



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**DETERMINACIÓN DE ALGUNOS FACTORES
DE VIRULENCIA EN CEPAS
DE *Vibrio vulnificus***

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A :

Q.B.P. SELENNE GABRIELA DÁVALOS MECALCO

TUTOR: DR. CARLOS VAZQUEZ SALINAS
ASESOR: M. en. C. ELSA IRMA QUIÑONES RAMÍREZ

MEXICO, D. F. DICIEMBRE 2006

INDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Características del microorganismo	3
I.1.1 Biotipos	3
I.2 Hábitat y reservorios	5
I.3 Distribución Geográfica	5
I.4 Epidemiología	6
I.5 Patogénesis	9
I.5.1 Dosis infectiva, Periodo de incubación, Signos y Síntomas	12
I.5.2 Factores de virulencia	12
II. JUSTIFICACIÓN	15
III. OBJETIVOS	16
IV. METODOLOGÍA	18
IV.1 Zona de estudio	18
IV.2 Criterio de selección de las muestras	18
IV.3 Obtención de la muestra	19
IV.4 Determinación de la salinidad y temperatura	20
IV.5 Análisis microbiológico	20
IV.6 Diferenciación en la morfología colonial	21
IV.7 Detección de enzimas	22
IV.7.1 Proteasa	22
IV.7.2 Hemolisina	22
IV.7.3 Lipasa con tween 80	22
IV.7.4 Dnasa	23
IV.7.5 Presencia de cápsula	23
IV.8 Evaluación del efecto de la toxina en cultivos celulares	23
IV.8.1 Obtención de la toxina	24
IV.8.2 Obtención de la monocapa	24
IV.8.3 Efecto de la toxina	24
IV.8.4 Adherencia en línea celular HEp-2	25
IV.8.5 Invasividad en línea celular HEp-2	25
IV.8.6 Titulación de la toxina.	26
	27

V. RESULTADOS	
V.1 Análisis Microbiológico	28
V.2 Determinación de temperatura y salinidad	28
V.3 Factores de virulencia	32
V.4 Evaluación del efecto de la toxina en cultivos celulares, adherencia e invasividad.	34
	40
VI. DISCUSIÓN	
VI.1 Análisis Microbiológico	44
VI.2 Efecto de la temperatura y salinidad	44
VI.3 Factores de virulencia	45
	47
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. BIBLIOGRAFÍA	52
IX. ANEXOS	63

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Características bioquímicas de los tres biotipos de <i>Vibrio vulnificus</i>	4
Cuadro 2 Casos y muertes debidos a <i>Vibrio vulnificus</i> de 1964 a 2006 por el consumo de productos de la pesca	7
Cuadro 3 Casos por <i>Vibrio vulnificus</i> debido al contacto con el agua y productos de la pesca.	8
Cuadro 4 Comparación de afecciones causadas por especies de <i>Vibrio</i> .	11
Cuadro 5 Resultados del análisis de las muestras de agua y ostiones recolectadas en los meses de septiembre de 2005 a junio de 2006 para el aislamiento de <i>Vibrio vulnificus</i> y por punto de muestreo.	29
Cuadro 6 Datos de salinidad y temperatura por mes y punto de muestreo.	32
Cuadro 7 Producción de enzimas como factores de virulencia de las cepas de <i>V. vulnificus</i> .	35
Cuadro 8 Resultados de adherencia e invasividad de las cepas de <i>Vibrio vulnificus</i> en la línea celular HEp-2	42
Cuadro 9 Titulos de la toxina obtenida de las cepas de <i>Vibrio vulnificus</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	10
Figura 2	17
Figura 3	18
Figura 4	18
Figura 5	19
Figura 6	28
Figura 7	28
Figura 8	30
Figura 9	31
Figura 10	31
Figura 11	31
Figura 12	33
Figura 13	38
Figura 14	38
Figura 15	38
Figura 16	38
Figura 17	39
Figura 18	39
Figura 19	39
Figura 20	39
Figura 21.	39

DETERMINACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Vibrio vulnificus*.

		Página
Figura 22	Testigo de células CHO	40
Figura 23	Efecto citopático de la toxina	40
Figura 24	Efecto de la toxina.	40
Figura 25	Destrucción de la monocapa (10Hrs).	40
Figura 26	Testigo de células HEp-2	41
Figura 27	Adherencia de <i>V. vulnificus</i> en células HEp-2	41
Figura 28	Invasividad de <i>V. vulnificus</i> en células HEp-2	41

ABREVIATURAS

APA	Agua Peptonada Alcalina
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
LIA	Agar Hierro Lisina
MIO	Medio de Movilidad Indol Ornitina
NaCl	Cloruro de Sodio
T ₁ N ₀	Agar Triptona sin Cloruro de Sodio
T ₁ N ₃	Agar Triptona con Cloruro de Sodio al 3%
T ₁ N ₆	Agar Triptona con Cloruro de Sodio al 6%
T ₁ N ₈	Agar Triptona con Cloruro de Sodio al 8%
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa
TSI	Agar Triple Azúcar Hierro
°C	Grados centígrados
‰	Partes por mil

I. INTRODUCCIÓN.

La importancia de los alimentos para la salud y la enfermedad se ha reconocido desde los tiempos de Hipócrates. Prescindiendo completamente del aspecto nutricional de los alimentos, no puede sorprender que estos sean para el hombre un vehículo de exposición a diversos agentes químicos y ser sustratos favorables para el desarrollo de microorganismos (SS. 1993).

El hombre como consumidor se encuentra al final de diversas cadenas alimenticias, expuesto un mayor número de veces a agentes químicos y microbianos. (OPS, 1982).

No se conoce la incidencia real de las enfermedades transmitidas por alimentos. Existen muchas razones para esto. En la mayoría de los países no es obligatorio denunciar a las autoridades sanitarias sobre las enfermedades transmitidas por alimentos. En los pocos países que tienen un sistema de recolección de denuncias, se observan graves incumplimientos. Se ha estimado que tan sólo se comunica el 1% de los casos reales de enfermedades transmitidas por alimentos. Esto se debe a que ni la víctima ni el médico son conscientes del papel etiológico de los alimentos. Además, a menudo no se dispone del alimento en cuestión para su análisis ni se identifica el auténtico agente etiológico de la enfermedad. Por lo tanto, las estadísticas siguientes sólo sirven para identificar tendencias y áreas de interés. (Mossel 1982).

Bryan (1980, 1987) ha analizado las enfermedades relacionadas con varias clases de productos pesqueros a lo largo del período 1970–84; este autor determinó que el producto involucrado con mayor frecuencia era el “pescado” seguido por los moluscos bivalvos y los crustáceos. Los moluscos son animales sésiles, que se alimentan filtrando el agua en donde se cultivan, concentrando los microorganismos y sustancias presentes en el medio, convirtiéndose en vehículos de enfermedades, aumentando su peligrosidad al ser consumidos crudos o ligeramente cocidos (Tamplin y Capers, 1992).

Las regiones de captura de los moluscos en donde el cólera, fiebre tifoidea y enfermedades similares son endémicas, constituyen un peligro mayor especialmente, si se realiza en las proximidades de la costa o en lugares en donde los asentamientos humanos son densos (Parker, *et al.*, 1994); como es el caso de la Laguna de Pueblo Viejo, en el Estado de Veracruz.

Los productos del mar (peces, moluscos, crustáceos, entre otros), son de gran importancia para el ser humano, como fuente de alimento (2002 hubo una producción mundial cercana a las 96,029,000 toneladas), por razones económicas (ganancias en el 2002 por \$548,933,000 dólares). El consumo mundial (humano) de pescado y marisco actualmente es de unos 91 millones de toneladas al año. El valor total de la producción pesquera mundial es de \$131 mil millones. (SAGARPA, 2002).

Los géneros bacterianos que pueden estar presentes en los productos de la pesca son: *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *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. compone la mayor parte de la biota presente en este ambiente. Las especies que conforman este género en su la mayoría son fácilmente cultivables en los laboratorios comunes; muchas especies del género son patógenos para los humanos y organismos marinos vertebrados e invertebrados (Zhang & Austin, 2005, Okada *et al*, 2005).

I.1 Características del microorganismo

Vibrio vulnificus es un patógeno que puede ser transmitido por alimentos obtenidos de la pesca, fue descrito en 1976, y se le denominó "Vibrio lactosa positivo" (Hollis, *et al.*, 1976). a partir de 1979, con la publicación de Farmer se estableció el nombre de *V. vulnificus*. Son bacilos pleomórficos (curvos y rectos) Gram negativos, móviles por la presencia de un flagelo polar, oxidasa positivo, no esporulados. Son termolábiles y se comportan como anaerobios facultativos.

En cuanto a su taxonomía, este microorganismo se le ubica según el *Manual Bergey* en:

- DOMINIO: Bacteria
- PHYLUM : Proteobacteria
- SECCION: Gammaproteobacteria
- CLASE: Zymobacteria
- ORDEN : Vibrionales
- FAMILIA : Vibrionaceae
- GENERO : Vibrio
- ESPECIE: vulnificus

(Madigan, *et al.*, 2002)

I.1.1 Biotipos

Se han descrito tres biotipos de *V. vulnificus* los dos primeros biotipos fueron definidos en base a las diferencias en la especificidad del huésped (Tison, *et al.*, 1982). El biotipo 1 es un patógeno oportunista para humanos, el cual puede ser transmitido por ingestión de productos de la pesca o por contacto con el agua de mar (Oliver, 1989). Tiene una gran variación en su lipopolisacárido (LPS), es indol positivo, no es virulento para anguilas y ha sido aislado de muestras clínicas y ambientales (Fouz *et al.*, 1996). Durante los meses de invierno las células de este biotipo son no cultivables en el ambiente acuático pero todavía retiene su virulencia (Oliver, *et al.*, 1991; Oliver, *et al.*, 1995).

En contraste, el biotipo 2 ha sido considerado como un patógeno obligado de anguillas esto se ha reportado a partir del aislamiento en anguillas enfermas (Tison, *et al.*, 1982; Song, *et al.*, 1990; Biosca y Amaro.1996), Fue descrito por primera vez en Japón a mediados de los años setenta, cuando afectó a una granja de cultivo de anguillas (*Anguilla japonica*). En 1989 aparece en España, posteriormente en Suecia, Noruega y Dinamarca (Biosca *et al.*, 1991, Sanjuan y Amaro, 2004). Recientemente se ha reconocido como un patógeno oportunista para el humano (Chiang y Chuang, 2003).

El tercer biotipo patógeno para el humano se describió en 1996 en un brote que se presentó en Israel por consumo de pescado y contacto con el agua de mar (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. Características bioquímicas de los tres biotipos de *Vibrio vulnificus*.

PRUEBA	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 3
Oxidasa	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+
Producción de ácido a partir de sacarosa	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	-	+
Producción de indol	+	-	+
Producción de ácido a partir de D-manitol	+	-	-
Producción de ácido a partir de D- sorbitol	-	+	-
Citrato de Simmon 's	+	+	-
Producción de ácido a partir de salicina	+	+	-
Producción de ácido a partir de celobiosa	+	+	-
Producción de ácido a partir de lactosa	+	+	-
ONPG	+	+	-

I.2 Hábitat y reservorios

Vibrio vulnificus es una bacteria común en el agua de los estuarios de climas tropicales, puede estar presente en alimentos de origen marino, como los bivalvos (ostiones, almejas) que tienen un importante papel en la transmisión de agentes etiológicos, debido a que se consumen crudos o insuficientemente cocinados. Otro alimento son los pescados que tienen un importante papel en la transmisión de agentes etiológicos (Hesselman, *et al.*, 1999)

Este microorganismo también está presente en agua, sedimento y plancton, todos ellos han sido descritos como reservorios (DePaola, *et al.*, 1994). *V. vulnificus* puede ser aislado de una gran variedad de ecosistemas acuáticos y la ocurrencia del organismo es favorecida por altas temperaturas (Kelly, 1982) ha sido aislado de una gran variedad de ecosistemas como, las costas del Golfo de México, Océano Atlántico y Océano Pacífico (Venkateswaran, *et al.*, 1989, Cornejo *et al.*, 2000).

I.3 Distribución geográfica

Vibrio vulnificus ha sido aislado de una gran variedad de ecosistemas como las costas del Golfo de México, Océano Atlántico, Océano Pacífico y Océano Índico (Venkateswaran *et al.*, 1989; Bisharat *et al.*, 1999; Hoi *et al.*, 1998; Yano *et al.*, 2004). 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).

Los factores ambientales responsables del número de *V. vulnificus* en los productos de la pesca, incluyen, la temperatura, pH, salinidad y el incremento de la materia orgánica (Wang & Gu, 2005). *V. vulnificus* se encuentra en las costas del Golfo de México, en ostiones y agua durante la época de lluvias o cuando la temperatura del agua es elevada (23°C) (Motes, *et al.*, 1998), y se ha estimado que de abril a octubre el 40 % o más de los ostiones capturados en las costas del Golfo de México pueden contener a este patógeno (Parker, *et al.*, 1994).

Se ha señalado que, los ostiones que son capturados en lugares, donde la temperatura y la salinidad favorecen el crecimiento de *V. vulnificus* son un riesgo, ya que puede ser causa de diversos cuadros clínicos. Altas concentraciones de este microorganismo, en estos bivalvos capturados en las costas del Golfo de México, se asocia con los meses de mas calor (Parvathi *et al.*, 2004). *V. vulnificus* se aísla con mayor frecuencia durante los meses de verano, cuando el agua tiene las mejores condiciones de salinidad y temperatura para su crecimiento. (Cornejo *et al.*, 2000)

Cuando la temperatura oscila entre 17 y 31°C con una salinidad entre 15 y 25 ‰ se ha observado que se incrementa la población de *V. vulnificus* (O'Neill, *et al.*, 1992). Los intervalos de temperatura y salinidad en los que se puede encontrar a este microorganismo son más amplios, siendo para la temperatura de 8 a 31°C y para la salinidad de 1 a 34 ‰ (Wright, *et al.*, 1996).

La temporada en la cual se reportan la mayoría de caos es, principalmente en verano, y ningún caso ha sido descrito entre los meses de diciembre a febrero. Se considera que durante esos meses, las aguas del golfo de México poseen las características óptimas para el crecimiento y desarrollo del vibrio tales como temperatura mayor de 20°C y salinidad entre 0.7 y 1.6‰. (Porras, *et al.*, 1994)

I.4 Epidemiología.

Vibrio vulnificus ha sido implicado, en infecciones humanas desde 1964 hasta 2006 . Los primeros reportes de infecciones causadas por *V. vulnificus* datan de 1974. En este año Thorsteinsson y colaboradores describieron tres pacientes con sepsis con o sin infecciones de tejidos blandos producidos por *vibrios* halofílicos no coléricos. Estos pacientes eran alcohólicos o cirróticos, y habían estado en contacto con ambientes marinos. Las lesiones eran ampollas necrotico-hemorrágicas. En 1976 Hollis y colaboradores aislaron e identificaron un *Vibrio* halofílico lactosa positivo en un paciente con un cuadro similar. (Porras, *et al.*, 1994). En los cuadros 2 y 3 se resumen los casos en los que *V. vulnificus* se ha implicado.

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
1964-1977	EUA	24	11	Ostiones	Blake, <i>et al.</i> , 1979
1972-1981	EUA	3	2	Ostiones y cangrejo	Bonner, <i>et al.</i> , 1983
1975-2001	Japón	80	----	Pescado	Inoue, 2006
1980-1981	EUA	12	----	Ostiones	Johnston, <i>et al.</i> , 1985
1981	EUA	1	1	Ostiones	Johnston, <i>et al.</i> , 1983
1981-1992	EUA	90	40	Ostiones	Hlady, <i>et al.</i> , 1993
1982	Corea	1	-	Pescado	Chong, <i>et al.</i> , 1982
1981-1982	EUA	19	12	ostiones	Tacket, <i>et al.</i> , 1984
1983	EUA	1	1	Ostiones y Almejas	Jenkins y Johnston, 1985
1985-1990	Taiwan	2	---	Ostines	Chuang, <i>et al.</i> , 1992
1987	Japón	1	0	Productos de la pesca	Kikawa, <i>et al.</i> , 1990
1988	EUA	1	1	Ostiones	Katz, <i>et al.</i> , 1988
1988-1995	EUA	204	111	Ostiones y almejas	Shapiro, <i>et al.</i> , 1998
1989	EUA	10	4	Ostión	Levine, <i>et al.</i> , 1993
1989-1997	Taiwan	10	5	-----	Ko, <i>et al.</i> , 1998
1990-1995	EUA	26	-	Ostiones	CDC 1996
1990-1999	México	8	7	Mariscos	Cornejo, <i>et al.</i> , 2000
1993-1996	EUA	16	3	Ostiones	CDC 1996
1994	México	1	1	Camarones	Porrás, <i>et al.</i> , 1994
1995	Israel	1	-	-	Bisharat, <i>et al.</i> , 1999
1997	EUA	1	1	Ostiones	Carlton, <i>et al.</i> , 1997
1999	México	1	1	Mariscos	Castañón, <i>et al.</i> , 2000
1999	Japón	1	1	Ostiones	Hui, <i>et al.</i> , 1999
2001	Chile	1	1	Ostiones	Poblete, <i>et al.</i> , 2002
2005	Corea	1	0	Pescado	Jung, <i>et al.</i> , 2005
2005	Taiwan	1	0	Mariscos	Huang, <i>et al.</i> , 2005
2005	Japón	1	0	Productos del mar	Inoue, 2006
2006	Japón	1	11	Oreja marina	Nagao, <i>et al.</i> , 2006

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

Año	País	No. de casos	Muertes	Medio de infección	Referencia
1964-1977	EUA	15	1	Contacto con agua	Blake, <i>et al.</i> , 1979
1972-1981	EUA	9	3	Contacto con productos de la pesca	Bonner, <i>et al.</i> , 1983
1974-1988	EUA	10	0	Contacto con agua	Hoge, <i>et al.</i> , 1989
1975-2001	Japón	13	----	Contacto con agua	Inoue, 2006
1979	EUA	1	1	---	Kelly, <i>et al.</i> , 1981
1980-1981	EUA	7	----	Contacto con el agua	Johnston, <i>et al.</i> , 1985
1981-1982	EUA	11	3	Contacto con agua	Tacket, <i>et al.</i> , 1984
1981-1992	EUA	35	----	Contacto con el agua	Hlady, <i>et al.</i> , 1993
1985-1990	Taiwan	26	12	Contacto con agua o pescados	Chuang, <i>et al.</i> , 1992
1988-1995	EUA	189	32	Contacto con grasa y agua	Shapiro, <i>et al.</i> , 1998
1989	China	1	----	Contacto con el agua	Arnold <i>et al.</i> , 1989
1989-1997	Taiwan	10	5	Contacto con agua	Ko, <i>et al.</i> , 1998
1989	EUA	8	0	Contacto con el agua	Levine, <i>et al.</i> , 1993
1991-1996	Dinamarca	14	----	Contacto con agua	Hoi, <i>et al.</i> , 1998
1992	Bélgica	5	-----	Contacto con agua Contacto con anguilas	Veenstra, <i>et al.</i> , 1994
1994	Suecia	1	0	Contacto con productos de la pesca	Melhus, <i>et al.</i> , 1995
1996-1997	Israel	62	0	Contacto con agua	Bisharat, <i>et al.</i> , 1999
2002	España	1	1	Contacto con agua	Torres, <i>et al.</i> , 2002
2002-2003	China	2	0	Contacto con productos e la pesca	Tang, <i>et al.</i> , 2006
2005	EUA	14	3	Contacto con el agua	CDC/MMWR, 2005
2006	Japón	1	0	Contacto con agua	Nagao, <i>et al.</i> , 2006

I.5 Patogénesis

I.5.1 Dosis infectiva, periodo de incubación y Signos y síntomas.

V. vulnificus es un agente patógeno oportunista, causa cuadros clínicos extraintestinales especialmente graves y causa tres formas de enfermedad humana:

- Gastroenteritis, que sigue después de la ingestión de ostras crudas. (Herrera y Esteve, 2001). los primeros síntomas como dolor abdominal, vómito y diarrea, ocurre 12 horas a 3 días después del consumo, se desconoce la dosis infectiva para esta expresión de la enfermedad, por lo general esta afección es autolimitante. En individuos inmunocomprometidos como diabéticos, cirróticos, con afección crónica en el hígado alcohólicos, 24 horas después de la ingestión de las bacterias, infecta torrente sanguíneo, caracterizado por fiebre, escalofrío, los niveles de fierro son elevados en suero disminuye la presión sanguínea llegando al shock séptico cuando son llevados para su atención, presentan hipotensión en un lapso de 12 horas a partir de su hospitalización (OPS, 1997, Shapiro, *et al.*, 1998, Grau y Pettis 2005).
- Infecciones en heridas con eritema, tumefacción y ampollas de contenido hemorrágico. Las personas afectadas son las que han tenido contacto con agua del mar o han manipulado mariscos. (Herrera y Esteve, 2001). Especialmente si el paciente tiene alguna enfermedad subyacente crónica. (Porrás, *et al.*, 1994). Uno de los grupos de riesgo implicados son los pescadores, que están expuestos continuamente a este ambiente en donde las lesiones en sus manos son usuales (Hlady, *et al.*, 1996). La letalidad es de 20%, pero la amputación o desbridamiento son frecuentemente necesarios (Sanjuán y Amaro, 2004).



Figura 1. Infección en heridas causadas por *V. vulnificus*

- Septicemia primaria, con malestar general fiebre, escalofrío y postración 24 horas después de la ingestión de las bacterias. Estos pacientes pueden presentar lesiones metastásicas cutáneas que evolucionan hacia la celulitis necrosante con extensas lesiones que pueden exigir la amputación y pueden terminar en la muerte. (Lamaury *et al.*, 1997, Herrera y Esteve, 2001). Mas de la mitad de las personas con septicemia primaria fallecen, la tasa de letalidad excede al 90 % en los casos de hipotensión (OPS, 1999).

El principal factor de riesgo de infección es la enfermedad hepática crónica, y con menor importancia el uso crónico de esteroides, la insuficiencia renal, la artritis gotosa, el alcoholismo y la diabetes mellitus. Se han observado mortalidad variable entre el 40 y el 63%. Se han reportado casos de neumonía, meningitis, osteomielitis y peritonitis primaria. (Cornejo *et al.*, 2000).

Se desconoce actualmente la relación dosis-respuesta; sin embargo, en la actualidad se están llevando a cabo estudios que permitan conocer la dosis infectiva y la diferenciación entre cepas virulentas y no virulentas, por lo que, en este momento, se considera que todas las cepas de *V. vulnificus* tienen el mismo potencial de patogenicidad (FAO, 2003).

El género *Vibrio* incluye 30 o más especies marinas o estuarinas, 12 de las cuales (*Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. metchnikovi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) son potencialmente patógenas para el ser humano. Tres especies tienen importancia clínica. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Altekruse, et al., 2000; Janda, et al., 1988; Oliver y Kaper, 1997). *V. vulnificus* es el más agresivo causando gastroenteritis, infecciones invasivas de heridas contaminadas y septicemias frecuentes mortales. (Herrera y Esteve, 2001).

En el Cuadro 3, se observa de manera comparativa las afecciones que causan algunas especies de *Vibrio*. (Heitmman, et al., 2005).

Cuadro 4. Comparación de afecciones causadas por especies de *Vibrio*.

Especies de <i>Vibrio</i>	Gastroenteritis	Septicemia	Infección en heridas
<i>V. cholerae</i> O1	+++	NO	+
<i>V. cholerae</i> no 1.	+++	+	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	++
<i>V. vulnificus</i> .	++	+++	+++
<i>V. fluviales</i> .	++	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	NO	+	+++
<i>V. damsela</i> .	NO	NO	++
<i>V. furnissii</i>	+	NO	NO
<i>V. hollisae</i> .	++	NO	NO
<i>V. mimicus</i> .	++	NO	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	NO
<i>V. cincinnatiensis</i> .	NO	+	NO

I.5.2 Factores de virulencia.

El papel de los factores de virulencia de *V. vulnificus* no se ha establecido muy bien, hasta ahora se han implicado muchas enzimas de tipo hidrolíticas en la patogénesis de este microorganismo: la lecitinasa, fosfolipasa, mucinasa, proteasas, elastasa, son enzimas que dañan la permeabilidad vascular (García y Landgraf, 1998), y metaloproteasa (Miyoshi y Shinoda, 1992, Shao y Hor, 2000).

La actividad de elastasa es la de una metaloproteasa, la cual está codificada en el gen *vvpE*, las características de la proteasa como un factor de virulencia han sido estudiadas usando la proteína purificada en modelos animales (Miyoshi, *et al*, 1998). La inyección de la elastasa purificada podría producir muchos de los aspectos observados en la enfermedad causada por *V. vulnificus*, incluyendo dermonecrosis, destrucción del tejido, edema y ulceración. La habilidad de esta proteasa de causar estos daños fue explicada por la capacidad que tiene de liberar histamina de las células plasmáticas e incrementar la permeabilidad vascular por la activación del factor Hageman. (Miyoshi y Shinoda, 1992).

Se ha señalado que *V. vulnificus* produce toxinas extracelulares como, la citolisina (hemolisina), con un peso molecular de 56 kDa, que está codificada en el gen *vvhA*, cuya actividad se ha relacionado con la lisis de glóbulos rojos a través de la formación de poros en la membrana de estas células y tienen efectos citotóxicos en las células de ovario de hámster chino (CHO) (Gray y Kreger, 1985), tiene actividad letal en ratones (Kreger y Lockwood, 1981, Wright y Morris, 1991).

Provoca permeabilidad vascular, cambios morfológicos y disfunción de las estructuras vasculares del pulmón, su efecto probado en endotelio de arteria pulmonar muestra que fragmenta el DNA y disminuyen los niveles de NAD⁺ y ATP dando por resultado la muerte celular (Kwon *et al*, 2001, Rho, *et al*, 2002). La actividad de la toxina es inhibida por el colesterol, por lo que se sugiere que este sea parte del receptor (Gulig, *et al*, 2005).

Yamanaka y colaboradores (1990), describen otra hemolisina con efectos citotóxico, con un peso molecular de 50 kDa, pero con menor actividad biológica. Se ha demostrado que la citolisina (hemolisina) puede ser letal para ratones a niveles de nano gramos por kilogramo de peso.

En un estudio con cepas de *Vibrio vulnificus* mutadas en el gen *vvh* inoculadas en ratones se observó que la virulencia de éstas no se redujo dada la mortalidad de los ratones (Wright, *et al*, 1991). En base a la secuencia del gen de la hemolisina que es altamente conservado, se han diseñado técnicas de biología molecular para usarse como blanco en la identificación del microorganismo a partir de muestras de agua, ostiones y pescado (Panicker, *et al*, 2004).

Este microorganismo tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales (Reyes, *et al.*, 1985), se sugiere que la presencia de pili sea el factor que ayude a la adhesión y que le permite tener una gran capacidad invasiva (Gander y LaRocco, 1989, Hackney y Dicharry, 1988). Se ha encontrado que *V. vulnificus* presenta un pili tipo IV, el cual es un factor importante para la adherencia en muchas bacterias Gram negativas (Stom *et al*, 1993). Paranjpye, *et al* en 1998, secuenciaron dos genes importantes para la formación del pili tipo IV, uno de estos es el *vvpC*, el cual codifica un polipéptido que es altamente homólogo a *PilC*, una proteína de función desconocida que es requerida para el ensamblaje del pili tipo IV. El otro gen *vvpD* codifica para un homólogo de la peptidasa bifuncional tipo IV/ N-metiltransferasa (Lory y Stoom, 1997).

Se dice que *V. vulnificus* dispone de hierro en suero humano para su sobrevivencia (Wright, *et al.*, 1991) debido a la producción de sideroforos (Starks, *et al.*, 2000). El hierro juega un papel importante en la patogénesis de *V. vulnificus*, los pacientes con hemocromatosis y otros síndromes que involucren elevación en los niveles de hierro sérico son más susceptibles a cursar con septicemia. (Hor *et al* 1999). Para poder obtener hierro el microorganismo produce un sideroforo llamado vulnibactina, con el cual adquiere hierro de la transferrina y la lactoferrina ya que este sistema posee una alta afinidad por el hierro. (Okujo, *et al*, 1996).

El polisacárido capsular (CPS) es vital para la virulencia de *V. vulnificus* ya que lo protege de la acción del complemento y la fagocitosis por macrófagos (Stom y Paranjpye, 2000). La presencia de la cápsula esta relacionada a la morfología colonial, cuando las cepas tienen cápsula son opacas y las cepas no capsuladas son translucidas (Wright, *et al*, 1999).

Vibrio vulnificus es ingerido con los productos de la pesca y podría pasar a través del ambiente ácido del estomago para llegar al epitelio intestinal donde el patógeno es capaz de invadir el tejido y pasar a torrente circulatorio (Linkous and Oliver, 1999).

II. JUSTIFICACIÓN

Los alimentos en ocasiones actúan como vehículos de transmisión de enfermedades para los humanos, y son causantes de altas tasas de morbilidad y mortalidad, por ello es importante poner de manifiesto aquellos microorganismos que nos afectan a si como las condiciones propicias y necesarias para que este tipo de contaminantes y afecciones se manifiesten.

En nuestro país las enfermedades entéricas ocupan el segundo lugar, siendo su origen el consumo de alimentos contaminados, entre los que se encuentran los productos de la pesca, los que pueden ser vehículos de transmisión si son capturados en lugares en donde la contaminación biológica es alta.

En México solo se ha informado de 10 casos por *Vibrio vulnificus* de los cuales solo un paciente sobrevivió. Debido a que no se ha tomado mucha importancia sobre ello, considere que era de gran importancia poner de manifiesto su presencia en ostiones y agua obtenidos de la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz, Méx., así como sus factores de virulencia mediante la producción de enzimas y en ensayos de biología celular.

III. OBJETIVOS

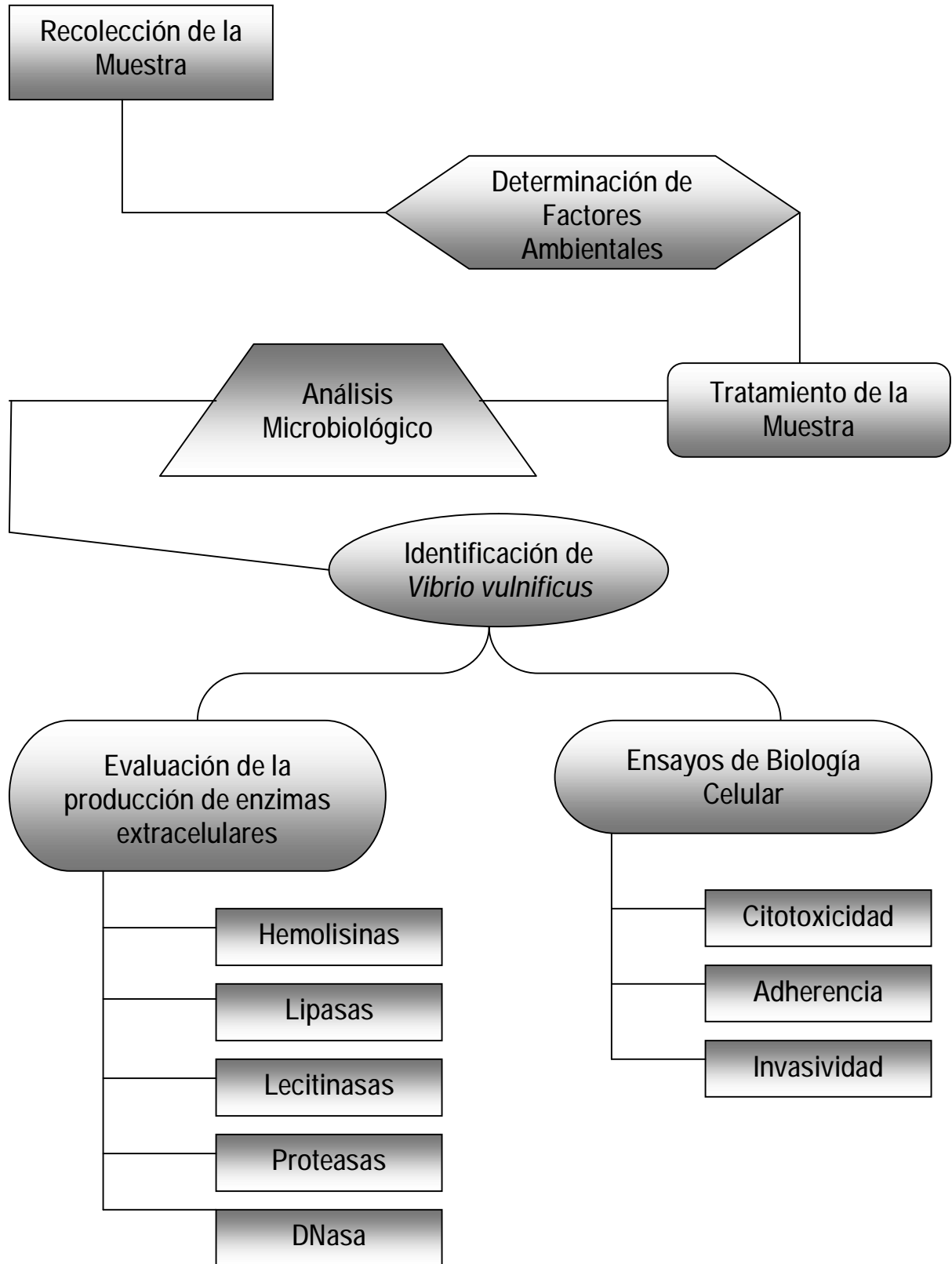
III. 1. GENERAL

Determinar algunos factores de virulencia en cepas de *Vibrio vulnificus* aisladas de muestras de agua y alimentos obtenidos en la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz, México.

III.2. ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar a *V. vulnificus* de muestras de ostiones y agua obtenidos de la laguna de Pueblo Viejo Veracruz, México.
2. Evaluar el efecto de la salinidad y la temperatura sobre *V. vulnificus* durante los meses de aislamiento.
3. Evaluar algunos factores de virulencia mediante la actividad enzimática cultivos celulares utilizando las líneas celulares CHO y HEp-2.

FIGURA 2. ESQUEMA DE TRABAJO.



IV. METODOLOGIAS

IV.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 97° 50' y 97° 57' de longitud oeste. 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; al oeste las de Mata de los Tinojos y Paso de Piedra. Los asentamientos humanos más importantes situados en sus márgenes son Cd. Cuahitémoc y Tampico Alto en Veracruz y la Cd. de Tampico en Tamaulipas (Anónimo, 1982)



Figura 3. Localización de la laguna de Pueblo Viejo Veracruz.

El cuerpo acuático tiene una superficie aproximada de 93.7 Km²; su eje mayor es paralelo a la costa y mide aproximadamente 15 Km de largo y 9.5 Km de ancho. En su interior existen isletas de tamaño pequeño. En general la profundidad es somera (1.75 m de profundidad promedio), siendo las partes más profundas características de la zona central norte sur (Contreras, 1988).



Figura 4. Laguna de Pueblo Viejo Veracruz

IV.2. Criterio de selección de las muestras

Para el desarrollo de este proyecto, se contemplaron 12 estaciones de colecta en los puntos que se considerarán críticos, de acuerdo a las Cooperativas y al Ayuntamiento de la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz.

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), El Puente (12). Para el caso de los ostiones solo se trabajaron 11, ya que, el puente tiene una profundidad de aproximadamente 30 m. Por lo que la recolección fue de 11 muestras de ostión y 12 de agua.



Figura 5. Distribución de los puntos de muestreo.

Para el análisis, las muestras de ostiones, se colocaron en bolsas de plástico, de forma independiente, evitando su contacto. En el caso del agua, se utilizó 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 hora. En el caso de las muestras de ostión, se transportaron en embalajes térmicos con hielo seco. El tiempo transcurrido entre la colecta y el análisis no fue mayor de 15 horas.

IV.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 y las algas posteriormente se desconcharon en condiciones asépticas, (Elliot, *et al.*, 1995) y se homogeneizaron en licuadora de manera aséptica.

IV.4. Determinación de la salinidad y temperatura.

Se determinó la salinidad 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).

1. Se colocó una gota del agua, de cada punto de muestreo, en el prisma.
2. Se cubrió de la luz del día, suavemente con la tapa del refractómetro.
3. Se tuvo la precaución de que la muestra cubriera totalmente la superficie del prisma.
4. Se observó la escala a través del ocular.
5. Se leyó la escala en donde se interceptan los límites de las líneas.
6. 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 envoltura de acero inoxidable, permitiendo solo ver la escala de temperatura, teniendo en uno de los extremos una cuerda que permitió deslizarlo y sumergirlo hasta aproximadamente 75 cm de profundidad.

IV.5. Análisis microbiológico

La metodología que se empleó para el aislamiento e identificación de *Vibrio 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.*, 1995).

1. De cada homogeneizado de ostiones, se pesaron 50 g en matraces que contenían 450 mL de agua peptonada alcalina (APA) (pH 8.5-9), para obtener la dilución 10^{-1} .
2. De las muestras de agua se transfirió 25 mL a matraces que contenían 225 mL de APA, para tener la dilución 1:10.
3. Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-3} por duplicado en APA.
4. Se incubaron a 35-37° y 42° C por 6 y 18 horas.
5. Cada tubo con crecimiento, se sembró en placas de Petri con agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS) por estría cruzada, y se incubaron a 37°C por 18-24 horas.
6. A tres colonias de cada placa, sacarosa negativo (verdes), circulares de 2 a 3 mm de diámetro, se les realizó la identificación, mediante las pruebas de halofiliismo en agar triptosa cloruro (T_1N_n), conteniendo 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}). Se incubara por 18-24 h a 35-37° C.
7. A las colonias que crecieron en 3 y 6 % de NaCl, se les realizó la tinción de Gram y la prueba de oxidasa.
8. La identificación fenotípica, solo se les realizó a las colonias oxidasa positiva y a las que, mediante la tinción de Gram fueron bacilos curvos Gram negativos. Las pruebas de metabolismo que se realizaron fueron: movilidad indol ornitina (MIO), triple azúcar hierro (TSI), agar hierro lisina (LIA), citrato de Simmon's, Producción de ácido a partir; de sacarosa, glucosa, arabinosa, celobiosa, lactosa, D- sorbitol, D-manitol, salicina y manosa producción de acetil metil carbinol en el medio de Voges Proskauer, descarboxilación de la ornitina y lisina, arginina dihidrolasa y ONPG.

IV.6. Diferencia en la morfología colonial. (García, *et al.*, 1998)

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

IV.7. Detección de enzimas

Las cepas que bioquímicamente se identificaron como *V. vulnificus* se les determinó la presencia de algunos factores de virulencia. Las cepas de *V. vulnificus* se crecieron en tubos que contenían BHI con 2% de NaCl. Se incubaron por 18-24 horas a 35-37 °C, se partió de estos tubos para sembrar los medios de las enzimas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como testigos de *V. vulnificus* una muestra clínica y una de ostiones, que fueron donadas por el Hospital Estatal de Tampico, Tamaulipas de la Secretaría de Salud

IV.7.1. Proteasa (García, *et al.*, 1998)

1. Se determinó la actividad proteolítica sembrando por estría cruzada en agar leche descremada (Skim milk) en concentración final del 2 %, con 2% de NaCl.
2. Se incubaron a 35-37 °C por 18-24 horas
3. La presencia de zonas claras alrededor del crecimiento indicó la proteólisis.

IV.7.2. Hemolisina (García, *et al.*, 1998)

1. La hemolisina se determinó sembrando por estría cruzada en agar base sangre con 5% de eritrocitos de carnero y de conejo
2. Se incubó por 18-24 horas a 35- 37°C,
3. Se observó la destrucción de los glóbulos rojos (hemólisis).

IV.7.3. Lecitinasas y Lipasa (García, *et al.*, 1998).

1. La lecitinasas y lipasa se determinaron sembrando por estría cruzada en agar nutritivo que contenía el 10% (v/v) de yema de huevo, con 2% de NaCl.
2. Se incubaron por 7 días a 35-37 °C.
3. Zonas de precipitado alrededor de la colonia demostraron la producción de lecitinasas y zonas claras indicaron la producción de lipasa.

IV.7.3 Lipasa con tween 80 (García, *et al.*, 1998).

1. Para la producción de lipasas se sembró tubos que contenía una concentración final de tween 80 (polioxietileno sorbitano monooleato) de 1% , con 2% de NaCl.
2. Se incubaron por 7 días a 35-37 °C.
3. Se observó intensificación del color del medio.

IV.7.4. Dnasa (García, *et al.*, 1998).

1. Se creció *Vibrio vulnificus* en un tubo con caldo BHI se incubó a 35-37 °C de 18-24 horas.
2. A los portaobjetos con agar DNA de timo de Carnero con 1% del colorante de azul de toluidina, se les realizó 20 hoyos con una pipeta Pasteur.
3. En cada perforación se colocó una gota con la pipeta Pasteur del caldo BHI con crecimiento del microorganismo. Se incubó a 35-37°C por 18-24 horas. La observación se realizó cada hora.
4. Se observó la degradación del DNA mediante un halo color de rosa.

IV.7.5. Presencia de cápsula

1. Se utilizaron cultivos de 18-24 horas incubados a 35-37 °C en caldo BHI
2. Se sembraron en agar gelosa glicero al 2% de NaCl por estría cruzada
3. Se incubaron a 35- 37°C por 18-24 horas.

4. Se tomo una colonia y se realizó un frotis el cual se tiño por la técnica de tinta china y rojo congo para demostrar la presencia de cápsula.
5. Se observó un halo transparente alrededor de la bacteria.

IV.8. Evaluación del efecto de la toxina en cultivos celulares (Elliot, *et al*, 1995)

IV.8.1. Obtención de la toxina

1. Se sembraron cada una de las cepas de *V. vulnificus* en un tubo con 3mL de caldo AKI (sin traducción), se incubaron de 18 horas en agitación (200rpm) a 37°C.
2. El cultivo se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos.
3. El sobrenadante se esterilizó por filtración utilizando una membrana 0.22 µm.
4. Como testigo se utilizó una cepa de *V. vulnificus* aislada de ostiones en trabajos previos como testigo positivo, y el medio AKI como negativo.
5. Como testigo positivo se utilizó una cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 11623 y como testigo negativo una cepa de *Escherichia coli* 25922.

IV.8.2. Obtención de la monocapa

1. Se obtuvo un crecimiento confluyente de células de ovario de hamster chino (CHO), en medio F12 con suero fetal de bovino (SFB), al 5%, en condiciones de 5% de CO₂ incubadas a 35-37° C.
2. Se eliminó el suero y el medio. Se adicionó un mililitro de pucks (NaCl, KCl, NaHCO₃ y EDTA, se esterilizó por filtración), para lavar la monocapa. Se añadió otro mililitro y se incubó 2 minutos a 37°C.
3. Se bajo la monocapa por paracentesis
4. Se agregó 10 mL del medio F12 mas 5% (0.5 mL) de SFB, se disgregó la monocapa (subiendo y bajando con la pipeta).
5. Se transfirió a otra botella para cultivo 2.5 mL y se adicionó 12.5 mL de medio F12 mas 15 % de SFB (1.9 mL), se incubó a 37 °C por 24-48 horas hasta observar 100% de confluencia.
6. Se eliminó el medio y suero, se lavo con 1 mL de pucks y con otro mililitro se bajo la monocapa con paracentesis, se adicionaron 12 mL de medio F12 y 15% (1.8 mL) de SFB y se disgregó la monocapa con la pipeta.

IV.8.3. Efecto de la toxina

7. En una placa de 96 pozos se colocó a cada uno 100 μ L de la monocapa con medio F12 y 15 % de SFB. Se incubó a 37° C con 5% de CO₂ por 24 horas.
8. Se eliminó el medio y suero y se lavó tres veces con regulador salino de fosfatos ((PBS) (NaCl, KCl, NaHPO₄ y K₂HPO₄ 0.1 M, pH 7.2), estéril.
9. Se agregó por pozo 80 μ L de medio F12 y 20 μ L del sobrenadante de la toxina (1:5). Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ hasta observar el efecto.
10. Se eliminó el medio y el sobrenadante, se lavó tres veces con PBS estéril, se agregó metanol absoluto hasta cubrir los pozos e inmediatamente se eliminó, se lavó tres veces con PBS.
11. 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 de colorante.
12. Se observó en el microscopio invertido y se tomaron fotos.
13. Se determinó cual era el tiempo en que se tiene la destrucción de la monocapa.

IV.8.4. Adherencia en la línea celular HEp-2

Preparación de los cultivos.

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

Preparación de la microplaca.

4. Se siguieron los pasos del punto IV.9.2 de obtención de la monocapa utilizando medio MEM en la línea celular Hep-2 (células cáncer laríngeo humano) y se llenaron microplacas de 24 pozos.

5. Las microplacas de 24 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células Hep-2, crecidas sobre un cubreobjetos estéril, se lavaron 3 veces con PBS estéril y se eliminó el último lavado.
6. Se colocó en cada pozo 975 μ L de medio MEM + 25 μ L de la suspensión bacteriana.
7. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO₂/ 3 horas.
8. Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
9. Se fijaron las células con metanol durante 1 minuto.
10. Se lavó 3 veces con PBS estéril.
11. Se realizó una tinción con Giemsa durante 20 minutos y se lavaron los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.
12. Se deshidrataron las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol.
13. Se montaron las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permount.
14. Se observó al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).
15. Se utilizó como testigo positivo de adherencia localizada a *E. coli* 886L, para adherencia difusa *E. coli* 251 y para adherencia agregativa *E. coli* JM221. Como testigo negativo *E. coli* 25922.

IV.8.5 Invasividad en la línea celular HEp-2

Preparación de los cultivos.

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

Preparación de la microplaca.

4. Se siguieron los pasos del punto IV.9.2 de obtención de la monocapa utilizando medio MEM en la línea celular Hep-2 (células cáncer laríngeo humano) y se llenaron microplacas de 24 pozos.

5. Las microplacas de 24 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células Hep-2, crecidas sobre un cubreobjetos estéril, se lavaron 3 veces con PBS estéril y se eliminó el último lavado.
6. Se colocó en cada pozo 975 μ L de medio MEM + 25 μ L de la suspensión bacteriana.
7. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO₂/ 3 horas.
8. Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
9. Se colocó en cada pozo 1000 μ L de medio MEM + Gentamicina (90 μ g/mL) + Lizosima (300 μ g/mL).
10. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO₂/ 3 horas.
11. Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
12. Se fijaron las células con metanol durante 1 minuto.
13. Se lavó 3 veces con PBS estéril.
14. Se realizó una tinción con Giemsa durante 20 minutos y se lavaron los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.
15. Se deshidrataron las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol.
16. Se montaron las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permount.
17. Se observó al microscopio con en el objetivo de inmersión (100x).
18. Se utilizó como testigo positivo de adherencia localizada a *E. coli* 886L, para adherencia difusa *E. coli* 251 y para adherencia agregativa *E. coli* JM221. Como testigo negativo *E. coli* 25922.

IV.8.6. Titulación de la toxina

14. A partir del punto 7 de IV.8.3, se agregará en la primera línea de pozos 180 μ L de medio F12 mas 20 μ L de la toxina (dilución 1:10), se realizaron diluciones subsecuentes, transfiriendo 100 μ L a la 2ª línea de pozos, y así sucesivamente hasta la línea de pozos 12. A partir de los pozos de la segunda línea hasta la doceava se pusieron 100 μ L de medio F12, por lo que se tuvieron las diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240, 1:20480.
15. Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ hasta observar el efecto.
16. Se continuó la metodología a partir del punto 10.

V. RESULTADOS

V.1. Análisis microbiológico

Durante los meses de septiembre de 2005 a junio de 2006 se analizaron un total de 230 muestras de las cuales 61 fueron positivas para el aislamiento de *V. vulnificus* 26.5% (61/230), el 11.7 % (27/230) de muestras de ostión y 14.8% (34/230) de agua (cuadro 4) (Figura 5 y 6)

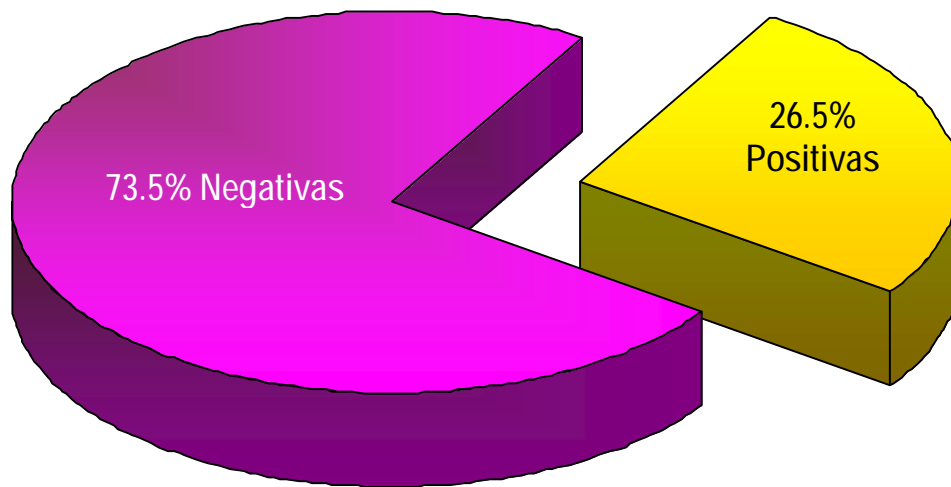


Figura 6. Total de muestras positivas

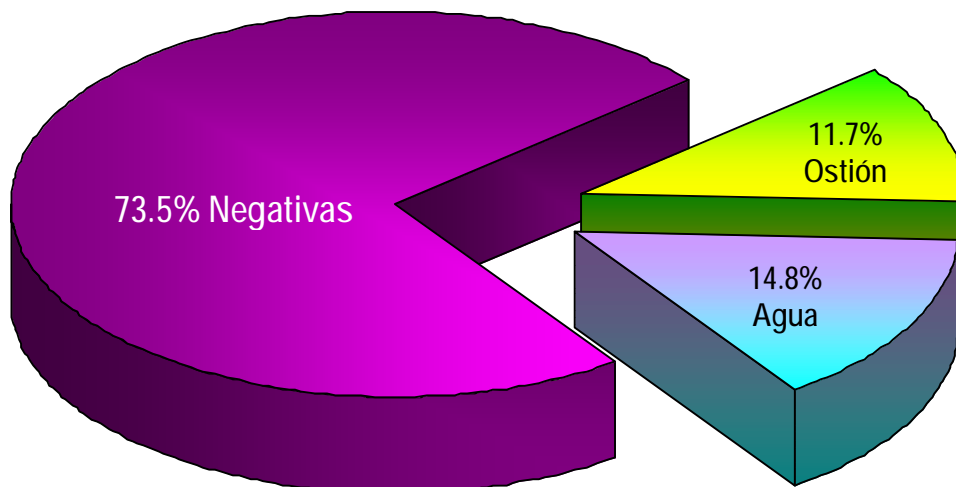


Figura 7. Muestras positivas para agua y ostión.

Cuadro 5. Resultados del análisis de las muestras de agua y ostiones recolectadas en los meses de septiembre de 2005 a junio de 2006 para el aislamiento de *Vibrio vulnificus* y por punto de muestreo.

MES	NUMERO DE MUESTRAS		NUMERO DE COLONIAS		TIPO DE MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
	ANALIZADAS	POSITIVAS	PRESUNTIVAS	CONFIRMADAS		
SEPTIEMBRE	11	1	25	7	OSTIONES	10
	12	1	19	11	AGUA	8
OCTUBRE	11	0	29	0	OSTIONES	-
	12	1	17	2	AGUA	11
NOVIEMBRE	11	1	15	3	OSTIONES	4
	12	0	12	0	AGUA	-
DICIEMBRE	11	1	17	1	OSTIONES	1
	12	0	15	0	AGUA	-
ENERO	11	0	10	0	OSTIONES	-
	12	1	13	1	AGUA	9
FEBRERO	11	1	12	1	OSTIONES	2
	12	0	11	0	AGUA	-
MARZO	11	4	17	5	OSTIONES	1,2,5,6
	12	9	21	13	AGUA	1,2,3,4,5,8,11,12
ABRIL	11	4	59	7	OSTIONES	1,2,3,4
	12	7	41	16	AGUA	1,2,3,5,6,7,9
MAYO	11	8	39	11	OSTIONES	1,2,3,4,6,8,10,11
	12	9	37	12	AGUA	1,2,3,4,6,7,8,9,11
JUNIO	11	7	98	31	OSTIONES	1,3,4,5,7,8,10
	12	6	59	25	AGUA	1,2,4,6,9,10
TOTAL	230	61	566	146		

A partir de las 61 muestras positivas se trabajaron un total de 566 colonias presuntivas con características de halofilismo (3-8% de NaCl), Gram (negativo) y oxidasa (positiva) de las cuales se confirmaron 146 como cepas de *V. vulnificus* 25.8% (146/566). De las cepas confirmadas el 45.2% (66/146) fueron aisladas de ostión y el 54.8% (80/146) se aislaron de agua. (Cuadro 5). Al hacer la identificación del biotipo mediante pruebas bioquímicas (Cuadro 1) se encontró que todas las cepas aisladas fueron biotipo 1.

Durante los meses de aislamiento fue posible el aislamiento de este microorganismo, entre los meses de marzo a junio y septiembre se tuvo el mayor número de muestras positivas, la temperatura mínima entre estos meses fue de 24°C y la máxima de 32 °C. En cuanto a la salinidad oscilo entre 5 a 2 ‰.(Figura 8).

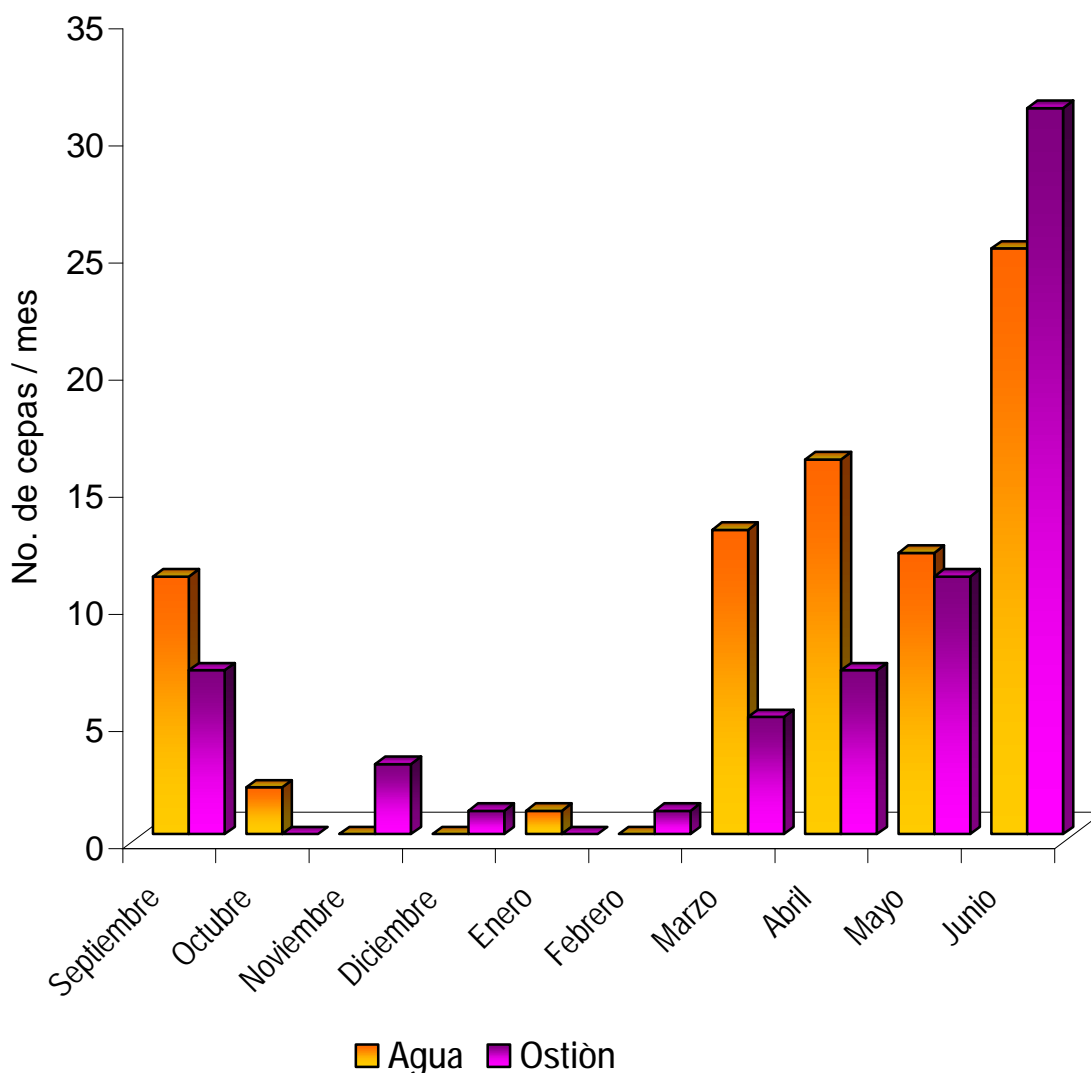


Figura 8. Número de cepas de *V. vulnificus* aisladas respecto al periodo de muestreo.

En todos los puntos de muestreo se aisló *V. vulnificus*. Se observó mayor número de muestras positivas en los primeros puntos, en el punto 12 se observó un menor número de aislamiento ya que solo se analizó el agua debido a su profundidad. (Figura 9).

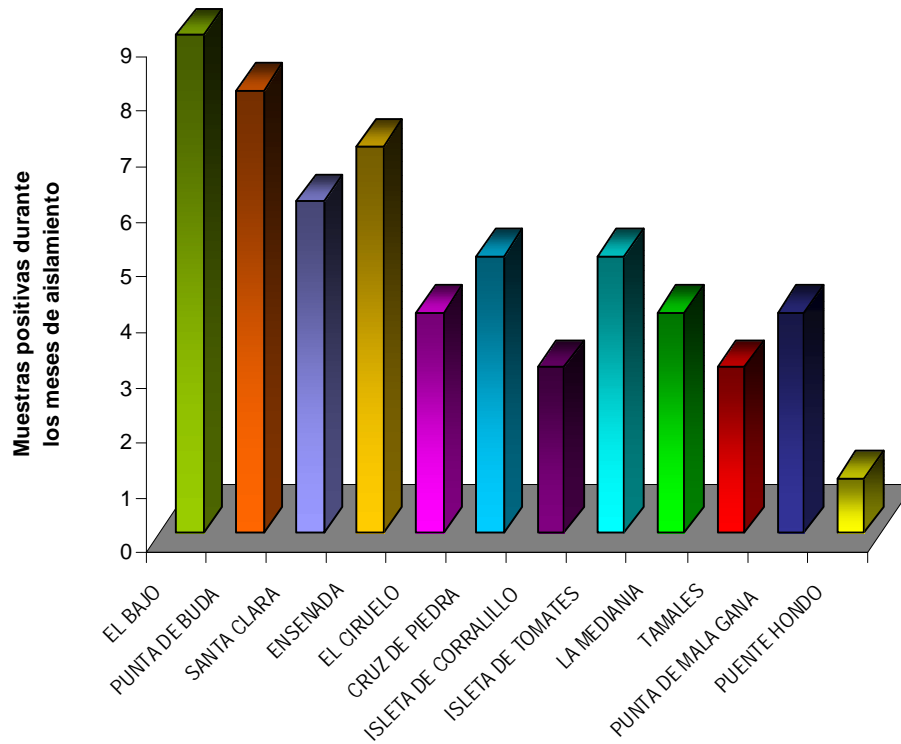


Figura 9. Muestras positivas durante el aislamiento en los diferentes puntos de muestreo.

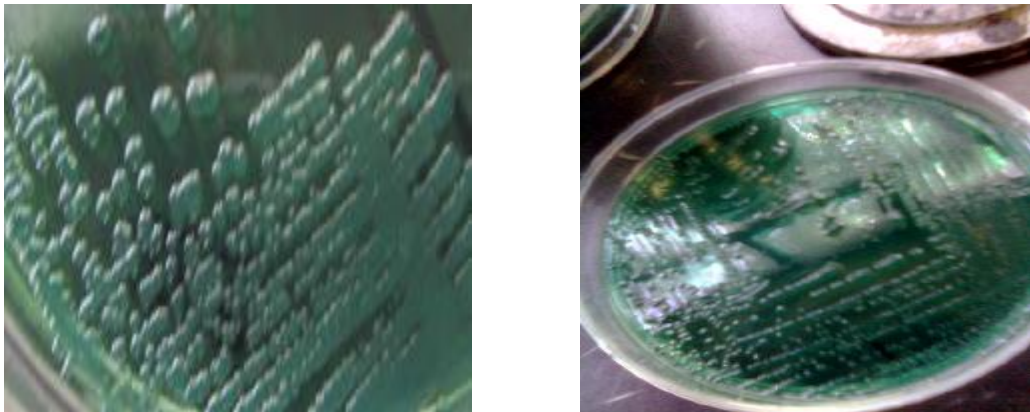


Figura 10. Morfología colonial de *V. vulnificus* en agar TCBS.

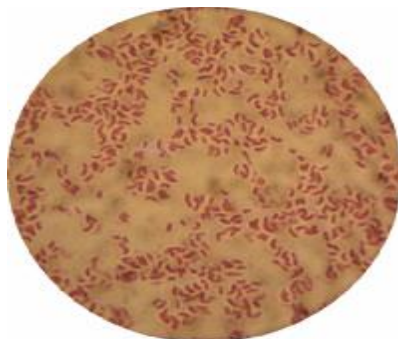


Figura 11. Morfología microscópica de *V. vulnificus* (tinción Gram) en 100x

V.2 Determinación de la salinidad y temperatura

Cuadro 6. Datos de salinidad y temperatura por mes y punto de muestreo

NOTA: Para observar las diferencias gráficamente se convirtió la salinidad a ppm.

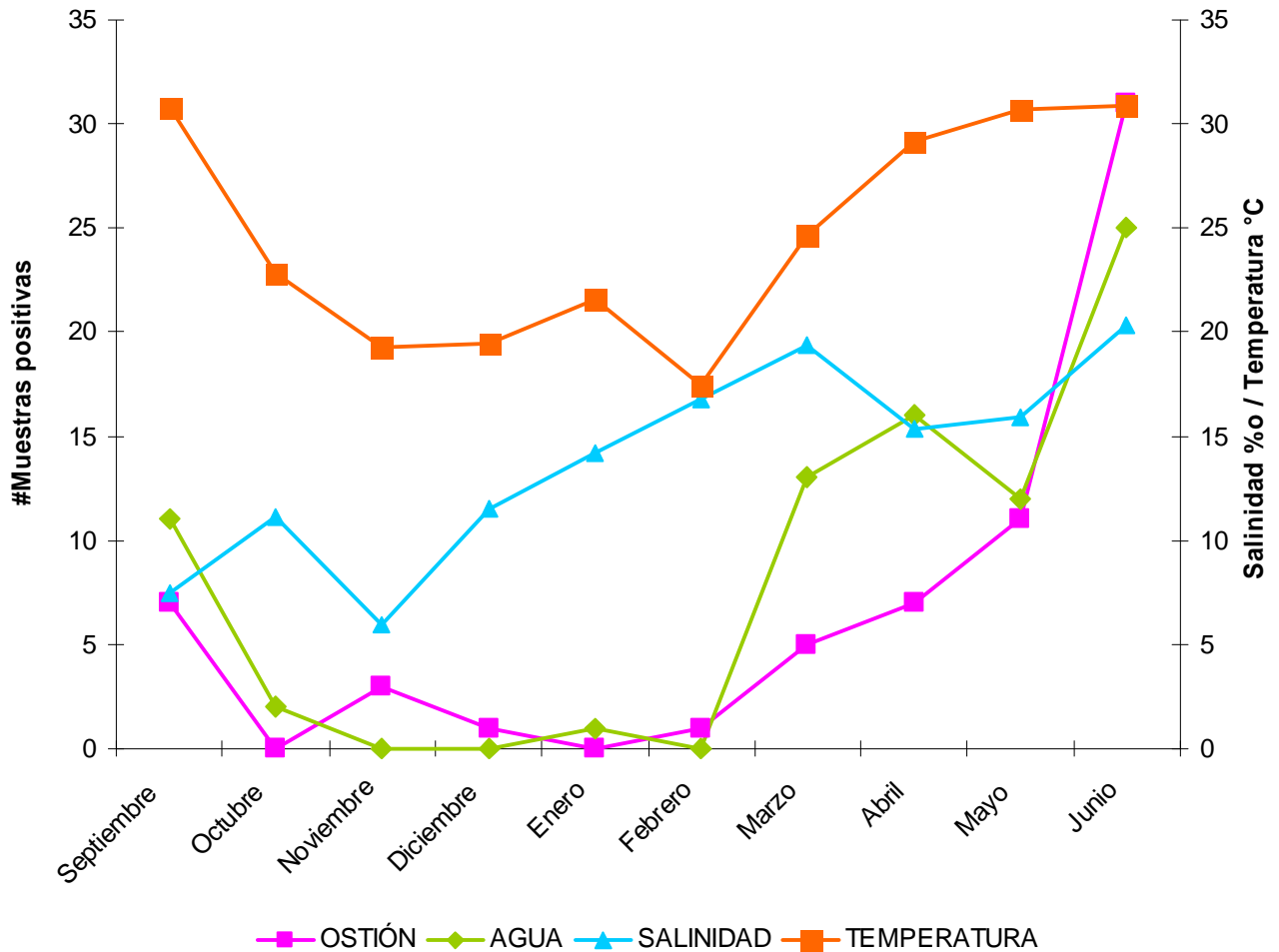
Punto de muestreo	SEP		OCT		NOV		DIC		ENE		FEB		MAR		ABR		MAY		JUN	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
1	8.4	29	9.0	23	7.0	20	15.0	19	14.0	23	16.0	18	19.0	25	17.0	28	15.0	29	21.0	32
2	8.7	31	11.0	23	6.8	20	13.0	19	15.5	21	17.0	17	19.5	24	17.0	29	13.0	31	19.0	28
3	5.7	30	10.0	23	6.0	20	12.0	19	12.0	22	16.0	17.5	19.0	25	18.0	29	15.0	30	20.0	30
4	7.8	31	11.0	22	5.9	19	10.0	20	16.5	21	18.0	16.5	20.0	24	21.0	30	18.5	30	21.0	31
5	7.0	31	9.0	23	4.5	20	7.0	20	14.0	22	17.0	17	19.0	24	20.0	30	16.0	31	20.0	31
6	7.9	30	12.0	23	3.5	20	8.0	20	14.0	22	16.0	17.3	20.0	25	19.0	29	13.5	31	20.0	31
7	7.5	32	11.0	24	4.0	20	8.0	20	13.5	21	16.0	17.5	19.0	24	17.0	30	14.5	31	21.0	30
8	7.4	31	13.0	23	6.0	19	13.0	19	14.0	21	17.0	17	19.0	25	16.0	30	17.0	32	21.5	32
9	5.0	31	12.0	23	7.0	19	13.0	19	12.0	21	16.0	18	20.0	25	16.5	30	14.0	31	20.0	32
10	6.8	32	11.9	22	6.0	18	13.0	20	15.0	22	17.0	17	20.0	25	15.0	28	14.0	31	21.0	32
11	7.6	31	12.5	23	8.0	18	13.0	19	14.5	21	18.0	18	19.0	25	17.5	28	17.0	31	21.0	32
12	10.9	30	11.0	22	7.0	18	14.0	20	16.0	22	18.0	18	20.0	25	10.0	29	10.0	30	19.0	30

S= Salinidad ‰ T=Temperatura °C

PUNTOS DE MUESTREO			
1	EL BAJO	7	ISLETA DE CORRALILLO
2	PUNTA DE BUDA	8	ISLETA DE TOMATES
3	SANTA CLARA	9	LA MEDIANIA
4	ENSENADA	10	TAMALES
5	EL CIRUELO	11	PUNTA DE MALA GANA
6	CRUZ DE PIEDRA	12	PUENTE HONDO

Se observó mayor aislamiento de *V. vulnificus* tanto en agua como ostión en el mes de junio cuando la temperatura era de 28 a 32°C y la salinidad era de 19 a 21.5 ‰.(Figura 12).

Figura 12. Distribución de aislamientos respecto al mes, producto y promedió de la salinidad y temperatura



V.3 Factores de virulencia.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de las 146 cepas analizadas, el 100% de las cepas (146/146), mostraron la producción de hemolisina tanto en glóbulos rojos de carnero como en glóbulos rojos de conejo, el 86.3% (126/146) tuvieron actividad de proteasas en agar leche descremada, la actividad de la lipasa fue de 78.7% (115/146) en medio Tween 80, y en agar yema de huevo, el 73.3% (107/146) manifestó actividad de la lecitinasa con un halo opaco alrededor del crecimiento en agar yema de huevo.

La actividad de proteasas se puso de manifiesto en todas las cepas al haber halos transparentes alrededor del crecimiento en agar leche descremada y en agar gelatina. Respecto a la DNasa el 80.1% (117/146) de las cepas hidrolizaron del DNA.

La presencia de capsula coincidió con la morfología colonial opaca ambas fueron en el 82.2% (120/146), el 17.8% (26/146) fueron translucidas y no presentaron capsula.

Cuadro 7 . Producción de enzimas como factores de virulencia de las cepas de *V. vulnificus*.

Cepa	Procedencia de la cepa	hemólisis		Proteasa	DNasa	lipasa		lecitinasa	capsula	Morfología colonial en BHI
		carnero	conejo			Tween 80	Yema de huevo			
Vv 1	Ostión	β	β	+	-	-	-	-	-	Translúcida
Vv 2	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 3	Ostión	β	β	+	-	-	-	-	+	Opaca
Vv 4	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 5	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 6	Ostión	β	β	+	-	-	-	-	-	Translúcida
Vv 7	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 8	Agua	β	β	-	+	-	-	-	+	Opaca
Vv 9	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 10	Agua	β	β	+	+	-	-	-	+	Opaca
Vv 11	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 12	Agua	β	β	-	-	+	+	-	-	Translúcida
Vv 13	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 14	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 15	Agua	β	β	+	-	-	-	-	+	Opaca
Vv 16	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 17	Agua	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 18	Agua	β	β	+	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 19	Agua	β	β	+	-	+	+	-	+	Opaca
Vv 20	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 21	Ostión	β	β	-	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 22	Ostión	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 23	Ostión	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 24	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 25	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 26	Ostión	β	β	+	-	-	-	-	+	Opaca
Vv 27	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 28	Ostión	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 29	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 30	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv31	Ostión	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 32	Agua	β	β	+	-	-	-	+	-	Translúcida
Vv 33	Agua	β	β	+	+	-	-	-	+	Opaca
Vv 34	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 35	Agua	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 36	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 37	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 38	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 39	Agua	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 40	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 41	Agua	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 42	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 43	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 44	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 45	Ostión	β	β	+	-	-	-	+	-	Translúcida
Vv 46	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 47	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 48	Ostión	β	β	+	-	-	-	-	-	Translúcida
Vv49	Ostión	β	β	-	+	-	-	+	-	Translúcida

DETERMINACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Vibrio vulnificus*

Cepa	Procedencia de la cepa	hemólisis		Proteasa	DNasa	lipasa		lecitinasa	capsula	Morfología colonial en BHI
		carnero	conejo			Tween 80	Yema de huevo			
Vv 50	Ostiones	β	β	+	-	+	+	-	+	Opaca
Vv 51	Ostiones	β	β	-	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 52	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 53	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 54	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 55	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 56	Agua	β	β	+	-	+	+	-	+	Opaca
Vv 57	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 58	Agua	β	β	-	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 59	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 60	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 61	Agua	β	β	-	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 62	Agua	β	β	+	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 63	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 64	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 65	Agua	β	β	-	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 66	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 67	Agua	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 68	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 69	Ostión	β	β	+	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 70	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 71	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 72	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 73	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 74	Ostión	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 75	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 76	Ostión	β	β	-	-	+	+	+	-	Translúcida
Vv 77	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 78	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 79	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 80	Agua	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv81	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 82	Agua	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 83	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 84	Agua	β	β	+	-	+	+	-	-	Translúcida
Vv 85	Agua	β	β	-	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 86	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 87	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 88	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 89	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv90	Agua	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 91	Ostión	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 92	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 93	Ostión	β	β	+	-	-	-	-	-	Translúcida
Vv 94	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 95	Ostión	β	β	-	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 96	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 97	Ostión	β	β	+	-	+	+	-	-	Translúcida
Vv 98	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 99	Ostión	β	β	-	-	+	+	-	-	Translúcida
Vv 100	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca

DETERMINACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Vibrio vulnificus*

Cepa	Procedencia de la cepa	hemólisis		Proteasa	DNasa	lipasa		lecitinasa	capsula	Morfología colonial en BHI
		carnero	conejo			Tween 80	Yema de huevo			
Vv101	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv102	Ostión	β	β	-	+	-	-	-	-	Translúcida
Vv103	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv104	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv105	Ostión	β	β	+	-	+	+	-	+	Opaca
Vv106	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv107	Ostión	β	β	+	+	-	-	-	-	Translúcida
Vv108	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv109	Ostión	β	β	+	-	+	+	-	+	Opaca
Vv110	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 111	Ostión	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 112	Ostión	β	β	+	-	+	+	-	-	Translúcida
Vv 113	Ostión	β	β	-	+	+	+	+	+	Opaca
Vv114	Ostión	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 115	Ostión	β	β	+	+	-	-	+	-	Translúcida
Vv 116	Ostión	β	β	-	-	+	+	+	-	Translúcida
Vv 117	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 118	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 119	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 120	Ostión	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 121	Ostión	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 122	Agua	β	β	-	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 123	Agua	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 124	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 125	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 126	Agua	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 127	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 128	Agua	β	β	-	-	+	+	-	-	Translúcida
Vv 129	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 130	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 131	Agua	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 132	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 133	Agua	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 134	Agua	β	β	+	+	-	-	+	+	Opaca
Vv 135	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 136	Agua	β	β	-	+	-	-	-	-	Translúcida
Vv 137	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 138	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 139	Agua	β	β	+	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 140	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv141	Agua	β	β	+	-	+	+	+	+	Opaca
Vv 142	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 143	Agua	β	β	-	+	+	+	-	+	Opaca
Vv 144	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca
Vv 145	Agua	β	β	-	+	-	-	-	-	Translúcida
Vv 146	Agua	β	β	+	+	+	+	+	+	Opaca



Figura 13. Hemolisina en agar base sangre de eritrocitos de carnero.

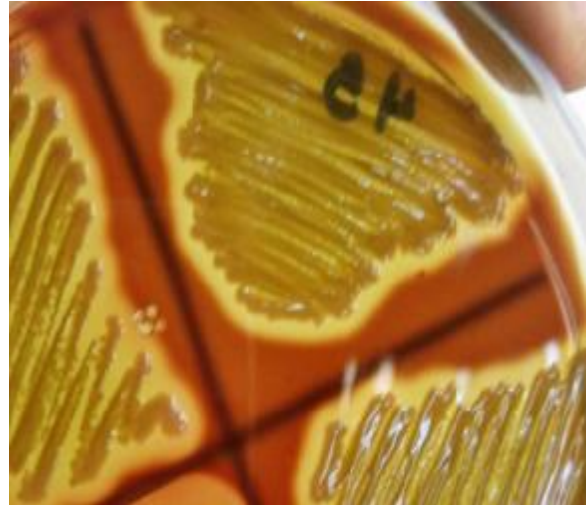


Figura 14. Hemolisina en agar base sangre de eritrocitos de conejo.

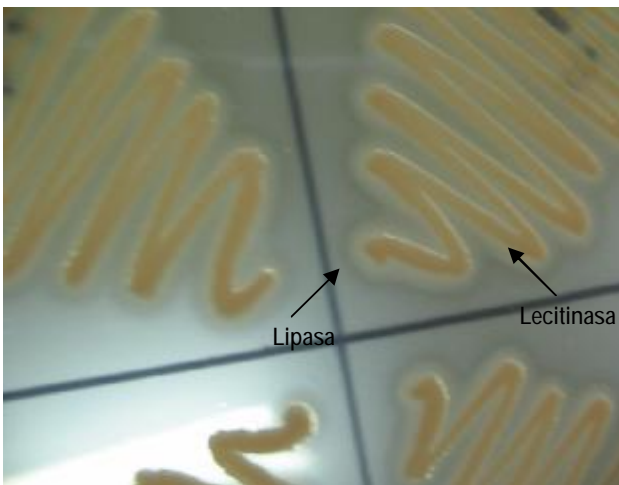


Figura 15. Lipasa y lecitinasa en agar yema de huevo.



Figura 16. Lecitinasa en agar yema de huevo.

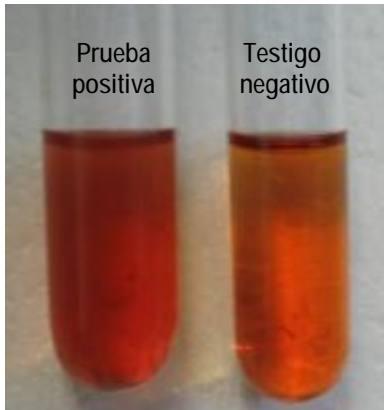


Figura 17. Lipasa en Tween 80.



Figura 18. Proteasa en agar leche descremada al 2%.



Figura 19. DNasa en agar DNA de timo de carnero.

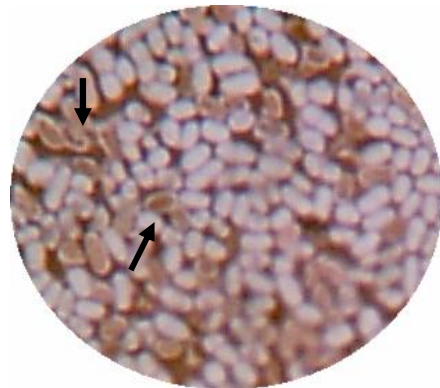


Figura 20. Cápsula (Rojo Congo).

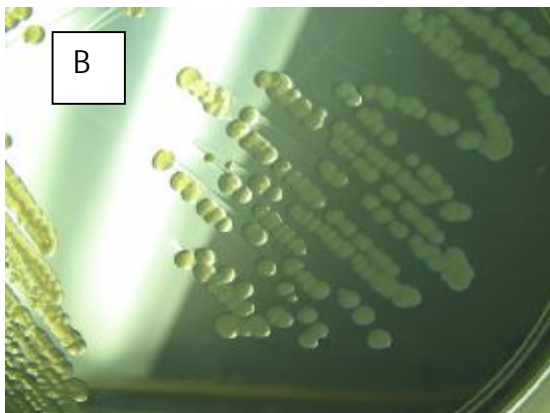


Figura 21. Morfología colonial en agar BHI
A) Translúcida B) Opaca

V.4 Evaluación del efecto de la toxina en cultivos celulares, adherencia e invasividad.

En relación a los ensayos de biología celular se observó que todas las cepas 100% (146/146) son citotóxicas para la línea celular CHO, en un periodo de incubación de 10 horas, este efecto se caracterizó por cambio en la morfología de las células (elongación) (Figura 23 y 24) y destrucción de la monocapa (Figura 25).

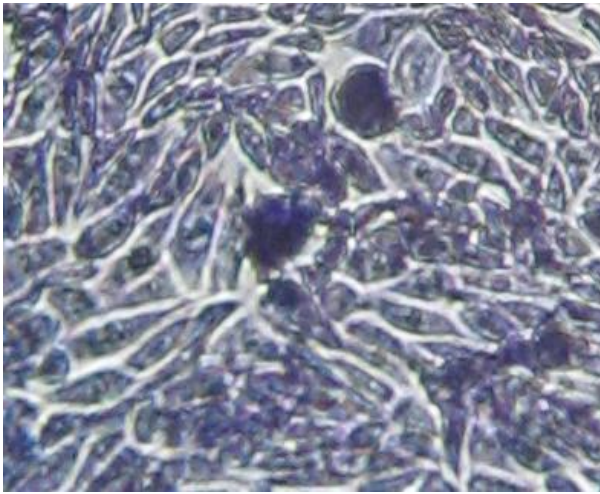


Figura 22. Testigo de células CHO.

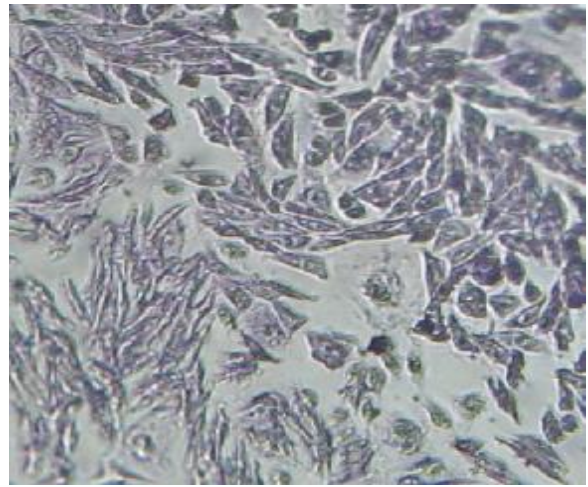


Figura 23. Efecto citopático de la toxina

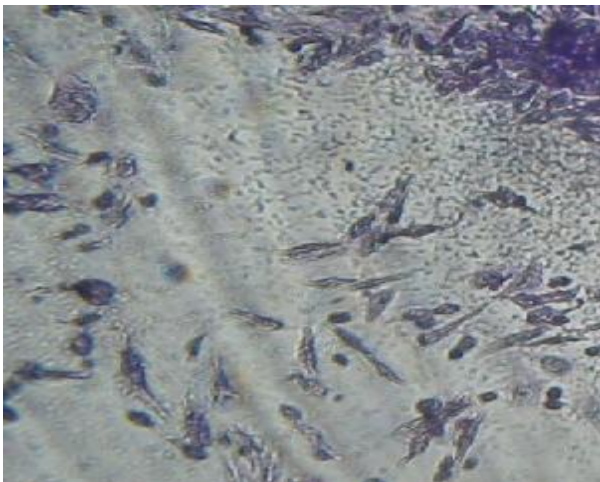


Figura 24. Efecto de la toxina.

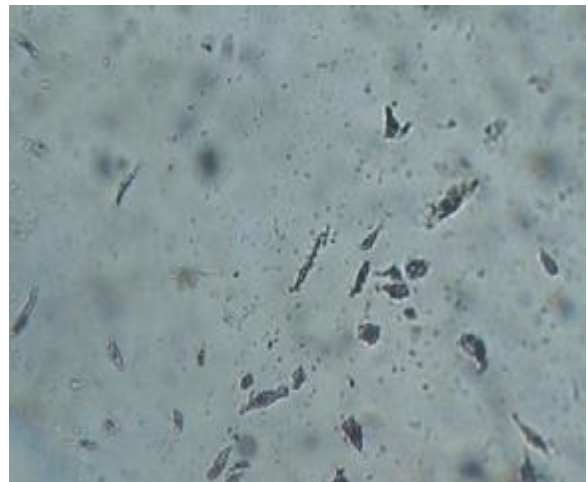


Figura 25. Destrucción de la monocapa (10Hrs).

El 96.6% (141/146) de las cepas analizadas mostraron el fenómeno de adherencia en la línea celular HEp-2, los datos de invasividad obtenidos indican que el 58.9 % (86/146) de las cepas son capaces de invadir esta línea celular (Cuadro 8).

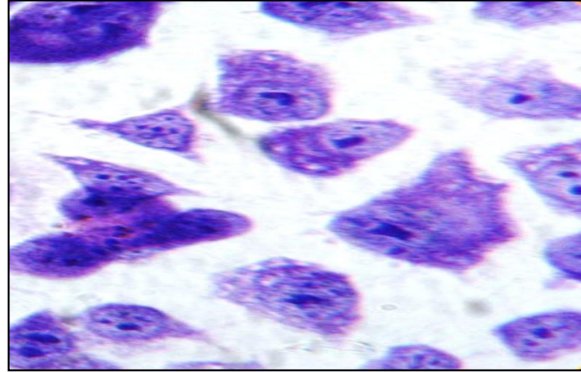


Figura 26. Testigo de células HEP-2

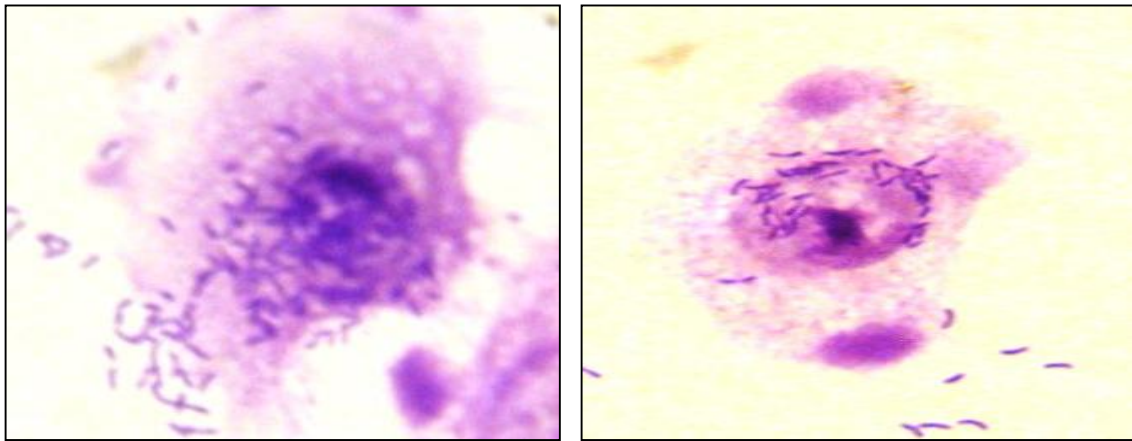


Figura 27. Adherencia de *V. vulnificus* en células HEP-2

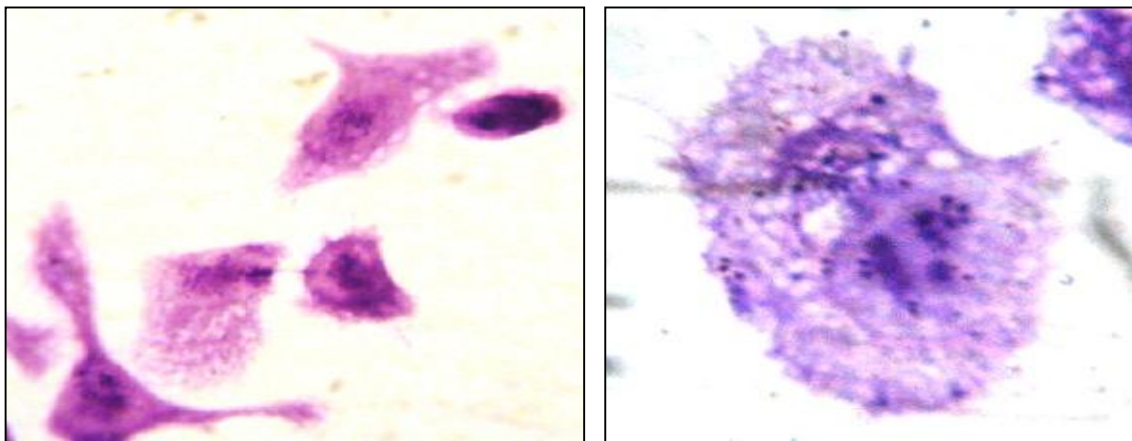


Figura 28. Invasividad de *V. vulnificus* en células HEP-2

Cuadro 8. Resultados de adherencia e invasividad de las cepas de *Vibrio vulnificus* en la línea celular HEP-2

Cepa	Adh	Inva	Cepa	Adh	Inva	Cepa	Adh	Inva	Cepa	Adh	Inva	Cepa	Adh	Inva	Cepa	Adh	Inva
Vv1	+	+	Vv27	+	+	Vv53	+	-	Vv79	+	+	Vv105	+	+	Vv131	+	+
Vv2	+	-	Vv28	+	-	Vv54	+	-	Vv80	+	-	Vv106	+	+	Vv132	+	+
Vv3	+	+	Vv29	+	-	Vv55	+	-	Vv81	+	+	Vv107	+	-	Vv133	+	-
Vv4	+	-	Vv30	+	-	Vv56	+	+	Vv82	+	-	Vv108	+	+	Vv134	+	-
Vv5	+	-	Vv31	+	-	Vv57	+	-	Vv83	+	-	Vv109	+	+	Vv135	+	+
Vv6	+	-	Vv32	-	+	Vv58	+	+	Vv84	+	+	Vv110	+	+	Vv136	+	+
Vv7	+	+	Vv33	+	-	Vv59	+	-	Vv85	+	+	Vv111	+	-	Vv137	+	+
Vv8	+	+	Vv34	+	-	Vv60	+	+	Vv86	+	+	Vv112	+	+	Vv138	+	-
Vv9	+	+	Vv35	+	+	Vv61	+	-	Vv87	+	+	Vv113	+	+	Vv139	+	-
Vv10	+	+	Vv36	+	+	Vv62	+	+	Vv88	+	+	Vv114	+	+	Vv140	+	+
Vv11	+	-	Vv37	+	+	Vv63	+	-	Vv89	+	+	Vv115	-	+	Vv141	+	+
Vv12	-	-	Vv38	+	+	Vv64	+	+	Vv90	+	-	Vv116	+	+	Vv142	+	+
Vv13	+	+	Vv39	+	-	Vv65	+	-	Vv91	+	-	Vv117	+	-	Vv143	+	-
Vv14	+	-	Vv40	+	-	Vv66	+	+	Vv92	+	-	Vv118	+	+	Vv144	+	+
Vv15	+	-	Vv41	+	-	Vv67	+	-	Vv93	+	-	Vv119	+	+	Vv145	-	+
Vv16	+	+	Vv42	+	-	Vv68	+	+	Vv94	+	+	Vv120	+	+	Vv146	+	-
Vv17	+	+	Vv43	+	+	Vv69	+	-	Vv95	+	+	Vv121	+	+			
Vv18	+	+	Vv44	+	-	Vv70	+	-	Vv96	+	+	Vv122	+	+			
Vv19	+	+	Vv45	-	+	Vv71	+	+	Vv97	+	+	Vv123	+	-			
Vv20	+	+	Vv46	+	+	Vv72	+	+	Vv98	+	+	Vv124	+	-			
Vv21	+	+	Vv47	+	+	Vv73	+	+	Vv99	+	-	Vv125	+	+			
Vv22	+	+	Vv48	+	-	Vv74	+	+	Vv100	+	+	Vv126	+	+			
Vv23	+	-	Vv49	+	-	Vv75	+	+	Vv101	+	+	Vv127	+	+			
Vv24	+	+	Vv50	+	+	Vv76	-	+	Vv102	+	-	Vv128	+	+			
Vv25	+	+	Vv51	+	-	Vv77	+	-	Vv103	+	+	Vv129	+	+			
Vv26	+	-	Vv52	+	-	Vv78	+	+	Vv104	+	-	Vv130	+	-			

DETERMINACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Vibrio vulnificus*

Se obtuvieron diferentes títulos de las toxinas de cepas de *V. vulnificus*. En el 39.7% (58/146) el título fue de 1:10, 39.0% (57/146) de 1:20, y el 21.2% (31/146), con título de 1:40. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Títulos de la toxina obtenida de las cepas de *Vibrio vulnificus*

Cepa	Título	Cepa	Título	Cepa	Título	Cepa	Título	Cepa	Título	Cepa	Título
Vv1	1:10	Vv27	1:40	Vv53	1:10	Vv79	1:10	Vv105	1:40	Vv131	1:40
Vv2	1:10	Vv28	1:10	Vv54	1:20	Vv80	1:10	Vv106	1:20	Vv132	1:20
Vv3	1:40	Vv29	1:10	Vv55	1:20	Vv81	1:10	Vv107	1:20	Vv133	1:10
Vv4	1:10	Vv30	1:10	Vv56	1:40	Vv82	1:10	Vv108	1:10	Vv134	1:40
Vv5	1:10	Vv31	1:10	Vv57	1:20	Vv83	1:10	Vv109	1:10	Vv135	1:20
Vv6	1:20	Vv32	1:20	Vv58	1:40	Vv84	1:20	Vv110	1:10	Vv136	1:10
Vv7	1:40	Vv33	1:10	Vv59	1:20	Vv85	1:40	Vv111	1:10	Vv137	1:10
Vv8	1:20	Vv34	1:20	Vv60	1:40	Vv86	1:10	Vv112	1:20	Vv138	1:20
Vv9	1:40	Vv35	1:40	Vv61	1:10	Vv87	1:20	Vv113	1:20	Vv139	1:40
Vv10	1:40	Vv36	1:40	Vv62	1:40	Vv88	1:40	Vv114	1:20	Vv140	1:10
Vv11	1:20	Vv37	1:40	Vv63	1:10	Vv89	1:20	Vv115	1:10	Vv141	1:10
Vv12	1:10	Vv38	1:20	Vv64	1:20	Vv90	1:10	Vv116	1:20	Vv142	1:10
Vv13	1:40	Vv39	1:20	Vv65	1:10	Vv91	1:10	Vv117	1:20	Vv143	1:20
Vv14	1:20	Vv40	1:10	Vv66	1:20	Vv92	1:10	Vv118	1:20	Vv144	1:20
Vv15	1:20	Vv41	1:10	Vv67	1:10	Vv93	1:10	Vv119	1:10	Vv145	1:10
Vv16	1:10	Vv42	1:10	Vv68	1:40	Vv94	1:40	Vv120	1:40	Vv146	1:40
Vv17	1:20	Vv43	1:20	Vv69	1:20	Vv95	1:20	Vv121	1:20		
Vv18	1:40	Vv44	1:10	Vv70	1:20	Vv96	1:20	Vv122	1:20		
Vv19	1:40	Vv45	1:20	Vv71	1:20	Vv97	1:10	Vv123	1:10		
Vv20	1:10	Vv46	1:40	Vv72	1:10	Vv98	1:20	Vv124	1:20		
Vv21	1:40	Vv47	1:20	Vv73	1:10	Vv99	1:10	Vv125	1:20		
Vv22	1:20	Vv48	1:10	Vv74	1:20	Vv100	1:40	Vv126	1:10		
Vv23	1:20	Vv49	1:10	Vv75	1:40	Vv101	1:20	Vv127	1:20		
Vv24	1:20	Vv50	1:40	Vv76	1:20	Vv102	1:20	Vv128	1:20		
Vv25	1:40	Vv51	1:20	Vv77	1:10	Vv103	1:10	Vv129	1:20		
Vv26	1:20	Vv52	1:10	Vv78	1:10	Vv104	1:10	Vv130	1:10		

VI. DISCUSIÓN.

VI.1 Análisis microbiológico.

En este estudio se aisló a *V. vulnificus* en el 26.5% (61/230) de las muestras recolectados en la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, analizadas en los meses de septiembre de 2005 a junio de 2006, y se encontró en el 14.8% (34/230) en muestras de agua y en el 11.7 % (27/230) de las muestras do ostión. El aislamiento de este microorganismo en agua y ostiones se ha informado por diversos autores. O'Neill y colaboradores (1990) lo aisló en el 19.2% de las muestras de agua y bivalvos. Matté y col en (1994) demostró su presencia en el 12 % de muestras de ostiones. Otros estudios demuestran la incidencia de *V. vulnificus* en el 16.9 % de las muestras de ostiones de las costas del océano Atlántico y Pacífico, así como del Golfo de México (Motes, *et al*, 1998). Parvathi y colaboradores (2004) lo encontraron en el 56% de las muestras de ostiones a *V. vulnificus*.

El análisis se realizó en ostiones debido a que los moluscos poseen en general una alimentación por filtración, este sistema de nutrición permite que se acumulen una gran cantidad de microorganismos y otros elementos presente en el ambiente donde los bivalvos se desarrollan debido a que tienen la capacidad de filtrar más de 34 litros de agua por hora (Galstsoff., 1964). En México el consumo de ostiones es una práctica común y la mayoría de las personas los consume crudos, sin saber el riesgo potencial que implica ya que puede contener gran cantidad de patógenos, no solo *V. vlnificus*.

La relación entre *V.vulnificus* y los ostiones en el ambiente ha sido demostrada previamente, también se ha demostrado su resistencia a la depuración, el cual es un procedimiento efectivo en la eliminación de otras especies de bacterias de los ostiones (Jones, *et al*, 1991). Los factores ambientales responsables del numero de *V vulnificus* en los ostiones incluyen, la temperatura, pH, salinidad, el incremento de la materia orgánica el contenido de oxígeno y de luz (Pruzzo *et al.*, 2005).

Se encontró que todas las cepas aisladas fueron biotipo 1, estos resultados indican que el ambiente de la Laguna de pueblo Viejo Veracruz podría considerarse como un reservorio y posible vehículo para la transmisión de *V. vulnificus* biotipo 1. En China también encontraron a este biotipo en bivalvos y agua que se vende en sus mercados (Yano *et al.*, 2004).

VI.1 Efecto de la temperatura y salinidad.

En el presente estudio se observó que *V. vulnificus* se aisló con mayor frecuencia en los meses de marzo a septiembre, cuando la salinidad era de 5 a 21‰ y la temperatura de 21 a 32 °C (Cuadro 4 y 5) lo cual concuerda con O'Neill y cols. 1992 el cual observó altos niveles de esta bacteria, cuando la temperatura oscila entre 17 y 31°C con una salinidad entre 1.5 y 2.5 ‰ (15-25‰). Hoi y cols. 1998 lo aisló en 72 de las 172 muestras de agua analizadas, cuando los intervalos de salinidad y temperatura fueron de 5-17‰ y 19-22°C.

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), y se ha estimado que de abril a octubre el 40 % o más de los ostiones capturados en las costas del Golfo de México pueden contener a este patógeno (Parker, *et al.*, 1994), mediante una asociación simbiótica entre el bivalvo y la bacteria que se adhiere (Tamplin y Capers, 1992).

V. vulnificus puede ser aislado de una variedad de ecosistemas acuáticos, la ocurrencia del microorganismo es favorecida por las altas temperaturas, y relativas bajas salinidades. En los Estados Unidos ha sido reportado en las costas del Océano Atlántico, Pacífico (Kaysner, *et al.*, 1987). *V. vulnificus* ha sido aislado en meses de verano donde a estado implicado en infecciones en humanos en Taiwán, Japón, Estados Unidos (Hoi, *et al.*, 1998), Dinamarca, Suecia, Alemania, Bélgica y Holanda (Delsgaard, *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que el número de organismos en los ostiones está fuertemente correlacionado con la temperatura del agua hasta los 26°C, por encima de esta temperatura no hay un incremento adicional en el número. (Motes, *et al.*, 1998). La incidencia de la recuperación del microorganismo se incrementaba durante los meses calurosos (Kelly, 1982). En salinidades mayores de 25 ‰ tienen un efecto negativo sobre el número de *V. vulnificus* en los ostiones (Motes, *et al.*, 1998).

V. vulnificus, se ha aislado de aguas en un intervalo de temperaturas entre 8-31°C y salinidades entre 1-34‰ (Wright, *et al.*, 1996) intervalos que corresponden con los aislamientos obtenidos. Otras investigaciones ha sido entre 5-17‰, que en estudios previos fueron reportadas como el intervalo óptimo para el aislamiento de esta bacteria (Kelly, 1982).

El aislamiento a temperaturas entre 15-27°C con niveles de salinidad entre 8-14 ‰ se vio favorecido (DePaola, *et al*, 1994). Se han observado altos niveles de esta bacteria, cuando la temperatura oscila entre 17 y 31°C con una salinidad entre 15 y 25 ‰ (O'Neill, *et al.*, 1992).

Esta bacteria ha sido ocasionalmente aislada de el Golfo de México cuando la temperatura del agua esta por debajo de los 20°C (Kelly, 1982), otros autores señalan su aislamiento de aguas con temperaturas de 8-11°C en la Bahía de Chesapeake (Wright, *et al*, 1996). La incapacidad de aislar al microorganismo a temperaturas por debajo de los 7 °C puede ser porque entra en el estado de viable pero no cultivable (Oliver, 1995), sin embargo otros autores informan de su presencia a temperaturas de 7°C (Wright, *et al*, 1996). La mayoría de las muestras que contienen a la bacteria el sitio en donde se recolectan tiene temperaturas por arriba de los 15°C (Hoi *et al.*, 1998). En el caso de la Laguna de Pueblo Viejo Ver, las temperaturas no descendieron mas allá de los 17 °C y se logro el aislamiento de *V. vulnificus* en, Noviembre, Diciembre, Enero y Febrero (Figura 8) aunque no en un gran número ya que probablemente intervengan otro tipo de factores que permitan el desarrollo del microorganismo. Una de las razones por la que esta bacteria es difícil de cultivar durante los meses fríos es un estado de viable pero no cultivable. Oliver *et al.*, (1995) demostró este fenómeno in situ en un ambiente estuarino al usar una cámara de difusión de membrana. El decremento en la frecuencia de su aislamiento de aguas de estuario en los meses de invierno, se ha sugerido como resultado de un sobreinvernadero de las células en el sedimento, pescado u ostiones (DePaola, *et al*, 1994; Tamplin, *et al*, 1992).

Como otros vibrios este microorganismo puede persistir en un estado de viable pero no cultivable por largos periodos. En respuesta al decremento de temperatura, las especies de *Vibrio* han demostrado que no son cultivables en medios sólidos (Brauns *et al*, 1991). Esto ha sugerido que la supervivencia de *V. vulnificus* en los ostiones y en agua en condiciones de temperatura baja puede ser explicada por la persistencia de las células en estado de viable pero no cultivable en el ambiente (Wright *et al.*, 1996).

Las temperaturas relativamente altas y las salinidades bajas optimas de *V. vulnificus* sugieren que este microorganismo es distinto de otras bacterias marinas, se adapta a los ambientes estuarinos con baja salinidad y crece a temperaturas relativamente altas. (Kelly, 1982).

Los parámetros ambientales que correlacionan con la recuperación del microorganismo de muestras de agua generalmente corresponden a condiciones de estuario con una salinidad relativamente baja (7-16 ppm) y altas temperaturas (arriba de los 20°C) en un medio rico, este organismo halofílico crece óptimamente a concentraciones de NaCl. de 0.5-2.0 % y a temperaturas entre 25-37°C (Wright *et al.*, 1996). En la Figura 12 se puede observar que la salinidad y la temperatura son variables independientes y que el microorganismo desarrolla en salinidades entre 5-20‰ y temperaturas entre 19-30°C, pero no se puede concluir estadísticamente debido a que el análisis solo se realizó durante 10 meses.

Generalmente en las aguas estuarinas con salinidades entre 6-16 ‰ se ha encontrado un gran número de *V. vulnificus*, mientras que a bajas temperaturas del agua (<10°C) tiene un efecto negativo en el aislamiento (Pfeffer, *et al.*, 2003). Esto sugiere que la salinidad y la temperatura son independientes y que *V. vulnificus* pueden tolerar temperaturas bajas y altas salinidades (Kaspar *et al.*, 1993).

VI.2. Factores de virulencia

La presencia de factores de virulencia en *V. vulnificus* es un hecho reconocido, sin embargo la patogénesis de la infección causada por este microorganismo aun no está muy estudiada. Al igual que otras bacterias patógenas los factores de este microorganismo incluyen tanto componentes estructurales como extracelulares.

De las 146 cepas trabajadas para evaluar la actividad enzimática de *Vibrio vulnificus*, se observó que el 100% de las cepas produjo hemólisis en agar base sangre con eritrocitos de carnero y conejo (Cuadro 7) esto concuerda con datos proporcionados por Kreger y Lockwood en 1981, García y Landgraf (1998) encontraron que el 96.2 de sus cepas fueron hemolíticas en eritrocitos de carnero. La actividad de la citolisina/hemolisina, 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), provocando la lisis de estas células durante el cuadro de septicemia (Bang *et al.*, 1999). Produce un cambio vascular en la permeabilidad de la membrana de la célula huésped (Yamamoto *et al.*, 1990), lo que se considera ayuda a la invasividad de las células microbianas (Fan *et al.*, 2001).

En estudios recientes sobre *V. vulnificus* se ha identificado la expresión de numerosos factores de virulencia que dañan la permeabilidad vascular, ayudan a su capacidad invasiva y provocan el daño tisular como las proteasas, elastasa, hialuronidasa (Wu, *et al.*, 2001), lecitinasa, fosfolipasas, mucinasa (García y Landgraf, 1998), metaloproteasa (Miyoshi y Shinoda, 1992, Shao y Hor, 2000), condroitina sulfatasa (Oliver, *et al.*, 1986), colagenasa y la producción de compuestos con actividad citolítica y proteolítica (Rodríguez *et al.*, 1992).

El 86.3% de las cepas analizadas produjeron proteasa, en el estudio realizado por García y Landgraf (1998), el 99.2% de sus cepas fueron positivas para producción de proteasa. *V. vulnificus* secreta una metaloproteasa dependiente de zinc de 45 kDa, la región N-terminal que codifica para un polipéptido que tiene la capacidad proteolítica y la región C-terminal que codifica para un polipéptido que reconoce sustratos proteicos y membranas de eritrocitos (Miyoshi *et al.*, 1997).

El 80.1% de las cepa expresaron DNasa, en el estudio de García y Landgraf (1998), el 96.9% de sus cepas fueron DNasa positiva. Se ha reportado la presencia de una nucleasa, que le permite al microorganismo la colonización del intestino delgado, la degradación del ADN le provee al microorganismo de una fuente de carbono y nitrógeno que le permiten multiplicarse. Esta nucleasa es muy similar a la producida por otro tipo de bacterias como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Aeromonas hydrophila* (Wu *et al.*, 2001).

El 78.7% lipasa (yema de huevo y tween 80) y 73.3% lecitinasa, García y Landgraf (1998) reportan en sus resultados que el 100% de sus cepas produjeron lecitinasas y lipasas en Tween 80 y 96.9% lipasa en yema de huevo. Dentro de las proteínas extracelulares producidas por *V. vulnificus* se encuentran las lipasas. Se ha sugerido que la lipasa puede proveer nutrientes y energía al microorganismo, se considera un factor de virulencia por incrementar los movimientos de los granulocitos humanos o afectando el funcionamiento del sistema inmunológico a través de la generación de ácidos grasos de cadena larga insaturada por actividad lipolítica; estudios en *Pseudomonas aeruginosa* han demostrado que la lipasa juega un papel importante en la virulencia ya que puede degradar los fosfolípidos de la superficie del pulmón lo que promueve la invasión por este microorganismo (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). Dentro de los nutrientes que pueden utilizar los microorganismos se encuentran el glicerol y los ácidos grasos libres que se obtiene después de la hidrólisis de los triglicéridos en el enlace éster que llevan a cabo las lipasas.

Las fosfolipasas o 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 al enlace éster que rompen. La fosfolipasa C rompe el enlace éster del fosfato en consecuencia se libera ácidos grasos y glicerol (Madigan *et al.*, 2004)

Las diferencias en la morfología colonial opaca y translúcida de las cepas se ha relacionado con la capacidad de virulencia, ya que, las cepas opacas son capsuladas mientras que las translúcidas tienen muy poco material capsular o en definitiva no presentan dicha estructura (Grau y Pettis, 2005), los datos obtenidos sobre la morfología colonial de *V. vulnificus* indican que el 88.2% presentaron morfología colonial opaca y el 17.8% translúcida. Al realizar la tinción negativa con rojo congo se observó que el 88.2 % de las cepas con morfología colonial opaca presentan cápsula (Cuadro 7), lo que sugiere que la relación morfología colonial opaca- presencia de cápsula se cumple en el 100%.

La cápsula es una estructura formada por polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos que se encuentran recubriendo la membrana externa de la bacteria. Es importante para la supervivencia del microorganismo dentro del huésped, ya que promueve la resistencia a la acción del complemento y puede actuar como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas como los detergentes, asimismo puede ayudar a que se adhiera a otras bacterias o a los tejidos del huésped (Gulig *et al.*, 2005), razón por la cual se pueden presentar cuadros clínicos como la septicemia cuya tasa de fatalidad excede el 50% (Shapiro, *et al.*, 1998).

De las cepas que presentaron cápsula y morfología colonial opaca el 64%(72/120) tienen actividad proteolítica, producción de DNasa, lipasa, lecitinasa y β hemólisis, lo que sugiere que pueden provocar una gastroenteritis.

Se cree que el papel principal de las proteasas y las lipasas es la de establecer y mantener la infección sobre todo en el caso de heridas o en la celulitis (Starks, *et al* 2000).

El efecto citotóxico producido por las cepas de *Vibrio vulnificus* aislado de muestras de ostiones y de agua, señalan su capacidad virulenta, aunque no todas las cepas muestren el 100% de destrucción de la monocapa.

Se ha señalado que esta bacteria produce toxinas extracelulares como la citolisina (hemolisina) (Zhang & Austin, 2005); sin embargo, otros autores han descrito la existencia de tres hemolisina con diferentes masas moleculares de: 50 kDa, 56 kDa, y 36 kDa (Yamanaka *et al.*, 1990).

La actividad citolisina (hemolisina) produce un cambio vascular en la permeabilidad de la membrana de la célula huésped (Yamamoto *et al.*, 1990), lo que se considera ayuda a la invasividad de las células microbianas (Fan *et al.*, 2001). Tiene efectos citotóxicos en las células de ovario de hámster chino (CHO) (Gray y Kreger, 1985) y actividad letal en ratones (Wright y Morris, 1991). Provoca permeabilidad vascular, cambios morfológicos y disfunción de las estructuras vasculares del pulmón, su efecto probado en endotelio de arteria pulmonar muestra que fragmenta el ADN y disminuyen los niveles de NAD⁺ y ATP dando como resultado la muerte celular (Kwon *et al.*, 2001; Rho *et al.*, 2002).

El 96.6% (141/146) de las cepas analizadas mostraron el fenómeno de adherencia en la línea celular HEp-2, los datos de invasividad obtenidos indican que el 58.9 % (86/146) de las cepas son capaces de invadir esta línea celular.

El 96.6% de las cepas de *Vibrio vulnificus* presento adherencia en la línea celular HEp-2 y el 58.9 % tuvieron capacidad invasiva (Cuadro 8). No se cuenta con referencias bibliográficas sobre estudio, adherencia e invasividad sobre esta bacteria sin embargo en otros miembros del género *Vibrio* como es el caso de la patogenia del cólera comprende la ingestión de *Vibrio cholerae*, movilidad de los vibriones, atracción quimiotáctica, penetración a la capa mucosa de la superficie intestinal, adherencia a receptores en el gel de moco, quimiotaxis hacia los espacios intervallosos mas profundos, adherencia a la superficie de células epiteliales y producción de la toxina del cólera (Afsar, *et al.*, 2002)

Estudios previos de laboratorios indican que tanto el biotipo 1 y 2 son capaces de adherirse a células de mamíferos pero solamente las cepas del biotipo 2 se pueden adherir a células de pescado, por lo que se sugiere que se producen adhesinas especializadas (Biosca, *et al*, 1996).

Vibrio vulnificus tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales, se sugiere que la presencia de pili sea el factor que ayude a la adhesión, que le permite tener una gran capacidad invasiva (Gander y 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 median 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 y Falcow, 1997).

En cuanto a la titulación de las toxinas obtenida de las cepas de *V. vulnificus* se obtuvieron títulos 1:10, 1:20 y 1:40 siendo el mas frecuente el de 1:10 (Cuadro 9). Al hacer la revisión bibliográfica no se encontraron datos sobre este ensayo por lo cual no se puede comparar los resultados obtenidos.

Estos resultados señalan la capacidad virulenta que tienen las cepas de *Vibrio vulnificus* para producir enfermedades tanto por contacto con el agua estuarina así como por el consumo de alimentos de la pesca, sobre todo en aquellos grupos de la población mas susceptibles.

VII. CONCLUSIONES

- Se aisló a *V. vulnificus* en la columna de agua y los ostiones recolectados en la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz.
- De las 230 muestras analizadas, *V. vulnificus* se aisló en 61.
- *V. vulnificus* se aisló en los meses de marzo a septiembre cuando la temperatura variaba de 5 a 21°C y la temperatura de 21 a 32 °C.
- De las cepas de *V. vulnificus* que presentaron cápsula y morfología colonial opaca el 64.2% fueron positivas para todas las enzimas lo cual señala la capacidad virulenta de esas cepas.
- El 100% de las cepas presentaron efecto citotóxico en línea celular CHO.
- El 96.6% de las cepas analizadas mostraron el fenómeno de adherencia en la línea celular HEp-2, de acuerdo a la distribución en las células se considera que es una adherencia de tipo difusa.
- El 58.9 % fue invasiva en línea celular HEp-2.
- Los títulos de las toxinas fueron 1:10, 1:20, 1:40.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ANONIMO, 1982. Plan de desarrollo urbano de Pueblo Viejo, Veracruz (PDUPVV). Gobierno del estado de Veracruz. H. Ayuntamiento de Pueblo Viejo. 388 p.
- BANG, Y.B., S.E. LEE., J.H. RHEE., AND S.H. CHOI. 1999. Evidence that expression of the *Vibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 181: 7639-7642.
- BIOSCA, E.G, AND C. AMARO.1991. Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2331-2337.
- BIOSCA, E.G, AND C. AMARO.1996. Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2331-2337
- BISHARAT, N., V. AGMON, R. FINKELSTEIN, R.RAZ, G.BEN DROR, L. LERNER, S. SOBOH, R. COLODNER, D.N. CAMERON, D.L. WYKSTRA, AND J.J. FARMER III. 1999. clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogrup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet* 354:1421-1424.
- BISHARAT, N., D.I. COHEN , R.M. HARDING, D. FALUSH, D..W. CROOK, T. PETO, AND M.C. MAIDEN. 2005 Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerg. Infect. Dis.*11 (1):30-35.
- 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(1).
- 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.
- BRAUNS. L; M.C. HUDSON, AND J.D. OLIVER. 1991. use of polymerase Chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *App. Environ. Microbiol.* 57: 2651-2655.
- BRYAN, F.L. 1980. Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970–1978. *J. Food Protect.* 43, 859–876.
- BRYAN, F.L. 1987. Seafood-transmitted infections and intoxications in recent years. In *Seafood Quality Determination*. Eds: D.E. Kramer and J. Liston. Elsevier Science Publishers, 319– 337.
- CARLTON. M,V & J.L. HERRERA. 1997. *Vibrio vulnificus* infection : An important cause of septicemia in patients with cirrhosis. *South. Med. J.* 90: 1040-1042

- CASTAÑÓN GJA, LL MARTINEZ, RR MIRANDA, RE TORRES, & GMA LEON. 2000. *Vibrio vulnificus* Infection in Mexico: Report of Fatal Case. *Revista Medica del IMSS*;38:23-25
- CDC 1993. *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption—Florida, 1981–1992. *MMWR*; 42:405-7.
- CDC.1996 *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption-LA, 1996. *MMWR*; 45(29):621-624.
- CHIANG, S. R., Y. C. CHUANG. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: Clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 36:81-88.
- CHUANG YC, YUAN CY, LIU CY, LAN CH, HUANG AH. 1992. *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin Infect Dis*;15:271-6
- CHOI, H.K., N.Y. PARK., D. KIM., H.J. CHUANG., S. RYU AND S. H CHOI. 2002. Promoter analysis and regulatory characteristics of *vvhBA* encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus* . *J. Biol Chem*. 277: 47292-47299.
- 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.
- COMISION INTERNACIONAL DE ESPECIFICACIONES MICROBIOLOGICAS PARA ALIMENTOS (ICMSF). 1985. *Ecología microbiana de los alimentos. Productos alimenticios*. Vol. 2. Ed. Acribia Espana.
- CONTRERAS, E. F., 1988. *Las lagunas costera mexicanas*. 2da. ed. CECODES, México, 263 p.
- CORNEJO, J. P., A. L. M. ROLON, AND J.O. SIFUENTES. 2000. Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus*. Serie de casos. *Rev. Invest. Clin. Mex*. 52 (6):632-637 .
- DALSGAARD, A.N, FRIMODT-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
- 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. 1995. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Chap 9. IN: Bacteriology Analytical Manual. Food and Drug Administration, Association of Analytical Chemistry C. I. F. Washington, D.C.
- FAN, J.J., C.P. SHAO, Y.C. HO, C.K. YU, AND L. I. HOR. 2001. Isolation and characterization of a *Vibrio vulnificus* mutant deficient in both extracellular metralloprotease and citolysin. *Infect. Immun.* 69: 5943-5948.
- FINLAY. B.B AND S. FALKOW. 1997. Common Themes in Microbial Pathogenicity Reviseted. *Microbiol Mol Biol. Rev.* 61: 136-169
- FERMER, J. 1979. *Vibrio* ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicaemia, and the sea. *Lancet*, 2:903
- 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., M.T. LaROCCO. 1989. Detection of piluslike structures on clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1015-1021.
- GALTSOFF, P. S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bult.* (Washington, O. C) 64:185-218.
- 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, AND G.S.PETTIS. 2005. High-frequency phase variation of *Vibrio vulnificus* 1003: isolation and characterization of rugose phenotypic variant. *J. Bacteriol.* 187: (7):2519-2525
- GRAY, L.D., 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
- HACKNEY, C.R., A. DICHARRY. 1988. sea food-borne bacterial pathogens of marine origin. *Food Technol.* 42:104-109.
- HEITMANN, I.G., L. JOFRÉ, J.C HORMAZABAL, A. OLEA, C. VALLEBUONA Y C. VALDES. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *V. parahaemolyticus*. *Rev Chil. Infect* 22 :131-140.

- HERRERA, F.C. Y M. STEVE. 2001. Vibrios patógenos no coléricos. Gac Méd Caracas, 109(2) :217-221.
- HESSELMAN, D.M., M.L. MOTES, 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.
- HLADY. W.G. AND K.C. KLONTZ. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida. 1981-1993. J. Infect. Dis. 173: 1176-1183
- HOI, L., J.L. LARSEN, I. SALSGAARD, A. DALSGAARD. 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish marine environmental. Appl. Environ. Microbiol. 64:7-13.
- HOLLIS, D.G., R.E.WEAVER, C.BAKER, C.THOURNBERRY. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood culture. J. Clin. Microbiol. 3:425-432
- HOR, L.I, , T.T CHUANG, 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
- 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, 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.
- JENKINS,R.D, AND J.M. JOHNSTON. 1985. Inland presentation of *Vibrio vulnificus* primary septicemia and necrotizing fasciitis. West. J. Med. 144: 78-80.
- JOHNSTON J.M, S.F.BECKER ,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. S.H, T.L, HOWELL, AND K.R. O'NEILL. 1991. Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio* sp, from eastern oysters (*Crassostrea virginica* gmelin, 1791) in a commercial controlled purification facility in Maine. J. Shellfish Res. 10:105-112.
- 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.
- 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.
- 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. Epl. Environ. Microbiol. 44:820-824.
- 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.
- 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, W. KONIG. 1996. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes and monocytes). Infect. Immun. 64: 3252-3258.
- KREGER, A., 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 Y B. PARK. 2001. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion.initiated apoptotic signaling pathwayin huma ECV304 cells. J. Biol . Chem. 276: 47518-47523
- 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.

- LINKOUS, D.A., AND J.D. OLIVER. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. 174: 207-214.
- MacFADDIN. J.F. 2003 Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de interés clínico 3 a edición Editorial medica Panamericana. México.
- MADIGAN, M.T., M. MARTINKO, 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.
- MATTÉ, G.R., M.H. MATTÉ, I.G. RIVERA, M.T. MARTINS. 1994. Distribution of potentially pathogenic *Vibrios* in oysters from a tropical region. J. Food Prot. 57 :870-873.
- MIYOSHI, A.I., S. SHINODA. 1992. Activation mechanism of human Hageman factor-plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* metalloprotease. Febs. 308:315-319.
- MIYOSHI, S., H. WAKE., K. TOMACHIKA., S. SHINODA. 1997 Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. J. Bacteriol. 179: 7606-7609
- MOSSEL. D.A.A. 1982. *Microbiology of Foods*. University of Utrecht. Faculty of Vet. Med., Bittshact 172, Utrecht, The Netherlands.
- 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.
- 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.
- OLIVER. J.D. 1989. *Vibrio vulnificus*, p569-600. In M.P Doyle(ed) Foodborne bacterial pathogens. Marcel Deckker. Inc, New York, N.Y.
- OLIVER. J.D. 1995. The viable but not-cultivable state in human pathogen *Vibrio vulnificus*. FEMS. Microbiol. Lett. 133:203-208
- O'NEILL, K.R., S.H. JONES, D.J. GRIMES. 1990. Incidence of *V. vulnificus* in northern New England water and shellfis. FEMS Microbiology Letters. 72:163-169-8.
- O'NEILL, K.R, S.H JONES, AND D.J. GRAMES. 1992. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. Appl. Environ. Microbiol. 58:3257-3262.

- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). 1982. Control sanitario de los alimentos. Publicación científica OPS No. 421.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). 1997. Control sanitario de los alimentos. Publicación científica OPS No.7
- PANICKER, G. M.L, MEYERS AND A.K. BEJ. 2004. Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Shellfish and Gulf of Mexico Water by Real Time PCR. *Appl. Environ Microbiol.* 70: 498-507
- PARKER, R.W.; E. M. MAURER, A.B CHILDERS, 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. Environ. Microbiol.* 70(11):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(6):3526-3531
- POBLETE R., M. ANDRESEN, C. PÉREZ, A. DOUGNAC, O. DÍAZ, AND V. TOMICIC. 2002. Septic shock caused by *Vibrio vulnificus*. Report of one case. *Rev. Med. Chile.* 130: 787-791.
- PORRAS, C.G. J.J VIANA, B. CHAVEZ, J. SIERRA. 1994. *Vibrio vulnificus* en México: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev Invest Clin.* 46:495-498.
- PRUZZO, C., G.GALLO, & L CANESI. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with hemolymph components. *Environmental Microbiology.* 7:761-772.
- REYES, A.I., B.K. BOUTIN, J.T. PEELER, R.M.TWEDT. 1985. Adherence and hemoagglutination of mammalian cells by demologically distinct strain of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 39:721-725
- 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. Cytotoxic mechanism of *Vibrio vulnificus* cytolysin in CPAE cells. *Life Sci.* 70: 1923-1934.
- 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.
- SAGARPA (Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación) CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca). 2003. Anuario estadístico de pesca. www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/anuario/anuario2003.pdf

- 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.
- SECRETARIA DE SALUD (SS). 1993. Diagnóstico sobre la protección de los alimentos en México. Organización Panamericana de la Salud. OMS. México.
- SHAO, C.P., L.I. HOR. 2000. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. Infect. Immun. 68:3569-3573
- SHAPIRO, R.L; S. ALTEKRUSE, L. HUTWAGNER, S. WILSON, B RAY, S. THOMPSON, R.V. TAUXE, P.M. GRIFFIN, THE *Vibrio* working group. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. JID . 178:752-759.
- SONG, Y.L., W.CHENG, C.H.SHEN, Y.C. OU, AND H.B. SONG. 1990. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in cultured shrimp and eel in Taiwan. p 172-179 In Proceedings of ROC-Japan Symposium on Fish Disease.
- STARKS, A.M., T.R. SCHOEB, M.L. TAMPLIN, S.PARVEEN, T.J. DOYLE, P.E. BOMEISL, G.M. ESCUDERO, P.A.GULIG. 2000. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. Infect. Immun. 68: 5785-5793.
- STORN, 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 disinfected with UV light. Appl. Environ. Microbiol 58: 1506-1510.
- TISON, D.L., M. N. NISHIBUCHI, J.D. GREENWOOD, AND R.J. SEIDLER. 1982. *Vibrio vulnificus* 2: new biogrup pathogenic for eels. Appl. Environ Microbiol 44:640-646.
- THORSTEINSSON, S, J. MINUTH, S. MUSER.1974. Clinical manifestations of halophilic non cholerae vibrio infections. Lancet ; 2 :1283-4.

- 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.
- VENKATESWARAN, C., M. KILYUKIA, K. TAKAKI, H. NAKANO, H. MATSUDA, H. KAWAKAMI, H. HASHIMOTO. 1989. Characterization of toxigenic vibrios isolated from the freshwater environment of Hiroshima, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 55:2613-2618.
- VENNEMAN I.H., CLOETTE, T.E., DYKES, G.A., AND VON HOLY, A., 1994. Bacterial populations associated with the processing of cape hake (*Merluccius capensis* and *Meluccius paradoxus*) J. Food. Prot. 57: 1016-1018
- 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 (1):83-93
- WRIGHT, A.C., J.G.MORRIS. 1991. The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and relationship to virulence in mice. Infect. Immun. 59:192-197.
- WRIGHT, A.C., R.T. HILL, J.A. JOHNSON, M.C. ROGHMAN, R.R. COLWELL, J.G. MORRIS. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 62: 717-724.
- WRIGHT, A. C., J L. POWELL, M. K. TANNER, L. A. ENSOR, A. B. KARPAS, J. G. MORRIS, JR., AND M. B. SZTEIN 1999. Differential Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide Infect. Immun. 67: 2250-2257.
- 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 foreign DNA. Appl. Environ. Microbiol. 67: 82-88.
- YANO, Y., M. YAKOYAMA, M. SATOMI, H. OIKAWA, AND S.S. CHEN. 2004. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. J. Food Prot. 67(8):1617-1623.
- YAMAMOTO, K., A.C. WRIGHT, J.B. KAPER, J.G. MORRIS. 1990. The cytotoxin gene of *Vibrio vulnificus*: Sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. Infect. Immun. 58:2706-2709

- YAMANAKA, H. K. SUMIYAMA, H. FURUTA, S. MIYOSHI, S. SHINODA. 1990. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity. J. Med. Microbiol. 32:39-43
- ZHANG, X.H, AND B. AUSTIN. 2005. A review: Hemolysins in *Vibrio* species. J. Appl. Microbiol. 98: 1011-1019.

ANEXOS

MEDIOS UTILIZADOS PARA EL AISLAMIENTO.

AGUA PEPTONADA ALCALINA.

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)

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 seco	14 g.
pH final	8.6 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver y vaciar en cajas petri estériles. NOTA: Este medio no se esteriliza.

MÉTODO:

Sembrar por estría cruzada la muestra en las placas con el medio TCBS. Incubar a 35°C de 18 a 24 horas.

LECTURA:

Colonias amarillas: fermentadores de la sacarosa.
Colonias verde-azules: no fermentadores de la sacarosa

AGAR TRIPTONA CLORURO DE SODIO (T₁N_x)

Fórmula en gramos por litro.

Triptona	10g
Agar	15g
NaCl	se agrega de acuerdo a la concentración requerida 3,6,8 y 10%.

PREPARACIÓN

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

NOTA: Las pruebas bioquímica se realizaron de acuerdo al MacFaddin 2003.

CALDOS Y MEDIOS UTILIZADOS PARA DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA

CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI)

Formula en gramos por litro de agua destilada

Infusión de cerebro de ternera	200.0g
Infusión de corazón de res	250.0g
Proteasa peptona o polipeptona	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico	2.5g
Dextrosa	2.0g
pH final	7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

AGAR LECHE DESCREMADA

Cantidad por litro de agua.

Peptona de caseína	5g
Extracto de levadura	25g
Glucosa	1g
Leche descremada reconstituida al 10%	100ml
pH final	7.0

PREPARACIÓN.

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada hasta ebullición y en agitación continua. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Por otra parte preparar la leche descremada y esterilizar por separado a 121°C durante 15 min. Finalmente se mezcla el medio base con la leche descremada y se distribuyen en cajas Petri estériles.

AGAR GELATINA

Formula en gramos por litro de agua destilada

Caldo nutritivo deshidratado	8g
Agar gelatina	30g
Agar	7.5g
pH final	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 durante 15 min. Por otra parte preparar la leche descremada y esterilizar por separado a 121°C durante 15 min. Finalmente distribuir en cajas Petri estériles.

AGAR BASE SANGRE

Formula en gramos por litro de agua destilada

Infusión de músculo cardiaco	37.5g
Peptona de carne	10g
NaCl	5g
Agar	15g
pH final	7.3

PREPARACIÓN.

Todos los ingredientes componen la base, se disuelve con agitación constante y calentando hasta ebullición, esterilizar a 121°C durante 15 min. Se deja enfriar y cuando se encuentra a 45°C adicionar sangre desfibrinada para obtener una concentración de 5%,homogeneizar y finalmente distribuir en cajas Petri estériles.

AGAR YEMA DE HUEVO

Formula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de carne	5g
Tristona	10g
Extracto de levadura	1g
Glicina	12g
Piruvato de sodio	10g
Agar	15g
pH final	6,8

PREPARACIÓN.

Mezclar todos los ingredientes y disolver en un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición, esterilizar a 121°C durante 15 min. enfriar a 60°C y adicionar 50ml de una emulsión estéril de yema de huevo y mezclar. Distribuir en cajas Petri estériles.

PRUEBA DE TWEEN 80**SOLUCION DE REACCION****COMPONENTES**

Solución reguladora de fosfatos M/15 pH 7.0

Solución A

Fosfato ácido disódico	9.47g
Agua destilada	1000 mL

Solución B

Fosfato ácido de potasio	9.09g
Agua destilada	1000 mL

Mezclar 61.1 mL de la solución A con 38.9 mL de la solución B.

Rojo neutro

Disolver 20 mg del colorante en 10 mL de la solución amortiguadora

SOLUCION

Amortiguador	98.5 mL
Rojo neutro	1.0 mL
Tween 80	0.5 mL
pH 7.0	

INTERPRETACION:

Prueba positiva: El vire del rojo neutro a rosa-rojo indica que el Tween80 fue hidrolizado por la enzima lipasa.

Prueba negativa: El medio es de color canela-ámbar.

AGAR DNA DE TIMO DE CARNERO.

Formula en gramos por litro de agua destilada

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

PREPARACIÓN.

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 DNA 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.

AGAR GLICEROL EXTRACTO DE LEVADURA

Formula en gramos por litro de agua destilada

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

PREPARACIÓN.

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

CALDOS Y MEDIOS UTILIZADOS PARA CULTIVOS CELULARES

MEDIO MÍNIMO ESENCIAL

Formulación

Medio Mínimo Esencial	10X 50 mL
Regulador de pH HEPES 1M pH 7.3 ± 0.01 estéril	5 mL
Glutamina estéril	200mM (X100)
[29.2 mg/mL de glutamina en NaCl 0.85 %]	5 mL
Bicarbonato de sodio al 7.5 % estéril	5 mL
Agua desionizada estéril	450 mL

PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se colocan todos los ingredientes en un frasco de tapón de rosca estéril y se almacenan en refrigeración hasta su uso. Al usarse se suplementa con la cantidad de suero fetal bovino deseada.

MEDIO F-12

Formulación

Medio F-12 10X	
Regulador de pH HEPES 1M pH 7.3 ± 0.01 estéril	50mL
Glutamina estéril 200mM (X100)	5mL
[29.2 mg/mL de glutamina en NaCl 0.85 %]	5mL
Bicarbonato de sodio al 7.5 % estéril	5mL
Agua desionizada estéril	450mL

PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se colocan todos los ingredientes en un frasco de tapón de rosca estéril y se almacenan en refrigeración hasta su uso. Al usarse se suplementa con la cantidad de suero fetal bovino deseada.

CALDO TRIPTONA AL 1 %

Formula en gramos por litro de agua destilada

Triptona-peptona	10.0g
------------------	-------

PREPARACIÓN

Se disuelve la triptona-peptona en el agua, se distribuye en tubos y se esteriliza 15 minutos/ 121 °C/ 15 libras de presión. Posteriormente en condiciones de esterilidad se le adiciona la manosa antes de inocular los tubos.

SOLUCIÓN DE PUCKS

Formula en gramos por litro de agua desionizada

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.40 g
Bicarbonato de sodio	0.35 g
EDTA	0.336 g
Agua desionizada estéril	1000 mL

PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelven una por una cada una de las sales en el orden en que se listaron, la solución se filtra en filtro de membrana de 0.22 μm colectándose en un frasco de tapón de rosca estéril. Se conserva en refrigeración.

MANOSA AL 10 %

Manosa	10g
Agua desionizada estéril	100 mL

PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelve la manosa en el agua, la solución se filtra en filtro de membrana de 0.22 μm colectándose en un frasco de tapón de rosca estéril. Se conserva en refrigeración.

SOLUCIÓN DE GENTAMICINA

Gentamicina	90 mg
Agua desionizada estéril	10 mL

PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelve la gentamicina en el agua y se conserva en un frasco de tapón de rosca en refrigeración.

SOLUCIÓN DE LISOZIMA

Lisozima	300 mg
Agua desionizada estéril	10 mL

PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelve la lisozima en el agua y se conserva en un frasco de tapón de rosca a -20 oC.

SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS (PBS)

Formula en gramos por litro de agua desionizada

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g

PREPARACIÓN

Se disuelven cada uno de los ingredientes y antes de aforar con el agua se ajusta el pH a 7.2 ± 0.2 . Posteriormente se esteriliza 15 minutos/ 121 oC/ 15 libras de presión.

MEDIO AKI

NaCl	0.5g
NaHCO ₃	0.3g
Extracto de levadura	0.4g
Bacto-peptona	1.5g
Água destilada	100mL

PREPARACIÓN.

Se disuelven los ingredientes, excepto el NaHCO₃, en la mitad del volumen de agua destilada y se mete al autoclave. El NaHCO₃ (0.6%) se esteriliza por filtración. En un tubo de ensaye se mezclan suavemente volúmenes iguales de ambos ingredientes esterilizados.

La presente tesis ya revisada por el asesor M. en. C. Elsa Irma Quiñones Ramírez, y el Dr. Carlos Vázquez Salinas, Director del alumno de Especialidad en Biotecnología Q.B.P. SELENNE GABRIELA DÁVALOS MECALCO., cumple con los requerimientos académicos para que el alumno pueda titularse.

