UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Casa abierta al tiempo

"CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Vibrio vulnificus* AISLADAS DE BIVALVOS Y DE LA COLUMNA DE AGUA EN LA LAGUNA DE PUEBLO VIEJO, VERACRUZ, MÉXICO"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

ELSA IRMA QUIÑONES RAMÍREZ

DIRECTORA: DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES
ASESOR: DR. MIGUEL BETANCOURT RULE
ASESOR: DR. CARLOS VÁZQUEZ SALINAS

MÉXICO, D.F. **29 DE SEPTIEMBRE DE 2010**

5 RESULTADOS 32
5.1 Análisis microbiológico 32
5.2 Efecto estacional 39
5.3 Efecto de la temperatura y la salinidad 39
5.4 Ensayos biológicos 41
5.4.1 Citotoxicidad 41
5.4.2 Adherencia 44
5.5 Factores asociados a la virulencia 45
5.5.1 Morfología colonial 45
5.6 Actividad hemolítica y enzimática, y presencia de cápsula 46
6 DISCUSIÓN 50
6.1 Aislamiento microbiológico 50
6.2 Efecto estacional 52
6.3 Efecto de la salinidad y temperatura 53
6.4 Factores asociados a la virulencia 55
6.4.1 Efecto citotóxico y actividad hemolítica 55
6.4.2 Adherencia a la línea celular HEp-2 56
6.4.3 Morfología colonial 57
6.4.4 Cápsula 57
6.5 Enzimas 58
6.5.1 Proteasa 58
6.5.2 Lipasa/lecitinasa 59
6.5.3 Nucleasa 60
7 CONCLUSIONES 62
8 PERSPECTIVAS 63
9 REFERENCIAS 64
ANEXOS 82

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de *Vibrio vulnificus* por el consumo de alimentos 8
Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de *Vibrio vulnificus* por contacto 8
Figura 3. Daño de *V. vulnificus* en piel. 11
Figura 4. Mapa de la ubicación de la laguna de pueblo Viejo Veracruz. 19
Figura 5. Ubicaciones de los puntos de muestreo s 20
Figura 6. Vista de la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz 21
Figura 7. Abundancia de Vibrio sacarosa negativo en las muestras de agua y ostión procedentes de la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. .....….33
Figura 8. Electrofograma del producto amplificado del gen *vvhA,* en las cepas de *V. vulnificus* mediante PCR. 37
Figura 9. Efecto de la toxina de *V. vulnificus* sobre la línea celular CHO. 43
Figura 10. Adherencia de *V. vulnificus* en las células HEp-2. 44
Figura 11. Pruebas fenotípicas de *V. vulnificus.* 46
Figura 12. Pruebas fenotípicas de *V. vulnificus.* 48

Índice de cuadros

Cuadro 1. Diferenciación bioquímica de los tres biotipos de *Vibrio vulnificus*..... 5
Cuadro 2. Casos y muertes debidos a *Vibrio vulnificus* por consumo de productos de la pesca 12
Cuadro 3. Casos y muertes por *Vibrio vulnificus* por contacto con el agua 13
Cuadro 4. Iniciadores y condiciones empleadas para la detección del gen *vvhA.* 25
Cuadro 5. Aislados de *Vibrio* sacarosa negativo en las muestras de agua y ostión durante primavera y verano..... 32
Cuadro 6. Aislados de *Vibrio* sacarosa negativo en las muestras de agua y ostión durante otoño e invierno..... 32
Cuadro 7. Número de muestras positivas para *Vibrio vulnificus* 34
Cuadro 8. Número de muestras positivas para *V. vulnificus* por punto de muestreo 35
Cuadro 9. Número de colonias trabajadas, presuntivas y confirmadas de *Vibrio vulnificus* de acuerdo al tipo de muestra y época del año 36
Cuadro 10. Número de colonias de *V. vulnificus* por punto de muestreo y mes 38
Cuadro 11. Datos de salinidad de marzo de 2002 a marzo de 2003 40
Cuadro 12. Datos de la temperatura de marzo de 2002 a marzo de 2003 40
Cuadro 13. Efecto citotóxico de las cepas de *Vibrio vulnificus* por su origen 42
Cuadro 14. Destrucción de la monocapa de células CHO por las cepas de *Vibrio vulnificus* de acuerdo a un valor cualitativo promedio en porcentaje..... 43
Cuadro 15. Prueba de adherencia en la línea celular HEp-2 44
Cuadro 16. Colonias con morfología opaca, translúcida u opaca/translúcida…. 45
Cuadro 17. Correlación de las cepas que mostraron producción de algunos factores de virulencia con la morfología colonial tipo de muestra y mes..... 49
Cuadro 18. Número de cepas que mostraron producción de algunos factores de virulencia de acuerdo al tipo de muestra y mes 49

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Dedicatoria

PARA MI PASADO PRESENTE Y FUTURO

Decir la palabra te amo no expresaría lo que siento por ti, solo te puedo decir que si volviera a nacer no cambiaría nada de mi vida contigo. ***GRACIAS CARLOS*** *por ser mi amigo, enemigo, compañero, amante, esposo, confidente, mi seguridad, apoyo, por toda la ayuda que me das. Gracias por el "tu puedes", cuando sentía que todo perdía el sentido, por el ayudarme a pensar en voz alta, por ser todo lo que yo deseaba y deseo en una persona que ha estado en mi juventud, madurez y espero que por siempre*

A MI HIJO CARLOS RAMÓN

Eres la alegría de mi vida, mi orgullo, mi fortaleza, como madre puedo decir que fui bendecida con un hijo como tú, con valores y buenos sentimiento. Que más puedo decir que no te haya expresado y espero seguir haciéndolo hasta que muera.

A MIS PADRES

Gracias por todo lo que me dieron, su amor, su tiempo, apoyo, ayuda, por enseñarme a valorar, a luchar por lo que se desea y a tener confianza para lograr las metas que hoy estoy cumpliendo. Me siento orgullosa de ustedes. Los quiero, respeto y valoro.

A MI TIA INES

Fuiste mi segunda madre, gracias por tus desvelos junto con mi madre, por ser la segunda madre de mi hijo; sin tu apoyo, amor, comprensión y ayuda, no hubiese podido tener lo que tengo hasta el día de hoy.

RAÚL Y CARLOS:

Saben que cuando por primera vez apretaron con su mano mi dedo, me atraparon para siempre, por eso constantemente están en mis pensamiento, para mí son parte de mi universo.

CESAR MANUEL

Me da gusto y tengo claro que es una fortuna tener un hermano como tú, que tiene la sensibilidad de estar al lado de mis padres apoyándolos y cuidando de ellos. Eres un buen ejemplo. Gracias hermano querido.

CONNY

Gracias por hacer felizna mi hijo y darme dos nietos maravillosos.

A LOS AMIGOS

En más de 25 años de amistad hemos salido fortalecidos, unidos, reconfortados.

Además por alentarme para cerrar este ciclo.

***"Un amigo es uno que lo sabe todo de ti y a pesar de ello te quiere".** Elbert Hubbard:*

A MIS ALUMNOS

Gracias por permitirme aprender de ustedes, por su apoyo y comprensión. Valoro y me queda clara su amistad porque estuvieron conmigo cuando los necesite, aunque les hubiese encantado estar en otra parte.

Agradecimientos

Son muchas a las personas que quiero agradecer su amistad y apoyo, en especial a:

Mis sinodales por sus comentarios y enriquecimiento del trabajo

Dr. Manuel Castillo por su ayuda con el análisis estadístico y su interpretación

Dr. Humberto González Márquez por apoyarme en darle formato al documento escrito, dada su experiencia en el manejo de los programas de computación

RESUMEN

Vibrio vulnificus es un bacteria halofílica que se encuentra ampliamente distribuida en las costas de mares, estuarios y diversos cuerpos acuícolas. Tiene como reservorios ostiones, pescado, sedimento, agua y plancton, por lo que se consideró importante evaluar el efecto estacional, la salinidad y la temperatura en la viabilidad de *V. vulnificus*, así como algunos factores de virulencia en las cepas aisladas de bivalvos y de la columna de agua en la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, México. Se hizo el análisis microbiológico de 299 muestras (11 de ostiones y 12 de agua por mes) de marzo de 2002 a marzo de 2003. Del total de las muestras analizadas, el 31% (94/299) fue positivo para el aislamiento de *V. vulnificus*; el biotipo identificado en todas las cepas fue el 1, y se aisló en todos los puntos de muestreo. En el periodo de marzo a septiembre, las muestras positivas contenían un mayor número de bacterias. La destrucción de la monocapa de la línea celular CHO se observó a las 10 horas. De las 94 cepas analizadas, el 43% (40/94) se encuentra en el intervalo máximo de 75 a 100% de destrucción de la monocapa, el 32% (30/94) se ubicó en el intervalo de 50 a 75% de destrucción, y el 26% (24/94) se localizó entre el 30 y el 50%. El 42.5% (17/40) correspondió a las muestras de ostión y el 57.5% (23/40) a las de agua. En los ensayos con la línea celular HEp-2, el 99% (93/94) de las cepas fue adherente. El 40.4% (38/93) provenía de las muestras de ostión y el 58.5% (55/93) de agua. El 100% de las cepas fueron proteolíticas, el 91% DNasa positivas, el 98% lecitinasa y el 80% lipasa positivas; el 51% mostró morfología colonial opaca, el 20% traslúcida y el 28% ambas, mientras que en el 81% se detectó la presencia de cápsula. La importancia de este trabajo radica en que se informa por primera vez en México de la presencia de *V. vulnificus* en agua y ostiones. Se considera que debe ser obligatorio informar sobre aquellos casos en los que se presenten septicemia y daño en piel, cuando la historia clínica indique que se han ingerido alimentos del mar. Esto debe solicitarse no sólo a los países tropicales, sino a las naciones donde se comercializan productos de la pesca obtenidos en ambientes de riesgo, sobre todo por el aumento de enfermedades crónico-degenerativas a nivel internacional, lo que permitirá conocer su importancia epidemiológica.

SUMMARY

Vibrio vulnificus is a halophylic bacterium widely distributed in coastal waters of seas, estuaries and other water bodies. Oysters, fish, sediments, water and plancton are reservoirs for *V. Vulnificus*, and it is thus important to assess the effect of salinity, temperature and seasonal changes on the viability of *V. Vulnificus,* as well as some virulence factors found in strains isolated from bivalve organisms and waters of Pueblo Viejo Lagoon in Veracruz, Mexico. A total of 299 samples were analyzed (11 oyster and 12 water samples collected monthly from 12 different sampling points between March 2002 and March 2003). Overall, 31% (94/299) of the samples were positive for *V. Vulnificus* isolation, positive samples were found at all sampling points and all strains were identified as biotype 1. Samples containing the highest bacterial counts were collected between March and September. Monolayer destruction in CHO cells was observed after 10 hours; 75 to 100% of the monolayer was destroyed in 43% (40/94) of the strains, 50 to 75% of the monolayer was destroyed in 32% of the strains (30/94); and 30 to 50% of the monolayer was destroyed in 26 % (24/94) of the strains analyzed. All strains isolated were proteolytic, 99% (93/94) of the strains showed adherence in HEP2 cell lines, 91% were DNase positive, 98% were lecitinase positive, 80% were lipase positive. Moreover, 51% of the strains showed opaque colon morphology, 20% were translucid, and 28% showed both types of morphology. In addition, 81% of the strains showed a capsule. This is the first report on the presence of *V. vulnificus* in oyster and water samples. Because *V. vulnificus* infection is underdiagnosed in Mexico and other countries, cases of septicemia and wound infection should be properly registered, particularly when seafood has been consumed or the individual has been exposed to seawater in order to improve diagnosis and to understand the epidemiological relevance of this pathogen.

1 INTRODUCCIÓN

La importancia de los alimentos para la salud y la enfermedad se ha reconocido desde los tiempos de Hipócrates. Prescindiendo por completo del aspecto nutricional de los alimentos, no puede sorprender que éstos sean un vehículo de exposición de los seres humanos a diversos agentes químicos y constituyan sustratos favorables para el desarrollo de microorganismos (SSa, 1993).

En la mayoría de los países de América son muchos los alimentos que llegan al comensal a través de una larga cadena de fases relacionadas con la producción, distribución y comercialización (Matté *et al.,* 1994; ICMSF, 1998).

El ser humano, como consumidor, se encuentra al final de diversas cadenas alimenticias y está más expuesto a múltiples agentes químicos y microbianos. Es sabido que muchas enfermedades en cuya etiología influyen los alimentos contaminados son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en los países latinoamericanos (OPS, 1997).

Es difícil estimar con precisión el daño que los alimentos contaminados provocan en la salud pública, debido a que no existe información sobre la calidad de los alimentos entre los diversos sectores que tienen que ver con el abastecimiento (SSa, 1993).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA´s) revisten especial importancia por sus altas tasas de morbilidad y mortalidad entre los grupos más vulnerables de la población y porque representan una proporción muy alta del costo de la atención médica y de hospitalización (OPS, 1991).

Entre los alimentos causantes de ETA se encuentran los productos de la pesca, mismos que pueden ser vehículos de enfermedades y cuya peligrosidad aumenta al consumirse crudos o ligeramente cocidos (Tamplin & Capers, 1992).

Los productos del mar (peces, moluscos y crustáceos, entre otros) son de gran importancia para el ser humano, tanto como fuente de alimento (en 2002 hubo una producción mundial cercana a las 96,029,000 toneladas) como por razones económicas (ganancias de $548,933,000 dólares en 2002) (SAGARPA, 2005).

La explotación, la conservación y el consumo adecuados de estos productos son de vital importancia para evitar la transmisión de enfermedades relacionadas con este tipo de alimentos, principalmente la gastroenteritis (salmonelosis y disentería, entre otras), las intoxicaciones (por ejemplo botulismo y marea roja) y el cólera.

En nuestro país han ocurrido brotes de ETA relacionados con productos de la pesca que corresponden al 2.8% del total (Barradas *et al.,* 1993); sin embargo, desde el 2001 no se han reportado casos de cólera (DGE, 2005).

Las regiones de captura en las que el cólera, la fiebre tifoidea y las enfermedades similares son endémicos constituyen un peligro mayor, en especial si la captura se realiza en las proximidades de la costa o en lugares donde los asentamientos humanos son densos (Parker *et al*., 1994).

Los géneros bacterianos que pueden estar presentes en los productos de la pesca son: *Pseudomonas, Alteromonas, Moraxella, Klebsiella, Acinetobacter, Flavobacterium, Vibrio, Micrococcus, Salmonella, Corynebacterium, Escherichia, Clostridium, Shigella, Proteus, Staphylococcus, Bacillus* (ICMSF, 1998; Venneman *et al*., 1994).

De todos los microorganismos que se encuentran en ambientes marinos y estuarios, el género *Vibrio* spp*.* constituye la mayor parte de la biota presente en este ambiente. Las especies que conforman este género son, en su mayoría, fácilmente cultivables en los laboratorios comunes; muchas especies del género son patógenas para los

seres humanos y para los organismos marinos vertebrados e invertebrados (Zhang & Austin, 2005; Okada *et al.,* 2005).

1.1 Generalidades del género Vibrio

Algunas de las más de 30 especies del género *Vibrio* se han reportado como patógenas para el ser humano y se les ha señalado como causantes de brotes de enfermedades (Chakraborty *et al*., 1997); entre ellas destacan *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Hoffmann *et al.* 2010; Altekruse *et al*., 2000; Janda *et al*., 1988).

Las bacterias del género *Vibrio* se distribuyen en todos los ambientes acuáticos del planeta, por lo general en aguas cálidas cuya temperatura se encuentra alrededor de 17°C y que presentan diversos intervalos de salinidad dependiendo de la especie (Wright *et al*., 1996; Kim *et al.,* 2010). Estas bacterias causantes de enfermedades en los seres humanos son de vida libre o se asocian con el fitoplancton, el zooplancton y los crustáceos y moluscos, en las costas y en ambientes estuarinos (Lipp *et al*., 2002).

Dada su abundancia en el agua, las especies de *Vibrio* suelen aislarse en bivalvos y productos de la pesca. Durante los meses de verano se considera que el 100% de los ostiones contiene *V. vulnificus* (Wright *et al*., 1996; Cook *et al*., 2002; Richards & Nuñes, 2006), lo que sugiere que los vibrios son componentes regulares de la microbiota de los moluscos y pueden representar un importante nicho ecológico para estas bacterias (Pruzzo *et al*., 2005).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia reportó por primera vez a *V. vulnificus* (Hollis *et al.,* 1976), al cual denominó “vibrio lactosa positivo”; posteriormente se le llamó *Beneckea vulnificus* y por último *Vibrio vulnificus* (Oliver & Kaper, 1997). Son bacilos Gram negativos, rectos y curvos, móviles por la

presencia de un flagelo polar, oxidasa positivos, no esporulados, termolábiles y se comportan como anaerobios facultativos (Janda *et al*., 1988).

V. vulnificus es un patógeno oportunista asociado a gastroenteritis y septicemia primaria en personas con condiciones crónicas preexistentes, tras el consumo de alimentos marinos y moluscos bivalvos crudos colonizados naturalmente por esta bacteria (Kim & Rhee, 2003; Han *et al.,* 2009). Tanto en la septicemia como en daño en piel, *V. vulnificus* se replica con rapidez en el tejido del huésped, llegando en ambos casos a causar daño en la epidermis (Gulig *et al*., 2005).

1.2 Características de Vibrio vulnificus

Los procedimientos para el aislamiento e identificación se mejoraron, durante la última década, con el desarrollo de medios selectivos y diferenciales, así como a través de la aplicación de diversos métodos de biología molecular (Panicker *et al*., 2004).

Se han descrito tres biotipos de *V. vulnificus* (Roig *et al.,* 2009). El biotipo 1, común en los ambientes marinos, es patógeno para seres humanos y tiene una gran variación en su lipopolisácarido (LPS); es indol positivo, es avirulento para anguilas y ha sido aislado de muestras clínicas y ambientales (Fouz *et al.*, 1996; Jones & Oliver, 2009). Algunas de las afecciones que puede causar son: gastroenteritis, septicemia primaria e infecciones en heridas tanto en personas sanas como en inmunosuprimidas (Kim & Rhee, 2003; Nagao *et al*., 2006; Grau *et al.,* 2008).

El biotipo 2 afecta principalmente a anguilas cultivadas y moluscos, puede intervenir en procesos zoonóticos, rara vez causa daño al ser humano, expresa un LPS común y la mayoría de las cepas son indol negativo (Roig *et al.,* 2009). Se describió a mediados de los años setenta, cuando afectó una granja de cultivo de anguilas (*Anguilla japonica)* (Biosca *et al.*, 1991; Sanjuan & Amaro, 2004).

En 1989 apareció en España y posteriormente en Suecia, Noruega y Dinamarca (Biosca *et al.*, 1991; Sanjuan & Amaro, 2004). Este patógeno se trasmite entre las anguilas, y en fechas recientes se le reconoció como un patógeno oportunista para el ser humano (Chiang & Chuang, 2003; Jones & Oliver, 2009).

El biotipo 3 se describió en 1996 en un mercado de pescados en Israel. El brote presentado afectó tanto a los consumidores de pescado como a los trabajadores de ese centro. La importancia de este brote se debió al número de casos que se informaron (Bisharat *et al.,* 1999; Warner & Oliver, 2008). No fue posible conocer el origen de esta enfermedad emergente; sin embargo, en su momento se consideró que se debía a las prácticas de manejo y provenía del alimento. De acuerdo con sus características, el biotipo 3 puede ser una hibridación de los biotipos 1 y 2 (Bisharat *et al.,* 1999; Bisharat *et al.,* 2005). En el cuadro 1 se muestran las características bioquímicas de cada biotipo (Bisharat *et al.*, 1999).

Cuadro 1. Diferenciación bioquímica de los tres biotipos de *Vibrio vulnificus*

Característica Bioquímica	**Biotipo**		
	1	2	3
Oxidasa	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+
Fermentación de la sacarosa	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	-	+
Producción de indol	+	-	+
Fermentación de D-manitol	+	-	-
Fermentación de D- sorbitol	-	+	-
Citrato de Simmon´s	+	+	-
Fermentación de salicina	+	+	-
Fermentación de celobiosa	+	+	-
Fermentación de lactosa	+	+	-
ONPG	+	+	-

1.3 Patogénesis

Se trata de una enfermedad grave, a menudo fatal, con una mortalidad superior al 50% (Watanabe *et al*., 2004; Kim *et al.,* 2010). En Estados Unidos, *V. vulnificus* tiene la tasa de mortalidad más elevada (FAO, 2003; Jones & Oliver, 2009).

V. vulnificus se ingiere con los productos de la pesca, pasa a través del ambiente ácido del estómago y llega al epitelio intestinal, donde el patógeno es capaz de invadir el tejido y pasar al torrente sanguíneo (Linkous & Oliver, 1999).

1.3.1 Dosis

Se desconoce hasta ahora la relación dosis/respuesta en general; sin embargo, en la actualidad se llevan a cabo estudios que permitirán conocer la dosis infectiva y la diferenciación entre cepas virulentas y no virulentas; por ello, en este momento se considera que todas las cepas de *V. vulnificus* tienen el mismo potencial de patogenicidad (FAO, 2003).

1.3.2 Gastroenteritis

En la gastroenteritis los primeros síntomas, como dolor abdominal, vómito y diarrea, ocurren entre 12 horas y 3 días después de haber ingerido mariscos (ostras) crudos o mal cocinados. Se desconoce la dosis infectiva para esta expresión de la enfermedad. Por lo general, esta afección es autolimitante (OPS, 1997).

En un reducido número de casos, *V. vulnificus* se ha aislado de pacientes con una enfermedad gastrointestinal; no obstante, queda por determinar su importancia como causa principal de esta afección (FAO, 2003).

1.3.3 Septicemia

Todas las enfermedades sistémicas causadas por *V. vulnificus* ocurren en individuos inmunocomprometidos con diabetes, alcoholismo, cirrosis o afección crónica en el

hígado (Shapiro *et al*., 1998; Muldrew *et al.,* 2007).

V. vulnificus infecta el torrente sanguíneo 24 horas después de la ingestión de alimentos contaminados, desencadenando una serie de síntomas entre los que se incluyen fiebre y escalofríos; la presión sanguínea disminuye, llegando al shock séptico y a la muerte del paciente (OPS, 1997; Grau *et al.,* 2005; Han *et al.,* 2009) (Figura 1).

Se ha observado que el 75% de los pacientes muestra lesiones bulosas características en la piel; la trombocitopenia es común y suele haber signos de coagulación intravascular diseminada. Más de la mitad de las personas con septicemia primaria fallecen, mientras que la tasa de letalidad es superior al 90% en los casos de hipotensión (OPS, 1997; Chen *et al.*, 2004).

1.3.4 Infección en piel

V. vulnificus puede producir daño en piel y en heridas expuestas al agua de mar o de esteros salobres, o por contacto con pescados o mariscos. Las lesiones pueden ir de leves y de duración limitada a lesiones de progresión rápida (Srivastava *et al.,* 2009). Son muy parecidas a las lesiones mionecróticas producidas por los clostridios dada la rapidez de su diseminación y capacidad de destrucción (OPS, 1997; FAO, 2003).

Estas afecciones se caracterizan por la formación de hemorragias y edemas en el sitio del daño, que pueden progresar hasta una gangrena; se informó de ellas durante los meses de abril a octubre (Hoi *et al*., 1998; Vinh *et al.,* 2006). Dentro de los grupos de riesgo propicios a este tipo de infecciones se encuentran los pescadores, que están expuestos continuamente a este ambiente, donde las lesiones en las manos son usuales (Hlady *et al.*, 1996). La letalidad es del 20%, pero la amputación o desbridamiento a menudo son necesarios (Hoi *et al*., 1998; Matsumoto *et al.,* 2010).

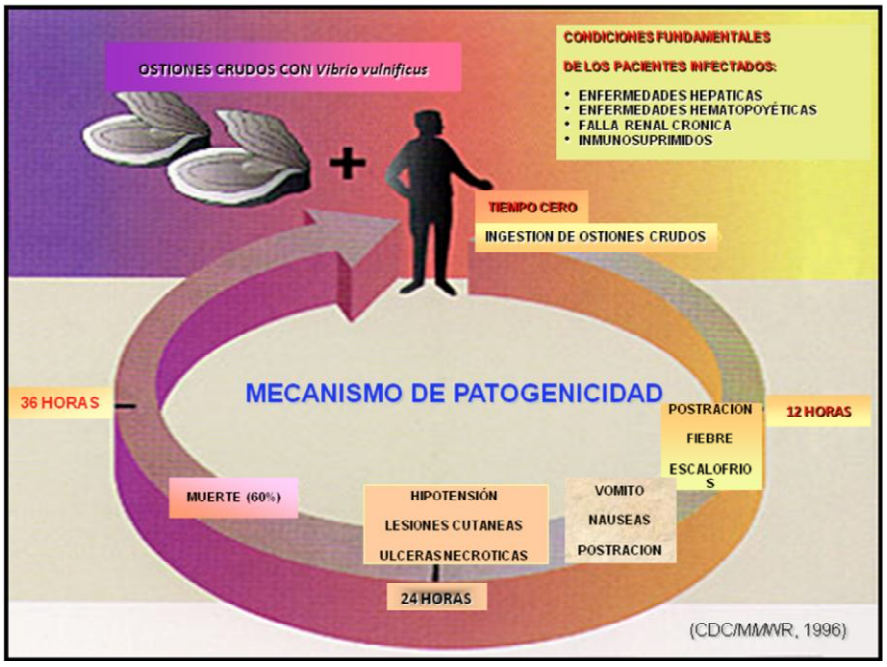


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de *Vibrio vulnificus* por el consumo de alimentos

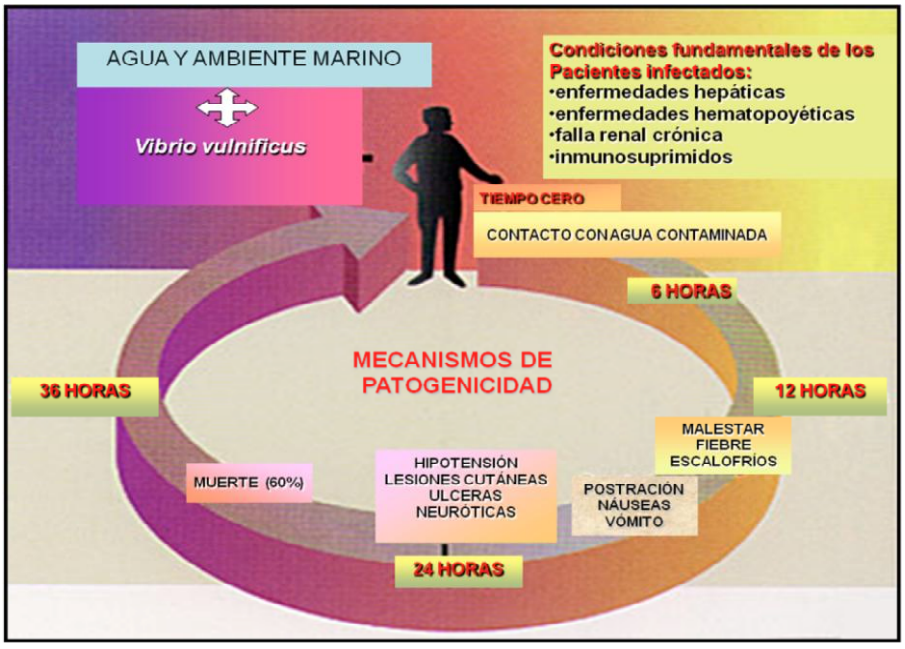


Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de *Vibrio vulnificus* por contacto con el agua

1.4 Ecología

1.4.1 Hábitat y reservorios

V. vulnificus es una bacteria común en el agua de los estuarios de climas tropicales y puede estar presente en ostiones, almejas y pescado principalmente durante los meses de verano (Bang & Drake, 2005; Han *et al.,* 2009).

Se ha señalado también que este microorganismo ha sido recuperado de ostiones cosechados en áreas geográficas con una incidencia relativamente baja de enfermedades, como las aguas frías de Nueva Inglaterra (Cook *et al.*, 1994). El plancton, en especial los copépodos (Pfeffer *et al*., 2003), y el sedimento se han descrito como reservorios de *V. vulnificus* (Hesselman *et al.*, 1999; Nakhamchick *et al.*, 2008).

1.4.2 Factores que contribuyen a su presencia

Entre los factores ambientales responsables del número de *V. vulnificus* en los productos de la pesca se incluyen: temperatura, pH, salinidad, incremento de la materia orgánica (Wang & Gu, 2005) y contenido de oxígeno y de luz (Pruzzo *et al*., 2005; Oh *et al.,* 2009).

1.4.3 Presencia de *Vibrio vulnificus* en el ambiente

Las temperaturas de verano y los intervalos de la salinidad normalmente encontrados en las costas del Golfo de México desempeñan un papel importante en el número de células bacterianas presentes (Motes *et al*., 1998; Parvathi *et al*., 2004). Esto ha sugerido que la salinidad y la temperatura son independientes y que *V. vulnificus* puede tolerar temperaturas bajas y salinidades altas (Randa *et al*., 2004; Silva *et al.,* 2009).

1.4.4 Viable pero no cultivable

En ciertas condiciones, y especialmente en ambientes marinos, *V. vulnificus*

desarrolla estrategias de supervivencia en situaciones de estrés. Se ha reportado en numerosos estudios que a temperaturas por debajo de 10º C, *V. vulnificus* entra en un estado de viable pero no cultivable en condiciones tanto *in vitro* como *in situ*.

En ese estado, *V. vulnificus* retiene su viabilidad y potencial para causar una infección, pero su cultivo en el laboratorio con medios de rutina no se puede llevar a cabo (Oliver *et al.*, 1995; Smith & Oliver, 2006).

En estado viable pero no cultivable (VBNC), *V. vulnificus* reduce la síntesis de macromoléculas, el transporte de nutrientes y la tasa de respiración; en cambio, los niveles de ATP permanecen altos, lo que permite al microorganismo realizar sus funciones vitales (Smith & Oliver, 2006).

1.4.5 Distribución

V. vulnificus ha sido aislado de una gran variedad de ecosistemas como las costas del Golfo de México, del Océano Atlántico, del Océano Pacifico y del Océano Índico (Venkateswaran *et al*., 1989; Bisharat *et al*., 1999; Hoi *et al*., 1998; Yano *et al*., 2004; Warner & Oliver, 2008). Se ha puesto en evidencia a *V. vulnificus* en países como México (Cornejo *et al*., 2000; Porras *et al*., 1994), Taiwán, Japón, Estados Unidos, Dinamarca, Alemania, Suecia, Holanda y Bélgica (Inoue, 2006), Chile (Poblete *et al.*, 2002), España (Torres *et al*., 2002), Israel (Bisharat *et al*., 1999) y China (Yano *et al*., 2004).

1.5 Epidemiología

Desde 1964 hasta 2007 se informó de 2006 casos, de los cuales el 21.5% falleció. Del total de casos, el 61.5% ocurrió en EUA, el 26.6% en Japón, 6.6% en Taiwán, y el 3.1% en Israel el 1.4% en Dinamarca; con una mortalidad de 80.7%, 1.0%, 2.3% respectivamente. En China se verificaron tres casos: dos de los enfermos se recuperaron, y del otro se desconoce su estado de salud (Cuadro 2 y 3).

El primer caso descrito en México fue el de una mujer de 44 años de edad con antecedente de cirrosis hepática. Doce horas antes de su ingreso al hospital presentó fiebre, escalofrío, mareo y náuseas; y 6 horas después de iniciada la fiebre, la paciente notó lesiones cutáneas. Al hacer el historial médico, la mujer señaló haber ingerido mariscos frescos dos días antes de iniciarse las manifestaciones clínicas (Porras *et al*., 1994).

La evolución de la paciente fue mala; las lesiones cutáneas se transformaron en ampollas necrótico-hemorrágicas de 6 a 15 cm de diámetro y la paciente presentó insuficiencia respiratoria progresiva, choque séptico e insuficiencia multiorgánica. La paciente falleció 72 horas después de haber ingresado al hospital.

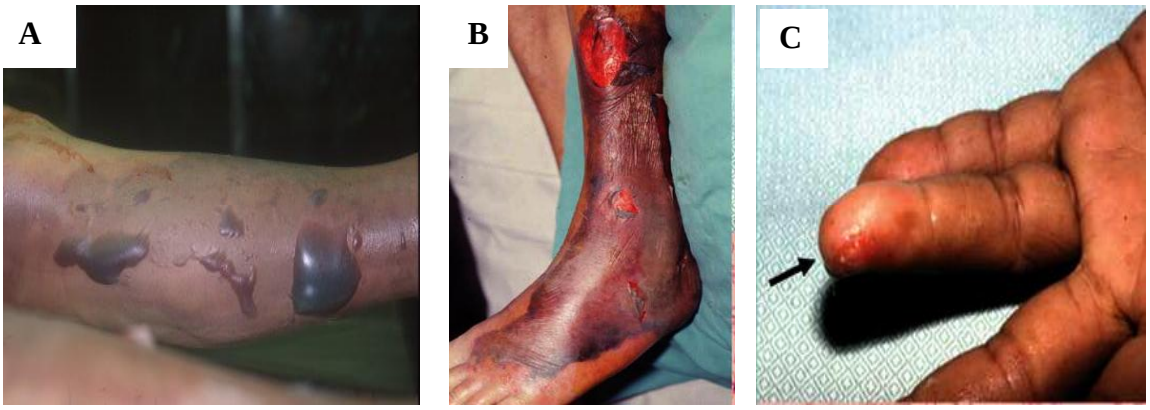


Figura 3. Daño de *V. vulnificus* en piel. Panel A. Formación de vesículas moradas y lesiones bulosas. Panel B. Destrucción de tejido epitelial. Panel C. Laceraciones en piel.

Posteriormente, en el año 2000 Cornejo y colaboradores informaron de 8 casos de infección por *V. vulnificus* con sepsis fulminante entre 1993 y 1999. Cinco de los pacientes tenían antecedentes de haber consumido mariscos crudos y sólo uno de ellos sobrevivió. Aproximadamente 40 casos se reportan cada año en EUA (Hlady *et al*., 1993; Hlady and Klontz, 1996). En Japón se estima que ocurren 425 casos de sepsis por *V. vulnificus* al año (Gulig *et al*., 2005).

Cuadro 2. Casos y muertes debidos a *Vibrio vulnificus* de 1964 a 2006 por el consumo de productos de la pesca

Año	País	No. de casos	Muertes	Medio de infección	Referencia
1964-2009	EUA	934	304	Ostiones, cangrejo, Almejas, Productos del mar	Blake, *et. al*., 1979; Bonner, *et. al*., 1983; Johnston,*et al*., 1985; Johnston, *et. al*., 1983;Hlady, *et. al*., 1993; Tacket, *et. al.,* 1984; Jenkis & Johnston, 1985; Katz, *et. al*., 1988; Shapiro, *et. al*., 1998; Levine, *et. al*., 1993; CDC 1996; Carlton, *et. al*., 1997; Bross, *et. al.,* 2007; Quan, *et. al.,* 2009; Kitchens, 2009
1975-2008	Japón	465	2	Ostiones, pescado, oreja marina Productos del mar	Hui, *et. al.,* 1999; Inoue, 2006; Nagao, *et. al.,* 2006; Matzumoto, *et. a*l., 2010 ; Chou, *et. al.,* 2010;
1982-2005	Corea	6	2	Pescado	Chong, *et. al*., 1982; Kim, *et. al*., 1986; Jung, *et al*., 2005
1985-2005	Taiwán	97	30	Mariscos, ostiones	Chuang, *et. al*., 1992; Ko, *et. al*., 1998; Hsueh, *et. al*., 2004; Huang,*et. al*., 2005
1995	Israel	1	0	Desconocido	Bisharat, *et al*., 1999
2001	Chile	1	1	Ostiones	Poblete, *et al*., 2002
2006	Canadá	1	1	Productos del mar	Vinh *et al.,* 2006
1990-1999	México	10	9	Camarón, Mariscos	Porras, *et. al*., 1994; Cornejo, *et. al*., 2000; Castaño *et. al.,* 2000
TOTALES		1515	349		

Cuadro 3. Casos y muerte causados por *Vibrio vulnificus* debido al contacto con el agua y productos de la pesca

Año	País	No. de casos	Muertes	Referencia
1964-2007	EUA	300	44	Blake, *et al*., 1979; Kelly, *et al*.,1981; Bonner, *et al*., 1983; Tacket, *et al.,* 1984; Johnston,*et al*., 1985; Hoge, *et al*., 1989; Hlady, *et al*., 1993; Shapiro, *et al*., 1998; Levine,*et al*., 1993; CDC/ MMWR,2005; Muldrew *et al*., 2007
1975-2006	Japón	69	20	Inoue , 2006; Nagao, *et al*., 2006 ; Chou *et al.*, 2010
1985-1997	Taiwan	36	17	Chuang, *et al*., 1992; Ko, *et al*., 1998
1989-2003	China	3	0	Arnold *et al*., 1989; Tang, *et al*.,2006
1991-1996	Dinamarca	14	0	Hoi, *et al.,* 1998
1992	Bélgica	5	0	Veenstra*, et al.,* 1994
1994	Suecia	1	0	Melhus, *et al*., 1995
1996-1997	Israel	62	0	Bisharat, *et al.,* 1999
2002	España	1	1	Torres, *et al*., 2002
	TOTALES	491	82	

1.6 Algunos factores de virulencia

1.6.1 Citolisina/ Hemolisina

El papel de los factores de virulencia de este microorganismo no está bien establecido; sin embargo, se ha señalado que *V. vulnificus* produce toxinas extracelulares como la citolisina (hemolisina), codificada en el operón *vvh*, el cual consta de 2 genes *vvhA* y *vvhB:* el primero codifica para la hemolisina, mientras que la función del segundo se desconoce hasta el momento (Bang *et al.,* 1999; Kashimoto*.et al.,* 2010).

El producto del gen *vvhA* tiene un peso molecular de 56 KDa y su actividad se ha relacionado con la lisis de glóbulos rojos a través de la formación de poros en la membrana de estas células (Zhang & Austin*,* 2005). Además, tiene un efecto citotóxico sobre las células de ovario de hámster chino (CHO) (Gray & Kreger, 1985), y se ha demostrado que la citolisina (hemolisina) puede ser letal para ratones en niveles de nanogramos por kilogramo de peso (Wright & Morris, 1991; Jones & Oliver, 2009).

1.6.2 Pili

V. vulnificus tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales, y se sugiere que la presencia de pili es el factor que ayuda a la adhesión (Gander & LaRocco, 1989). Los pili son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedera. La punta de los pili media la adherencia bacteriana uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre la superficie de las células de los tejidos. Por lo general, estos receptores de las adhesinas fimbriales corresponden a carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos (Finlay & Falcow, 1997; Paranjpye *et al.,* 2007; Jones & Oliver, 2009).

1.6.3 Proteasas

V. vulnificus secreta una metaloproteasa dependiente de zinc de 45 KDa, la cual está codificada en el gen *vvpE,* cuya región N-terminal codifica para un polipéptido con capacidad proteolítica y la región C-terminal codifica para un polipéptido que aumenta la afinidad con las proteínas blanco (Miyoshi *et al.*, 1997; Jeong *et al.,* 2000; Miyoshi, 2006).

Originalmente, *V. vulnificus* se descubrió por su actividad de colagenasa (Smith & Merkel, 1982), y, posteriormente, se demostró que tiene, además, diversas actividades como elastasa y caseinasa (Kothary & Kriger, 1985; Kawase *et al.,* 2004.).

1.6.4 Cápsula

Es una estructura formada por polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos que recubren la membrana externa de la bacteria. Esta estructura es importante para la supervivencia del microorganismo dentro del hospedero ya que promueve la resistencia a la acción del complemento, puede actuar como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas como los detergentes y ayuda a la adherencia a los tejidos del hospedero (Chiang & Chuang, 2003; Whitfield, 2006; Tsuchiya *et al.,* 2007; Guo & Rowe-Magnus, 2010).

Se ha mencionado en diversas publicaciones que la presencia de cápsula está directamente relacionada con la morfología colonial, indicando que el fenotipo encapsulado genera una morfología colonial opaca (O), mientras que cuando se observa un fenotipo translúcido (T) hay poca o nula producción de cápsula (Hilton *et al.,* 2006). Sin embargo, se ha reportado un tercer morfotipo llamado intermedio (Int), en el cual la expresión de la cápsula es menor que en el fenotipo opaco pero mayor que el fenotipo tranlúcido (Roshe *et al.,* 2006).

1.6.5 Sideróforos

Como en muchos microorganismos, el hierro desempeña un papel importante en la patogénesis de *V. vulnificus* (Hor *et al.,* 1999). Una de las estrategias empleadas para obtener hierro es la producción de sideróforos, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad por el hierro. Una vez que el sideróforo se une al hierro, este complejo se reconoce a través de receptores específicos y se introduce al citosol mediante un sistema de transporte específico (Crosa, 1989; Okujo *et al.,* 1996). Este microorganismo produce un sideróforo llamado vulnibactina, con el cual adquiere hierro de la transferrina y la lactoferrina (Okujo *et al.*, 1996; Jones & Oliver, 2009).

El crecimiento bacteriano depende mucho de la disponibilidad de hierro en el ambiente en donde se desarrolla, ya que este elemento, participa en procesos biológicos de gran importancia, como son la cadena transportadora de electrones y un cofactor para diversas enzimas del metabolismo central (Crosa, 1989). Los pacientes con hemocromatosis y otros síndromes que impliquen una elevación de los niveles de hierro sérico son más susceptibles a cursar con septicemia (Hor *et al.,* 1999). Recientemente Ashrafian (2003) propuso que la hepcidina, una proteína antimicrobiana expresada en el hígado y que interviene en la regulación del hierro por el huésped, podría ser un factor determinante en la infección por *V. vulnificus.*

2 JUSTIFICACIÓN

Los alimentos representan satisfactores, necesidades y gustos diferentes, por lo que deben estar pulcramente cuidados desde su obtención hasta su consumo ya que pueden ser un vehículo de transmisión de algunas enfermedades, las cuales revisten especial importancia por sus altas tasas de morbilidad y mortalidad. En la actualidad, la presencia en aumento de contaminantes biológicos en los alimentos ha dado pie a la realización de estudios orientados a conocer los agentes causales y los vehículos de transmisión, así como las condiciones propicias e indispensables para que este tipo de contaminantes y afecciones se manifiesten.

En nuestro país, las enfermedades entéricas ocupan el segundo lugar; su origen se encuentra en el consumo de alimentos contaminados, entre los que se hallan los productos de la pesca, que pueden ser vehículos de transmisión si se obtienen en lugares donde la contaminación biológica es alta, como es el caso de la cuenca del Río Pánuco en la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. Esta zona se ha convertido en un importante núcleo de desarrollo económico, en el que destacan actividades como la industria y la actividad pesquera. Esto tiene como consecuencia el surgimiento de asentamientos humanos no planificados, lo que ha ocasionado trastornos ambientales en diferentes niveles, que no se han evaluado con detalle.

El impacto de la actividad de los seres humanos sobre los cuerpos acuícolas en la totalidad del territorio de los Estados Unidos Mexicanos es un problema prioritario, ya que las consecuencias de dicho impacto derivan en el deterioro de las actividades económicas relacionadas con la pesca, además de ocasionar problemas de salud en los habitantes de la región. La información en México sobre el aislamiento de *V. vulnificus* es escasa, por lo que esta propuesta de investigación permitió demostrar que esta bacteria está presente en los alimentos de origen acuático y puede expresar algunos factores asociados a la virulencia.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Caracterizar las cepas de *Vibrio vulnificus* aisladas de bivalvos y de la columna de agua en la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, México.

3.2 Específicos

1. Determinar la presencia y caracterización fenotípica de *V. vulnificus* mediante su aislamiento en tejido de ostiones y en la columna de agua.
2. Amplificar el gen *vvhA* en las cepas obtenidas para su identificación genotípica.
3. Valorar el efecto de la temperatura, salinidad y época del año en la supervivencia de *V. vulnificus* en la columna de agua.
4. Evaluar algunos factores de virulencia mediante cultivos celulares, actividad enzimática y efecto de la hemolisina.

4 METODOLOGÍA

4.1 Zona de estudio

La Laguna de Pueblo Viejo se localiza en la parte norte del Estado de Veracruz, entre los 22°5 y 22°13 de latitud norte y los 97°50 y 97°57 de longitud oeste (PDUPW, 1982). Se encuentra en un sistema fluvial complejo alimentado por el Río Pánuco (al norte) y tributarios. Los cuerpos acuáticos más importantes son las Lagunas del Chairel, Carpintero y el Mango; y al oeste las de Mata de los Tinojos y Paso de Piedra. Los asentamientos humanos más importantes situados en sus márgenes son Ciudad Cuauhtémoc y Tampico Alto en Veracruz, así como la ciudad de Tampico en Tamaulipas (Anónimo, 1982).

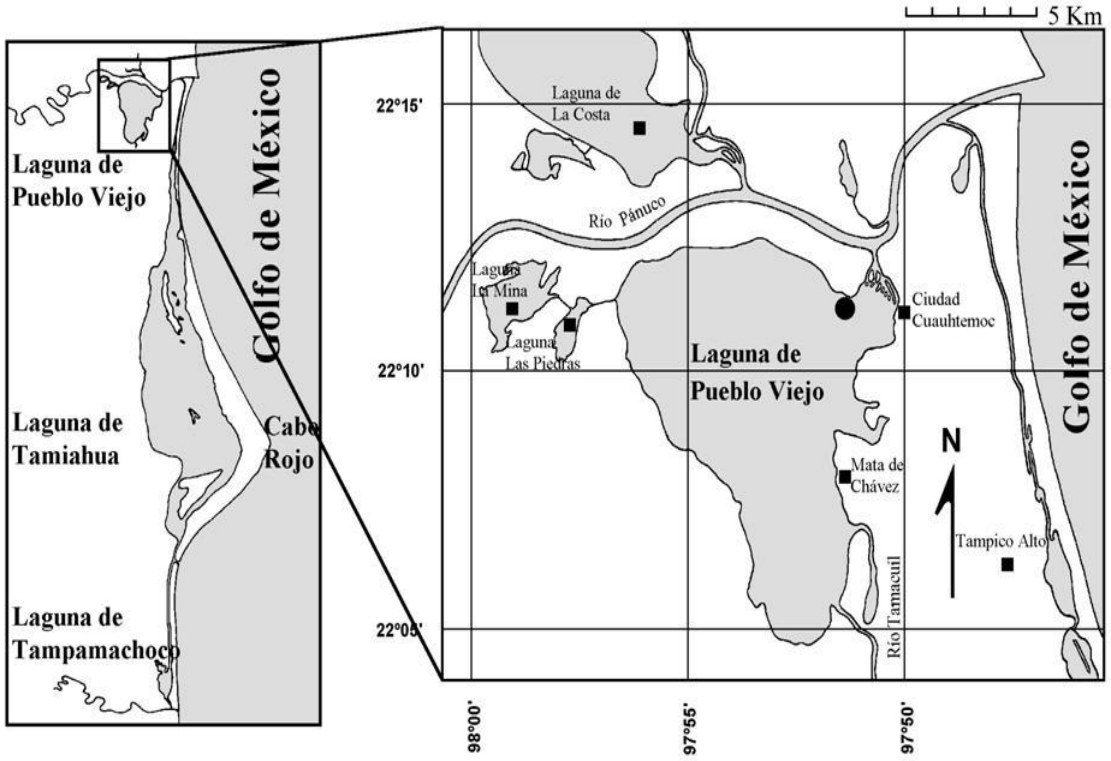


Figura 4. Mapa de la ubicación de la laguna de pueblo Viejo Veracruz. Tomado de Castillo *et al.,* 2005.

Figura 5. Ubicaciones de los puntos de muestreo establecidos por la cooperativa de pescadores: El Bajo (1), Punta de Buda (2), Santa Clara (3), Ensenada (4), El Ciruelo (5), Cruz de Piedra (6), Isleta de Corralillo (7), Isleta de Tomates (8), Medianía (9), Tamales (10), Punta de Malagana (11) y El Puente (12)

Figura 6. Vista de la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz

El cuerpo acuático tiene una superficie aproximada de 93.7 km^2; su eje mayor es paralelo a la costa y mide aproximadamente 15 km de largo y 9.5 km de ancho (Figura 4). En su interior existen isletas de tamaño pequeño. En general, la profundidad es somera (1.75 m de profundidad promedio), y las partes más profundas son características de la zona central norte-sur (Contreras, 1988).

4.2 Criterio de selección de las muestras

Para el desarrollo de este proyecto se contemplaron 12 estaciones de colecta en los puntos que se consideraron críticos, de acuerdo con la información proporcionada por las cooperativas y el ayuntamiento de la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz.

El muestreo se realizó de marzo de 2002 a marzo de 2003, y los puntos de muestreo fueron: El Bajo (1), Punta de Buda (2), Santa Clara (3), Ensenada (4), El Ciruelo (5), Cruz de Piedra (6), Isleta de Corralillo (7), Isleta de Tomates (8), Medianía (9), Tamales (10), Punta de Malagana (11) y El Puente (12). Para el caso de los ostiones sólo se trabajaron 11, ya que el puente tiene una profundidad de aproximadamente

30 m (Figuras 5 y 6); por ello, la recolección fue de 11 muestras de ostión y 12 de agua por mes.

Para el análisis las muestras de ostiones se colocaron en bolsas de plástico, de manera independiente para evitar el contacto. Para el agua se utilizaron botellas de plástico de boca ancha, sumergiendo la botella a una profundidad de 75 centímetros, hasta tres cuartos de su volumen. Todas las muestras se etiquetaron, señalando el punto de muestreo, la fecha y la hora. En el caso de las muestras de ostión, éstas se transportaron en embalajes térmicos con hielo seco. El tiempo transcurrido entre la colecta y el análisis no fue superior a 15 horas.

4.3 Obtención de la muestra

Las muestras de ostiones obtenidas de cada punto de muestreo se lavaron con un cepillo y abundante agua para eliminar el lodo, las algas y las almejas. Posteriormente se desconcharon en condiciones asépticas (Elliot *et al*., 1998) y se homogeneizaron en licuadora de manera aséptica.

4.4 Análisis microbiológico

La metodología utilizada para el aislamiento e identificación de *V. vulnificus* a partir de ostiones y de agua fue la descrita en el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (Elliot *et al*., 1998).

- Se pesaron 50 g de cada homogeneizado de ostiones, en matraces que contenían 450 mL de agua peptonada alcalina (APA) (pH 8.5-9), para obtener la dilución 10^1.
- Se transfirieron 25 mL de las muestras de agua a matraces con 225 mL de APA para obtener la dilución 1:10. Se hicieron diluciones decimales hasta 10^3 por duplicado en APA.
- Se incubó a 35-37° y 42°C por 6 y 18 horas.

- Se sembró cada tubo con crecimiento en placas de Petri con agar tiosulfato citrato, sales biliares sacarosa (TCBS) y agar celobiosa polimixina B-colistina (mCPC), por estría cruzada, y se incubó a 37°C por 18-24 horas.
- Se hizo la identificación mediante las pruebas de halofilismo en agar triptosa cloruro (T_1N_n), que contenían 0, 3, 6, 8 y 10% de NaCl (T_1N_0, T_1N_1, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 y T_1N_{10}), a tres colonias de cada placa sacarosa negativa (verdes) circulares de 2 a 3 mm de diámetro.
- Se incubó por 18-24 h a 35-37°C. A las colonias que crecieron en 3 y 6% de NaCl se les hizo la tinción de Gram y la prueba de oxidasa.

La identificación fenotípica sólo se hizo a las colonias oxidasa positiva y a las que, mediante la tinción, fueron bacilos curvos Gram negativos. Las pruebas de metabolismo fueron: movilidad indol ornitina (MIO), triple azúcar hierro (TSI), agar hierro lisina (LIA), caldo glucosa Hugh-Leifson, fermentación de sacarosa, arabinosa, celobiosa, lactosa, sorbitol, manitol y manosa, producción de acetil metil carbinol en el medio de Voges Proskauer, descarboxilación de ornitina y lisina, y arginina dihidrolasa, citrato de Simmon´s y ONPG.

4.5 IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

4.5.1 Obtención de DNA

Para obtener el DNA se empleó el kit **Wizard® Genomic DNA Purification (**PROMEGA). Las cepas se sembraron en caldo Luria Bertani y se incubaron a 37ºC por 24 horas.

1. Se colocó 1 mL de un cultivo de 24 horas en un tubo Eppendorf.
2. Se centrifugó a 15000 x *g* por 2 minutos y se decantó el sobrenadante.
3. Se adicionaron 600 □ L de la solución de lisis y se incubó a 80ºC por 5 minutos.

4. Se adicionaron 3 □ L de la solución de RNasa y se incubó por 40 min a 37ºC. Posteriormente se adicionaron 200□ L de la solución para precipitar proteínas y se agitó vigorosamente por 20 segundos.
5. Se incubó por 5 minutos la muestra en hielo.
6. Se centrifugó a 15000 x *g* por 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 600 □ L de isopropanol.
7. Se agitó suavemente hasta la observación de los hilos de DNA.
8. Se centrifugó a 15000 x *g* por 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 600 □ L de etanol al 70%; se mezcló.
9. Se centrifugó a 15000 x *g* por 2 minutos y se decantó el etanol; el tubo se dejó secar por 10-15 minutos para eliminar todo el etanol.
10. Se adicionaron 50 □ L de la solución de rehidratación de DNA y se incubó 1 hora a 65ºC.
11. Se almacenó el DNA a -20º C.

4.5.2 Amplificación del gen *vvhA* en las cepas de trabajo mediante la técnica de PCR

La mezcla de reacción se preparó con: 34.95 □ l de agua destilada estéril, 5 □ l de regulador 10X (200mM Tris-HCl (pH 8.4) y KCl a 500 mM), 2.5 □ l de $MgCl_2$ 50mM, 0.25 □ l de trifosfato deoxinucléosidos (10mM), 2.5 □ l de cada iniciador, 0.3 □ l de *Taq* polimerasa (5 U/□ l) y 2 □ l de la solución que contiene el DNA; el volumen total de la mezcla de reacción fue de 50 □ l.

Las amplificaciones se hicieron en un termociclador Hybaid-Omn-E con los iniciadores y las condiciones descritos en el cuadro 4. Como testigo positivo se utilizó el DNA genómico de la cepa de referencia *V. vulnificus* ATCC 29307 y como negativo la cepa de referencia *V. mimicus* ATCC 33653.

Se elaboró un gel de agarosa al 1.5% con regulador Tris-Ácido acético glacial-EDTA (TAE); se mezclaron 4 □ l del producto de PCR con 1.5 □ l del regulador de carga (azul de bromofenol (0.25%), sacarosa (40%) y xileno cianol (0.25%)). Se cargaron el gel y la electroforesis, y se desarrollaron en regulador TAE mediante la aplicación de 120 volts por 1 hora. Se empleó un marcador de talla molecular de 100 pb (Invitrogen). La tinción del producto de la PCR se hizo con una solución de bromuro de etidio en una concentración final de 0.5□ g/mL.

El gel se observó en un transiluminador Bio Rad 2000 (que emite luz con longitud de onda de 302 nm) y se obtuvo la imagen digital.

Cuadro 4. Iniciadores y condiciones empleadas para la detección del gen *vvhA.*

Secuencia blanco	Iniciadores	Referencia
vvhA	F- 5´TTCCAACTTCAAACCGAACTATGA-3´ R-5´ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG-3´	Paniker *et al.,* 2004

	vvhA
Desnaturalización inicial	94 °C/ 3 min
Desnaturalización Alineamiento Extensión	94 °C/ 1min 68 °C/ 1min 72 °C/ 1min
Número de ciclos	30
Tamaño del fragmento	205 pb

4.6 Determinación de la salinidad y temperatura

La salinidad se midió en cada punto de muestreo mediante un refractómetro de mano ATAGO H-50/H-80, con una escala Brix 0.0-50.0 % (H-50, Brix 30.0-80.0% (H-80)).

- Se colocó en el prisma una gota del agua de cada punto de muestreo.
- Se protegió de la luz del día, suavemente, con la tapa del refractómetro.

- Se tuvo la precaución de que la muestra cubriera totalmente la superficie del prisma.
- Se observó la escala a través del ocular.
- Se leyó la escala donde se interceptan los límites de las líneas.
- Con un material que no soltara pelusas ni rayara el prisma, se limpió y lavó suavemente con una piceta con agua destilada.

La temperatura se determinó mediante un termómetro de campo con una envoltura de acero inoxidable que sólo permitía ver la escala de temperatura; en uno de los extremos tenía una cuerda para poder deslizarlo y sumergirlo hasta aproximadamente 75 cm de profundidad.

4.7 Efecto de la toxina en cultivos celulares (Elliot et al., 1998; Kreger & Lockwood, 1981; Cravioto et al., 1999)

4.7.1 Obtención de la toxina

- Se sembró cada una de las cepas de *V. vulnificus* en un tubo que contenía 15 mL de caldo AKI; se incubó por 18 horas en agitación (200 rpm) a 37ºC.
- Se centrifugó el cultivo a 2500 rpm durante 10 minutos.
- Se esterilizó el sobrenadante por filtración utilizando una membrana de 0.22 μm.
- Como testigo positivo se utilizó una cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 11623 y como testigo negativo una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.7.2 Obtención de la monocapa de células CHO

- Se obtuvo un crecimiento confluente de células de ovario de hámster chino (CHO) en medio F12 con 20% de suero fetal de bovino (SFB), en una atmósfera de CO_2 al 5% e incubadas a 35-37ºC por 24-48 horas.

- Se eliminó el medio y el suero. Se adicionó un mililitro de solución salina de Pucks para lavar la monocapa. Se incubó durante 3-5 minutos en una atmósfera de CO_2 al 5% a 35-37ºC para favorecer el desprendimiento de las células.
- Se golpeó la botella por los cantos para desprender la monocapa.
- Se adicionó 14 mL del medio F12 con SFB al 15% para resuspender las células; se disgregaron perfectamente las células con una pipeta.

4.7.3 Efecto de la toxina

- En una placa de 96 pozos se colocó en cada uno 100 μL de las células provenientes de la monocapa disgregadas con medio F12 y 20% de SFB. Se incubó a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5% por 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.
- Se eliminó el medio y el suero, y se lavó tres veces con regulador salino de fosfatos ((PBS) estéril.
- Se agregó, en la primera línea de pozos, 180 μL de medio F12 más 20 μL de la toxina.
- Se incubó a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5% hasta observar el efecto.
- Se eliminó el medio y el sobrenadante, se lavó tres veces con PBS estéril, se agregó metanol absoluto hasta cubrir los pozos y se eliminó de inmediato; se lavó tres veces con PBS.
- Se tiñó con colorante de Giemsa cubriendo los pozos durante 20 minutos. Se recuperó el colorante y se lavó con agua destilada hasta no observar eliminación del colorante.
- Se observó el efecto y se determinó el título de la toxina en el microscopio de campo invertido.

4.8 Adherencia en la línea celular HEp-2 (Paranjpye & Strom, 2005)

4.8.1.1 Preparación de los cultivos

- Se sembró una asada de cada cultivo en tubos con 3 mL de caldo triptona con manosa al 1%; se incubó a 37ºC/ 18 horas/ 100 rpm.
- Se centrifugó a 2500 rpm/ 20 min/4ºC.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de PBS estéril.

4.8.2 Obtención de la monocapa de células HEp-2

- Se obtuvo un crecimiento confluente de células de HEp-2 (células de cáncer laríngeo humano) en medio MEM con 20% de suero fetal de bovino (SFB) en una atmósfera de CO_2 al 5% y se incubó a 35-37ºC por 24-48 horas.
- Se eliminó el medio y el suero. Se adicionó un mililitro de solución salina de Pucks para lavar la monocapa. Se incubó durante 3-5 minutos en una atmósfera de CO_2 al 5% a 35-37ºC para favorecer el desprendimiento de las células.
- Se golpeó la botella por los cantos para desprender la monocapa.
- Se adicionaron 14 mL del medio MEM con SFB al 20% para resuspender las células y se disgregaron con una pipeta.

4.8.2.1 Preparación de la microplaca

- Se colocaron, en cada pozo de una placa de 24 pozos, un cubreobjetos estéril y 100 μL de las células provenientes de la monocapa disgregadas con medio MEM y 20% de SFB. Se incubó a 37ºC con una atmósfera de CO_2 al 5% hasta 100% de confluencia (24H). Los ensayos se realizaron por triplicado.
- Se eliminaron el medio y el suero, y se lavó tres veces con regulador salino de fosfatos ((PBS) estéril.
- Se colocaron en cada pozo 975 μL de medio MEM, 20% de SFB y 25 μL de la suspensión bacteriana. Se incubó la microplaca a 37º C/5% CO_2/ 3 h.

- Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur; se lavó 3 veces con PBS estéril.
- Se fijaron las células con metanol durante 1 minuto; se lavaron 3 veces con PBS estéril.
- Se tiñeron las células con Giemsa durante 20 minutos y se lavaron con agua destilada los pozos hasta que el agua salió sin colorante.
- Se deshidrataron las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol. Se montaron las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permount.
- Se observó al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).
- Se utilizó como testigo positivo de adherencia localizada *E. coli* 886L, para adherencia difusa *E. coli* 251 y para adherencia agregativa *E. coli* JM221. Como testigo negativo se empleó *E. coli* ATCC 25922.

*4.9 Diferencia en la morfología colonial (*Lee *et al.,* 1997*)*

- Las 94 cepas de *V. vulnificus* se crecieron en tubos que contenían agar BHI (infusión cerebro corazón) y se incubaron por 18-24 horas a 35-37°C.
- Se sembró por duplicado cada tubo por estría cruzada en placas con agar infusión cerebro/corazón con 2% de NaCl.
- Se incubaron por 18-24 horas a 35-37°C y se observó la morfología colonial.

4.10 Detección de enzimas

Las 94 cepas de *V. vulnificus* se crecieron en tubos que contenían caldo de soya tripticasa con 2% de NaCl. Se incubaron por 18-24 horas a 37°C. Todos los ensayos se hicieron por triplicado, y como testigo positivo se usó ATCC 29307.

4.10.1 Proteasa (Sizemore & Stevenson, 1970)

- Se determinó la actividad proteolítica sembrando por estría cruzada en agar leche descremada (Skim milk) en una concentración final del 2%.
- Se incubó a 37°C por 18-24 horas.

La presencia de zonas claras alrededor del crecimiento indica la proteólisis.

4.10.2 Hemolisina (García & Landgraf, 1998)

- Se sembró por estría cruzada en agar base sangre con 5% de eritrocitos de carnero y de conejo.
- Se incubó por 18-24 horas a 37°C.
- Se observó la destrucción de los glóbulos rojos.

4.10.3 Lecitinasa y Lipasa (García & Landgraf, 1998)

- Se sembró en agar nutritivo que contenía el 10% (v/v) de yema de huevo.
- Se incubó por 7 días a 37°C.

Zonas de precipitado alrededor de la colonia demuestran la producción de lecitinasa y zonas claras la producción de lipasa.

4.10.4 DNasa (García & Landgraf, 1998; Lachica *et al.,* 1971)

- Las cepas de *V. vulnificus* se crecieron por duplicado en BHI por 18-24 horas y se incubaron a 37°C.
- Se prepararon placas Petri con agar DNA de timo de carnero que contenía 1% del colorante azul de toluidina. En el agar se hicieron orificios de aproximadamente 2-3 mm de diámetro, los cuales se llenaron con el cultivo de las cepas.
- Se incubó a 37°C por 18-24 horas. La observación se hizo cada hora.

Se observó si el DNA se degradaba mediante un halo color de rosa.

4.10.5 Hidrólisis de la gelatina (2% DE NaCl)

- Se sembró por estría placas con agar gelatina.
- Se incubó a 37°C durante 48 horas.

- Se añadió $HgCl_2$ a las placas.

Se observaron los halos transparentes alrededor del crecimiento bacteriano.

4.10.6 Presencia de cápsula (Clark, 1973)

- Se sembró en agar gelosa glicerol al 2% de NaCl por estría cruzada.
- Se incubó a 37°C por 18-24 horas.

Se hizo frotis del crecimiento y se tiñó por las técnicas de tinta china para demostrar la presencia de cápsula.

4.11 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (H), la cual fue seguida de una prueba de Comparación Múltiple, Z-Values (Neter *et al*., 1996; Siegel & Castellan, 1988; Zar, 1999).

5 RESULTADOS

5.1 Análisis microbiológico

Se analizó un total de 299 muestras en las cuales se aisló *Vibrio* sacarosa negativo en un intervalo de 50 000-400 000 UFC/g y 40 000-300 000 UFC/mL en las muestras de ostión y agua respectivamente (Cuadros 5 y 6; Anexos 1 y 2).

Durante todo el periodo de estudio se aisló a *Vibrio* sacarosa negativo, con las cuentas más altas en los meses que comprenden las estaciones de primavera y verano (Figura 7).

Cuadro 5. Aislados de *Vibrio* sacarosa negativo en las muestras de agua y ostión durante primavera y verano

	Primavera			Verano		
Muestra	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago
Ostión (UFC/g)	$25x10^4$	$40x10^4$	$40x10^4$	$25x10^4$	$15x10^4$	$17\ x10^4$
Agua (UFC/mL)	$30x10^4$	$20\ x10^4$	$15\ x10^4$	$28\ x10^4$	$40x10^4$	$17\ x10^4$

Cuadro 6. Aislados de *Vibrio* sacarosa negativo en las muestras de agua y ostión durante otoño e invierno

	Otoño			Invierno			
Muestra	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
Ostión (UFC/g)	$15\ x10^4$	$80x10^3$	$10\ x10^4$	$10\ x10^4$	$50x10^3$	$80x10^4$	$15\ x10^4$
Agua (UFC/mL)	$15\ x10^4$	$50x10^3$	$80\ x10^3$	$40\ x10^3$	$60x10^3$	$50x10^3$	$30\ x10^4$

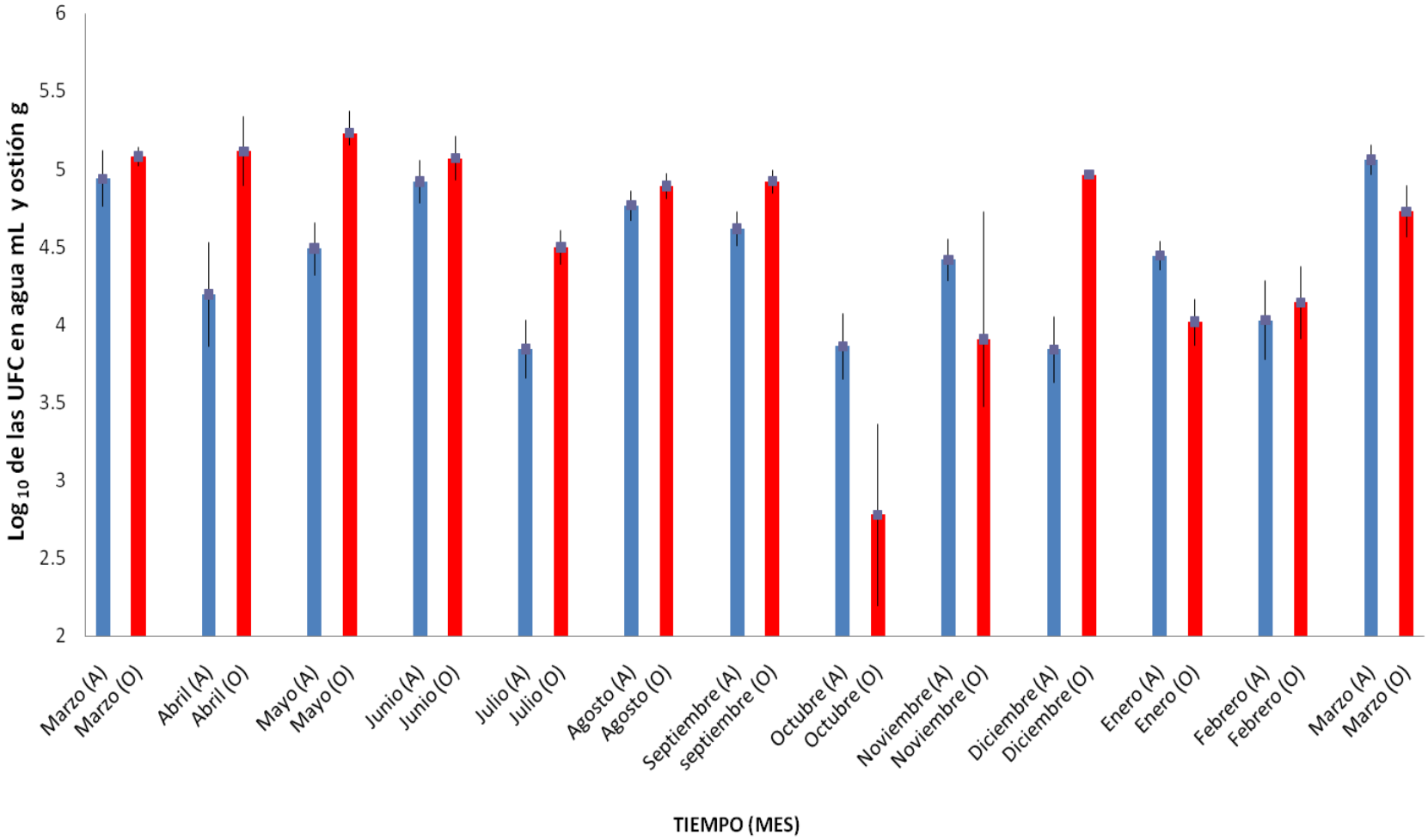


Figura 7. Abundancia de Vibrio sacarosa negativo en las muestras de agua y ostión procedentes de la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. Marzo de 2002 a Marzo de 2003.

Del total de muestras, el 31% (94/299) fue positivo para el aislamiento de *V. vulnificus*. En lo que se refiere a la positividad por tipo de muestras, el 13% (39/94) correspondió a las muestras de ostión y el 18% (55/94) a las de agua (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de muestras positivas para *Vibrio vulnificus* por tipo de muestra y mes

Año	Mes	Tipo de muestra		Total
		Ostiones	Agua	
2002	Marzo	3/11	5/12	8
	Abril	4/11	7/12	11
	Mayo	8/11	9/12	17
	Junio	7/11	6/12	13
	Julio	5/11	9/12	14
	Agosto	4/11	6/12	10
	Septiembre	1/11	1/12	2
	Octubre	0/11	1/12	1
	Noviembre	1/11	0/12	1
	Diciembre	1/11	0/12	1
2003	Enero	0/11	1/12	1
	Febrero	1/11	1/12	2
	Marzo	4/11	9/12	13
	Total	39/143	55/156	94/299

Como se muestra en el cuadro 7, durante todo el estudio se tuvieron muestras positivas, observándose que del mes de marzo al de agosto se tuvo el mayor número de ejemplares positivos, con un máximo de 18% en mayo.

En todos los puntos de muestreo se aisló a *V. vulnificus*; sin embargo, en el punto denominado Medianía las muestras de ostiones analizadas fueron negativas,

contrariamente a lo que sucedió en las de agua, donde 14.54% de ellas fueron positivas (Cuadro 8; Anexo 3).

Cuadro 8. Número de muestras positivas para *V. vulnificus* por punto de muestreo

Punto de muestreo	Tipo de muestra		Total
	Ostión	Agua	
1. El Bajo	6	6	12
2. Punta de Buda	7	4	11
3. Santa Clara	6	5	11
4. Ensenada	4	6	10
5. El Ciruelo	3	5	8
6. Cruz de Piedra	4	4	8
7. Isleta de Corralillo	2	3	5
8. Isleta de Tomates	3	5	8
9. La Medianía	0	8	8
10. Tamales	3	3	6
11. Punta de Malagana	1	4	5
12. Puente Hondo	NR	2	2
Total	39	55	94

NR=No se recolecto

A partir de las 299 muestras se trabajó un total de 7 212 colonias con el 66% (4 733/7 212) de ostión y el 34% (2 479/7 212) de agua. De ellas, el 11% (804/7 212) fue presuntivo por sus características de halofilismo (3-6% de NaCl), Gram (negativo) y oxidasa (positiva). Mediante pruebas bioquímicas, sólo el 35% (289/804) resultó ser *V. vulnificus.* Del total de colonias confirmadas como *V. vulnificus*, el 45% (131/289) correspondió a los bivalvos y el 55% (158/289) a la columna de agua, mientras que el biotipo identificado en todas las cepas fue el 1 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número de colonias trabajadas, presuntivas y confirmadas de *Vibrio vulnificus* de acuerdo al tipo de muestra y época del año

Mes	Número de colonias			Tipo de muestra
	Trabajadas	Presuntivas	Confirmadas	
Marzo	394	29	12	Ostiones
	482	66	35	Agua
Abril	632	59	7	Ostiones
	310	41	16	Agua
Mayo	620	39	11	Ostiones
	225	37	12	Agua
Junio	564	98	62	Ostiones
	470	59	45	Agua
Julio	230	75	9	Ostiones
	125	39	11	Agua
Agosto	327	17	5	Ostiones
	246	15	9	Agua
Septiembre	417	25	7	Ostiones
	321	19	11	Agua
Octubre	110	29	0	Ostiones
	165	17	2	Agua
Noviembre	152	15	3	Ostiones
	162	12	0	Agua
Diciembre	593	17	6	Ostiones
	136	15	0	Agua
Enero	116	10	0	Ostiones
	200	13	3	Agua
Febrero	157	12	2	Ostiones
	179	11	1	Agua
Marzo	421	17	7	Ostiones
	542	21	13	Agua
Total	7, 212	804	289	

Mediante la técnica de PCR se puso en evidencia la presencia del gen *vvhA* en el 100% de las cepas; el fragmento amplificado fue de 205 pb, lo que sugiere que todas las cepas son *V. vulnificus* ya que dicho gen se ha usado como blanco para identificar este microorganismo (Figura 8).

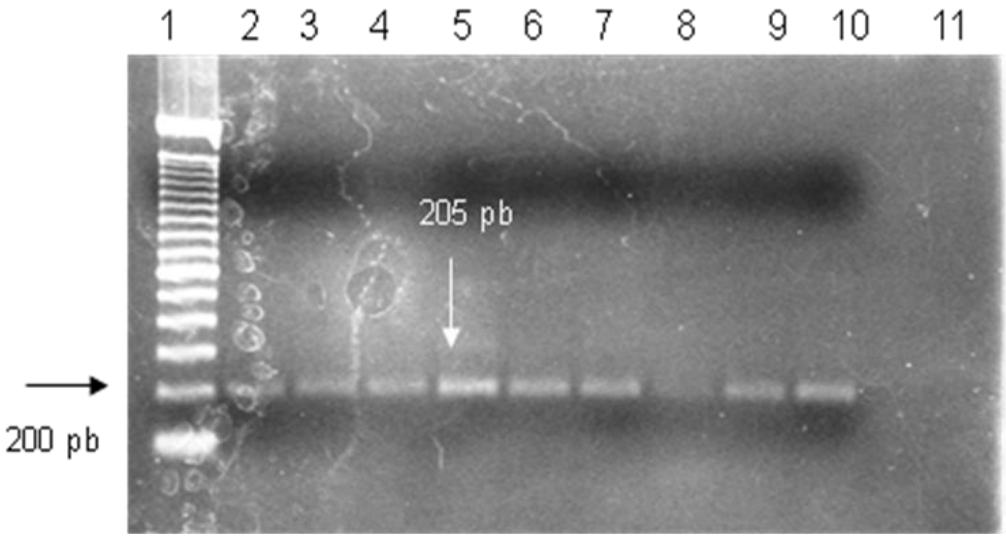


Figura 8. Electrofograma del producto amplificado del gen *vvhA,* en las cepas de *V. vulnificus* mediante PCR. Carril 1 marcador de 100 pb. Carril 2 testigo positivo (*V. vulnificus* ATCC 29307), carril 11 testigo negativo (*V. mimicus* ATCC 33653) carriles 3-10 cepas problema.

En el cuadro 10 se observa que aun cuando en todos los puntos de muestreo se aisló la bacteria, en el punto nombrado El Bajo se tuvo el mayor porcentaje de aislamiento (15%), mientras que el menor se dio en Puente Hondo (0.69%).

Asimismo, la época del año condicionó el número de microorganismos presentes: el 37% de las colonias identificadas como *V. vulnificus* fue en el mes de junio y el 0.69% en octubre. El análisis estadístico de las colonias señala que no existen diferencias significativas entre los puntos de muestreo (n= 143, H= 7.668, P< 0.661) con respecto a las muestras de agua, lo que significa que el microorganismo se distribuye de manera homogénea en la laguna. Sin embargo, no sucede lo mismo

con las de ostión, donde se encontraron diferencias significativas (n= 143, H=19.384, P<0.0360) entre los puntos de muestreo el Bajo y Medianía, y Punta de Buda y Medianía.

Cuadro 10. Número de colonias de *V. vulnificus* por punto de muestreo y mes

Puntos de muestreo	**Mar**	**Abr**	**May**	**Jun**	**Jul**	**Ago**	**Sep**	**Oct**	**Nov**	**Dic**	**Ene**	**Feb**	**Mar**	**COLONIAS**
El Bajo	7	5	4	15	4	0	0	0	0	6	0	0	5	46
Punta de Buda	4	6	4	9	3	2	0	0	0	0	0	2	4	34
Santa Clara	5	4	4	10	3	3	0	0	0	0	0	0	2	31
Ensenada	0	1	2	21	2	2	0	0	3	0	0	0	2	33
El Ciruelo	13	3	0	9	1	3	0	0	0	0	0	0	2	31
Cruz de Piedra	3	2	2	5	1	1	0	0	0	0	0	0	1	15
Isleta de Corralillo	0	1	1	7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	11
Isleta de Tomates	9	0	2	7	3	0	11	0	0	0	0	0	1	33
La Medianía	0	1	1	8	1	1	0	0	0	0	3	1	1	17
Tamales	0	0	1	16	0	1	7	0	0	0	0	0	0	25
Punta de Malagana	5	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	11
Puente Hondo	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
TOTAL	47	23	23	107	20	14	18	2	3	6	3	3	20	289

5.2 Efecto estacional

El aislamiento de este microorganismo fue posible durante los trece meses que duró la investigación, tanto en muestras provenientes de ostión como en las provenientes de agua. Sin embargo, de las 94 muestras positivas el 18% fue en mayo (Cuadro 7).

La época del año también influyó en la presencia de *V. vulnificus:* el 37% de las colonias fueron aisladas en el mes de junio y el 0.69%, en octubre (Cuadro 9; Anexo 3). Al hacer el análisis estadístico se encontró que en el caso de los aislamientos a partir de ostión, existen diferencias significativas (H= 39.999; gl=11; P< 0.00001) entre los meses debido a las diferencias encontradas entre junio y los meses de enero, febrero, noviembre y diciembre.

En relación con los aislamientos de agua, se encontraron diferencias significativas (H046.167; gl=11; P<0.0001) entre mayo y los meses de noviembre y diciembre, así como entre junio, noviembre y diciembre. Por ello, es posible concluir que *V. vulnificus* se puede aislar en los meses de mayo y junio.

5.3 Efecto de la temperatura y la salinidad

La salinidad de este cuerpo acuícola se encontró entre 3.5 y 23 UPS (Cuadro 11). En el mes de noviembre se observa la menor salinidad (3.5 UPS) y un menor número de colonias de *V. Vulnificus* en los aislados de ostión mientras que no fue posible evidenciar esta bacteria en las muestras de agua (Cuadros 9 y 11).

La salinidad presentó diferencias significativas (H<16.698, P<0.001) con respecto a las muestras en las que no se aisló, lo que señala que el microorganismo tiene preferencias por salinidades superiores a 18 UPS. La temperatura durante el periodo de estudio osciló entre 16.5 y 32ºC, favorables para el crecimiento de *V. vulnificus* en todos los puntos de muestreo (Cuadro 12; Anexo 3).

Cuadro 11. Datos de salinidad de marzo de 2002 a marzo de 2003

PM	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
1	20	17	15	21	20	20.5	8.4	9	7	15	14	16	19
2	20.5	17	13	19	19	21	8.7	11	6.8	13	15.5	17	19.5
3	21	18	15	20	20	21	5.7	10	6	12	12	16	19
4	21.5	21	18.5	21	21	22	7.8	11	5.9	10	16.5	18	20
5	20	20	16	20	20	22	7.0	9	4.5	7	14	17	19
6	21	19	13.5	20	20	23	7.9	12	3.5	8	14	16	20
7	21	17	14.5	21	21.5	23	7.5	11	4	8	13.5	16	19
8	21	16	17	21.5	21	22	7.4	13	6	13	14	17	19
9	21	16.5	14	20	20.5	18	5.0	12	7	13	12	16	20
10	21	15	14	21	20	20.5	6.8	11.9	6	13	15	17	20
11	20	17.5	17	21	20	19	7.6	12.5	8	13	14.5	18	19
12	21	10	10	19	18	20.5	10.9	11	7	14	16	18	20

PM= Punto de Muestreo; Mar= Marzo; Abr=Abril; May=Mayo; Jun=Junio; Jul= Julio; Ago=Agosto; Sep= Septiembre; Oct=Octubre; Nov=Noviembre; Dic=Diciembre; Ene=Enero; Feb=Febrero. 1=El Bajo;2= Punta de Buda;3= Santa Clara; 4= Ensenada;5= El Ciruelo;6= Cruz de Piedra;7= Isleta de Corralillo;8= Isleta de Tomates; 9= La Mediania;10= Tamales;11= Punta de Malagana;12= Puente Hondo.

Cuadro 12. Datos de la temperatura de marzo de 2002 a marzo de 2003

PM	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar
1	21	28	29	32	30	30	29	23	20	19	23	18	25
2	21	29	31	28	31	31.5	31	23	20	19	21	17	24
3	22	29	30	30	32	30.5	30	23	20	19	22	17.5	25
4	23	30	30	31	30	31	31	22	19	20	21	16.5	24
5	22.5	30	31	31	31	31	31	23	20	20	22	17	24
6	23	29	31	31	31	31.5	30	23	20	20	22	17.3	25
7	23	30	31	30	30	31.5	32	24	20	20	21	17.5	24
8	24.5	30	32	32	32	31	31	23	19	19	21	17	25
9	23	30	31	32	30	28.5	31	23	19	19	21	18	25
10	24	28	31	32	31	30	32	22	18	20	22	17	25
11	22	28	31	32	30	29	31	23	18	19	21	18	25
12	21	29	30	30	30	31	30	22	18	20	22	18	25

PM= Punto de Muestreo; Mar= Marzo; Abr=Abril; May=Mayo; Jun=Junio; Jul= Julio; Ago=Agosto; Sep= Septiembre; Oct=Octubre; Nov=Noviembre; Dic=Diciembre; Ene=Enero; Feb=Febrero. 1=El Bajo;2= Punta de Buda;3= Santa Clara; 4= Ensenada;5= El Ciruelo;6= Cruz de Piedra;7= Isleta de Corralillo;8= Isleta de Tomates; 9= La Mediania;10= Tamales;11= Punta de Malagana;12= Puente Hondo.

Al evaluar si la temperatura influye en el aislamiento del microorganismo en muestras de agua y ostión, se encontraron diferencias significativas ($H>20.107$, $P<0.001$) dado que el microorganismo prefiere temperaturas por arriba de 24°C, lo que significa que es más probable su aislamiento en los meses calurosos. Los resultados (Cuadro 7) muestran que, entre los meses de marzo y agosto, se tuvo el mayor número de muestras positivas; la temperatura mínima en estos meses fue de 21°C y la máxima de 32°C (Cuadro 12), mientras que la salinidad osciló entre 10 y 23 UPS en estos meses (Cuadro 11; Anexo 3).

5.4 Ensayos biológicos

Para todos los ensayos se tomó una colonia por cada muestra positiva, por lo que se trabajó con 94 cepas de *V. vulnificus.*

5.4.1 Citotoxicidad

La destrucción de la monocapa en la línea celular CHO se observó a las 10 horas. Este efecto se caracterizó por el cambio en la morfología de las células (elongación) y la destrucción de la monocapa (Figura 9). La evaluación del efecto de destrucción se hizo por triplicado para cada una de las cepas y se evaluó de manera cualitativa, dando un valor en porcentaje (de 10 en 10).

Los resultados muestran que la actividad biológica de las toxinas de *V. vulnificus* es variable, ya que no todas las cepas tuvieron la misma capacidad para destruir la monocapa. Sólo 7.4% (7/94) de las cepas (4 de ostión y 3 de agua) mostró una actividad citotóxica del 100%. La toxina obtenida de las cepas de *V. vulnificus* aisladas entre los meses de marzo y agosto destruyó la monocapa en un intervalo del 75 al 100%, tanto en ostiones como en agua (Cuadro 13). De las 94 cepas analizadas, el 43% (40/94) se ubicó en el intervalo máximo de 75 a 100% de destrucción de la monocapa, el 32% (30/94) del 50 al 75% y el 26% (24/94) entre el 30 y el 50%. El 42.5% (17/40) correspondió a las muestras de ostión y el 57.5% (23/40) a las de agua (Cuadros 13 y 14).

Cuadro 13. Efecto citotóxico de las cepas de *Vibrio vulnificus* por su origen y época del año en que fueron colectadas.

Cepas	%	Época del Año																							
		Ostión													Agua										
		M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M
6	30	1					1							1	1		1										1
9	40		1		1					1				1	1	1	1	1									1
9	50			1	1	1										1	1	1	1								2
14	60			1	2	1					1		1		2		1		2	1						1	1
16	70	1		1	1	1	1							1		2	1	2	2	2					1		
16	80		1	2	1	1	1	1								1	2	1	1	2							2
17	90		1	1	1	1	1							1	1	2	1	1	2	1	1	1					1
7	10	1	1	2													1		1								1
	0																										
94		3	4	8	7	5	4	1		1	1		1	4	5	7	9	6	9	6	1	1			1	1	9

M= Marzo; A=Abril; M=Mayo; J=Junio; J= Julio; A=Agosto; S= Septiembre; O=Octubre; N=Noviembre; D=Diciembre; E=Enero; F=Febrero

Cuadro 14. Destrucción de la monocapa de células CHO por las cepas de *Vibrio vulnificus* de acuerdo a un valor cualitativo promedio en porcentaje

Número de aislados	Porcentaje (%)	Ostiones	Agua
6	30	3	3
9	40	4	5
9	50	3	6
14	60	6	8
16	70	6	10
16	80	7	9
17	90	6	11
7	**100**	**4**	**3**
Totales 94		39	55

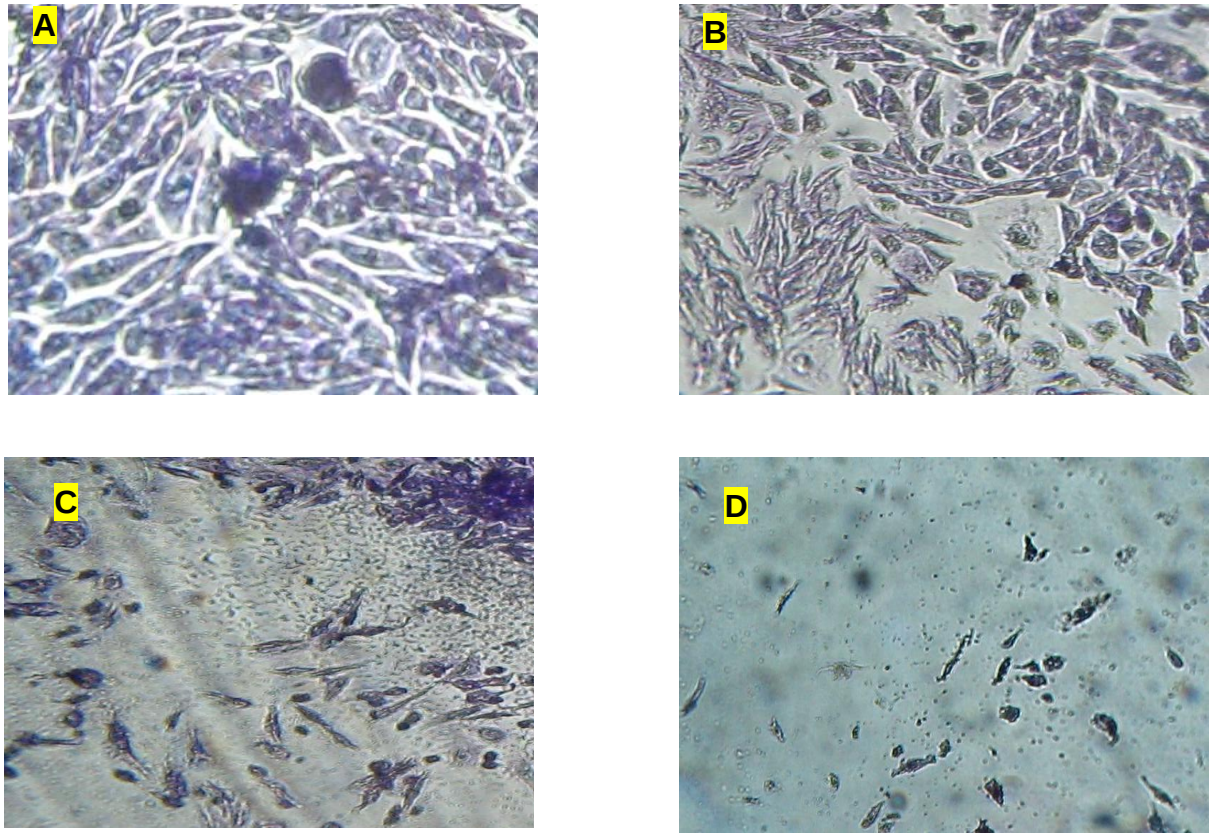


Figura 9. Efecto de la toxina de *V. vulnificus* sobre la línea celular CHO. En el panel A se observa el testigo (células CHO sin inocular), paneles B y C se ve el alargamiento celular y destrucción de las células (se pierde la estructura de monocapa) y panel D destrucción de la monocapa (a las 10 horas de incubación).

5.4.2 Adherencia

En los ensayos con la línea celular HEp-2, el 99% (93/94) de las cepas fue adherente (Cuadro 15; Anexo 4). El 40.4% (38/93) provenía de las muestras de ostión y el 58.5% (55/93) de las muestras de agua. En la figura 10 se observa que *V. vulnificus* se adhiere a toda la superficie de la célula, siguiendo un patrón de adherencia difuso.

Cuadro 15. Prueba de adherencia en la línea celular HEp-2

Muestra	Mes													T
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	
Ostión	3/3	3/4	8/8	7/7	5/5	4/4	1/1	0	1/1	1/1	0	1/1	4/4	38/39
Agua	5/5	7/7	9/9	6/6	9/9	6/6	1/1	1/1	0	0	1/1	1/1	9/9	55/55

M= Marzo; A=Abril; M=Mayo; J=Junio; J= Julio; A=Agosto; S= Septiembre; O=Octubre; N=Noviembre; D=Diciembre; E=Enero; F=Febrero; T=Total

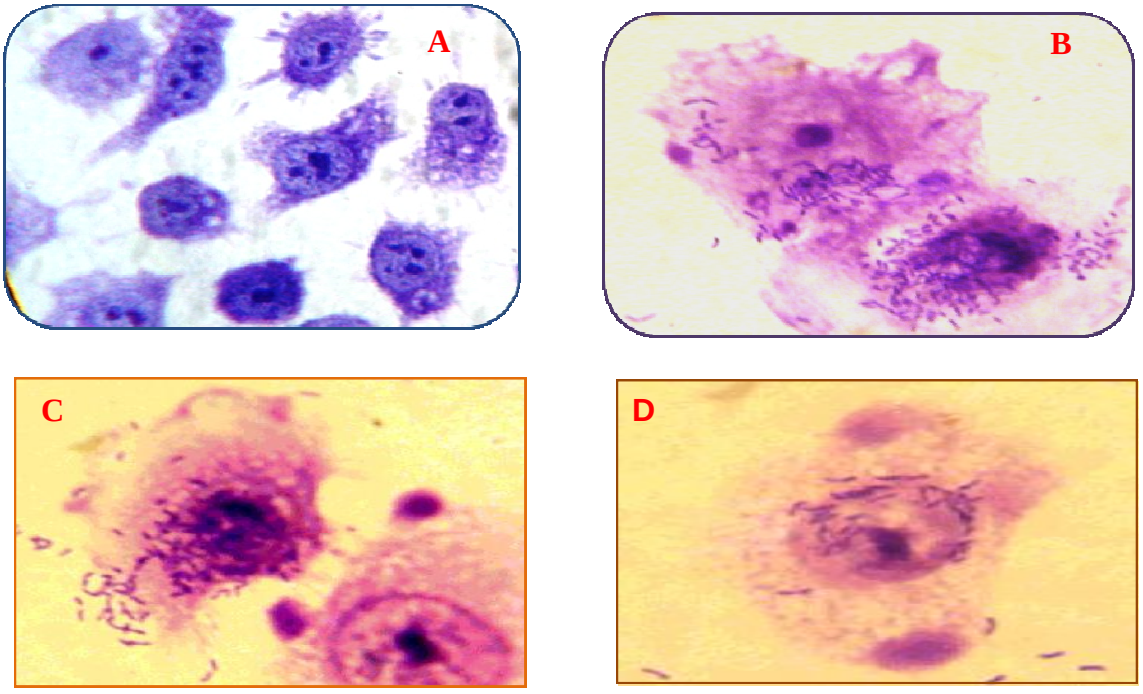


Figura 10. Adherencia de *V. vulnificus* en las células HEp-2. Adherencia de *V. vulnificus* en las células HEp-2. En el panel A se observa el testigo (celular HEp-2 sin inocular). En los paneles B, C y D se muestra la adherencia de *V. vulnificus* (el microorganismo se adhiere sobre toda la superficie celular).

Los datos tanto para efecto citopático como para adherencia muestran que las cepas tienen una distribución que no permite hacer un análisis estadístico y ponderar su actividad con respecto a la época del año, el punto de muestreo, el tipo de muestra y los factores ambientales como salinidad y temperatura.

5.5 Factores asociados a la virulencia

5.5.1 Morfología colonial

En lo que se refiere a las colonias de *V. vulnificus*, el 52% (49/94) se observó con morfología opaca, el 20% (19/94) se observó traslúcida y el 28% (26/94) creció opaco/traslúcida (INT). De las 49 cepas, el 47% (23/49) fue de ostión y el 51% (25/49) de agua (Cuadro 16; Anexo 5).

Cuadro 16. Colonias con morfología opaca, translúcida u opaca/translúcida.

Mes	Ostión			Agua		
	O	T	INT	O	T	INT
Marzo	2	1	0	2	1	2
Abril	2	1	1	3	1	3
Mayo	5	1	2	4	2	3
Junio	4	2	1	4	1	1
Julio	3	1	1	5	1	3
Agosto	2	2	0	2	1	3
Septiembre	1	0	0	1	0	0
Octubre	-	-	-	0	0	1
Noviembre	1	0	0	-	-	-
Diciembre	1	0	0	-	-	-
Enero	-	-	-	0	1	0
Febrero	0	0	1	1	0	0
Marzo	2	1	1	4	2	3
Total	23	9	7	26	10	19

O = Morfología colonial opaca T = Morfología colonial translúcida INT= opaca /translúcida

5.6 Actividad hemolítica y enzimática, y presencia de cápsula

En los ensayos de actividad hemolítica, el 100% (94/94) de las cepas trabajadas produjo β hemólisis en gelosa sangre con 5% de eritrocitos de conejo y 99% (93/94) de eritrocitos de carnero. El 100% (94/94) tuvo actividad proteolítica en leche descremada y el 98% (92/94) en gelatina, mientras que el 91% (86/94) dio positivo en la prueba de DNasa. La producción de lipasa y lecitinasa se observó en el 80% (75/94) y el 98% (92/94) respectivamente. En el 81% (76/94) de las cepas se observó la presencia de cápsula (Figura 11; Anexos 8, 9 y 10).

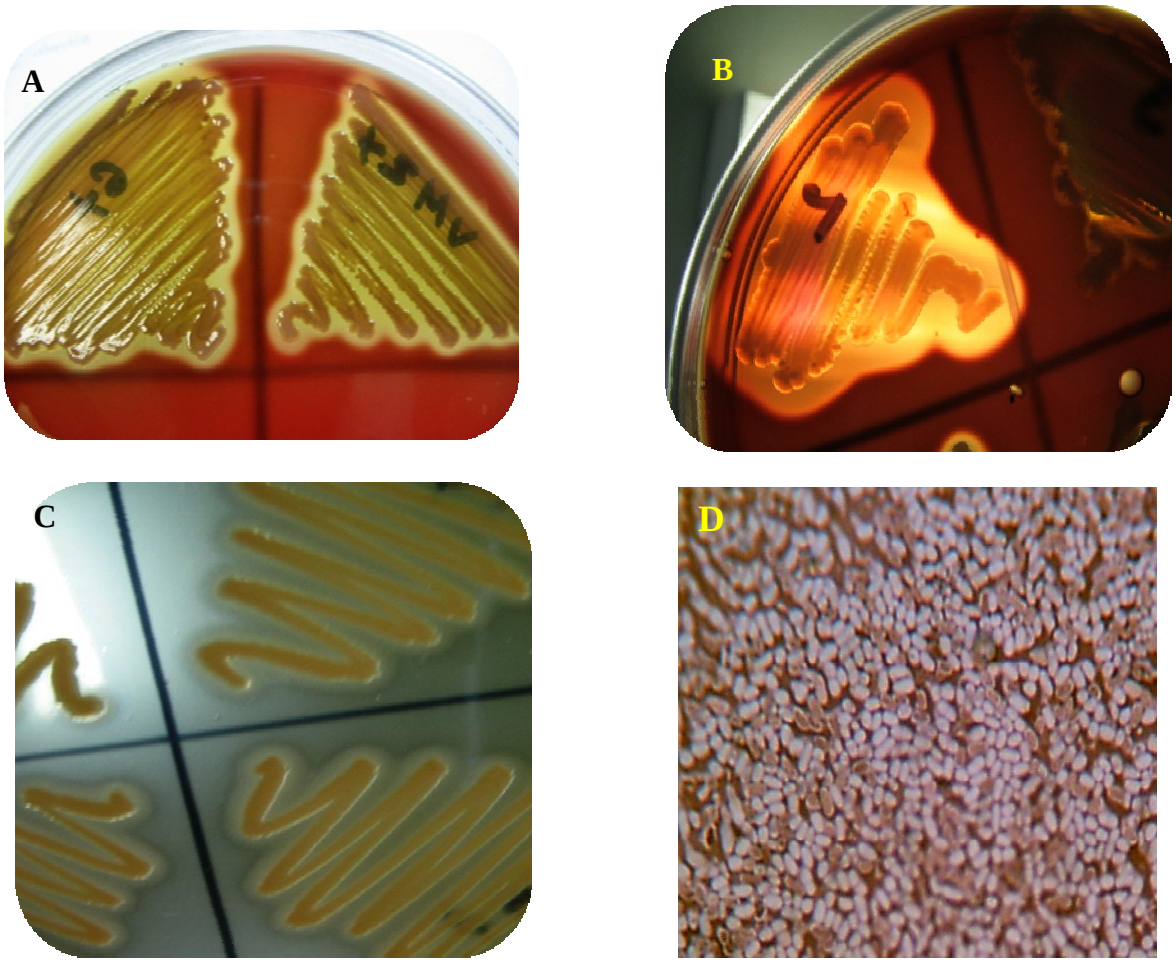


Figura 11. Pruebas fenotípicas de *V. vulnificus.* En el panel A y B se observa actividad hemolítica de *V. vulnificus* sobre los eritrocitos de carnero, panel C producción de lipasas y lecitinasas en medio yema de huevo y en el panel D se observa la presencia de cápsula (tinción negativa con nigrosina)

Al relacionar la producción de algunas enzimas como factores asociados a la virulencia con la morfología colonial de las cepas de *V. vulnificus*, se observó que las 49 cepas con morfología colonial opaca expresaron la producción de proteasas, lecitinasa, presencia de cápsula, β hemólisis en eritrocitos de carnero y conejo, el 96% DNasa y gelatinasa, en tanto que el 94 % produjo lipasa (Anexo 5).

De las 23 colonias opacas procedentes de las muestras de ostión, el 91% (21/23) produjo las enzimas probadas; en cuanto a las provenientes de agua, sólo 92% (24/26) fueron positivas en un 100% en la producción de las enzimas examinadas (Figura 12).

En relación con los resultados de las cepas que desarrollaron colonias traslúcidas, ninguna de las cepas dio positivo en todas las pruebas trabajadas tanto de las muestras de ostión como de las de agua.

La producción de las enzimas de las 19 cepas fue la siguiente: el 100% produjo proteasas, lecitinasa, gelatinasa y hemólisis en eritrocitos de conejo; el 89% DNasa; el 84% hemólisis en eritrocitos de carnero; el 37% lipasa, y sólo en el 5% se observó cápsula.

En lo que respecta a la cepas que presentaron ambos tipos de morfología colonial, el 27% (7/26) provenía de ostión y el 73% (19/26) de agua. De las 26 cepas con ambas morfologías, el 62% (16/26) presentó el 100% de las pruebas positivas.

La expresión de las enzimas de las 26 cepas fue: el 100% (26/26) para proteasas y gelatinasas, presencia de cápsula y β hemólisis en eritrocitos de carnero y de conejo; el 92% (24/26) lecitinasa; y el 85% (22/26) DNasa y lipasa (Anexos 6 y 7).

En los cuadros 17 y 18 se observa la distribución de las 59 cepas de *Vibrio vulnificus* con características de virulencia; el 47.5% fue de ostión y el 52.5% correspondió a

las muestras de agua. Asimismo, el 78% de las cepas procedía de las colonias con morfología opaca, el 5% de las colonias con morfología translúcida y el 17% de las colonias con ambas morfologías. Las cepas se aislaron preferentemente en los meses de marzo a septiembre (Anexos 5, 6 y 7).

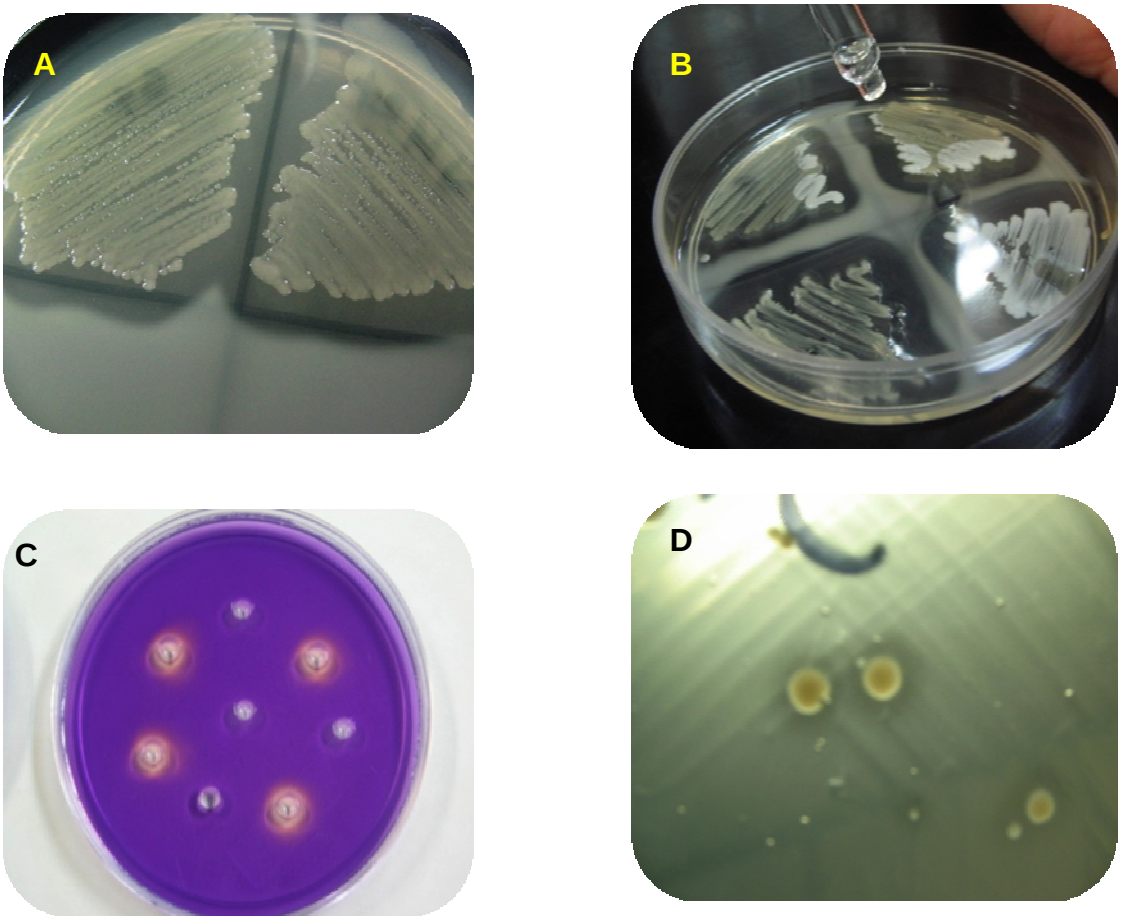


Figura 12. Pruebas fenotípicas de *V. vulnificus.* Panel A y B actividad de proteasas (halos de hidrólisis en gelosa leche descremada y agar gelatina respectivamente); panel C producción de DNasas (halo rosa en la gelosa DNA-azul de toluidina) y panel D producción de lipasas en medio yema de huevo.

Cuadro 17. Correlación de las cepas que mostraron producción de algunos factores de virulencia con la morfología colonial tipo de muestra y mes

Morfología colonial	Producto	Mes												
		M	A	Ma	J	Ju	A	S	O	N	D	E	F	M
Opaca	Ostión	2	2	5	4	3	2	1	0	0	1	0	0	2
	Agua	2	3	4	3	4	2	1	0	0	0	0	1	4
Translúcida	Ostión	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Agua	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambas	Ostión	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	Agua	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL		6	8	11	9	9	4	2	0	0	1	0	1	8

M = MARZO, A = ABRIL, MA = MAYO, J = JUNIO, JU= JULIO, A = AGOSTO, S= SEPTIEMBRE, O = OCTUBRE N= NOVIEMBRE. D= DICIEMBRE

Cuadro 18. Número de cepas que mostraron producción de algunos factores de virulencia de acuerdo al tipo de muestra y mes

Mes	Tipo de muestra		Total
	Ostión	Agua	
Marzo	2	4	6
Abril	4	4	8
Mayo	6	5	11
Junio	5	4	9
Julio	4	5	9
Agosto	2	2	4
Septiembre	1	1	2
Diciembre	1	0	1
Febrero	0	1	1
Marzo	3	5	8
Total	28	31	59

De las 94 cepas trabajadas, el 26% (24/94) proveniente de ostiones y el 39% (37/94) proveniente de agua presentaron el 100% de los factores asociados a la virulencia, mientras que el 35% (33/94) no expresó uno o dos de ellos (Anexos 8, 9 y 10).

6 DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento microbiológico

Se analizaron un total de 299 muestras en las cuales se aisló *Vibrio* sacarosa negativo en un intervalo de 50 $x10^3$ a 400 $x10^3$ UFC/g y 40 $x10^3$ a 300 $x10^3$ UFC/mL en las muestras de ostión y agua respectivamente (Cuadros 5 y 6; Anexos 1 y 2). Estos datos son similares a los reportados por Mahmud y colaboradores en 2008, quienes encontraron una concentración de 10^2 a 10^6 UFC/g y de 0 a 10^4 UFC/mL en ostiones y agua respectivamente. Por otro lado, en 2009 Silva y colaboradores reportaron de 25 a 590 x 10^5 UFC/g en ostiones. Los resultados demuestran que la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz reúne las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de las bacterias del género *Vibrio*.

Este estudio revela la presencia de *V. vulnificus* en el 31% de las muestras recolectadas en la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz; el 13% correspondió a muestras provenientes de ostión y el 18% a las muestras provenientes de agua confirmadas por la amplificación del gen *vvhA* (Cuadros 7 y 8; Anexo 3).

En 1990 se informó que esta bacteria se aisló en el 19.2% de las muestras de agua y bivalvos (O'Neill *et al.,* 1990). Otros autores señalan su presencia en el 12% de los ostiones analizados (Matté *et al.*, 1994). En 2002 Cook y colaboradores encontraron *V. vulnificus* en el 49% de los ostiones, todos ellos provenientes del Golfo de México. Otros estudios demuestran la existencia de *V. vulnificus* en el 16.9% de los ostiones colectados en las costas de los océanos Atlántico y Pacifico y en las del Golfo de México (Motes *et al.*, 1998). En un trabajo desarrollado en 2004 en la India, se informa que el 56% de las muestras de ostiones contenía *V. vulnificus* (Parvathi *et al*., 2004); por otra parte, en 2010 Chen y colaboradores aislaron *V. vulnificus* en 67 de 122 muestras de ostiones analizadas en el sur de China.

Los moluscos bivalvos se alimentan por medio de un mecanismo de filtración. Este

sistema de nutrición permite acumular una gran cantidad de microorganismos y otros elementos presentes en el ambiente donde los bivalvos se desarrollan (Brown & Dorn, 1977). *V. vulnificus* es resistente a los procesos de depuración, lo cual es un procedimiento efectivo en la eliminación de otras bacterias en los moluscos bivalvos (Jones *et al.*, 1991; Chae *et al.,* 2009).

Se ha observado que diversos factores como la temperatura, el pH, la salinidad, el incremento de la materia orgánica y las cantidades de oxígeno y luz que recibe el medio acuático son factores predominantes para la fluctuación de las poblaciones de *V. vulnificus*; como consecuencia de esto, el número varía en los moluscos (Pruzzo *et al*., 2005; Smith & Oliver, 2006).

En todos los puntos de muestreo y durante todos los meses del año en el que se llevó a cabo este estudio, fue posible aislar *V. vulnificus* tanto en agua como en ostiones, salvo en el punto llamado Puente Hondo, donde no se recolectaron muestras de ostiones. Con el análisis estadístico respectivo, se encontró que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo en relación con los aislamientos en las muestras de agua.

En el caso de los ostiones, se encontró una diferencia significativa entre los puntos El Bajo y Medianía; en el primero existe un mayor número de muestras positivas, lo que se puede explicar si consideramos los asentamientos humanos que están cerca, lo cual conlleva un aumento en la materia orgánica y la presencia de aves, lo que favorece la proliferación de la biota presente, incluida *V. vulnificus.* Estas consideraciones no tiene impacto en el punto llamado Medianía, ya que se encuentra en la parte central de la laguna.

V. vulnificus ha sido aislado del contenido intestinal de una gran variedad de aves del área del Golfo de México (Hoi *et al*., 1998). En la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz

se puede encontrar una diversidad de aves, dentro de ellas los cormoranes (*Phalacrocorax* spp).

Se ha reportado que la presencia abundante de estas aves en las granjas de mejillones puede ser de gran importancia para la prevalencia de *V. vulnificus*. La hipótesis que se maneja es que: “Los mejillones contaminados con este microorganismo son consumidos por los cormoranes, la bacteria puede sobrevivir y replicarse en el intestino de las aves y regresar al ambiente en sus heces”. La temperatura del cuerpo de las aves es de 41-42°C, temperatura a la cual *V. vulnificus* se desarrolla muy bien (Hoi *et al*., 1998).

6.2 Efecto estacional

El número mayor de UFC de *V. vulnificus* se obtuvo en el mes de marzo, en muestras de agua; y en junio, para ambas muestras (Cuadros 9 y 10). Este fenómeno se presentó cuando la temperatura y la salinidad del agua se encontraba, durante el mes de marzo, entre 22.5ºC y 20.7 UPS respectivamente y para el mes de junio en 31ºC y 20.4 UPS (Cuadros 11 y 12).

Se ha señalado que este microorganismo se encuentra en las costas del Golfo de México, en ostiones y agua durante la época de lluvias o cuando la temperatura del agua se encuentra por arriba de 23°C (Motes *et al*., 1998). Por ello, se sugiere que la superficie del agua provee tanto la temperatura como los nutrientes adecuados para el crecimiento de *V. vulnificus* durante el verano (Kelly, 1982; Parvathi *et al*., 2004; Kim *et al.,* 2010).

La época de verano incluye un aumento en las temperaturas medias y, en el caso del Golfo de México, la presencia de los vientos alisios y grandes cantidades de precipitación pluvial, lo que trae consigo la disminución de la salinidad y movimientos en las masas de agua (De la Lanza, 1998).

Al hacer el análisis estadístico comparando el efecto que tiene la época del año con las UFC, se encontró que hay diferencias significativas entre los meses de junio y noviembre y diciembre, en los aislados de agua y ostiones, lo que indica que la época del año influye en el aislamiento de este microorganismo; es decir, que es más probable el aislamiento de *V. vulnificus* en los meses calurosos, lo que coincide con lo descrito en 2008 por Mahmud y colaboradores, quienes señalan que la abundancia de *Vibrio vulnificus* es mayor cuando la temperatura del agua se encuentra entre 20 y 29°C, como es el caso de la laguna en estudio. Este comportamiento se ha observado también en otros países, como Taiwán, Japón y Estados Unidos (Hoi *et al*., 1998; Kaysner *et al*, 1987; Kim *et al.,* 2010) y en Dinamarca, Suecia, Alemania, Bélgica y Holanda (Dalsgaard *et al.*, 1996).

Estudios ambientales muestran que los ostiones pueden contener esta bacteria en un nivel de 10^3 a 10^4 UFC/g durante el verano y que la temperatura correlaciona con los niveles de este microorganismo (Warner & Oliver, 2008).

El decremento en la frecuencia de su aislamiento en agua de estuario en los meses de invierno se ha sugerido como una adaptación a la época invernal, en donde las células se depositan en el sedimento encontrando condiciones más favorables para su supervivencia (DePaola *et al*., 1994; Tamplin *et al*., 1994; Warner & Oliver, 2008).

6.3 Efecto de la salinidad y temperatura

En la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, tanto las temperaturas como las salinidades determinadas mensualmente durante un año, en los doce puntos de muestreo, se ubicaron dentro de los intervalos señalados por Wrigth y colaboradores (1996) (Cuadros 11 y 12). Dichas temperaturas no descendieron más allá de los 15°C y se logró el aislamiento de *V. vulnificus.* El menor número de muestras positivas se tuvo entre los meses de septiembre a diciembre de 2002 y febrero del 2003 (Cuadro 7). La temperatura de septiembre a febrero osciló entre 17 y 32ºC (Cuadro 11).

Se ha sugerido que el número de organismos en los ostiones está fuertemente correlacionado con la temperatura. Estudios realizados por Gooch y colaboradores (2001) demuestran que la población de *V. vulnificus* en estos alimentos se incrementa de 10 a 100 veces en 10 horas durante los meses cálidos. Por otra parte, las salinidades superiores a 25 UPS tienen un efecto negativo en el número de *V. vulnificus* en los ostiones (Motes *et al.,* 1998; Bross *et al.,* 2007; Mahamud *et al.,* 2008).

Algunos trabajos sobre la presencia de esta bacteria en agua demuestran una fuerte correlación con la temperatura del agua, como lo han reportado otros autores, según los cuales el aislamiento de *V. vulnificus* se ve favorecido cuando la temperatura del agua se encuentra por encima de los 20ºC (O'Neill *et al*., 1992; Wright *et al*., 1996 y 2007).

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios sobre los intervalos de temperatura y salinidad en los que se puede encontrar *V. vulnificus.* Éste se ha aislado de aguas cuya temperatura se halla entre 8 y 31°C y su salinidad entre 1 y 34 UPS (Wright *et al.*, 1996). En otras investigaciones se informa que este microorganismo se encuentra en salinidades entre 5 y 17 UPS, dato que en estudios previos se reportó como el intervalo óptimo para la presencia de esta bacteria (Kelly, 1982).

Algunos autores señalan quea temperaturas entre 15 y 27°C y niveles de salinidad entre 8 y 14 UPS favorecien el aislamiento de *V. vulnificus* (DePaola *et al.*, 1994; Hoi *et al*., 1998). Sin embargo, también se ha podido aislar cuando la temperatura oscila entre 17 y 31°C con una salinidad de entre 15 y 25 UPS (O´Neill *et al.,* 1992; Pfeffer *et al.*, 2003).

Para el estudio de estas relaciones, Wright y colaboradores, 1996, utilizaron el modelo de regresión múltiple, en el cual las cuentas de *V. vulnificus* de la Bahía de Chesapeake en muestras de agua, correlacionaron inversamente con la salinidad.

Sin embargo, en otros estudios esta bacteria fue detectada en áreas con altas salinidad, como son el Océano Atlántico y el Golfo de México, por lo que la correlación entre la salinidad y concentración de esta bacteria no es clara (Mahmud *et al.,* 2008). Esto también se ve reflejado en el trabajo presente ya que, al aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (H), se encontró que *V. vulnificus* tiene preferencia por salinidades y temperaturas elevadas.

6.4 Factores asociados a la virulencia

La presencia de factores asociados a la virulencia en *V. vulnificus* es un hecho reconocido; sin embargo, la patogénesis de su infección aún está poco estudiada. Al igual que otras bacterias patógenas, los factores de patogenicidad incluyen tanto componentes estructurales como extracelulares (Bross *et al.,* 2007).

6.4.1 Efecto citotóxico y actividad hemolítica

De las 94 cepas analizadas, el 43% (40/94) se ubicó en el intervalo máximo de 75 a 100% de destrucción de la monocapa celular, el 32% (30/94) del 50 al 75% y el 26% (24/94) entre el 30 y el 50%. El 42.5% (17/40), correspondió a las muestras de ostión y el 57.5% (23/40) a las de agua. El efecto citotóxico producido por las cepas de *V. vulnificus* aisladas de muestras de ostión y agua demuestra su capacidad virulenta, aun cuando no todas las cepas destruyan al 100% de la monocapa en la línea CHO a las 10 horas de exposición (Cuadros 13 y 14; Figura 9) .

La única información sobre el efecto citotóxico de la toxina de *V. vulnificus* es la aportada por Kreger y Lockwood (1981), quienes reportaron que a las 24 horas de incubación se tenía un efecto de arredondamiento de las células, efecto que no se observó con las cepas analizadas. El mecanismo de acción propuesto para la citotoxicidad de esta bacteria es la secreción de la hemolisina (*vvh*A), la cual se une a la membrana y se oligomeriza formando poros de 3 nm, lo que induce la ruptura de la célula por un shock osmótico (Kashimoto *et al.,* 2009).

El 100% (94/94) de las cepas estudiadas fueron hemolíticas para los eritrocitos de conejo y el 99% (93/94) para los eritrocitos de carnero (Figura 17), datos similares a los obtenidos por García y Landgraf (1998), quienes reportan el 96.2% de actividad hemolítica en eritrocitos de carnero. Se ha señalado que la citolisina puede lisar glóbulos rojos de diversas especies animales a través de la formación de poros en la membrana citoplásmica (Gulig *et al.,* 2005; Kashimoto *et al.,* 2010), además de tener actividad citolítica contra algunas líneas celulares (Choi *et al.,* 2002).

Esta hemolisina provoca permeabilidad vascular, cambios morfológicos y disfunción de las estructuras vasculares del pulmón, y su efecto probado en el endotelio de arteria pulmonar muestra que fragmenta el ADN y reduce los niveles de NAD^+ y ATP, lo cual da como resultado la muerte celular (Kwon *et al.*, 2001; Rho *et al.,* 2002).

6.4.2 Adherencia a la línea celular HEp-2

El 99% de las cepas de *V. vulnificus* presentó adherencia en la línea celular HEp-2; no se observa correspondencia con el mes de aislamiento, con el tipo de muestra y con el efecto citopático (Cuadro 15; Figura 10; Anexo 4).

No se cuenta con referencias bibliográficas sobre estudios de adherencia en esta bacteria; sin embargo, en otros miembros del género *Vibrio*, como es el caso de *V. cholerae*, para que se produzca el cuadro clínico se necesita la adherencia del microorganismo al epitelio intestinal, por lo cual la adherencia es una fase importante para que se inicie la colonización del patógeno (Afsar *et al*., 2002).

Se señala que el pili es el factor que ayuda a *V. vulnificus* en la adhesión (Gander & LaRocco, 1989; Paranjpye *et al*., 2007). Strom y Paranjpye (2005) identificaron que *V. vulnificus* puede, mediante la presencia del Pili, formar biofilm en superficies abióticas. Tiene un flagelo polar constituido de diversas flagelinas con actividad citoadherente (Jong-Ho *et al*., 2004; Kim & Rhee, 2003). En este año Lee y colaboradores demostraron que *V. vulnificus* tiene una lipoproteína de unión a

membrana (llpA) que desempeña un papel importante en la adherencia a la línea celular INT-407.

Los datos de citotoxicidad y adherencia obtenidos tienen una distribución que no permite hacer un análisis estadístico para ponderar su actividad con respecto a la época del año, el punto de muestreo, el tipo de muestra y los factores ambientales como salinidad y temperatura.

6.4.3 Morfología colonial

De las 94 cepas trabajadas, el 51% (48/94) tuvo morfología colonial opaca, el 20% (19/94) traslúcida y el 28% (26/94) opaca y translúcida (Anexos 5, 6 y 7), datos similares a los reportados por García y Landgraf (1998). Las diferencias en la morfología colonial opaca y traslúcida de las cepas se ha relacionado con la capacidad de virulencia, ya que las cepas opacas son encapsuladas mientras que las traslúcidas no tienen material capsular (Cuadro 16) (Grau *et al.,* 2005; Jones & Oliver, 2009).

En diversos estudios se ha señalado que las cepas rugosas o de morfología colonial opaca son capaces de formar películas que permiten al microorganismo persistir en condiciones nutricionales deficientes o no favorables para su desarrollo; además, son altamente resistentes a la acción del complemento y virulentas en modelos animales (Tsuchiya *et al.,* 2007*;* Hilton *et al.,* 2006). Con base en estas características, la forma rugosa de *V. vulnificus* puede tener un papel importante no sólo en la patogénesis en seres humanos, sino también en la supervivencia en el ambiente (Grau *et al.*, 2005).

6.4.4 Cápsula

En el 80.9% de las cepas se observó la cápsula (Figura 11; Anexos 8, 9, 10). Se ha descrito que esta bacteria produce un polisacárido semejante al capsular (Hayat *et al*., 1993), señalado como el principal factor de virulencia (Simpson *et al*., 1987; Grau

et al., 2008). No existe un estudio en el cual se señale la frecuencia de esta estructura en cepas ambientales; sin embargo, se ha indicado que hay una correlación entre la presencia de cápsula y la virulencia (Grau *et al.,* 2008; Jones & Oliver, 2009).

El polisacárido capsular (CPS) es vital en la virulencia de *V. vulnificus* ya que lo protege de la acción del complemento y la fagocitosis (Stom & Paranjpye, 2000; Nakhamchik *et al*., 2008). Estimula además la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias *in vivo* y puede activar las células mononucleares de la sangre periférica (Powell *et al.*, 1997).

Kashimoto (2003) informó que *V. vulnificus* induce apoptosis en macrófagos, así como la evasión de la fagocitosis *in vivo*, por lo que la capacidad de este microorganismo de matar este tipo de células parece ser muy importante en la iniciación de la infección y el desarrollo de la patogénesis.

6.5 Enzimas

En estudios recientes sobre *V. vulnificus* se ha identificado la expresión de enzimas que actúan como factores de virulencia provocando daño tisular, permeabilidad vascular, lo que colabora con su capacidad invasiva; entre ellos se encuentran: proteasas, elastasa, hiauronidasa (Wu *et al.*, 2001), lecitinasa, fosfolipasas, mucinasa (García & Landgraf, 1998), metaloproteasa (Miyoshi & Shinoda, 1992; Shao & Hor, 2000), condroitina sulfatasa (Oliver *et al*., 1986), colagenasa y la producción de compuestos con actividad citolítica y proteolítica (Rodrigues *et al.,* 1992).

6.5.1 Proteasa

El 100% (94/94) de las cepas analizadas tuvo actividad proteolítica en leche descremada y el 98% (92/94) en gelatina (Figura 12), datos muy similares a los reportados por García y Landgraf (1998) y Rodrigues y colaboradores (1992),

quienes reportan 99% y 100% de cepas proteolíticas respectivamente (Anexos 8, 9, 10).

V. vulnificus secreta una metaloproteasa dependiente de zinc de 45 KDa (Miyoshi *et al.*, 1997; Jeong *et al.,* 2000); originalmente se descubrió por su actividad de colagenasa (Smith & Merkel, 1982) y más adelante se demostró que tiene, además, diversas actividades como elastasa y caseinasa (Kothary & Kriger, 1985; Kawase *et al.,* 2004). La inyección de esta proteasa purificada produce muchos de los aspectos observados en la enfermedad causada por *V. vulnificus*, incluyendo dermonecrosis, destrucción del tejido, edema y ulceración a través de la digestión de la membrana basamental muscular, en especial el colágeno tipo IV que forma parte de las proteínas de membrana (Miyoshi, 2006). Su capacidad de provocar edema se explica por su habilidad para liberar histamina de las células plasmáticas, provocando un incremento en la permeabilidad vascular a través de la activación del factor Hageman y la generación de bradicinina (Miyoshi & Shinoda, 1992), así como por la diseminación intravascular de la bacteria (Maruo *et al.,* 1998; Miyoshi, 2006).

6.5.2 Lipasa/lecitinasa

La producción de lipasa se observó en el 80% (75/94) de las cepas, y de lecitinasa en el 98% (92/94) (Figuras 11 y 12). Rodrigues y colaboradores (1992), informan que el 100% de sus cepas producía lecitinasa, al igual que García y Landgraf (1998), pero estos últimos además señalan que el 97% fueron lipolíticas (Anexos 8, 9, 10).

Dentro de las proteínas extracelulares producidas por *V. vulnificus* se encuentran las lipasas, de las cuales se ha sugerido que pueden proveerle nutrientes y energía; se consideran un factor de virulencia ya que incrementan los movimientos de los granulocitos humanos y afectan el funcionamiento del sistema inmunológico a través de la generación de ácidos grasos de cadena larga insaturada. Estudios en *Pseudomonas aeruginosa* han demostrado que la lipasa desempeña un papel importante en la virulencia ya que puede degradar los fosfolípidos de la superficie del

pulmón, lo que promueve la invasión (Konig *et al.,* 1996), lo que sugiere que las lipasas pueden tener un papel importante en la patogénesis de *V. vulnificus* (Su *et al.,* 2004).

Las lecitinasas no son muy específicas y atacan triglicéridos con ácidos grasos de cadena variable, las cuales se clasifican (A, B, C y D) de acuerdo con el enlace éster que rompen. La fosfolipasa C rompe el enlace éster del fosfato y, en consecuencia, se liberan ácidos grasos y glicerol (Madigan *et al.*, 2004). Se ha señalado que las lecitinasas son factores asociados a la virulencia en diversas bacterias (Schmiel & Miller, 1999). Estas permiten al microorganismo invadir el tejido del hospedero por la destrucción de las membranas celulares, con el resultado de lisis celular (Koo *et al.,* 2007; Manilal *et al.,* 2010).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, ésta tiene un papel importante en la virulencia ya que causa destrucción masiva de tejido, produciendo gangrena gaseosa y daño al pulmón (Konig *et al.,* 1996; Koo *et al.,* 2007), algo semejante puede suceder en la infección por *V. vulnificus.*

6.5.3 Nucleasa

El 91% (86/94) dio positivo en la prueba para DNasa (Figura 12), un dato similar al de García y Landgraf (1998), quienes reportaron el 97%; Rodrigues y colaboradores (1992) informan el 100%. Esta nucleasa pertenece a la familia de nucleasas extracelulares y tiene la capacidad de degradar tanto el DNA como el RNA (Li *et al.,* 2003). La degradación del DNA proporciona al microorganismo una fuente de carbono y nitrógeno que le permite multiplicarse en el sitio de la infección (Wu *et al.*, 2001). Esta nucleasa es muy similar a la producida por *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Aeromonas hydrophila* (Gulig *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, no se han llevado a cabo estudios acerca del papel de la DNasa durante la infección en cepas de *V. vulnificus;* sin embargo, esta enzima es muy

importante en *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* para el establecimiento y mantenimiento de la infección, y poco se sabe de su papel en la patogénesis (Podbielski *et al*., 1996; Eriksson *et al.,* 1999).

7 CONCLUSIONES

La importancia de este trabajo radica en que se informa, por primera vez en México, de la presencia de *V. vulnificus* en agua y ostiones. Los resultados demuestran que la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, reúne las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de *V. vulnificus* e identificado mediante el gen vv*hA* y bioquímicamente como Biotipo 1.

Asimismo, fue posible ponerlo en evidencia en todos los puntos de muestreo y durante todos los meses en que se desarrolló la investigación. El mayor número de muestras positivas se obtuvo en los meses de mayo a julio, a temperaturas por arriba de 24°C, lo que significa que es mayor la posibilidad de aislarlo en los meses calurosos Por lo que toca a la salinidad, el microorganismo se desarrolla mejor con salinidades arriba de 18 UPS.

Las 94 cepas de *V. vulnificus* aisladas, pueden provocar daño a personas sanas o inmunocomprometidas aun cuando no expresen el 100% de los factores estudiados asociados con la virulencia. Esto significa que puede ser causante de enfermedades, tanto en manejadores de productos de la pesca, como en los consumidores. Por lo anterior, debería hacerse obligatorio informar de casos en los que se presente septicemia y daño en piel cuando la historia clínica indique que se han ingerido productos de la pesca, esto coadyuvará a determinar la importancia epidemiológica de *Vibrio vulnificus*.

8 PERSPECTIVAS

Aún cuando hace 30 años se aisló e identificó por primera vez a *V. vulnificus,* y se han descrito su genoma y algunos factores de virulencia, a la fecha todavía existen preguntas sin respuesta como:

- ¿Cuál es su mecanismo de patogenicidad?
- ¿Cuál es el receptor en las células huésped?
- ¿Cuáles son las condiciones ambientales o las señales externas que lo inducen a encender los genes de patogenicidad?
- ¿A qué se debe que se observe daño en piel cuando *V. vulnificus* fue ingerido en alimentos?
- ¿Por qué cuando un hombre sano se infecta a través de una herida se presenta la sintomatología, no así cuando lo ingiere?
- ¿A qué se debe que tenga la capacidad de multiplicarse muy rápidamente cuando se encuentra en el tejido del huésped?

9 REFERENCIAS

Afsar, A., H. R. Mohammed, and D. K. R. Karaolis. 2002. High-Frequency Rugose Exopolysaccharie Production by *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 69(11):5773-5778

Altekruse, S. F., R. D. Bishop, L. M. Baldy, S. G. Thompsom, S. A. Wilson, B. J. Ray, and P. M. Griffin. 2000. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of México region: the role of raw oysters. Epidemiol. Infect. 124:489-495.

Anonimo. 1982. *Plan de desarrollo urbano de Pueblo Viejo, Veracruz (PDUP)*. Gobierno del Estado de Veracruz. H. Ayuntamiento de

Arnold, M., M. L. Woo, and G. L. French. 1989. *Vibrio vulnificus* septicemia presenting as espontaneous necrotising cellulitis in a woman with hepatic cirrhosis. Scand. J. Infect. 21: 727-731.

Ashrafian, H. 2003. Hepcidin: the missing link between hemochromatosis and infections. Infect. Immun. 71: 6693-6700.

Bang, W., and M. A. Drake. 2005. Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* and subsequent impact on stress tolerance. Food Microbiol. 22:301-309.

Bang, Y. B., S. E. Lee, J. H. Rhee, and S. H. Choi. 1999. Evidence that expression of the V*ibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. J. Bacteriol. 181: 7639-7642

Barradas, H., E. Bárzana, and S. Bermejo. 1993. Diagnóstico sobre la situación de la protección de los alimentos en México. Secretaria de Salud OPS. PMS México

Biosca, E.G., C. Amaro, C. Esteve, E. Alcaide, and E. Garay. 1991. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel *Anguilla anguilla* L. J. Fish .Dis 14: 103-109.

Bisharat, N., D. I. Cohen, R. M. Harding, D. Falush, D. W. Cook, T. Peto, and M. C. Malden. 2005. Hybrid *Vibrio vulnificus*. Emerg. Infect. Dis. 11: 30-35

Bisharat, N., V. Agmon, R. Finkelstein, R. Raz, G. BenDror, L. Lerner, S. Soboh,

R. Colodner, D. N. Cameron, D. L. Wykstra, and J. J. Farmer. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogrup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Lancet 354:1421-1424.

Blake, P. A., M. H. Merson, R. E. Weaver, D. G. Hollis, and P. C. Heublein. 1979. Disease caused by a marine vibrio. New Eng. J. Med. 300.

Bonner, J. R., A. S. Coker, C. R. Berryman, and H. M. Pollock. 1983. Spectrum of *Vibrio* infections in a gulf coast community. Ann. Inter. Med. 99: 464-469.

Bross, M. H., K. Soch, R. Morales, and R. B. Mitchell. 2007. *Vibrio vulnificus* Infection:Diagnosis and Treatment. American Family Physician. 76:539-544.

Brown, l. D., and C. R. Dorn. 1977. Fish shellfish and human health. J. Food Protec. 40:712-717

Carlton, M. V. and J. L. Herrera. 1997. *Vibrio vulnificus* infection : An important cause of septicemia in patients with cirrhosis. South. Med. J. 90: 1040-1042

Castañon, G. J. A., L. L Martinez, R. R. Miranda, R. E Torres, and G. M. A. Leon. 2000.*Vibrio vulnificus* Infection in Mexico: Report of Fatal Case. Revista Medica Instituto Mexicano del Seguro Social: *38*

Center for Disease Control and Prevention (CDC)**.** 1996. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters—Los Angeles, 1996. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 45:621-624.

Center For Disease Control and Prevention (CDC). 2005. *Vibrio* illnesses after hurricane Katrina-multiple states, august-september 2005. Morb. Mortal. Wkly. Rep 54:1-4.

Chae, M. J., D. Cheney, and Y. C. Su. 2009. Temperature Effects on the Depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American Oyster (Crassostrea virginica). J. Food Sci. 74:62-66.

Chen, Y. C., M. C. Chang, Y. C. Chuang, and C. L. Jeang. 2004. Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. Curr. Microbiol. 49: 175-179.

Chiang, S .R., and Y.C. Chuang. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: Clinical

manifestations, pathogenesis, and antrimicrobial therapy. J. Microbiol. Immun. Infect.. 36:81-88.

Choi, H. K., N. Y. Park, D. Kim, H. J. Chuang, S. Ryu, and S. H. Choi. 2002. Promoter analysis and regulatory characteristics of *hBA* encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus* . J. Biol Chem. 277: 47292-47299.

Choi, M., H. Sun, R. Y. Park, Y. H. Bai, Y. Y. Chung, C. M. Kim, and S. H. Shin. 2006. Human serum albumin enhaces the hemolytic activity of *Vibrio vulnificus*. Biol. Pharm .Bull. 29: 180-182

Chong, Y. M., Y. Park, S.Y. Lee, K.S. Kim, and S.I. Lee. 1982. *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with liver cirrhosis. Yon. Med. J. 23: 146-152.

Chou, K. T. N. K., W. N. Chao, C. Yang, R. H. Wong, K. C. Ueng, and S. C. Chen. Predictors of Mortality in Skin and Soft-tissue Infections Caused by *Vibrio vulnificus.* World J. Surg. DOI 10.1007/s00268-010-0455-y.

Chuang, Y. C., C. Y. Yuan, C. Y. Liu, C. H. Lan, and A. H. Huang. 1992. *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. Clin Infect Dis.15:271-276.

Clark, G. L. 1973. Stainig procedured by the biological stain. Commission 3era Ed. Baltimore, Williams and Wilkings.

Contreras, E. F. 1988. Las lagunas costera mexicanas. 2da. ed. CECODES, México, 263 p.

Cook, D. W. 1994. Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in post harvest Gulf Coast shellstock oysters. Appl. Environ. Microbiol. 60: 984-988.

Cook, D. W., P. O´Leary, J. C. Hunsucker, E .M. Sloan, J. C. Bowers, R. J. Blodgett, and A. DePaola. 2002 *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. U.S. retail shell oyster: a national survey from June 1998 to July 1999. J. Food Protec. 65:79-87.

Cornejo, J. P., A. L. M. Rolon, and J. O. Sifuentes. 2000. Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus*. Serie de casos. Rev. Invest. Clin. 52 :632-637

Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe.1979. An adhesive factor

found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbilo 3**:** 95-99.

Crosa, J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore mediated iron transport in bacteria. Microbiol. Rev. 53: 517-530.

Dalsgaard, A. N., F. Moller, B. Bruun, L. Hoi, and J. L Larsen. 1996. Clinical manifestations and epidemiology of *Vibrio vulnificus* infections in Denmark. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 15: 227-231

De La Lanza, E. G., N. Sánchez-Santillán, and A. H. Esquivel. 1998. Análisis temporal y espacial fisicoquímico de una laguna tropical a través del análisis multivariado. Hidrobiol. 8: 89-96.

DePaola, A. G., M. Capers, and D. Alexander. 1994. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from de U.S Gulf Coast. Appl Environ. Microbiol. 60:984-988.

Elliot, E. I., C. A. Kaysner, L. Jackson, and M. L. Tamplin. 1998. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Chap 9. *In*: Food and Drug Administration, Association of Analytical Chemistry C. l. F. Bacteriology Analytical Manual. Washington, D.C., pp. 111-140.

Eriksson A., B. Eriksson, S. E. Holm, and M. Norgren. 1999. Streptococcal DNase B is immunologically identical to superantigen SpeF but involves separate domains. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6: 133–136.

Finlay. B. B., and S. Falkow. 1997. Common Themes in Microbial Pathogenicity Reviseted. Microbiol Mol Biol. Rev. 61: 136-169

Fouz, B., R. Mazoy, M. L. Lemos, M. J. Del Olmo, and C. Amaro. 1996. Utilization of hemin and hemoglobin by *Vibrio vulnificus* biotype 2. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2806-2810.

Gander, R. M., and M. T. Larocco.1989. Detection of piluslike structures on clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. J.Clin. Microbiol. 27:1015-1021

Garcia, M. L. M., and M. Landgraf. 1998 Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. J. Appl. Environ. Microbiol. 84:747-751

Grau, B. L., M. C. Henk, K. L. Garrison, B. J. Olivier, R. M. Schulz, K. L. O'Reilly, and G. S. Pettis. 2008. Further Characterization of *Vibrio vulnificus* Rugose Variants and Identification of a Capsular and Rugose Exopolysaccharide Gene Cluster. Infect. Inmun. 76:1485–1497.

Grau, B. L., M. C. Henk, and G. S. Pettis. 2005. High-frequency phase varation of *Vibrio vulnificus* 1003: isolation and characterization of rugose phenotypic variant. J. Bacteriol. 187:2519-2525

Gray, L. D., and A. S. Kreger. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus.* Infect. Immun. 48:62-72

Gulig, A. P., K. L. Bourdage, and A. M. Starks. 2005. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. J. Microbiol. 43: 118-131

Guo, Y., and D. A. Rowe-Magnus. 2010 Identification of a c-di-GMP-regulated polysaccharide locus governing stress resistance and biofilm and rugose colony formation in *Vibrio vulnificus*. Infect Immun. 78:1390-402

Han F., S. Pu, A. Hou, and B. Ge. 2009. Characterization of Clinical and Environmental Types of *Vibrio vulnificus* Isolates from Louisiana Oysters. Foodborne Pathogens Disease. 6:1251-1258

Hayat, U., G. P. Reddy, C. A. Bush, J. A. Johnson, A. C. Wright, and J. G. Morris. 1993. Capsular types of *Vibrio vulnificus*: An analysis strain from clinical and environmental sources. J. Infect, Dis. 167:758-762.

Hesselman, D. M., M. L. Motes, and J. P Lewis. 1999. Effects of a commercial heat-shock process on *Vibrio vulnificus* in the american oyster, *Crassostrea virginica*, harvested from the gulf coast. J. Food Prot. 62:1266-1269.

Hilton T., T. Rosche, B. Froelich, B. Smith and J. Oliver. 2006. Capsular Polysaccharide Phase Variation in *Vibrio vulnificus.* Appl. Environ. Microbiol. 72:6986–6993.

Hlady, W. G., and K. C. Klontz. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida. 1981-1993. J. Infect. Dis. 173: 1176-1183

Hlady, W. G., R .C. Mullen, and R. S. Hpkings.1993. *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption--Florida, 1981–1992. MMWR 42:405-407.

Hoffmann, M., E. W. Brown, P. C. H. Feng, C. E. Keys, M. Fischer, and S. R. Monday. 2010. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species. BMC Microbiol. 10:1-14.

Hoge, C. W., D. Watsky, R. N. Peeler, J. P. Libonati, E. Israel, and J. D. Morris Jr. 1989. Epidemiology and spectrum of *Vibrio* infections in a Chesapeake bay community. J. Infect. Dis. 160: 985-993.

Hoi, L., J. L. Larsen, I. Salsgaard, and A. Dalsgaard. 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish marine environmental. Appl. Environ. Microbiol. 64:7-13.

Hor, L. I., T. T. Chuang, and S. T. Wang. 1999. Survival of *Vibrio vulnificus* in whole blood from patients with cronic liver disease: association with phagocytosis by neutrophils and serum ferritin levels. J. Infect.Dis. 179: 275-278

Hsueh, P. R., C. Y. Lin, H. J. Tang, H. C. Lee, J. W. Liu, Y. C. Liu, and Y. C. Chuang. 2004. *Vibrio vulnificus* in Taiwan. Emerg. Infect. Dis. 10: 1363-1368.

Huang, S. F., and C. T. Chen. 2005. *Vibrio vulnificus* a rare but fulminant pathogen causing airway obstruction. Am. J. Emerg. Med. 23: 221-222.

Hui, K. C., F. Zhang, E. K. Timek, H. Bloom, and W. C. Lineweaver. 1999. Compartment syndrome of the forearm as the initial symptom of systemic *Vibrio vulnificus* infection. J. Hand Surg. 24A: 715-717.

Inoue, H. 2006. *Vibrio vulnificus* infection of the hand. J. Orthop. Sci. 11:85-87.

International Comission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1998. Microorganisms in Foods.6.Microbial Ecology of Foods Commodities. Blackie Acad & Profess. Press. London.

Janda, M. J., C. Powers, G. R. Bryan, and L. S. Abbot. 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clin. Microbiol. Rev. 1:245-267

Jenkins, R. D., and J. M. Johnston. 1985. Inland presentation of *Vibrio vulnificus*

primary septicemia and necrotizing fascitis. West. J. Med. 144: 78-80.

Jeong, K. C., H. S. Jeong, J. H. Rhee, S. E. Lee, S. S. Chung, A. M. Starks, G. M. Escudero, P. A. Guling, and S. H. Choi. 2000. Construction and phenotypic evaluation of a *Vibrio vulnificus vvpE* mutant for elastolytic protease. Infect. Immun. 68: 5096-5106.

Johnston, J. M., S .F. Becker, and L. M. Mcfarland. 1985. *Vibrio vulnificus*: man and the sea. JAMA. 253: 2850-2853

Johnston, J. M., W. A. Andes, and G. Glasser. 1983. *Vibrio vulnificus*: a gastronomic hazard. JAMA. 249: 1756-1758.

Jones, M. K., and J. D. Oliver. 2009. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. Infect. Inmun. 77:1723–1733.

Jong-Ho, L., B. R. Jong, P. Kyung-Je, K. B. Chang, H. Yang-Soo, H. Ch. Sang, L. Kyu-Ho, and P. Soo-Jung. 2004. Role of Flagellum and Motility in Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immune. 72:4905-4910

Jung, S. I., D. H. Shin, K. H. Park, J. H. Shin, and M. S. Seo. 2005. *Vibrio vulnificus* endophthalmitis occurring after ingestion of raw oyster. J. Infect. 51: e281-e283.

Kashimoto, T., S. Ueno, T. Koga, S. Fukudome, H. Ehara, M. Komai, H. Sugiyama, and N. Susa. 2010 The aromatic ring of phenylalanine 334 is essential for oligomerization of *Vibrio vulnificus* hemolysin. J. Bacteriol. 192:568-74

Kashimoto T., S. Ueno, H. Ehara, S. Fukudome, M. Komai, and N. Susa. 2009. Oligomerization is Essential for Apoptotic Activity of *Vibrio vulnificus* Hemolysin. *J. Vet. Med. Sci.* 71:1403–1406.

Kashimoto, T., S. Ueno, M. Hanajima, H. Hayashi, Y. Akeda, S. Miyoshi, T. Hongo, T. Honda, and N. Susa. 2003. *Vibrio vulnificus* induces macrophage apoptosis in vitro and in vivo. Infect. Immun. 71: 533-535.

Kaspar, C. W., and M. L. Tamplin. 1993. Effect of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Appl. Environ Microbiol. 59:2425-2429

Katz, B.Z. 1988. *Vibrio vulnificus* meningitis in a boy with talassemia alter eating raw oysters. Pedit. 82: 784-786.

Kawase, T. S., I. Miyoshi, Z. Sultan, and S. Shinoda. 2004. Regulation system for protease production in *Vibrio vulnificus*. FEMS. Microbiol. Let. 240: 55-59.

Kaysner, C. A., C. J. Abeyta, M. M. Wekell, A. DePaola, R. F. Stott, and J. M. Leitch. 1987. Virulence strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States west coast. Appl. Environ. Microbiol. 53:1349-1351

Kelly, M. L. 1982. Effect of temperature and salinity of *Vibrio* (Beneckea) *vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. Appl. Environ. Microbiol. 44:820-824

Kelly, M. T., and W. F. McCormick. 1981. Acute bacterial myositis caused by *Vibrio vulnificus*. JAMA. 246.

Kikawa, K., K. Yamasaki, T. Sujiura, H. Myose, M. Chinen, K. Tsutsumi, N. Iwao, and T. Dohzono. 1990. A successfully treated case of *Vibrio vulnificus* septicemia with shock. Jpn. J. Med. 29: 313-318.

Kim S., S. H. Kim, S. H. Kim, S. Jeon, and B. K. Lee. 2010. Assorted Ribotypes of *Vibrio vulnificus* Human and Environmental Isolates. J. Infect. Dis. 63:116-118.

Kim, J. J., K. J. Yoon, H. S. Yoon, Y. Chong, S. Y. Lee, C. Y. Chon, and I. S. Park. 1986. *Vibrio vulnificus* septicemia: report of four cases.Yonsei Med. J. 27: 307-313.

Kim, Y. R., and J. H. Rhee. 2003. Flagellar basal body *flg* operon as a virulence determinat of *Vibrio vulnificus*. Bioch. Biophy.Res.Comm. 304: 405-410.

Kitchens, C. S. 2009. Thrombocytopenia and thrombosis in disseminated intravascular coagulation (DIC). American Society of Hematology. 240-246.

Ko, W. C., Y. C. Chuang, G. C. Huang, and S. Y. Hsu. 1998. Infection due to non-O1 *Vibrio cholerae* in southern Taiwan: predominance in cirrhotic patients. Clin. Infect. Dis. 27: 774-780.

Konig, B., K. E. Jaeger, A. E. Sage, M. L. Vasil, and W. Konig. 1996. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelests, granulocytes and monocytes). Infect. Immun. 64: 3252-3258.

Koo, B.S., J. Lee, S. Kim, H. Yoon, K. Kim, K. Kwon, H. Kim, J. Park, and B. Park. 2007 Phospholipase A as a potent virulence factor of *Vibrio vulnificus* Int. J. Mol. Med. 20: 913-918.

Kothary, M. H., and A. S. Kreger. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 50: 534-540.

Kreger, A., and D. Lockwood.1981. Detection of extracellular toxin (s) produced by *Vibrio vulnificus.* Infect. Immun. 33:583-590

Kwon, K., J. Yang, D. Ryu, H. Roo, J. Kim, J. Park, H. Kim, and B. Park. 2001. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion.initiated apoptotic signaling pathwayin huma ECV304 cells. J. Biol . Chem. 276: 47518-47523.

Lachica, R. V. F., G. Genigeorgis, and D. Hoeprich. 1971. Metachromatic Agar-Diffusion Methods for Detecting Staphylococcal Nuclease Activity Appl. Environ. Microbiol. 21:585-587

Lee, K. J., N. Y. Lee, Y. S. Han, K. H. Lee, J. Kim, and S. J. Park. 2010 Functional characterization of the IIpa protein of *Vibrio vulnificus* as an adhesin and its rol in bacterial pathogenesis. Infect and Inmun. 78:2408-17.

Lee, K. K., H. T. Chiang, K. C. Yii, W. M. Su, and P. C. Liu. 1997. Effects of extracellular products of Vibrio vulnificus on Acanthopagrus schlegeli serum components in vitro and in vivo. Microbios. 92:209-17

Levine,. W. C, P. M. Griffin, and the Gulf Coast *Vibrio* working group. 1993. *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance. J. Infect. Dis. 167: 479-483.

Li, C. L., L. I. Hor, Z. F. Ghang, L. C. Tsai, W. Z. Yang, and H. S. Yuan. 2003. DNA binding and cleavaje by the periplásmic nuclease n: a novel structure with a known active site. EMBO J. 22:4014-4025.

Linkous, D .A., and J. D. Oliver. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. 174: 207-214.

Lipp, E. K., A. Huq, and R. R. Colwell. 2002 Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin. Microbiol. Rev. 15: 7557-770.

Livanis, M. C., M. K. Jones, and A. C. Wright. 2006. Genetic Variation in the *Vibrio*

vulnificus Group 1 Capsular Polysaccharide Operon .J. Bacteriol. 188: 1987–1998.

Madigan, M.T., M. Martinko, and J. Parker. 2004. The lipids nutrients microbians: 596-597**. In**: Brock Biology of Microorganism. Madigan, M.T., M. Martinko, J. Parker (Eds). Pearson Prentice Hall.

Mahmud, Z. H., S. B. Neogi, A. Kassu, B. T. M. Huong, I. K. Jahid, M. S. Islam and F. Ota. 2008. Occurrence, season alityand genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. FEMS Microbiol. Ecol. 64:209–218.

Manilal, A., S. Sujith, J. Selvin, C. Shakir, and R. Gandhimathi. 2010 Virulence of *Vibrios* Isolated from Diseased Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius J. W. Aqua Soc. 41 :332-343

Maruo, K., T. Akaike, T. Ono, and H. Maeda. 1998. Involvement of bradykinin generation in intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus* and prevention of invasion by a bradykinin antagonist. Infect. Immun. 66: 866-869

Matsumoto, K., K. Ohshige, N. Fujita, Y. Tomita, S. Mitsumizo, M. Nakashima, and H. Oishi. 2010. Clinical features of *Vibrio vulnificus* infections in the coastal areas of the Ariake Sea, Japan. J Infect Chemother. DOI 10.1007/s10156-010-0050-z.

Matté, G. R., M. H. Matté, I. G. Rivera, and M. T. Martins. 1994. Distribution of potentially pathogenic *Vibrios* in oysters from a tropical region. J. Food Prot. 57 :870-873.

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe 1999. Food Related Illness and Death in the United States. Emerg. Infect. Dis 5: 607-625.

Melhus, A., T. Holmdah, and I. Tjernberg. 1995.First documented case of bacteremia with *Vibrio vulnificus* in Sweden. Scand J Infect Dis; 27:81-82

Miyoshi, A. I., and S. Shinoda. 1992. Activation mechanism of human Hageman factor-plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* metalloprotease. Febs. 308:315-319

Miyoshi, S. I. 2006. *Vibrio vulnificus* infection and metalloprotease. J. Dermatol. 33: 589–595.

Miyoshi, S., H. Wake., K. Tomachika, and S. Shinoda. 1997. Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. J. Bacteriol. 179: 7606-7609

Motes, M. L., A. DePaola, D. W. Cook, J. E. Veazey, J. C. Hunsucker, W. E. Garthright, R. J. Blodgett, and S. J Chirtel. 1998 Influence of after temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern gulf and atlantic coast oysters (*Crassostrea virginica*). Appl. Environ. Microbiol. 64:1459-1465

Muldrew, K. L., R. R. Miller, M. Kressin, Y. Tang, and C. Stratton. 2007. Necrotizing Fasciitis from *Vibrio vulnificus* in a Patient with Undiagnosed Hepatitis and Cirrhosis. J. Clinic. Microbiol. 45:1058–1062.

Munn, C. B., E. E. Ishiguro, W. W. Kay, and T. J. Trust. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent A*eromonas salmonicida*. Infect. Immun. 36: 1069-1075

Nagao, M., Y. Shimuzu, Y. Kawada, H. Baba, K. Yamada, K. Torii, and M. Ohta. 2006. Two cases of sucrose-fermenting *Vibrio vulnificus* infection in which 16S rDNA sequencing was usefull for diagnosis. Jpn. J. Infect. Dis. 59: 108-110.

Nakhamchik, A., C. Wilde, and D. A. Rowe-Magnus. 2008. Cyclic-di-GMP Regulates Extracellular Polysaccharide Production, Biofilm Formation, and Rugose Colony Development by *Vibrio vulnificus.* Appl. Environ. Microbiol. 74:4199–4209.

Neter, J., M. H. Kutner, C. J. Nachtsheim, and W. Wasserman 1996. Applied Linear Statistical Models. 4th Ed. McGraw-Hill, Boston. USA.

Oh, M. H., S. M. Lee, D. H. Lee, and S. H. Choi. 2009. Regulation of the *Vibrio vulnificus hupA* Gene by Temperature Alteration and Cyclic AMP Receptor Protein and Evaluation of Its Role in Virulence. Infect. Immun. 77:1208-1215.

Okada, K., T. Lida, K. Kita-Tsukamoto, and T. Honda. 2005. *Vibrios* Commonly Possess Two Chromosomes. J. Bacteriol. 187:752-757

Okujo, N., T. Akimaya, S. Miyoshi, S. Shinoda, and S. Yamamoto. 1996. Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin

and lactoferrin bound iron by *Vibrio vulnificus*. Microbiol. Immunol. 40: 595-598

Oliver, J. D., and J. B. Kaper. 1997. *Vibrio* species: 228-264. IN: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle, M. P., L. R. Beuchat, and T. J. Montville. (Eds). ASM Press, Washington, D.C.

Oliver, J. D., J. E. Wear, M. B. Thomas, M. Warner, and K. Lin. 1986. Production of extracellular enzymes and cytotoxin by *Vibrio vulnificus*. Diag. Microbiol. Infec. Dis. 5:99-11.

Oliver, J.D. 1995. The viable but nonculturable state in the human pathogen, *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett .133: 203–208.

O´Neill, K. R., S. H. Jones, and D. J. Grimes.1992. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. Appl. Environ. Microbiol. 58:3257-3262.

O'Neill, K. R., S. H. Jones, and D. J. Grimes.1990. Incidence of *V. vulnificus* in northern New England water and shellfis. FEMS Microbiol. Lett. 60(12):163-7.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2003. Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp en pescados y mariscos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 75. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1982. Control sanitario de los alimentos. Publicación científica OPS No. 421. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1991. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1997. Control sanitario de los alimentos. Publicación científica OPS No.7. Organización Mundial de la Salud. Ginebra

Panicker, G. M., L. Meyers, and A. K. Bej. 2004. Rapid Detection of *Vibrio vulnifcus*in Shellfish and Gulf of Mexico Water by Real Time PCR. Appl.Environ Microbiol.70: 498-507

Paranjpye, R. N., A. B. Johnson, A. E. Baxter, and M. S. Strom. 2007. Role of Type IV Pilins in Persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* Oysters. Appl. Environ. Microbiol. 73:5041–5044.

Paranjpye, R. N., J. C. Lara, J. C. Pepe, C. M. Pepe, and M. S. Strom. 1998. The type IV leader peptidase/ N-metiltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEp-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. Infect. Immun. 66: 5659-5668.

Paranjpye, R. N., J. C. Lara, J. C. Pepe, C. M. Pepe, and M. S. Strom. 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contribute to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. Infect. Immun.73:1411-1422

Parker, R. W., E. M. Maurer, A. B. Childers, and D. H. Lewis. 1994 . Effect of frozen storage and vacuum-packaging on survival of *Vibrio vulnificus* in gulf coast oysters (*Crassostrea virginica*). J. Food Prot. 57: 604-606.

Parvathi, A., H. S. Kumar, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2004. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oyster from two estuaries along the southwest coast of India, using molecular methods. Appl. Environt. Microbiol. 70:6909-6913

Pfeffer, C. S., M. Frances, and J. D. Oliver. 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. Appl Environ Microbiol .69:3526-3531

Poblete, R., M. Andresen, C. Pérez, A. Dougnac, O. Díaz, and V. Tomicic. 2002. Septic shok caused by *Vibrio vulnificus*. Report of one case. Rev. Med. Chile. 130: 787-791.

Podbielski, A., I. Zarges, A. Flosdorff, and J. Weber-Heynemann. 1996. Molecular characterization of a major serotype M49 group A streptococcal DNase gene (*sdaD*). Infect. Immun. 64: 5349–5356.

Porras, C. G., J. J. Viana, B. C. Mazari, and S. S. Madero.1994. Vibrio vulnificus in Mexico: a case report and review of the literature. Rev Invest Clin. 46:495-498.

Powell, J. L., A. C. Wright, S. S. Wasserman, D. M. Hone, and J. G. Morris Jr. 1997. Release of tumor necrosis factor alpha in response to *Vibrio vulnificus*

capsular polysaccharide in *in vivo* and *in vitro* models. Infect. Immun. 65: 3713-3718.

Pruzzo, C., G. Gallo, and L. Canesi. 2005. Persitence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with hemolymph components. Environ. Microbiol. 7:761-772.

Quan, Y., K. D. Choi, D. Chung, and I. S. Shin. 2010. Evaluation of bactericidal activity of weakly acidic electrolyzed water (WAEW) against Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus. Int. J. Food Microbiol. 136:255–260.

Randa, M. A., M. F. Polz, and E. Lim. 2004. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. Appl Environ Microbiol.70:5469-76.

Rho, H. W., M. J. Choi, J. N. Lee, J. W. Park, J. S. Kim, B. H. Park, H. S. Sohn, and H. R. Kim. 2002. Citotoxic mechanism of *Vibrio vulnificus* cytolysin in CPAE cells. Life Sci. 70: 1923-1934.

Richards, G. P., and A. Nuñez. 2006. Specificity of a *Vibrio vulnificus* Aminopeptidase toward Kinins and Other Peptidyl Substrates. J. Bacteriol. 188(6):2056–2062.

Rodrigues, D. P., R. V. Ribeiro, and E. Hofer. 1992. Analysis of some virulence factors of *Vibrio vulnificus* isolated from Río de Janeiro, Brazil. Epidemiol. Infect. 108: 463-467.

Roig, F. J., A. Llorens, B. Fouz, and C. Amaro. 2009. Spontaneous Quinolone Resistance in the Zoonotic Serovar of *Vibrio vulnificus.* Appl. Environ. Microbiol. 75:2577–2580.

Sanjuán, E., and C. Amaro. 2004. Protocol for Specific Isolation of Virulent Strains of *Vibrio vulnificus* Serovar E (Biotype 2) from Environmental Samples. Appl. Environ. Microbiol. 70:7024-7032.

Schmiel, D.H., and V. L. Miller 1999 Bacterial phospholipases and pathogenesis. Microbes. Inferct. 1: 1103-1112.

Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). 2005. Boletín indicador de actividad pesquera. www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/boletin/Indicador_Marzo_2002.pdf

Secretaria de Salud (SS). 1993. Diagnóstico sobre la protección de los alimentos en México. Organización Panamericana de la Salud. OMS. México.

Shapiro, R. L.; S. Altekruse, L. Hutwagner, S. Wilson, B. Ray, S. Thompson, R. V. Tauxe, P. M. Griffin, and The *Vibrio* Working Group. 1998. The role of Goulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. J.Infect.Dis . 178:752-759

Silva, R. H., F. Vieira, O. V. Sousa, R. C. Alburquerque, G. D. Nazareth, A. Theophilo, A. Macrae, A. F. Filho, and D. P. Rodrigues. 2010. Raw oysters can be a risk for infections. Braz. J. Infect. Dis. 14:66-70

Sizemore, R. K., and H. L. Stevenson. 1970. Method for the isolation of proteolytic marine bacteria. Appl. Microbiol. 20:991-992.

Smith, B., and J. D. Oliver. 2006. In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence whitin and resuscitation from the viable but no culturable state. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1445-1451.

Smith, G. C., and J. R. Merkel. 1982. Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. Infect. Immun. 35: 1155-1156

Srivastava, M., M. S Tucker, P. A. Gulig, and A. C. Wright. 2009 Phase variation, capsular polysaccharide, pilus and flagella contribute to uptake of *Vibrio vulnificus* by the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Environ Microbiol. 11:1934-44.

Strom, M. S., and R. N. Paranjpye. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Microbes. Infect. 2: 177-188.

Su, J. H., M. C. Chang, Y. S. Lee, I. C. Tseng, and Y. C. Chiang. 2004. Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. Bioch. Bioph. Act. 1678: 7-13

Tacket, C. O., F. Brenner, and P. A. Blake. 1984. Clinical features and an

epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. J. Infect. Dis. 149: 558-562.

Tamplin, M. L., and G. M. Capers. 1992. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf coast oysters, exposed to seawater desinfected with UV light. Appl. Environ. Microbiol 58: 1506-1510.

Tang, W. M., K. K. Fung, V. C. Cheng, and L. Lucke. 2006. Rapidly progressive necrotisisng fasciitis following a stonefish sting: a report of two cases. J. Orth. Surg. 14:67-70.

Torres, L., S. Escobar, A. I. Lopez, M. L. Marco, and V. Pobo. 2002. Wound infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. Eur. J. Microbiol. Infect. 21: 537-538.

Tsuchiya, T, E. Mitsuo, N Hayashi, Y. Hikita, H. Nakao, S. Yamamoto, K. Miyamoto, and H. Tsujibo. 2007. *Vibrio vulnificus* damages macrophages during the early phase of infection. Infect Immun. 75:4592-6.

Veenstra, J. P., J. G. M. Rietra, J. M. Coster, E. Slaats, and S. Dirks-go. 1994. Seasonal variations in the occurrence of *Vibrio vulnificus* along the dutch coast. Epidemiol. Infect. 112: 285-290.

Venkateswaran, C., M. Kilyukia, K. Takaki, H. Nakano, H. Matsuda, H. Kawakami, and H. Hashimoto. 1989. Characterization of toxigenic vibrios isolated from the freshwater environment of Hiroshima, Japan. Appl. Environ, Microbiol. 55:2613-2618.

Vennneman, I. H., T. E. Cloette, G. A. Dykes, and A. Von Holy. 1994. Bacterial populations associated with the processing of cape hake (*Merluccius capensis* and *Meluccius paradoxus*). J. Food Prot. 57:1016-1018

Vinh, D. C., S. Mubareka, B. Fatoye, P. Plourde and P. Orr. 2006. *Vibrio vulnificus* septicemia after handling Tilapia species fish: A Canadian case report and review. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 17:129-132.

Wang, Y., and J. D. Gu. 2005. Influence of temperature, salinity and pH on growth of environmental *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from Mai Po and the Deep Bay Nature Reserve Ramsar Site of Hong Kong. J. Basic. Microbiol. 45:83-93.

Warner, E. and J. D. Oliver. 2008. Population Structures of Two Genotypes of *Vibrio vulnificus* in Oysters (*Crassostrea virginica*) and Seawater. Appl. Environ. Microbiol. 74:80–85.

Watanabe, H., S. Miyoshi, T. Kawase, K. Tomochika, and S. Shinoda. 2004. High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype I is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans. Microb. Path. 36: 117-123

Whitfield, C. 2006. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli.* Annu. Rev. Biochem. 75: 39-68.

Wright, A. C., V. Garrido, G. Debuex, M. F. Evans, A. A. Mudbidri, and W. S. Otwell. 2007. Evaluation of postharvest-processed Oysters by using PCR-Based Most-Probable-Number Enumeration of *Vibrio vulnificus* bacteria. Appl. Environ. Microbiol.73:7477-7481.

Wright, A. C., and J. G. Morris. 1991. The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and relationship to virulence in mice. Infec. Immun. 59:192-197

Wright, A. C., J. L. Powell, J. B. Kaper, and J. G. Morris Jr. 2001. Identification of a group 1-capsular polysaccharide operon for *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 69: 6893-6901

Wright, A. C., R. T. Hill, J. A. Johnson, M. C. Roghman, R. R. Colwell, and J. G. Morris. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 62: 717-724.

Wu, S. I., S. K. Lo, C. P. Shao, H. W. Tsai, and L. I. Hor. 2001. Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreing DNA. Appl. Environ. Microbiol. 67: 82-88.

Yano, Y., M. Yakoyama, M. Satomi, H. Oikawa, and S. S. Chen. 2004. Ocurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in china. J. Food Prot. 67:1617-1623

Zhang, X. H., and B. Austin. 2005. A review: Hemolysins in *Vibrio* species. J. Appl. Microbiol. 98: 1011-1019.

Zuppardo, A. B., A. DePaola , J. C. Bowers, K. L. Schully , J. A. Gooch, and R. J.

Siebeling. 2001. Heterogeneity of environmental, retail, and clinical isolates of *Vibrio vulnificus* as determined by lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies. J Food Prot. 64:1172-7.

URL´s:

10 de aosto de 2010: **Dirección General de Epidemiología. 2005. Anuario de Morbilidad** http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html

20 de agosto de 2010

www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/anuanrio/anuario2003.pdf

ANEXOS

ANEXO 1.Número de colonia sacarosa negativa obtenidas de muestras de ostión por punto de muestreo y mes

	MARZO					ABRIL				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	10	10	10	30	1000-100000	25	15	30	70	2500-300000
2	15	10	25	50	1500-250000	10	25	25	60	1000-250000
3	15	30	15	60	1500-150000	30	20	40	90	3000-400000
4	15	5	10	30	1500-100000	30	10	20	60	3000-200000
5	5	15	10	30	500-100000	25	10	25	60	2500-250000
6	20	20	20	60	2000-200000	30	40	20	90	3000-200000
7	15	5	15	35	1500-150000	30	10	25	65	3000-250000
8	10	0	10	20	1000-100000	20	30	40	20	2000-400000
9	15	10	15	40	1500-150000	15	0	10	25	1500-100000
10	5	10	5	20	500-50000	10	0	0	10	1000
11	10	0	9	19	1000-90000	6	0	6	12	600-60000
				394	500-250000				632	600-400000

	MAYO					JUNIO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	15	30	40	85	1500-400000	30	10	20	60	3000-200000
2	18	35	12	65	1800-120000	25	40	20	85	2500-200000
3	23	5	12	40	2300-120000	23	10	17	50	2300-170000
4	20	8	15	43	2000-150000	20	5	20	45	2000-200000
5	10	25	40	75	1000-400000	20	40	10	70	2000-100000
6	35	20	30	75	3500-300000	25	5	15	45	2500-150000
7	30	5	10	45	3000-100000	40	10	25	75	4000-250000
8	28	6	20	54	2800-200000	30	0	15	45	3000-150000
9	10	25	10	45	1000-100000	10	5	0	15	1000-5000
10	30	5	20	55	3000-200000	25	5	15	45	2500-150000
11	20	10	8	38	2000-80000	19	0	10	29	1900-100000
				620	1000-400000				564	1000-250000

CONTINUACION DEL ANEXO 1

	JULIO					AGOSTO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	15	10	5	30	1500-50000	10	0	5	15	1000-50000
2	10	0	5	15	1000-50000	10	20	5	35	1000-50000
3	10	20	0	30	1000-20000	30	5	10	45	3000-100000
4	7	22	3	32	700-30000	20	2	15	37	2000-150000
5	8	0	4	12	800-40000	3	10	10	23	300-100000
6	10	0	2	12	1000-20000	11	15	17	43	1100-170000
7	7	13	0	20	700-13000	4	10	2	16	400-20000
8	10	22	0	22	1000-22000	15	0	10	25	1500-100000
9	14	8	0	12	1400-8000	15	5	10	30	1500-100000
10	10	5	15	30	1000-150000	8	20	5	33	800-50000
11	8	0	7	15	800-70000	15	0	10	25	1500-100000
				230	700-150000				327	300-170000

	SEPTIEMBRE					OCTUBRE				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	20	4	15	39	2000-150000	15	2	8	25	1500-80000
2	10	0	25	35	1000-250000	0	0	0	0	0
3	17	12	3	32	1700-30000	14	20	5	39	1400-50000
4	15	2	8	25	1500-80000	5	5	0	10	500-5000
5	12	0	28	40	1200-280000	0	0	0	0	0
6	14	3	7	24	1400-70000	8	0	0	8	800
7	25	40	8	73	2500-80000	10	0	2	12	1000-20000
8	10	19	3	32	1000-30000	0	0	0	0	0
9	20	5	10	35	2000-100000	2	0	0	2	200
10	25	10	15	50	2500-150000	3	0	2	5	300-20000
11	2	20	10	32	200-100000	6	3	0	9	600-3000
				417	200-280000				110	0-80000

CONTINUACION DEL ANEXO 1

	NOVIEMBRE					DICIEMBRE				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	2	5	10	17	200-100000	10	15	30	55	1000-300000
2	18	2	8	28	1800-80000	25	5	15	45	2500-150000
3	10	0	5	15	1000-50000	38	10	25	73	3800-250000
4	7	15	2	24	700-20000	17	29	5	51	1700-50000
5	0	0	0	0	0	10	25	42	77	1000-420000
6	5	10	0	15	500-10000	10	15	30	55	1000-300000
7	15	0	5	20	1500-50000	29	8	20	57	2900-200000
8	5	0	0	5	500	30	10	20	60	3000-200000
9	8	1	4	13	800-40000	20	10	28	58	2000-280000
10	5	0	2	7	500-20000	19	5	10	34	1900-100000
11	2	6	0	8	200-6000	15	3	10	28	1500-100000
				152	0-100000				593	1000-420000

	ENERO					FEBRERO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	15	1	4	20	1500-40000	15	2	8	25	1500-80000
2	4	4	0	8	400-4000	10	0	5	15	1000-50000
3	5	4	0	9	500-4000	7	12	3	22	700-30000
4	6	0	5	11	600-50000	2	0	8	10	200-80000
5	4	3	0	7	400-3000	3	4	0	7	300-4000
6	2	4	0	6	200-4000	8	0	4	12	800-40000
7	1	3	5	9	100-50000	16	1	5	22	1600-50000
8	5	7	0	12	500-7000	8	14	2	24	800-20000
9	6	1	3	10	600-30000	4	0	0	4	400
10	7	5	0	12	700-5000	7	2	0	9	700-2000
11	4	8	0	12	400-8000	4	3	0	7	400-3000
				116	100-50000				157	200-80000

CONTINUACION DEL ANEXO 1

	MARZO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	10	20	5	35	1000-50000
2	25	5	15	45	2500-150000
3	28	10	12	50	2800-120000
4	17	30	8	55	1700-80000
5	22	7	14	43	2200-140000
6	12	29	7	48	1200-70000
7	20	10	15	55	2000-150000
8	17	2	8	27	1700-80000
9	10	19	5	34	1000-50000
10	15	8	0	23	1500-8000
11	3	3	0	6	300-3000
				421	300-150000

Anexo 2.Número de colonia sacarosa negativa obtenidas de muestras de agua por punto de muestreo y mes

	MARZO					ABRIL				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	40	10	30	80	4000-300000	10	20	10	40	1000-100000
2	15	5	30	50	1500-300000	15	0	15	30	1500-150000
3	10	15	10	35	1000-100000	20	5	15	40	2000-150000
4	10	10	20	40	1000-200000	5	0	0	0	500
5	40	20	25	85	4000-250000	8	15	20	43	800-200000
6	10	10	10	30	1000-100000	5	15	20	40	500-200000
7	15	0	10	25	1500-100000	23	17	5	45	2300-50000
8	25	30	20	75	2500-200000	4	6	0	10	400-6000
9	10	5	10	25	1000-100000	20	10	10	40	2000-100000
10	5	2	0	7	500-2000	5	0	0	5	500
11	15	0	5	20	1500-50000	8	0	0	8	800
12	8	0	2	10	800-20000	4	0	0	4	400
				482	500-300000				310	400-200000

	MAYO					JUNIO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	15	0	5	20	1500-50000	15	3	8	26	1500-80000
2	7	1	11	19	700-110000	14	8	22	44	1400-220000
3	10	2	5	17	1000-5000	12	8	17	37	1200-170000
4	5	3	4	12	500-40000	25	20	15	60	2500-150000
5	10	4	1	15	1000-10000	10	20	2	32	1000-20000
6	5	8	2	15	500-20000	12	1	7	20	1200-70000
7	2	5	5	12	200-50000	7	14	2	23	700-20000
8	7	3	0	10	700-3000	20	5	10	35	2000-100000
9	5	5	15	25	500-150000	10	20	28	58	1000-280000
10	10	5	10	25	1000-100000	15	30	20	65	1500-200000
11	5	10	15	30	500-150000	10	15	15	40	1000-150000
12	15	10	0	25	1500-10000	20	10	0	30	2000-10000
				225	200-150000				470	700-280000

CONTINUACION DEL ANEXO 2

	JULIO					AGOSTO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	8	4	0	12	800-4000	4	4	4	12	400-40000
2	7	0	3	10	700-30000	7	1	2	10	700-20000
3	6	6	2	14	600-20000	5	5	10	20	500-100000
4	5	7	3	15	500-30000	12	2	6	20	1200-60000
5	7	0	2	9	700-20000	2	4	15	21	200-150000
6	3	6	1	10	300-10000	5	10	17	32	500-170000
7	2	5	0	7	200-5000	10	5	10	25	1000-100000
8	8	0	4	12	800-40000	8	0	3	11	800-30000
9	9	0	0	9	900	5	10	2	17	500-20000
10	8	4	1	13	800-10000	15	5	10	30	1500-100000
11	7	0	0	7	700	16	4	7	27	1600-70000
12	7	0	0	7	700	8	10	3	21	800-30000
					200-40000				246	200-170000

	SEPTIEMBRE					OCTUBRE				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	5	15	2	22	500-20000	16	2	4	22	1600-40000
2	5	5	13	23	500-130000	7	1	5	12	700-50000
3	10	19	1	30	1000-19000	14	2	0	16	1400-2000
4	17	3	7	27	1700-70000	11	0	5	16	1100-50000
5	10	15	2	27	1000-20000	3	7	0	10	300-7000
6	15	2	8	25	1500-80000	6	0	0	6	600
7	7	10	3	20	700-30000	8	0	0	8	800
8	10	15	15	40	1000-150000	7	1	2	10	700-20000
9	15	10	2	27	1500-20000	2	6	2	10	200-20000
10	20	5	10	35	2000-100000	15	5	0	20	1500-5000
11	15	0	5	20	1500-50000	10	15	2	27	1000-20000
12	15	10	0	25	1500-10000	8	0	0	8	800
				321	500-150000				165	300-50000

CONTINUACION DEL ANEXO 2

	NOVIEMBRE					DICIEMBRE				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	7	5	5	17	700-50000	8	2	4	14	800-40000
2	2	5	6	13	200-60000	3	7	0	10	300-7000
3	5	9	2	16	500-20000	2	6	0	8	200-6000
4	6	2	4	12	600-40000	5	11	0	16	500-11000
5	9	0	4	13	900-40000	7	0	0	7	700
6	3	4	7	14	300-70000	3	5	0	8	300-5000
7	7	0	3	10	700-30000	2	0	0	2	200
8	4	8	1	13	400-10000	10	2	0	12	1000-2000
9	2	5	4	11	200-40000	8	1	4	13	800-40000
10	12	2	8	22	1200-80000	5	8	4	17	500-40000
11	2	8	0	10	200-8000	5	8	3	16	500-30000
12	9	2	0	11	900-2000	5	7	1	13	500-10000
				162	200-70000				136	200-40000

	ENERO					FEBRERO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	9	2	3	14	900-30000	5	8	5	18	500-50000
2	5	10	6	21	500-60000	2	2	1	5	200-10000
3	2	12	11	25	200-110000	4	4	8	16	400-80000
4	20	5	10	35	2000-100000	5	7	7	19	500-70000
5	5	10	20	35	500-200000	10	5	7	22	1000-70000
6	4	2	4	10	400-40000	12	5	14	31	1200-140000
7	1	5	2	8	100-20000	4	0	0	4	400
8	4	8	4	16	400-40000	6	0	0	6	600
9	5	7	3	15	500-30000	3	5	7	15	300-70000
10	8	1	3	12	800-30000	15	8	3	26	1500-30000
11	2	6	2	10	20-20000	7	5	0	12	700-5000
12	5	4	0	9	500-4000	5	0	0	5	500
				200	100-200000				179	200-140000

CONTINUACION DEL ANEXO 2

	MARZO				
PM	-1	-2	-3	TOTAL	INTERVALO
1	12	10	20	42	1200-200000
2	20	12	30	62	2000-300000
3	10	20	16	46	1000-160000
4	20	37	10	67	2000-100000
5	30	10	20	60	3000-200000
6	20	20	15	55	2000-150000
7	29	10	17	56	2900-170000
8	15	20	13	48	1500-130000
9	20	12	14	46	2000-140000
10	10	5	5	20	1000-50000
11	12	8	2	22	1200-20000
12	10	2	6	18	1000-60000
				542	1000-300000

ANEXO 3. Clasificación de las cepas por mes y procedencia

Cepa	Muestra	Mes	Cepa	Muestra	Mes
1	Ostión	Mar	26	Ostion	May
2	Ostión	Mar	27	Ostión	May
3	Ostión	Mar	28	Agua	May
4	Agua	Mar	29	Agua	May
5	Agua	Mar	30	Agua	May
6	Agua	Mar	31	Agua	May
7	Agua	Mar	32	Agua	May
8	Agua	Mar	33	Agua	May
9	Ostión	Abr	34	Agua	May
10	Ostión	Abr	35	Agua	May
11	Ostión	Abr	36	Agua	May
12	Ostión	Abr	37	Ostión	Jun
13	Agua	Abr	38	Ostión	Jun
14	Agua	Abr	39	Ostión	Jun
15	Agua	Abr	40	Ostión	Jun
16	Agua	Abr	41	Ostión	Jun
17	Agua	Abr	42	Ostión	Jun
18	Agua	Abr	43	Ostión	Jun
19	Agua	Abr	44	Agua	Jun
20	Ostión	May	45	Agua	Jun
21	Ostión	May	46	Agua	Jun
22	Ostión	May	47	Agua	Jun
23	Ostión	May	48	Agua	Jun
24	Ostión	May	49	Agua	Jun
25	Ostión	May	50	Ostión	Jul

Continuación del anexo 3

Cepa	Muestra	Mes	Cepa	Muestra	Mes
51	Ostión	Jul	76	Agua	Oct
52	Ostión	Jul	77	Agua	Ene
53	Ostión	Jul	78	Ostión	Dic
54	Ostión	Jul	79	Agua	Ene
55	Agua	Jul	80	Ostión	Feb
56	Agua	Jul	81	Agua	Feb
57	Agua	Jul	82	Ostión	Mar
58	Agua	Jul	83	Ostión	Mar
59	Agua	Jul	84	Ostión	Mar
60	Agua	Jul	85	Ostión	Mar
61	Agua	Jul	86	Agua	Mar
62	Agua	Jul	87	Agua	Mar
63	Agua	Jul	88	Agua	Mar
64	Ostión	Ago	89	Agua	Mar
65	Ostión	Ago	90	Agua	Mar
66	Ostión	Ago	91	Agua	Mar
67	Ostión	Ago	92	Agua	Mar
68	Agua	Ago	93	Agua	Mar
69	Agua	Ago	94	Agua	Mar
70	Agua	Ago			
71	Agua	Ago			
72	Agua	Ago			
73	Agua	Ago			
74	Ostión	Sep			
75	Agua	Sep			

ANEXO 4. Prueba de adherencia de las cepas de *Vibrio vulnificus* en la línea celular HEp-2

Cepa	Adh	Cepa	Adh	Cepa	Adh	Cepa	Adh	Cepa	Adh
1	+	20	+	39	+	58	+	77	+
2	+	21	+	40	+	59	+	78	+
3	+	22	+	11	+	60	+	79	+
4	+	23	+	42	+	61	+	80	+
5	+	24	+	43	+	62	+	81	+
6	+	25	+	44	+	63	+	82	+
7	+	26	+	45	+	64	+	83	+
8	+	27	+	46	+	65	+	84	+
9	+	28	+	47	+	66	+	85	+
10	+	29	+	48	+	67	+	86	+
11	+	30	+	49	+	68	+	87	+
12	-	31	+	50	+	69	+	88	+
13	+	32	+	51	+	70	+	89	+
14	+	33	+	52	+	71	+	90	+
15	+	34	+	53	+	72	+	91	+
16	+	35	+	54	+	73	+	92	+
17	+	36	+	55	+	74	+	93	+
18	+	37	+	56	+	75	+	94	+
19	+	38	+	57	+	76	+		

ANEXO 5. Expresión de los factores de virulencia estudiados en las 94 colonias de *V. vulnificus*

Muestra	Cepa	Mes	Ci	A	P	D	G	L	Le	Hemólisis		C	MC
										C	Co		
Ostión	1	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	2	Mar	+	+	+	+	+	-	+	α	β	-	T
Ostión	3	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	4	Mar	+	+	+	D	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	5	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Agua	6	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	7	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	8	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	9	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	10	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	11	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	12	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	-	T
Agua	13	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	14	Abr	+	+	+	D	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	15	Abr	+	+	+	+	-	+	-	β	β	+	INT
Agua	16	Abr	+	+	+	D	+	+	-	β	β	-	T
Agua	17	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	18	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	19	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	20	May	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Ostión	21	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	22	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	23	May	+	+	+	D	+	+	-	β	β	+	INT
Ostión	24	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	25	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostion	26	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	27	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	28	May	+	+	+	-	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	29	May	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Agua	30	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	31	May	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Agua	32	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	33	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	34	May	+	+	+	D	-	+	+	β	β	+	INT
Agua	35	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	36	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	37	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	38	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	39	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O

Ostión	40	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	41	Jun	+	-	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Ostión	42	Jun	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Ostión	43	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	44	Jun	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Agua	45	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	46	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	47	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	48	Jun	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	O
Agua	49	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	50	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	51	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	52	Jul	+	+	+	+	+	+	-	β	β	-	T
Ostión	53	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	54	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	55	Jul	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	56	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	57	Jul	+	+	+	-	+	+	-	β	β	+	INT
Agua	58	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	59	Jul	+	+	-	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	60	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	61	Jul	+	+	+	+	+	-	-	β	β	-	T
Agua	62	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	63	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	64	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	65	Ago	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	T
Ostión	66	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	67	Ago	+	+	+	-	+	+	+	β	β	-	T
Agua	68	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	69	Ago	+	+	+	D	+	+	-	β	β	+	INT
Agua	70	Ago	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	71	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	72	Ago	+	+	+	-	+	+	+	β	β	-	T
Agua	73	Ago	+	+	+	D	+	-	+	β	β	+	INT
Ostión	74	Sep	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	75	Sep	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	76	Oct	+	+	+	+	+	+	-	β	β	+	INT
Ostión	77	Nov	+	+	+	D	-	-	+	β	β	+	O
Ostión	78	Dic	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	79	Ene	+	+	+	D	+	+	-	β	β	-	T
Ostión	80	Feb	+	+	+	-	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	81	Feb	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	82	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Ostión	83	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT

Ostión	84	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	85	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	86	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	87	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	88	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	89	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	90	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-	T
Agua	91	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	-	T
Agua	92	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	93	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	94	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O

Anexo 5. Colonias con morfología opaca, translucida e Intermedias en agar infusión cerebro corazón (BHI)

Cepa				Cepa				Cepa				Cepa			
	O	T	INT		O	T	INT		O	T	INT		O	T	INT
1	+			25	+			49			+	73			+
2		+		26			+	50	+			74	+		
3	+			27	+			51	+			75	+		
4			+	28			+	52		+		76			+
5		+		29		+		53			+	77	+		
6	+			30			+	54	+			78	+		
7	+			31		+		55			+	79		+	
8			+	32	+			56	+			80			+
9	+			33	+			57			+	81	+		
10	+			34			+	58	+			82		+	
11			+	35	+			59	+			83			+
12		+		36	+			60	+			84	+		
13	+			37	+			61		+		85	+		
14			+	38	+			62	+			86	+		
15			+	39	+			63			+	87	+		
16		+		40			+	64	+			88	+		
17			+	41		+		65		+		89			+
18	+			42		+		66	+			90		+	
19	+			43	+			67		+		91		+	
20		+		44		+		68	+			92			+
21	+			45	+			69			+	93			+
22	+			46	+			70			+	94	+		
23			+	47	+			71	+						
24	+			48	+			72		+					

O = Morfología colonial opaca; T = Morfología colonial translúcida; INT= opaca /translúcida

Anexo 6. Aislados de *Vibrio vulnificus* que expresaron todos los factores de virulencia estudiados

Muestra	Cepa	Mes	Ci	A	P	D	G	L	Le	Hemólisis		C	MC
										C	Co		
Ostión	1	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	3	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	6	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	7	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	8	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	9	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	10	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	11	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	12	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	-	T
Agua	13	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	17	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	18	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	19	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	21	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	22	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	24	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	25	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostion	26	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	27	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	30	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	32	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	33	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	35	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	36	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	37	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	38	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	39	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	40	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	43	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	45	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	46	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	47	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	49	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	50	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	51	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	53	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	54	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O

Agua	55	Jul	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+	INT
Agua	56	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	58	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	59	Jul	+	+	-	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	60	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	62	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	63	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	64	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	66	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	68	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	71	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	74	Sep	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	75	Sep	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	78	Dic	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	81	Feb	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	83	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Ostión	84	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	85	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	86	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	87	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	88	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	91	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	-	T
Agua	93	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	INT
Agua	94	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O

P=Proteasa L=Lipasa C=Carnero A= Adherencia

D=DNasa L=Lecitinasa Co=Conejo MO=Morfología colonial

G=Gelatinasa C=Capsula Ci=Citotoxicidad

Anexo 7. Resultados de la expresión de factores de virulencia en las cepas de *V. vulnificus* con morfología colonial translúcida procedentes de agua y ostiones

Muestra	Cepa	Mes	Ci	A	P	D	G	L	Le	Hemólisis		C
										C	Co	
Ostión	2	Mar	+	+	+	+	+	-	+	α	β	-
Agua	5	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Ostión	12	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	-
Agua	16	Abr	+	+	+	D	+	+	-	β	β	-
Ostión	20	May	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Agua	29	May	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Agua	31	May	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Ostión	41	Jun	+	-	+	+	+	-	+	β	β	-
Ostión	42	Jun	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Agua	44	Jun	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Ostión	52	Jul	+	+	+	+	+	+	-	β	β	-
Agua	61	Jul	+	+	+	+	+	-	-	β	β	-
Ostión	65	Ago	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+
Ostión	67	Ago	+	+	+	-	+	+	+	β	β	-
Agua	72	Ago	+	+	+	-	+	+	+	β	β	-
Agua	79	Ene	+	+	+	D	+	+	-	β	β	-
Ostión	82	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Agua	90	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	-
Agua	91	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	-

P=Proteasa; D= DNasa; G=Gelatinasa; L=Lipasa; Le=Lecitinasa; C=Carnero;
Co= Conejo; C=Cápsula

Anexo 8. Resultados de las cepas con ambas morfologías intermedia procedentes de agua y ostiones

Muestra	Cepa	Mes	Ci	A	P	D	G	L	Le	Hemólisis		C
										C	Co	
Agua	4	Mar	+	+	+	D	+	+	+	β	β	+
Agua	8	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Ostión	11	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	14	Abr	+	+	+	D	+	-	+	β	β	+
Agua	15	Abr	+	+	+	+	-	+	-	β	β	+
Agua	17	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Ostión	23	May	+	+	+	D	+	+	-	β	β	+
Ostion	26	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	28	May	+	+	+	-	+	+	+	β	β	+
Agua	30	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	34	May	+	+	+	D	-	+	+	β	β	+
Ostión	40	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	49	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Ostión	53	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	55	Jul	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+
Agua	57	Jul	+	+	+	-	+	+	-	β	β	+
Agua	63	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	69	Ago	+	+	+	D	+	+	-	β	β	+
Agua	70	Ago	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+
Agua	73	Ago	+	+	+	D	+	-	+	β	β	+
Agua	76	Oct	+	+	+	+	+	+	-	β	β	+
Ostión	80	Feb	+	+	+	-	+	-	+	β	β	+
Ostión	83	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+
Agua	89	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+
Agua	92	Mar	+	+	+	+	+	-	+	β	β	+
Agua	93	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+

P=Proteasa; D= DNasa; G=Gelatinasa; L=Lipasa; Le=Lecitinasa; C=Carnero;Co= Conejo; C=Cápsula

Anexo 9. Aislados de *Vibrio vulnificus* con características de cepas virulentas en muestras de ostión con morfología colonial opaca

Muestra	Cepa	Mes	Ci	A	P	D	G	L	Le	Hemólisis		C	MC
										C	Co		
Ostión	1	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	3	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	9	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	10	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	21	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	22	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	24	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	25	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	27	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	37	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	38	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	39	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	43	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	50	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	51	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	54	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	64	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	66	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	74	Sep	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	78	Dic	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	84	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	85	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O

P=Proteasa L=Lipasa C=Carnero A= Adherencia

D=DNasa L=Lecitinasa Co=Conejo MO=Morfología colonial

G=Gelatinasa C=Capsula Ci=Citotoxicidad

Anexo 10. Aislados de *Vibrio vulnificus* con características de cepas virulentas en muestras de agua con morfología colonial opaca

Muestra	Cepa	Mes	Ci	A	P	D	G	L	Le	Hemólisis		C	MC
										C	Co		
Agua	6	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	7	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	13	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	18	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	19	Abr	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	32	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	33	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	35	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	36	May	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	45	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	46	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	47	Jun	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	56	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	58	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	60	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	62	Jul	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	68	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	71	Ago	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	75	Sep	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Ostión	78	Dic	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	81	Feb	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	86	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	87	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	88	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O
Agua	94	Mar	+	+	+	+	+	+	+	β	β	+	O

P=Proteasa, D=DNasa, G=Gelatinasa, L=Lipasa, C=Capsula, L=Lecitinasa, C=Carnero, Co=Conejo, Ci=Citotoxicidad, A= Adherencia, MO=Morfología colonial

ANEXOS DE PREPARACION

DE MEDIOS DE CULTIVO

AGUA PEPTONADA ALCALINA.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Fórmula en gramos por litro

Peptona	10.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g

1.- Disolver el cloruro y la peptona en el agua y ajustar a pH de 8.4

2.- Distribuir en cantidades de 9 ml en tubos con tapón de rosca

3.- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

MEDIO DE TCBS (Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa)

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

Cantidad por litro de agua:

Tiosulfato de sodio	10 g.
Citrato de sodio	10 g.
Bilis de buey	5 g.
Colato de sodio	3 g.
Sacarosa	20 g.
Peptona de caseína	5 g.
Peptona de carne	5 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro de sodio	10 g.
Citrato férrico	1 g.
Azul timol	0.04 g.
Azul de bromotimol	0.04 g.

Agar	14 g.
pH final	8.6 ± 0.2

MÉTODO:

1.- Sembrar por estría cruzada la muestra en las placas con el medio TCBS.

2.- Incubar a 35ºC de 18 a 24 horas.

AGAR TRIPTONA CLORURO DE SODIO (T_1N_X)

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Fórmula en gramos por litro

Triptona	10g
Agar	15g

NaCl se agrega de acuerdo a la concentración requerida 3,6,8 y 10%.

1. Disolver el agar, sal y la triptona en el agua, calentar hasta completa disolución.
2. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos
3. Vaciar en cajas de petri

AGAR LECHE DESCREMADA

Cantidad por litro de agua:

Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g

Lecha descremada reconstituida al 10%	100 ml
pH final	7.0

PREPARACION:

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada hasta la ebullición y en agitación continua.

Esterilizar a 121º C durante 15 minutos. Por otra parte preparar la leche descremada y estilizar por separado a 121º C durante 15 minutos.

Finalmente se mezcla el medio base con la leche descremada, se mezclan y se distribuyen en cajas de Petri estériles.

AGAR GELATINA

Cantidad por litro de agua:

Caldo nutritivo deshidratado	8 g
Gelatina	30 g
Agar	7.5 g
pH	7

PREPARACIÓN:

Dejar hidratar la gelatina en agua por 30 minutos, calentar a 50° C y agregar el caldo nutritivo, ajustar el pH; posteriormente agregar el agar y calentar hasta ebullición, esterilizar a 121° C por 15 minutos y envasar en cajas petri.

AGAR SANGRE

Cantidad por litro de agua:

Infusión de músculo cardiaco	375 g
Peptona de carne	10 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
pH	7.3

PREPARACION:

Todos los ingredientes componen la base, se disuelven con agitación constante y calentando hasta ebullición. Se esterilizan a 121º C por 15 minutos.

Se deja enfriar y cuando se encuentra a 45º C adicionar sangre desfibrinada para obtener una concentración de 5%. Mezclar. Enfriar y vaciar en cajas de Petri.

INTERPRETACION

Algunas proteínas producidas por los microorganismos tienen la capacidad de destruir a los eritrocitos presentes en el medio de cultivo, liberando el contenido celular. Dependiendo de las características metabólicas de cada microorganismo, se presentaran diferentes fenómenos: la hemólisis gamma, en la cual no hay lisis de los eritrocitos, la hemólisis alfa en la cual la hemoglobina liberada por la ruptura de la membrana del eritrocito es oxidada hasta que se genera biliverdina, dando una coloración verdosa al medio y la hemólisis beta en donde la digestión del grupo hemo de la hemoglobina es total y por tanto hay la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento.

AGAR YEMA DE HUEVO

Cantidad por litro de agua:

Extracto de carne	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
Glicina	12 g
Piruvato de sodio	10 g
Agar	15 g
pH	6.8

PREPARACION:

Mezclar todos los ingredientes y disolver en un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121º C por 15 minutos. Enfriar a 60 º C, y

adicionar 50 ml de una emulsión estéril de yema de huevo y mezclar. Distribuir en placas de Petri estériles. Se incuba por 7 días a 35-37 ºC.

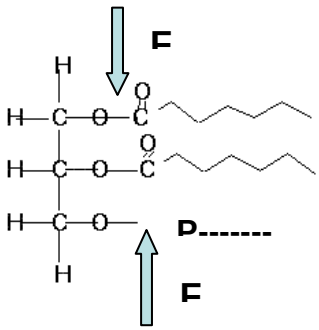
La lecitina es uno de los principales componentes en la yema de huevo, esta compuesto por glicerol que tiene esterificados en sus grupos hidroxilo dos ácidos grasos y una fosforilcolina, por lo cual esta molécula es antipática.

Existen varios tipos de lecitinasas secretadas por los microorganismos, las más comunes son la A y la C, estas tienen diferentes sitios de corte sobre la lecitina, las de tipo A separan el acido graso que esta unido al carbono alfa, mientras que las de tipo C separan la fosforilcolina del resto de la molécula.

Estos cortes enzimáticos generan la opacidad del medio de cultivo debido a varias razones:

1. Las fosfolipasas C generan un diglicérido que es insoluble que precipita formando halos opacos.
2. Los ácidos grasos libres presentes cuando hay actividad de una fosfolipasa A desestabilizan a la emulsión de la yema de huevo precipitándose y generando halos opacos.
3. Las proteínas insolubles de la yema del huevo (vitelina y vitelinina), son capaces de precipitar a los ácidos grasos libres.

Por lo que las zonas opacas alrededor de las colonias indicaron la actividad de la fosfolipasa.



Estructura molecular de la lecitina y los sitios de corte enzimático por la fosfolipasa A (FA) y la C (FC)

Por otro lado tenemos que las lipasas, son enzimas con la capacidad de romper los enlaces de los triglicéridos, generando glicerol y ácidos grasos libres. Por lo cual los halos transparentes que aparecen alrededor del crecimiento indican la digestión de los triglicéridos contenidos en la yema del huevo

Se considera como prueba positiva a la aparición de color rosa a rojo en menos de cinco días.

AGAR DNA Y AZUL DE TOLUIDINA

Cantidad por litro de agua:

Acido desoxirribonucleico de timo de carnero	0.3 g
Agar	10 g
Cloruro de calcio anhidro 0.01 M	1 ml
NaCl	10 g
Azul de toluidina “O” 0.1M	3 g
Solución reguladora de Tris 0.05 pH 9	100 ml

PREPARACION:

A 100 ml de solución reguladora de tris agregar todos los reactivos excepto el azul de toluidina. Calentar suavemente con agitación hasta ebullición y una vez que el ADN se halla disuelto completamente enfriar y adicionar la solución de azul de toluidina. Distribuir en tubos estériles. Y almacenar en refrigeración. No es necesario esterilizar.

La prueba es positiva si alrededor del pozo hay un halo rosa lo cual indica la hidrólisis del ADN, esto debido a que en el medio el colorante que es el azul de ortotoluidina y el ADN integro forman un complejo de color azul; cuando el ADN es hidrolizado por la acción de una nucleasa no importando que tipo sea, el complejo cambia a un tono rosa.

AGAR GLICEROL EXTRACTO DE LEVADURA

Cantidad por litro de agua:

Caldo nutritivo deshidratado	8 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glicerol	20 ml
Agar	15 g
pH	6.8

PREPARACIÓN:

Disolver todos los ingredientes, calentar hasta la disolución del agar y esterilizar a 121° C por 15 minutos, distribuir en cajas Petri estériles.

El agar glicerol por que induce la producción de cápsula debido a que es un precursor en la síntesis de carbohidratos y con ello se facilita el anabolismo de esta estructura celular. Pasado el tiempo de incubación se hizo un frotis y se tiño por la técnica de Rojo Congo.

Los colorantes ácidos son útiles para observar las estructuras que se encuentran por encima de la pared de las bacterias, debido a que no tiñen a las células, entre estas estructuras esta la cápsula. Esta se hace evidente por medio de una tinción negativa, como el método del rojo congo, y debido a que las partículas del colorante no pueden penetrar a través de la cápsula, esta no se tiñe pero el resto de la preparación si gracias a la acción del mordente. Por tanto la prueba es positiva si al observar al objetivo de inmersión se observan halos sin color alrededor de los bacilos sin teñir en un fondo obscuro.

ARTICULO

International Journal of Environmental Health Research
Vol. 00, No. 0, Month 2010, 1–11

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Putative virulence factors identified in *Vibrio vulnificus* strains isolated from oysters and seawater of Mexico

Elsa I. Quiñones-Ramírez[a], Ivan Natividad Bonifacio[b], Miguel Betancourt-Rule[b], Florina Ramirez-Vives[b] and Carlos Vázquez-Salinas[b]*

[a]*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas;* [b]*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico*

(*Received 9 January 2010; final version received 27 March 2010*)

The presence of *Vibrio vulnificus* was analyzed in oyster and estuarine water samples from Mexico by PCR amplification of the *vvhA* gene and some putative virulence factors were tested. Samples were collected from 12 different sampling points over a one-year period; 31% samples were positive for *V. vulnificus* and all isolates were identified as biotype 1. All strains were cytotoxic and proteolytic, 98% showed adherence to epithelial cells, 91.4% were DNase-positive, 77.6% were mucinase-positive, 97.8% were lecithinase-positive and 79.8% were lipase positive. Regarding colony morphology, 51% strains were opaque, 20% were translucid, 28% were both opaque and translucid, and 80.8% showed a capsule. This is the first report on the isolation of *V. vulnificus* strains from environmental samples in Mexico, which may pose a health risk for local fisherman and seafood consumers.

Keywords: *Vibrio vulnificus*; virulence factors; hemolysin/cytolysin; estuarine waters; oysters

Introduction

Vibrio vulnificus is a naturally occurring opportunistic pathogen commonly found in estuarine waters of tropical climates (Smith and Oliver 2006). It has been implicated in human infection a consequence of consuming contaminated clams, oysters or fish, and is known to cause life-threatening septicemia in individuals suffering underlying chronic disease or immunodeficiency (Paranjpye et al. 2007). It may also cause serious wound infection through contact with estuarine waters, frequently requiring amputation (Blake et al. 1979; Kumamoto and Vukich 1998; Bross et al. 2007). Of the three different *V. vulnificus* biotypes described, biotype 1 is the most common in marine environments, is pathogenic to humans, and has been isolated from both clinical and environmental samples (Amaro et al. 1992).

Although the pathogenesis of *V. vulnificus* is not fully understood, several virulence factors have been described. The hemolysin/cytolysin is a heat-labile 56-KDa lytic enzyme codified by the *vvh* operon (Bang et al. 1999). This enzyme not only lyses mammalian erythrocytes, it is also extremely cytotoxic to a variety of tissue culture cell lines such as Chinese hamster ovary (CHO) cells (Gray and Kreger

*Corresponding author. Email: cvs@xanum.uam.mx

ISSN 0960-3123 print/ISSN 1369-1619 online
© 2010 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/09603123.2010.491856
http://www.informaworld.com

1985). The hemolysin gene sequence is highly conserved and has been used to identify *V. vulnificus* in water, oyster and fish samples by PCR techniques (Panicker and Bej 2005). Numerous other virulence-associated factors have been identified including the polysaccharide capsule, type IV pili and enzymes which may alter vascular permeability or promote invasive capacity and cause tissue damage such as proteases, elastase, hialuronidase, lecithinase, phospholipases, mucinase and metalloprotease (Miyoshi and Shinoda 1992; García and Landgraf 1998; Shao and Hor 2000; Wu et al. 2001; Miyoshi 2006).

Overall, information on the presence of *V. vulnificus* in Mexico is scarce. There are no reports on the presence of *V. vulnificus* in environmental or seafood samples, and the presence of this pathogen had not been included as a criterion in the current Mexican sanitary regulations for shellfish or water quality standards until 2009 (Secretaría de Salud, NOM-242-SSA1-2009). Moreover, only nine cases of human infection have been reported in Mexico since 1993, eight of which had fatal outcomes (Castañón et al. 2000; Cornejo et al. 2000). *V. vulnificus* infection is probably underdiagnosed in Mexico as the pathogen is not routinely sought in clinical practice, and appropriate medical records are frequently unavailable in rural areas. We thus sought to investigate the presence of this pathogen in oyster and estuarine water samples from Pueblo Viejo Lagoon in Veracruz (Mexico), one of the most important fishery resources of the Gulf coast of Mexico, by PCR amplification of the *vvhA* gene. In addition, because environmental sources such as oysters show considerable pathogenicity variation (Strom and Paranjpye 2000), we characterized some putative virulence factors in these strains.

Materials and methods

Sampling sites

Pueblo Viejo Lagoon is located on the west side of the Gulf of Mexico, in the state of Veracruz (Figure 1). It is part of the alluvial plain of the Pánuco River, with a total surface area of 93.7 km^2, and five small rivers flow into the lagoon with significant runoff during the rainy season. Various small isles are found in the lagoon, which is connected to the Panuco River by a canal opening one kilometer from the river mouth to the Gulf of Mexico. The town of Pueblo Viejo is located along this canal, and the most important human settlements in the area are Cuauhtémoc City and Tampico Alto in Veracruz, and Tampico City in the State of Tamaulipas. It is one of the most important fishery resources of the Gulf coast, and is mainly used for shellfish harvesting (recreational activities are confined to the local population). Unfortunately, the Pánuco River and the urban development of Pueblo Viejo and Tampico contaminate the oyster beds with a heavy organic load, possibly caused by sewage discharge, generating high coliform bacterial counts and heavy metal concentrations deposition in sediments (Baqueiro-Cárdenas et al. 2007). However, annual oyster production in Pueblo Viejo lagoon has remained stable over the last decade, and has been used as a source of oyster seed for restocking other lagoons, even though the levels of pollution detected are among the highest in all the coastal lagoons (Villanueva and Botello 1990, 1992). Twelve sampling points in Pueblo Viejo Lagoon, considered as the most important according to the Fishermen Cooperatives and the local authorities, were selected for this study: El Bajo, Punta de Buda, Santa Clara, Ensenada, El Ciruelo, Cruz de Piedra, Isleta de Corralillo, Isleta de Tomates, Medianía, Tamales, Punta de Malagana and El Puente (Figure 1).

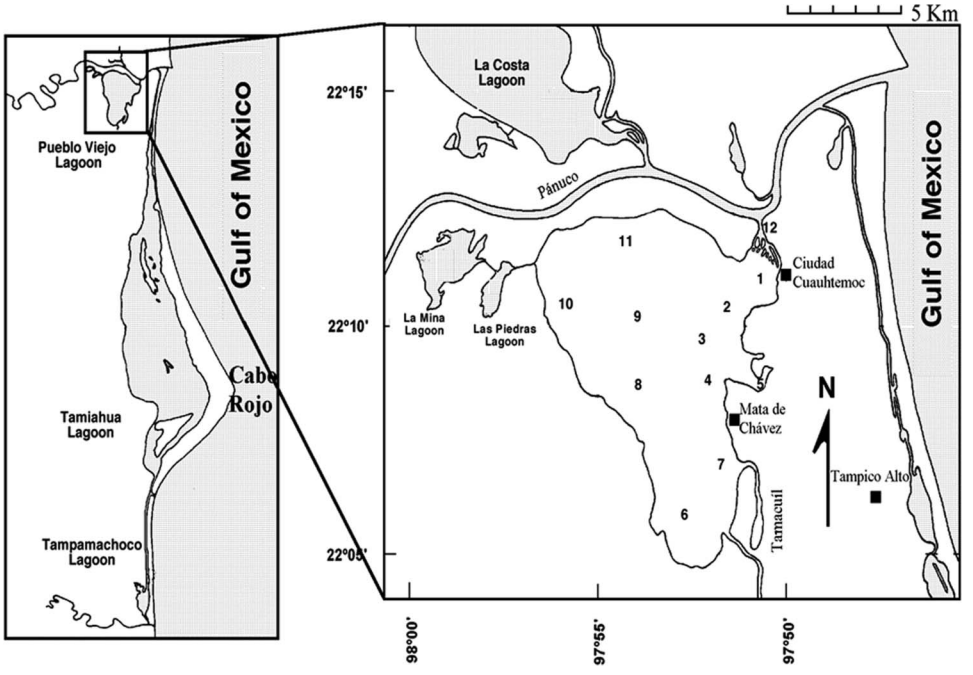


Figure 1. Map of Pueblo Viejo Lagoon, in Veracruz, Mexico. Numbers indicate sampling points: 1: El Bajo; 2: Punta de Buda; 3: Santa Clara; 4: Ensenada; 5: El Ciruelo; 6: Cruz de Piedra; 7: Isleta de Corralillo; 8: Isleta de Tomates; 9: La Medianía; 10: Tamales; 11: Punta de Mala Gana; 12: Puente Hondo.

Samples

A total of 299 seawater and oyster samples were collected from the different sampling points between March 2002 and March 2003. Temperature and salinity were measured in the upper 0.75 m of the surface water with a salinometer (ATAGO H-50/H-80) and a field stainless-steel wrapped thermometer. The oysters were transported on dry ice in individually labeled and sealed plastic bags. Seawater samples were collected in sterilized plastic jars, placed in sealed containers and transported at environmental temperature to the laboratory for analysis. The time between sample collection and analysis was approximately 24 h.

V. vulnificus strain isolation and identification

V. vulnificus was isolated and identified as described in the Bacteriological Analytical Manual of the Food and Drug Administration (Elliot et al. 1995). All commercial reagents used were obtained from Difco™ unless indicated otherwise. The oysters were shucked in aseptic conditions and homogenized in blenders; 50 g of each homogenate were placed in 450 ml of alkaline peptone water (APW) to obtain a 10:1 dilution. Seawater samples (25 ml) were added to 225 ml of APW, and 10:2 and 10:3 APW dilutions were prepared in duplicate and incubated at 37 and 42°C for 6–24 h. Enrichment broth was streaked onto thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar plates and incubated at 37°C for 18–24 h. Two or three suspect *V. vulnificus* colonies

(round, 1 to 2 mm in diameter, humid, shiny, sucrose negative) were selected from each plate. Halophilism tests were performed on NaCl-tryptone agar (T1N0, T1N3, T1N6, T1N8, and T1N10). The API 20E system (BioMerieux™) was used for identification purposes, and biotype was determined as described by Bisharat et al. (1999).

Hemolytic activity

V. vulnificus strains were seeded in blood agar as described by Elliot et al. (1995). Positive and negative controls were included in all assays.

DNA purification

Strains were seeded in Luria Bertani broth and incubated at 37°C for 24 h. DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification kit (PROMEGA®).

PCR

The *vvhA* gene was amplified using the primers and conditions described by Panicker and Bej (2005), designed to produce a 205 bp amplicon. Amplification reactions were performed in a Hybaid-Omn-E thermocycler as follows: Initial melting at 94 C for 3 min; followed by 30 cycles consisting of denaturalization at 94°C for 1 min, annealing at 68°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. Genomic DNA from the *V. vulnificus* ATCC 29307 strain was used as positive control, while *V. mimicus* ATCC 33653 and non-template samples were used as negative controls. Amplified products were separated in a 1.5% agarose gel, and observed in a Bio Rad 2000 transilluminator.

Enzymes

Cells were grown overnight in tryptic soy agar with 2% NaCl at 37°C, and spot-inoculated onto the plated assay media as described by García and Landgraf (1998). Protease activity was determined using casein (2% skim milk) as substrate, lecithinase and lipase activity were assessed in nutrient basal agar containing 10% (v/v) egg yolk emulsion, DNase production was assessed on DNase test agar, and mucinase activity was determined using porcine stomach mucine type II (Sigma®, St Louis, MO, USA; M-2378) (final concentration 1% in brain heart agar with 2% NaCl).

Colony morphology

Colony morphology was analyzed as described by Kim et al. (1997). Cultures were grown in brain heart infusion (BHI) at 37°C for 24 h and streaked on BHI agar, incubated at 37°C for 24 h. Opaque/translucid morphology was observed under transmitted light.

Capsule

Negative staining with Congo red was performed to identify the capsule on cross-streaked gelose glycerol agar cultures with 2% NaCl incubated at 37°C for 18–24 h.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed measuring the cytolysin activity of *V. vulnificus* culture supernatants in Chinese hamster ovary cells (CHO) as described by Paranjpye et al. (1998). Briefly, cultures were grown overnight in AKI broth at 30°C. Supernatants were centrifuged twice at 12,000 *g* and filtered through 0.2-mm pore-size cellulose acetate syringe filters to remove bacteria; 20 μl of each supernatant was added to CHO cell monolayers covered with 80 μl of HAM in 96-well tissue culture plates with 100% confluence CHO cells, 24 h prior to the experiment. The cells were then incubated at 37°C in 5% CO_2. Cytotoxicity was determined by changes in CHO cell morphology (cell rounding and lysis; detachment of the monolayer from the plastic surface) after 6 h of exposure to the bacterial supernatants. Staining was performed as described by Cravioto et al. (1979).

Tissue culture adherence assay

Adherence assays were performed in human laryngeal carcinoma cell (HEp-2) monolayers grown on coverslips, in 24-well microtiter plates and grown to confluence at 37°C in 5% CO_2. *V. vulnificus* strains were grown overnight in BHI with 2% NaCl at 30°C under gentle agitation. After estimating bacterial cell concentration from previous growth curves, the cultures were pelleted in a microcentrifuge (6,000 *g*) and resuspended in PBS. Cell monolayers were inoculated in triplicate with 50 μl diluted bacteria. The tissue culture plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 3 h. Monolayers were then washed three times with PBS to remove non-adherent bacteria (Paranjpye and Strom 2005). Staining was performed as described by Cravioto et al. (1979).

Statistical analysis

All statistical testing was performed using SPSS version 10. D'Agostino-Pearson and Levene's tests were used to assess normality and variance homogeneity. Because data sets did not meet criteria for normality and variance equality, the Kruskal-Wallis (H) non-parametric and Multiple Comparison Z-value tests were used to assess whether salinity, temperature, season (month) or sampling point affected the isolation rate of *V. vulnificus* from oyster or water samples.

Results

A total of 299 samples (143 oyster and 156 water) were analyzed. *V. vulnificus* was isolated from 31% (94/299) samples collected from all sampling points. Overall 27% (39/143) of the oyster samples and 35% (55/156) of the water samples were positive. All isolates were identified as biotype 1 as the 205 bp fragment of the *vvhA* gene amplified by PCR in all strains.

All strains showed β-hemolysis in blood gelose and were proteolytic; while 97.8% showed lecitinase activity, 91.4% were DNAse positive, 77.6% produced mucinase and 79.8% produced lipase (Table 1). Overall, 52% (49/94) of *V. vulnificus* strains were opaque, 20% (19/94) were translucid and 28% (26/94) grew opaque/translucid. Moreover, 44.9% (22/49) of the opaque colony forming units (CFU) were isolated from oysters, while 55.1% (27/49) were isolated from water samples. A capsule was

Table 1. Virulence-associated factors by *Vibrio vulnificus* strains isolated from water and oyster samples of Mexico.

Enzyme	Percentage of positive strains
Protease	100
Haemolysin (rabbit)	100
Haemolysin (ram)	98.9
Lecithinase	97.8
DNase	91.4
Lipase (egg yolk)	79.8
Mucinase	77.6

identified in 80.8% (76/94) of the strains. All strains were cytotoxic for CHO cells after 6 h of incubation. This effect was characterized by morphology changes (elongation) and monolayer destruction. In addition, 98.9% of the strains showed diffuse adherence to the HEp-2 cells distributed all over the cell surface (Figure 2).

Although *V. vulnificus* was isolated from water and oyster samples of Pueblo Viejo Lagoon all year round, seasonal fluctuation was observed (Figure 3). Isolation rates from both oysters and water were significantly higher in June than in the period from November to February ($p < 0.0002$ for oysters and $p < 0.0001$ for water samples). The number of strains isolated from water showed no significant differences according to sampling site ($p = 0.661$), however isolation rates in oysters were significantly higher when collected from El Bajo, Punta de Buda, Santa Clara, Ensenada and Tamales ($p = 0.036$). *V. vulnificus* was found to prefer salinity conditions above 18 and temperatures above 24°C ($p < 0.001$).

Discussion

Vibrio vulnificus infection has been reported in several countries including Mexico, with high mortality rates (Porras et al. 1994; Bisharat et al. 1999; Castañón et al. 2000; Cornejo et al. 2000; Poblete et al. 2002; Torres et al. 2002; Inoue 2006). The Food and Agriculture Organization (FAO 2003) has pointed out that all *V. vulnificus* strains should be considered as virulent and a potential cause of disease for consumers or workers handling sea products, and it is now recognized as one of the most rapidly fatal human pathogens (Shinoda 2005). *Vibrio vulnificus* infection is probably underdiagnosed in Mexico, so it is important to identify possible sources of infection and to test for this pathogen in clinical practice. This is the first report on the isolation and identification of some virulence factors of environmental *V. vulnificus* strains in Mexico.

Overall, 31% of the oyster and water samples collected from 12 different sites at Pueblo Viejo Lagoon, Veracruz, were positive for *V. vulnificus*, posing a health risk for both oyster consumers and fishermen. The process by which *V. vulnificus* causes severe tissue damage potentially leading to fatal septicemia involves various factors (Lee et al. 2007), and in this regard it is noteworthy that all strains showed several virulence associated factors. Firstly, PCR amplification of the *vvhA* gene was positive in all strains analyzed, confirming their capability of producing the hemolysin/cytotysin reported to cause a cell-rounding effect after 24 h of incubation (Kreger and Lockwood 1981). The cytotoxic effect observed in the strains from Pueblo Viejo Lagoon was substantial, as the monolayer was completely destroyed after 24 h of

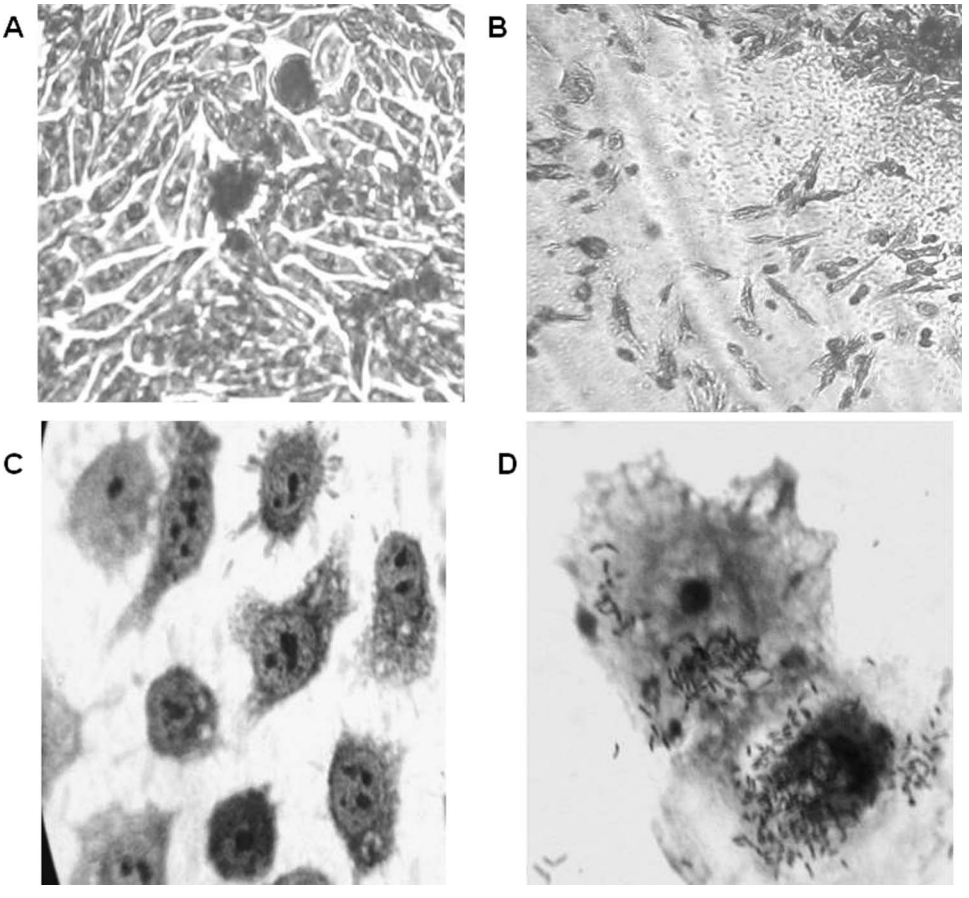


Figure 2. (A) and (B) Effect of the *V. vulnificus* cytotoxin on CHO cells (40 ×): (A) Untreated control CHO cells; (B) CHO cells cultured in the presence of cytotoxin during 10 hours. Cells are elongated and the monolayer has been destroyed. (C) and (D) Adherence of *V. vulnificus* to HEp-2 cells. (C) Untreated HEp-2 control cells; (D) *V. vulnificus* adheres to HEp-2 cells distributed throughout the cell surface.

incubation. Secondly, all but one of the strains analyzed (93/94) showed diffuse adherence all over the cell. Type IV pili are essential for host cell adherence in several pathogens such as *Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria gonorrhoeae* (Paranjpye et al. 1998; Reidl and Klose 2002), and contribute to virulence in *Vibrio vulnificus*, playing a role in colonization or persistence in oysters (Paranjpye et al. 2007). Moreover, 79% of the environmental strains from Pueblo Viejo Lagoon had a capsule, related to its ability to resist the action of complement (Collins and Derrick 2007). All strains showed proteolytic and hemolytic activity, and the majority hydrolyzed lecithin and showed lipase, DNase and mucinase activity, in accordance with previous reports (Rodrigues et al. 1992; García and Landgraf 1998).

The presence of several of these virulence factors in most of the strains isolated is particularly relevant because, in addition to posing a health risk to oyster and shellfish consumers, Pueblo Viejo Lagoon is surrounded by small rural populations where fishing is one of the main economical activities. Because the lagoon is very

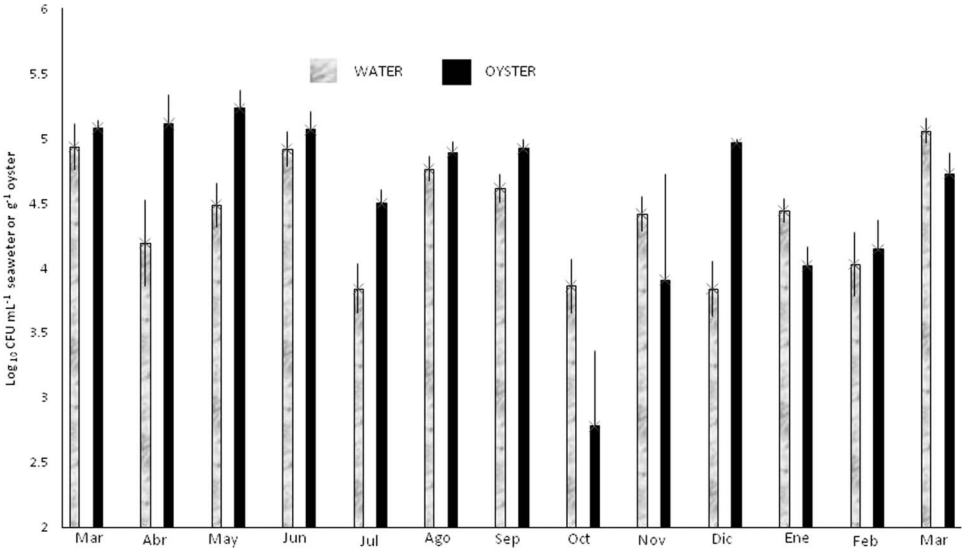


Figure 3. Abundance of sucrose-negative *Vibrio* isolated from water and oyster samples of Pueblo Viejo Lagoon, Veracruz, Mexico, between March 2002 and March 2003.

shallow, fishermen walk through the lagoon continuously exposing not only their hands but also their lower limbs to estuarine waters. Fishermen are particularly at risk because they frequently have wounds on their hands (Hlady and Klontz 1996).

Bacteriological pollution surpassing the permissible limits of bacterial count for consumption has been previously reported in oysters of Pueblo Viejo Lagoon, suggesting human contamination (fecal coliforms and fecal streptococci) (Barrera-Escorcia et al. 1998; Baqueiro-Cárdenas et al. 2007). This is the first report of *V. vulnificus* contamination both in oyster and water samples in Mexico, although the presence of this pathogen is not considered as a pollution indicator because of its natural presence in estuarine waters. Screening for the presence of *V. vulnificus* was recently included in the Mexican Norm to determine and shellfish quality standards (Secretaría de Salud 2009). Thus, not only the presence of apparently virulent strains, but the high isolation rate observed in water and oyster samples from Pueblo Viejo Lagoon requires additional prevention and treatment actions that should be implemented by authorities to protect fishermen and potential consumers.

Seasonal fluctuation of isolation rates is a well known phenomenon, depending mainly on water temperature and salinity variations. In Pueblo Viejo Lagoon, *V. vulnificus* grew preferably at temperatures above 24°C ($H > 20.107$; $p < 0.001$), and under salinity conditions above 18 parts per trillion (ppt) ($H < 16.698$, $p < 0.001$), in accordance with previous findings indicating that water surface temperatures are more favorable for *V. vulnificus* during the summer months (Kelly 1982; Parvathi et al. 2004; Randa et al. 2004). However, positive samples were found during all seasons, posing a risk of infection for consumers and fishermen all year round. Future studies should assess the effect of other environmental factors known to influence the number of *V. vulnificus* isolated from fish products such as pH, salinity, organic matter content, oxygen and light conditions (Pruzzo et al. 2005; Wang and

Gu 2005; Blackwell and Oliver 2008), as well as the possible effect of these factors on *V. vulnificus* pathogenicity

In conclusion, *V. vulnificus* was isolated from oyster and estuarine water samples of Pueblo Viejo Lagoon in Mexico during all seasons of a one-year period. Several putative virulence factors were characterized in all strains, which may pose a health risk for local fisherman and seafood consumers.

References

Amaro C, Biosca EG, Fouz B, Garay E. 1992. Electrophoretic analysis of heterogeneous lipopolysaccharides from various strains of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 by silver staining and immunoblotting. Curr Microbiol. 25:99–104.

Bang YB, Lee SE, Rhee JH, Choi SH. 1999. Evidence that expression of the V*ibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol. 181:7639–7642.

Barrera-Escoria G, Wong-Chang I, Sobrino-Figueroa AS, Guzmán-García X, Hernández-Galindo F, Saavedra-Villeda F. 1998. Estudio preliminares de contaminación bacteriológica en la laguna Pueblo Viejo, Veracruz, México. Revista Int Contamin Ambiental. 14:63–68.

Baqueiro-Cárdenas ER, Aldana-Aranda D, Sevilla ML, Rodríguez-Espinosa PF. 2007. Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo Lagoon, Veracruz, México. Transit Waters Bull. 2:37–46.

Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, Lerner L, Soboh S, Colodner R, Cameron DN, Wykstra DL, Farmer JJ. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel Vibrio Study Group. Lancet. 354:1421–1424.

Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein PC. 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*. N Engl J Med. 300:1–5.

Blackwell KD, Oliver JD. 2008. The ecology of *Vibrio vulnificus, Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. J Microbiol. 46:146–153.

Bross MH, Soch K, Morales R, Mitchell RB. 2007. *Vibrio vulnificus* infection: Diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 76:539–544.

Castañón GJA, Martínez LL, Miranda RR, Torres RE, León GMA. 2000. *Vibrio vulnificus* infection in Mexico: Report of fatal case. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 38:23–25.

Collins RF, Derrick JP. 2007. Wza: A new structural paradigm for outer membrane secretory proteins. Trends Microbiol. 15:96–100.

Cornejo JP, Rolon AL, Sifuentes JO. 2000. Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus*. Serie de casos. Rev Invest Clin. 52:632–637.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol. 3:95–99.

Elliot EI, Kaysner CA, Jackson L, Tamplin ML. 1995. FDA Bacteriological analytical manual. 8th ed. Chapter 9: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus, V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Gaithersburg, MD: AOAC International. p. 9.01–9.27.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003. Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp en pescados y mariscos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 75.

García MLM, Landgraf M. 1998. Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. J Appl Environ Microbiol. 84:747–751.

Gray LD, Kreger AS. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. Infect Immun. 48:62–72.

Hlady WG, Klontz KC. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981–1993. J Infect Dis. 173:1176–1183.

Inoue H. 2006. *Vibrio vulnificus* infection of the hand. J Orthop Sci. 11:85–87.

Kelly MT. 1982. Effect of temperature and salinity of *Vibrio* (*Beneckea*) *vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. Appl Environ Microbiol. 44:820–824.

Kim CM, Jeong KC, Rhee JH, Choi SH. 1997. Thermal-death times of opaque and translucent morphotypes of *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 63:3308–3310.
Kreger A, Lockwood D. 1981. Detection of extracellular toxin (s) produced by *Vibrio vulnificus*. Infect Immun. 33:583–590.
Kumamoto KS, Vukich DJ. 1998. Clinical infections of *Vibrio vulnificus*: A case report and review of the literature. J Emerg Med. 16:61–66.
Lee JH, Kim MW, Kim BS, Kim SM, Lee BC, Kim TS, Choi SH. 2007. Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus rtxA* essential for cytotoxicity *in vitro* and virulence in mice. J Microbiol. 45:146–152.
Miyoshi SI. 2006. *Vibrio vulnificus* infection and metalloprotease. J Dermatol. 33:589–595.
Miyoshi AI, Shinoda S. 1992. Activation mechanism of human Hageman factor-plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* metalloprotease. FEBS Lett. 308:315–319.
Panicker G, Bej AK. 2005. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: Comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*. Appl Environ Microbiol. 71:5702–5709.
Paranjpye RN, Strom MS. 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. Infect Immun. 73:1411–1422.
Paranjpye RN, Lara JC, Pepe JC, Pepe CM, Strom MS. 1998. The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEp-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. Infect Immun. 66:5659–5668.
Paranjpye RN, Johnson AB, Baxter AE, Strom MS. 2007. Role of type IV pilins in persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virgininca* oysters. Appl Environ Microbiol. 73:5041–5044.
Parvathi A, Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I. 2004. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oyster from two estuaries along the southwest coast of India, using molecular methods. Appl Environ Microbiol. 70:6909–6913.
Poblete R, Andresen M, Pérez C, Dougnac A, Díaz O, Tomicic V. 2002. Septic shock caused by *Vibrio vulnificus*. Report of one case. Rev Med Chil. 130:787–791.
Porras CG, Viana JJ, Mazari BC, Madero SS. 1994. *Vibrio vulnificus* in Mexico: A case report and review of the literature. Rev Invest Clin. 46:495–498.
Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: The role of interactions with hemolymph components. Environ Microbiol. 7:761–772.
Randa MA, Polz MF, Lim E. 2004. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. Appl Environ Microbiol. 70:5469–5476.
Reidl J, Klose K. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: Out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev. 20:125–139.
Rodrigues DP, Ribeiro RV, Hofer E. 1992. Analysis of some virulence factors of *Vibrio vulnificus* isolated from Río de Janeiro, Brazil. Epidemiol Infect. 108:463–467.
Secretaría de Salud. 2009. Norma Oficial Mexicana NOM-224-SSA1-2009, Bienes y Servicios. Productos de la Pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones Sanitarias.
Shao CP, Hor LI. 2000. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. Infect Immun. 68:3569–3573.
Shinoda S. 2005. Pathogenic factors of vibrios with special emphasis on *Vibrio vulnificus*. Yakugaku Zasshi. 125:531–547.
Smith B, Oliver JD. 2006. In situ gene expression by *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 72:2244–2246.
Strom MS, Paranjpye RN. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *V. vulnificus*. Microbes Infect. 2:177–188.
Torres L, Escobar S, López AI, Marco ML, Pobo V. 2002. Wound infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21:537–538.
Villanueva FS, Botello AV. 1990. Metal pollution in coastal areas of Mexico. Rev Environ Contam Toxicol. 157:53–94.
Villanueva FS, Botello AV. 1992. Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano: Una revisión. Rev Int Cont Ambient. 8:47.61.

Wang Y, Gu JD. 2005. Influence of temperature, salinity and pH on growth of environmental *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from Mai Po and the Deep Bay Nature Reserve Ramsar Site of Hong Kong. J Basic Microbiol. 45:83–93.

Wu SI, Lo SK, Shao CP, Tsai HW, Hor LI. 2001. Cloning and characterization of a periplasmic nuclease of *Vibrio vulnificus* and its role in preventing uptake of foreign DNA. Appl Environ Microbiol. 67:82–88.