático de la flora intestinal de peces en varias partes del mundo. Igualmente se ha confirmado la influencia de la variación estacional sobre el número de organismos detectados en muestras de agua superficiales en análisis realizados en Japón y Europa (4). *Plesiomonas shigelloides* habita normalmente en el ambiente, en aguas dulces, peces y aves. La bacteria se ha encontrado con frecuencia en las aguas dulces de superficie (5-7). Se ha determinado una alta incidencia de *P. shigelloides* en Tilapia y en otros pescados de río (8-12).

Debido al auge del cultivo de la Tilapia como opción para obtener una fuente proteica accesible a grandes niveles de la población, se llevó a cabo el presente estudio con el objeto de conocer el papel de este alimento como vehículo de transmisión del microorganismo, investigar su presencia en el agua de la laguna de cultivo, estudiar el efecto estacional en su prevalencia y determinar la eficiencia de dos técnicas de aislamiento y el efecto de dos medios selectivos a la vez que correlacionar su presencia con la de *Escherichia coli*.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 30 muestras de pescado y 12 de agua provenientes de un cultivar de Tilapia en lagunas artificiales ubicadas en la Región Central del país, las cuales fueron tomadas al azar (utilizando la tabla de números aleatorios) mediante la pesca con chinchorro y conforme a las recomendaciones del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (13) respectivamente. Fueron llevadas de inmediato al laboratorio, en una cava con hielo, donde se les analizó posteriormente. El estudio abarcó las estaciones de lluvia y sequía, realizando un total de seis lotes, tres en la época de lluvia y tres en la época de sequía. Cada lote estaba compuesto por cinco muestras de pescados (225g/pescado) y dos de agua (100mL/muestra). Los análisis microbiológicos (incidencia de *Plesiomonas shigelloides* y *Escherichia coli*) se realizaron en la piel, branquias e intestinos así como al agua de la laguna de cultivo.

Otros análisis realizados al agua de cultivo de los peces fueron la medición de pH y de la temperatura al momento de la captura de los peces. Para ello se utilizó una cinta de medición de pH para el campo (pHydrion Paper, Micro Essential Laboratory Inc. Brooklyn, New York) verificando luego en el laboratorio en un pHmetro (Marca Orion, Modelo 420A), y un termómetro de mercurio en la medición de temperatura.

Aislamiento de *P. shigelloides*

Se utilizaron las técnicas de: enjuague para analizar la piel de los pescados enteros donde cada pez fue enjuagado con 225mL de Agua Peptonada (Peptona al 0,1%. Difco, Detroit MI) usando movimientos de agitación y masaje durante 2 minutos y empleando las mismas bolsas donde fueron transportados al laboratorio y técnica de homogeneizado para el análisis de las branquias (10g de promedio) e intestinos (25g de promedio) en el Stomacher LAB-BLENDER 400 (Suffolk, Inglaterra) durante 2 minutos usando 90mL y 225mL de Agua Peptonada (Peptona al 0,1%. Difco Detroit MI) respectivamente. El homogeneizado fue sembrado directamente, mediante un asa de 3mm de diámetro, en la superficie de las placas de agar Inositol-Verde Brillante-Sales Biliares (IBB) y de agar *Plesiomonas* (PL)(14). A su vez, 10 mL del homogeneizado fueron enriquecidos en agua peptonada alcalina (pH 8,6) durante 24 horas a 37°C, después de lo cual se sembró con el asa en la superficie de los medios selectivos mencionados. Las muestras de agua fueron sembradas directamente, mediante un asa de 3mm de diámetro, en la superficie de los agares PL e IBB y paralelamente 100mL fueron concentrados a través una membrana Millipore de 0,45µm (Millipore Corp, Bedford, MA, USA) (15) que luego fue colocada en un medio de enriquecimiento (agua peptonada alcalina, pH 8,6) a 37°C por 24 horas, al cabo de las cuales se aisló con el asa en la superficie de los dos agares selectivos. Las placas de los agares IBB y PL fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Las colonias sospechosas (colonias de 1-2,5mm de diámetro, rosadas pálidas en Agar IBB y colonias de 1-2mm de diámetro, rosadas y rodeadas de una zona rosada en Agar PL) se transplantaron a tubos de Agar Nutritivo (Difco, Detroit, MI) que fueron incubados a 37°C durante 24 horas. A partir del cultivo en Agar Nutritivo se realizó una coloración de Gram para observar las características morfológicas de la bacteria. Se procedió a realizar las pruebas bioquímicas a aquellos cultivos que presentaron bacterias en forma de bacilos largos, delgados y de extremos redondeados Gram negativos, con dimensiones de 0,8-1 por 3,0 µm, de crecimiento aislado o en pares. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron oxidasa, la capacidad de fermentar azúcares en medio agar tres azúcares hierro (TSI) y la fermentación del inositol e hidrólisis de la gelatina en agar inositol gelatina. En el agar TSI *P. shigelloides* produce una reacción ácida/alcalina sin gas ni sulfuro de hidrógeno y en el agar gelatina torna el medio amarillo y no hidroliza la gelatina, así mismo, el microorganismo muestra reacción de oxidasa positiva (16).

Aislamiento de *E. coli*

Se analizó a partir del homogeneizado (técnica de siembra directa) y del caldo de enriquecimiento (técnica de enriquecimiento) sembrando con un asa (3mm) en la superficie de placas de Agar Directo de *E. coli* (ECD) Fluorocult (E. Merck, Darmstadt, Alemania) (17) que fueron incubadas a 37°C por 24 horas. El crecimiento bacteriano en las placas del

medio mencionado se apreció con el uso de una lámpara UV, tomando como colonias sospechosas aquellas que presentaron fluorescencia (azul claro). Para la confirmación del diagnóstico se colocó una gota del reactivo de KOVAC sobre las colonias. Las colonias confirmadas como *E. coli* presentaron formación de una coloración roja a los 2-10 segundos, evidenciando la reacción de indol positiva.

Cultivos de referencia

Conforme sugieren Koburger y Wei (14) se llevaron a cabo controles positivos y negativos en forma paralela y se utilizaron como cultivos de referencia una cepa de *Plesiomonas shigelloides* CVCM 243 suministrada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela) y una cepa de *E. coli* del cepario de la Cátedra de Microbiología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Análisis estadístico

Se utilizaron las pruebas de Análisis de Varianza, Rangos Múltiples de Duncan y Rangos de Kruskal-Wallis y de Correlación Lineal Simple con la finalidad de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la presencia de *P. shigelloides* y *E. coli* a nivel superficial (piel y branquias) con el contenido intestinal y ésta con la presencia de los microorganismos en el agua y de correlacionar la incidencia del microorganismo con la de *E. coli*. Igualmente se estudiaron las posibles diferencias existentes en la tasa de recuperación de las dos técnicas de siembra empleadas y en los dos agares selectivos, así como establecer la influencia de efecto estacional en la incidencia del microorganismo.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las muestras de Tilapia analizadas se encontró una alta incidencia (73%) de *P. shigelloides* siendo mayor en el tracto intestinal (60%), seguido de la piel (36,67%) y por último las branquias (26,67%), sin existir correlación alguna entre ellos. En el agua de la laguna de cultivo el microorganismo se aisló con una frecuencia de 41,67%, encontrándose que los valores de pH y de temperatura promedio fueron de 7.05 y 28°C respectivamente. En la Figura 1 se muestra la influencia de las técnicas de aislamiento de *P. shigelloides* en las muestras analizadas, el microorganismo no pudo ser recuperado en la mayoría de los casos mediante la técnica de enriquecimiento, lo cual señala que este procedimiento no es el más indicado para su aislamiento en muestras de peces de agua dulce debido a su baja competitividad en presencia de la flora acompañante. En la Figura 2 se observa la eficiencia de los medios selectivos utilizados en el aislamiento del microorganismo, donde no se observó diferencias significativas en los resultados obtenidos, sin embargo se apreció mayor especificidad en el agar *Plesiomonas* que en el agar IBB, ya que en éste último se

desarrollaron un elevado número de colonias falso positivas. El crecimiento de *P. shigelloides*, se ve favorecido en el agar IBB ya que este posee inositol como fuente de carbono, el cual es poco usado por la flora competitiva (16,18).

FIGURA 1
Influencia de las técnicas de aislamiento de *P. shigelloides* (Siembra directa vs enriquecimiento)

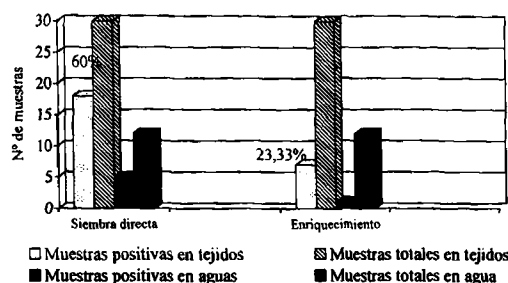
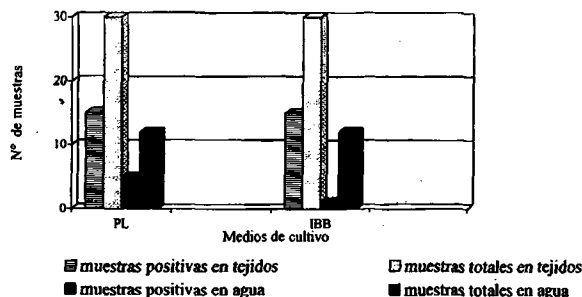
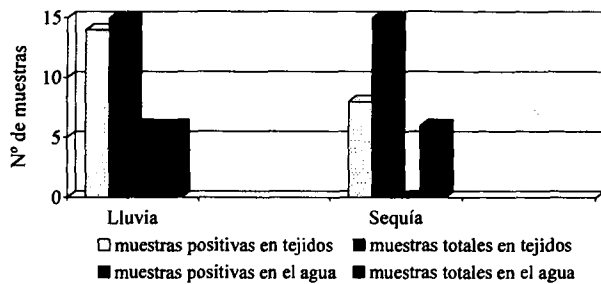


FIGURA 2
Eficiencia de los medios selectivos: Agar *Plesiomonas* y Agar Inositol . Verde brillante sales biliares en el aislamiento de *P. shigelloides*



Son numerosos los estudios que han demostrado la presencia de un efecto estacional en la frecuencia de aislamiento de *P. shigelloides* así como un aumento de los casos de diarrea durante los meses más cálidos (5,9,20). En la Figura 3 se aprecia el efecto estacional sobre la incidencia de *P. shigelloides* en Tilapia y el agua de la laguna de cultivo, con un repunte en la época que presenta las temperaturas más altas. Nedoluha y Westhoff (9) en un análisis de la flora microbiana del bagre rayado realizado en Maryland (Estados Unidos) a lo largo de un año apreciaron que en el mes de Junio la flora intestinal de los pescados estaba representada en un 89% por *P. shigelloides*.

FIGURA 3
Efecto estacional sobre la incidencia de *P. shigelloides*
en *Tilapia rosada*



La incidencia de *E. coli* en las 30 muestras de tetrahíbridos de *Tilapia* analizadas fue del 100% en cada uno de los tejidos (piel, branquias e intestinos) y en el agua de la laguna de cultivo, este resultado nos puede dar una idea de la baja calidad microbiológica del sistema ecológico donde crecen estos peces. Resultados similares han sido apreciados por otros investigadores en diferentes partes del mundo (21,22). Los valores obtenidos en el presente estudio reflejan las condiciones inadecuadas de manejo y cultivo de peces puesto que los terrenos próximos a la laguna se dedican a la cría de ganado vacuno y la fertilización de la laguna se efectúa con materia orgánica no tratada, lo que representa un riesgo potencial a la salud del público consumidor.

Los análisis estadísticos no arrojaron correlación entre la presencia de *P. shigelloides* y *E. coli* en las muestras analizadas. Resultados similares han sido obtenidos por otros investigadores (5,8) por lo que se plantea la escogencia de otro indicador más apropiado. Sin embargo, existe correlación en la presencia de *E. coli* en los diferentes tejidos de *Tilapia* entre sí y éstos con el agua de la laguna, concordando con lo señalado por Hejkal y col (23).

Los resultados obtenidos evidencian que los peces de agua dulce constituyen un reservorio del microorganismo y para su consumo se requiere una apropiada evisceración, el mantenimiento a bajas temperaturas hasta el momento del consumo y una adecuada cocción con el fin de evitar riesgos a la salud pública, especialmente en poblaciones susceptibles (infantes, ancianos e individuos inmunocomprometidos).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por los productores de la laguna de cultivo por su valiosa colaboración en el suministro de las muestras y al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos de la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela por la donación de la Cepa de referencia de *Plesiomonas shigelloides*.

REFERENCIAS

1. Doyle M, Beuchat L and Montville T. Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. Ed ASM Press. Washington D.C. USA. 1997;768p.
2. ICMSF. Microorganisms in Foods. Microbiological Specifications of Food Pathogens. 5th Ed Ed. Blackie Academic Professional. Great Britain. 1996.
3. Jay J. Modern Food Microbiology. 5th Ed. Chapman and Hall, NY, USA. 1997.
4. Krieg N and Holt J. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg N.R. and Holt J.G. (Eds), Vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1984.
5. Hernández P y Rodríguez R. Prevalencia de *Plesiomonas shigelloides* en agua de superficie. Arch Latin Nutr 1997;47: 47-49.
6. Abbey S, Emerinwe N, Phill M and Amad E. Ecological Survey of *Plesiomonas shigelloides*. J. Food Protect 1993; 55:44-446.
7. Kwaga J, Adesiyn A, Bello C and Abdullahi S. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in humans and water in Zaria, Nigeria. Microbiologica. 1988;11:165-167.
8. Sadata T and Koreeda Y. A Numerical Taxonomic Study of the Dominant Bacteria Isolated from *Tilapia* Intestines. Bull. Japan Soc. Sci Fish 1986;52:1625-1634.
9. Nedoluha P and Westhoff D. 1995. Microbiological Analysis of Striped Bass (*Morone saxatilis*) grown in Flow-Through Tanks. J Food Protect 1995; 58:1363-1368.
10. Sugita H, Nakamura T and Deguchi Y. Identification of *Plesiomonas shigelloides* isolated from fresh water fish with the microplate Hybridization Method. J.Food Protect. 1993;56:949-953.
11. Esteve C and Garay E. Heterotrophic Bacterial Flora Associated with European Eel *Anguilla anguilla* Reared in Freshwater. Nippon Suisan Gakkaishi. 1991;57: 1369-1375.
12. Van Damme R and Vandepitte J. Frequent Isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from Healthy Zairese Freshwater fish: a Possible Source of Sporadic Diarrhea in the Tropics. Appl Environ Microbiol 1980;39:475-479.
13. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed. American Public Health Association, Washington-DC.,USA. 1995.
14. Koburger J and Wei C. *Plesiomonas shigelloides*. En: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3thd. Ed. Vanderzant, and Splittstoesser. D.(eds) American Public Health Association, Washington DC.,USA. 1992.
15. Seidler R, Allen D, Lockman H, Colwell R, Joseph S and Daily O. Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters, encountered in diving operations. Appl. Environ. Microbiol. 1980;9:1010-1018.
16. Jeppesen C. Media for *Aeromonas* spp, *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* from food and environment. Int J Food Microbiol 1995;26: 25-41.
17. Hahn G and Wittrock E. Comparison of Chromogenic and Fluorogenic substances for differentiation of coliforms and *Escherichia coli* in Soft Cheese. Acta Microbiologica Hungarica. 1991;38:265-271.

18. Schubert R. Genus IV. *Plesiomonas* En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Holt J.G. (Eds). Vol 1 Williams and Wilkins. Baltimore, USA. 1984.
19. Miller M and Koburger J. Tolerance of *Plesiomonas shigelloides* to pH, Sodium Chloride and Temperature. J Food Protect 1986;49:877-879.
20. Islam S, Alam J and Islam S. Distribution of *Plesiomonas shigelloides* in Various Components of Ponds Ecosystems in Dhaka, Bangladesh. Microbiol Immunol 1991;35:927-932.
21. Fattal B, Dotan A and Tchorsh Y. Rates of experimental microbiological contamination of fish exposed to polluted water. Wat Res 1992;26: 1621-1627.
22. Buras N, Duek L and Niv S. Reactions of Fish to microorganisms in wastewater. Appl Environ Microbiol 1985;50: 989-995.
23. Hejkal T, Gerba C, Henderson S and Freeze M. Bacteriological, Virological and Chemical evaluation of a wastewater-aquaculture system. Wat Res 1983;17:1749-1755.

Recibido: 22-01-1998

Aceptado: 14-10-1998