

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS
TOXINAS PRODUCIDAS POR *Vibrio vulnificus*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

MARÍA ALEJANDRA REYES MENDOZA

MÉXICO, D.F.

2004

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro **0471-0/Maestría en Biotecnología**”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó
la comunicación de resultados que presentó:

María Alejandra Reyes Mendoza

El día 27 de julio de 2004.

Dr. Carlos Vázquez Salinas
Tutor

Dr. Humberto González Márquez
Vocal

Dr. Arturo Rojo Domínguez
Vocal

Dr. José Mariano García Garibay
Secretario

Dr. Edmundo Bonilla González
Presidente

5. DEDICATORIAS

A GABRIEL ORDAZ HERNÁNDEZ

Mi querido esposo, quien me apoyó y motivó para el logro de esta meta y que de manera incondicional ha estado conmigo tanto en los momentos buenos como los malos.

A GABRIELA ORDAZ REYES

Mi pequeña hija quien desde antes de nacer me acompañó en la realización de esta tesis.

A MIS PADRES Y HERMANOS

Que de alguna forma influyeron en mi para la realización de este trabajo.

5.1. AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por la vida que me dio y
por estar siempre conmigo.

A LOS PROFESORES:

Dr. CARLOS VAZQUEZ SALINAS

M. en C. ELSA IRMA QUIÑÓNEZ RAMÍREZ

Por su apoyo y disposición para la
realización de este trabajo.

A LAS MAESTRAS:

XÓCHITL NOCHEBUENA PELCASTRE

MARIA MYRNA SOLIS OBA

Por su valiosa colaboración
en el desarrollo de esta tesis.

...Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE ALGUNA MANERA ME BRINDARON
SU APOYO.

RESUMEN

Desde que fue reportado por primera vez por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en 1976, *Vibrio vulnificus* ha sido objeto de numerosos estudios al ser relacionado con enfermedades causadas por la ingesta de productos de la pesca. Se han asociado diversos factores a la virulencia de *V. vulnificus* tales como la presencia de una hemolisina y una citolisina con masas moleculares relativas (M_r) de aproximadamente 36 y 56 kDa, respectivamente. Por lo anterior, se consideró importante realizar la purificación y la caracterización bioquímica de estas dos toxinas en aislados mexicanos. Se verificó la identidad de las especies de 211 cepas aisladas de ostiones y pescado, confirmándose que 27 cepas pertenecían a la especie *vulnificus*, de las que se obtuvo la toxina y se determinó el efecto citotóxico en la línea celular CHO. Se observó a las 10 horas de incubación que tres de las cepas destruyeron entre 20 y 40% de la monocapa, 18 cepas mostraron entre 40 y 60% de destrucción, dos entre 60 y 80% y cuatro entre 80 y 100%. En todos los casos se observó un efecto citotóxico caracterizado por la elongación de las células CHO. Mediante precipitación diferencial salina y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, se observó que la mayoría de las muestras estaban constituidas por diferentes proteínas. Este comportamiento no fue el mismo en todas las muestras ya que hubo tres con una sola banda de proteína a concentración de saturación del 50%, con estas tres muestras se realizó nuevamente precipitación y electroforesis, con la finalidad de apreciar a qué porcentaje de saturación se observa claramente la banda de interés (36 o 56 kDa). Se encontró que las masas determinadas para la precipitación al 45 y 50% de saturación fueron muy similares (60.4 y 60 kDa, respectivamente), sin embargo, la actividad citotóxica y la proteína mostraron acumulación en la fracción precipitada al 50% de saturación con sulfato de amonio y corresponden a la masa reportada para citolisina. Esta muestra fue caracterizada por electroforesis bidimensional obteniéndose un pI cercano a 5. Un enfoque isoelectrico en gel de poliacrilamida permitió asignar al pI un valor de 4.6. La importancia de esta investigación radica en que se determinaron algunas características bioquímicas (M_r , pI) de una toxina de *V. vulnificus* obtenida de productos de la pesca de las Costas del Golfo de México.

ÍNDICE GENERAL

1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de <i>Vibrionaceae</i>	1
1.2 Características de <i>Vibrio vulnificus</i>	2
1.2.1 Morfología	2
1.2.2 Clasificación	3
1.2.3 Ecología	3
1.2.4 Reservorios	5
1.3 Patología	5
1.3.1 Periodo de incubación y sintomatología	5
1.3.2 Factores de riesgo	6
1.3.3 Mortalidad y antibióticos	6
1.3.4 Dosis	7
1.4 Factores de virulencia	7
1.4.1 Toxinas extracelulares	8
1.5 Purificación y caracterización de toxinas del género <i>Vibrio</i>	10
2.0 JUSTIFICACIÓN	13
3.0 OBJETIVOS	14
4.0 MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Identificación de <i>Vibrio vulnificus</i>	15

4.2 Obtención de la toxina	16
4.3 Determinación de actividad citotóxica	16
4.4 Cuantificación de proteína	17
4.5 Precipitación con sales	17
4.6 Precipitación con acetona	17
4.7 Electroforesis	18
4.8 Electroforesis bidimensional	19
4.9 Enfoque isoelectrico	19
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1 Identificación de <i>Vibrio vulnificus</i>	21
5.2 Citotoxicidad	27
5.3 Electroforesis	29
5.4 Electroforesis bidimensional	33
5.5 Enfoque isoelectrico	33
6.0 CONCLUSIONES	36
7.0 PERSPECTIVAS	37
8.0 BIBLIOGRAFÍA	38
APÉNDICE	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estudios de purificación y caracterización de toxinas de algunas especies del género <i>Vibrio</i>	11
Tabla 2.	Identificación de las cepas del género <i>Vibrio</i>	21
Tabla 3.	Características bioquímicas de las cepas identificadas.....	26
Tabla 4.	Citotoxicidad del medio de cultivo de cepas de <i>V. vulnificus</i> en células CHO.....	27
Tabla 5.	Análisis de SDS-PAGE.....	31
Tabla 6.	Citotoxicidad de las fracciones del medio de cultivo de <i>V. vulnificus</i>	32

6. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología microscópica de <i>Vibrio vulnificus</i>	2
Figura 2.	Efecto citotóxico en células CHO.....	28
Figura 3.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de toxinas de <i>V. vulnificus</i> y testigos.....	29
Figura 4.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de toxinas de <i>V. vulnificus</i>	30
Figura 5.	Toxina de <i>V. vulnificus</i> analizada por electroforesis bidimensional.....	33
Figura 6.	Determinación de pI de la toxina de <i>V. vulnificus</i> mediante enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida.....	34

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE VIBRIONACEAE

La familia *Vibrionaceae* está constituida por los géneros: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium* y *Vibrio* (Baumann y Schubert, 1984). Los miembros del género *Vibrio* son bacilos curvos gramnegativos que miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro por 1.4 a 2.6 μm de largo; son móviles por flagelos polares. Son anaerobios facultativos y poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo; no fijan ni desnitrifican el nitrógeno, todos son quimiorganótrofos. Fermentan la D-glucosa con producción de ácido pero no de gas. Todos utilizan la D-fructosa, la D-maltosa y el glicerol, la mayoría son oxidasa positivo y todas crecen bien entre 20°C y 30°C. Sólo unas cuantas cepas necesitan de factores orgánicos de crecimiento. Los iones sodio estimulan el desarrollo de todas las especies, la concentración mínima necesaria de estos cationes para obtener crecimiento óptimo es del orden de 5-700 mM (Kelly *et al.*, 1991).

En el género *Vibrio* se incluyen cerca de 37 especies las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza en ambientes acuáticos con diversos grados de salinidad, algunas especies viven en el intestino de animales marinos. También se les halla en agua dulce donde sobreviven horas o semanas cuando está contaminada con materia orgánica y su pH es entre 6 y 9. La temperatura del agua modula la población de *Vibrio*, aumentando su número durante el verano. Las bacterias del género *Vibrio* son susceptibles a desecación, ebullición, cloro y otros desinfectantes y antimicrobianos como las tetraciclinas. La viabilidad de la bacteria disminuye por competencia de la biota contaminante. La acidez reduce notablemente su viabilidad (Glass *et al.*, 1982; Sakazari, 1992; Thampuran y Surendran, 1998). Once especies son patógenas para el humano sobresalen *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* como agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por alimentos (Elliot *et al.*, 1998; Oliver y Kaper, 1997).

1.2 CARACTERÍSTICAS DE *Vibrio vulnificus*

1.2.1 Morfología

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta Georgia reportó por primera vez a *V. vulnificus* (Hollis *et al.*, 1976) al cual identificó como “vibrio lactosa positivo”, “vibrio Lac⁺” ó “vibrio L⁺” posteriormente se le llamó *Beneckeia vulnificus* y finalmente *V. vulnificus* (Oliver y Kaper, 1997); desde entonces este patógeno ha sido objeto de numerosos estudios ya que junto *V. parahaemolyticus* son los microorganismos más comúnmente relacionados con enfermedades asociadas a la ingesta de productos de la pesca (Hlady, 1997).

Las especies de *Vibrio* se dividen en seis grupos con base en sus requerimientos de sodio, producción de oxidasa, reducción de nitrito a nitrato, fermentación de inositol, producción de arginina dihidrolasa y descarboxilación de lisina y ornitina (Kelly *et al.*, 1991).

V. vulnificus es una bacteria halofílica, móvil, gramnegativa, oxidasa positivo, lisina descarboxilasa positivo y arginina dihidrolasa negativo, por lo que se encuentra en el grupo 6 de los *Vibrios* junto con *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio carchariae*. Se diferencia de otros organismos en este grupo por la capacidad que tiene de fermentar salicina y celobiosa. *V. vulnificus* es resistente a la colistina pero sensible a la ampicilina y carbenicilina (Kelly *et al.*, 1991). En la figura 1 se encuentra una micrografía de *V. vulnificus*.

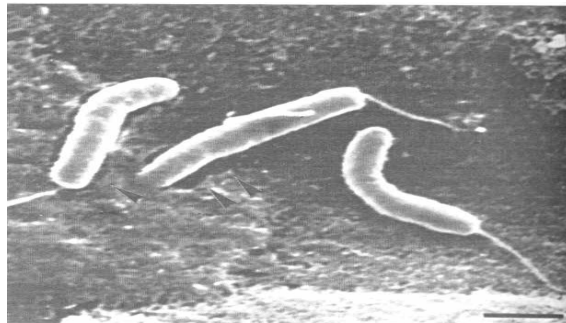


Figura 1. Morfología microscópica de *Vibrio vulnificus*.

V. vulnificus tiene una excepcional capacidad invasiva, de hecho es la especie más invasiva del género *Vibrio* (Hacknery y Dicharry, 1988; Rodrigues *et al.*, 1992).

1.2.2 Clasificación

Existen dos biotipos de *V. vulnificus* los cuales se diferencian en patogenicidad en anguilas (*Anguilla anguilla*) rasgos fenotípicos y variaciones genotípicas (Banerjee *et al.*, 2002).

Ambos biotipos son patógenos para ratón, pero sólo el 2 es patógeno en anguilas (Biosca *et al.*, 1996) ya que se sabe que el biotipo 1 es destruido por la acción del efecto bactericida del suero de anguilas, mientras que el biotipo 2 es resistente (Amaro *et al.*, 1997).

V. vulnificus biotipo 1 puede ser aislado de varias fuentes ambientales; se encuentra en estuarios, es oportunista y patógeno para el humano ya que es capaz de causar septicemia y severas infecciones en heridas, no es patógeno para anguilas y es indol positivo (Hoi *et al.*, 1998).

V. vulnificus biotipo 2 raramente se encuentra en el medio ambiente, se aísla de anguilas enfermas y se ha reportado que puede causar enfermedad al humano por manipulación de este pez (Amaro y Biosca, 1996). Los primeros aislados de este biotipo fueron obtenidos de anguilas japonesas entre 1975 y 1977 (Nishibuchi *et al.*, 1980). Se observó por primera vez en 1989 en España y fue aislado por primera vez en Dinamarca en 1991 de infecciones en humanos (Hoi *et al.*, 1998). El biotipo 2 es patógeno para anguilas e indol negativo (Biosca *et al.*, 1997).

1.2.3 Ecología

V. vulnificus es una bacteria autóctona de estuarios y aguas marinas con climas tropicales, su sobrevivencia está asociada a las condiciones ambientales de pH, salinidad y temperatura del agua, niveles de oxígeno disuelto y coliformes ya que crece mejor en ausencia de bacterias entéricas (Kaspar y Tamplin, 1993; Pfeffer *et al.*, 2003).

Se sabe que de mayo a octubre las aguas del Golfo de México poseen las características óptimas para el crecimiento y desarrollo de *V. vulnificus*, tales como 7-16‰ de salinidad y temperatura mayor de 20°C. La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es de 37°C, aunque crecen bien de 30-35°C e inclusive a 43°C como máximo, no crecen a temperatura menor de 8°C. Las condiciones límites para su crecimiento son Aw 0.96 y pH entre 5-10 (Elliot *et al.*, 1998; Bang y Drake, 2002).

V. vulnificus es sensible a concentraciones salinas mayores de 28‰; la exposición de ostras durante un periodo de 7-17 días en agua con una salinidad de 30-34‰ reduce el número de bacterias de 10^3 - 10^4 Número Más Probable/g a menos de 10 NMP/g (Motes y DePaola, 1996).

Se ha demostrado que los microorganismos patógenos contaminantes de moluscos pueden ser eliminados si se someten a un tratamiento con calor, ya que son sensibles a este; 10 minutos a 50°C es suficiente para eliminar *V. vulnificus* en ostras (Hesselman *et al.*, 1999).

Bajo ciertas condiciones y especialmente en ambientes marinos, *V. vulnificus* desarrolla estrategias de sobrevivencia bajo condiciones de estrés. Cuando la temperatura es menor de 7°C, el organismo entra en un estadio llamado viable pero no cultivable (VNBC). En esta fase, la bacteria no puede cultivarse en medios normalmente usados en su aislamiento, pero mantiene actividad respiratoria y metabólica. Este estado fisiológico es considerado como una estrategia para responder a condiciones adversas, de ahí que durante los meses de invierno se dificulte el aislamiento de *V. vulnificus* de agua y moluscos (Oliver *et al.*, 1991; Whitesides y Oliver, 1997).

V. vulnificus se ha aislado de una variedad de ecosistemas acuáticos; en los Estados Unidos ha sido reportado en el Atlántico, Pacífico y en las costas del Golfo (Kaysner *et al.*, 1987). La temporada en la cual se reportan la mayoría de los casos es principalmente en verano, ningún caso se ha descrito entre los meses de diciembre a febrero (Johnston *et al.*, 1985; Klontz *et al.*, 1988). En Florida la mayoría de los casos de infecciones por *V. vulnificus*

ocurren en mayo; durante este periodo la densidad del microorganismo en ostras es del orden de 10^5 - 10^6 organismos/g ostra (Klontz *et al.*, 1988; Hesselman *et al.*, 1999). También se ha aislado de agua o ha sido implicado en infecciones en humanos durante el verano en Dinamarca, Suecia, Alemania, Holanda, Australia y Bélgica (Hoyer *et al.*, 1995; Dalsgaard *et al.*, 1996; Hoi *et al.*, 1998), así como en Japón, Taiwán, Hong Kong, Israel, Tailandia, Corea y en la India (Chuang *et al.*, 1992; Thampuran y Surendran, 1998).

En América Latina se sabe de casos en Brasil (Rodrigues *et al.*, 1992; García y Landgraf, 1998). En México hasta donde se conoce sólo se ha reportado un caso de infección por *V. vulnificus*; se cree que esto podría deberse a la poca experiencia en el aislamiento e identificación de este microorganismo (Porrás *et al.*, 1994).

1.2.4 Reservorios

V. vulnificus se encuentra normalmente en estuarios, agua de mar, sedimento, plancton, mariscos, moluscos, ostiones, almejas, mejillón y pescado. Los moluscos bivalvos son reservorios importantes debido a que para alimentarse filtran el agua a través de sus cuerpos, con lo que facilitan la captación y concentración de los microorganismos suspendidos en el agua, es por ello que *V. vulnificus* se ha aislado en ostras y almejas con mayor frecuencia que en los crustáceos (Wright *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000). Se ha estimado que de abril a octubre el 40% o más de los ostiones y un 10% de cangrejos capturados en las costas del Golfo de México pueden contener a este patógeno (Parker *et al.*, 1994).

1.3 PATOLOGÍA

1.3.1 Período de incubación y sintomatología

La infección por *V. vulnificus* puede ser de dos tipos: por contacto de heridas con el agua de mar contaminada o mediante el consumo de alimentos que contengan a este microorganismo. El periodo de incubación es de 12-36 horas después del consumo de mariscos crudos o deficientemente cocinados; la muerte sobreviene en un lapso de 1-2 días (Hill *et al.*, 1991).

Las formas clínicas de infección por *V. vulnificus* son: septicemia, infección gastrointestinal e infección de tejidos blandos. En la septicemia primaria, la sintomatología más frecuente es: fiebre, escalofrío, náusea, cambios en el estado mental, hipotensión, vómito y gastroenteritis. Del 60-70% de los pacientes con septicemia primaria también desarrollan lesiones cutáneas como celulitis, bulas y equimosis que progresa a úlceras necróticas. La razón por la que aparecen las lesiones es desconocida (Klontz *et al.*, 1988; Chuang *et al.*, 1992).

1.3.2 Factores de riesgo

En el desarrollo de la septicemia los factores de riesgo son: hepatopatía crónica, diabetes, alcoholismo, cáncer, sida, etc. (Chin *et al.*, 1987; Shapiro *et al.*, 1998). En la infección de heridas o de tejidos blandos, el factor de riesgo es la exposición al agua de mar y/o productos marinos (Klontz *et al.*, 1988).

Los pacientes con hemocromatosis y otros síndromes con sobrecarga crónica de hierro, son inusualmente susceptibles a la infección por *V. vulnificus*, por lo que el CDC recomienda que la gente que presenta estos padecimientos no consuman moluscos crudos (Eastaugh y Shepherd, 1989). El hierro juega un papel importante en la patogénesis de la infección, sin embargo, el mecanismo de la utilización de hemoglobina en la virulencia de esta bacteria es desconocido (Litwin y Byrne, 1998).

El pH gástrico menor de 3.0 es suficiente para matar a *V. vulnificus*, por lo que los individuos con aclorhidria son más susceptibles a la infección (Koo *et al.*, 2000).

1.3.3 Mortalidad y antibióticos

La mortalidad de las infecciones por *V. vulnificus* es de hasta un 60% en los pacientes con septicemia primaria y de un 25% en los pacientes con infección en heridas o en tejidos blandos (Hijarrubia *et al.*, 1996). Se sabe que el 95% de los decesos relacionados con el consumo de productos marinos son debido a *V. vulnificus* (Bang y Drake, 2002).

Algunos estudios han demostrado que el 100% de las cepas de *V. vulnificus* son sensibles a cefalosporinas de tercera generación, carbenicilina, piperacilina y trimetoprim sulfametoxazol, 96% a la ampicilina y gentamicina, 92% a cloranfenicol y 91% a tetraciclinas (Chuang *et al.*, 1992).

1.3.4 Dosis

La dosis infectiva es desconocida, ya que varía dependiendo de la predisposición del individuo (Kaysner *et al.*, 1994). Se sabe que 100 células bacterianas son suficientes para causar infección en heridas abiertas (Chuang *et al.*, 1992). En general la enfermedad es autolimitante y sólo se requiere el restablecimiento de agua y electrolitos (Banerjee *et al.*, 2002).

Las personas con un sistema inmune intacto y un buen funcionamiento del hígado pueden consumir ostras crudas conteniendo *V. vulnificus* sin manifestar enfermedad o en algunos casos presentar una ligera gastroenteritis (Shapiro *et al.*, 1998).

1.4 FACTORES DE VIRULENCIA

La expresión de los factores de virulencia está controlado por factores ambientales, ya que la bacteria posee sistemas reguladores de temperatura, osmolaridad, pH, concentración de CO₂, hierro, etc. (Lee *et al.*, 2000).

Existe una variedad de factores asociados a la virulencia de *V. vulnificus* entre ellos podemos mencionar:

- Habilidad de adherirse a la superficie del epitelio (Reyes *et al.*, 1985).
- Enzimas bacterianas: DNasa, amilasa, lecitinasa, gelatinasa, elastasa, colagenasa, fosfolipasa, proteasa, condroitín-sulfatasa (Oliver *et al.*, 1986; Kothary y Kreger, 1987; Rodrigues *et al.*, 1992; Miyoshi *et al.*, 1998).
- Cápsula (Simpson *et al.*, 1987; Hayat *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1997).
- Resistencia a efectos bactericidas del suero humano (Johnson *et al.*, 1984; Yoshida *et al.*, 1985; Janda *et al.*, 1988).

- Resistencia a fagocitos (Kreger *et al.*, 1981; Wright y Morris, 1991).
- Sideróforos (Gander y La Rocco, 1989; Okujo *et al.*, 1994).
- Disponibilidad de hierro en el suero humano (Wright *et al.*, 1981; Hor *et al.*, 2000).
- Presencia de pili Tipo IV (grado de virulencia) (Gander y La Rocco, 1989).
- Toxinas extracelulares (Kreger y Lockwood, 1981; Wright y Morris, 1991; Rho *et al.*, 2002).

1.4.1 Toxinas extracelulares

Un número importante de los *Vibrios* aislados de alimentos producen toxinas extracelulares o exotoxinas que son proteínas hidrosolubles que se caracterizan por su capacidad de lesionar tejidos, y debido a que ocasionan la muerte del enterocito (célula del intestino) también son referidas como citotóxicas (Achenson, 1992; Wong *et al.*, 1993). *V. vulnificus* produce 2 exotoxinas: citolisina y hemolisina.

Citolisina

La citolisina es un polipéptido soluble en agua con una masa molecular relativa (M_r) estimada de 56 kDa; esta toxina es inhibida por el colesterol y parcialmente inactivada por proteasas, es termolábil y su punto isoeléctrico (pI) es de 7.1. Tiene efecto citotóxico en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) es lítica para eritrocitos de varias especies de mamíferos: ratón, cerdo, burro, gato, perro, rata, conejo, entre otros. La citotoxina purificada es letal para ratón a niveles de 3 µg/kg inyectada por vía intravenosa. Presenta permeabilidad vascular y causa cambios morfológicos y disfunción de las estructuras vasculares del pulmón, su efecto probado en endotelio de arteria pulmonar muestra que fragmenta el ADN y decrece los niveles de NAD^+ y ATP dando por resultado la muerte celular (Testa *et al.*, 1984; Gray y Kreger, 1985; Kwon *et al.*, 2001; Rho *et al.*, 2002). La citolisina es altamente tóxica y se sabe que juega un papel importante en los daños severos que se ocasionan en la piel durante el transcurso de la infección por *V. vulnificus* (Gray y Kreger, 1985).

Dentro de los factores asociados con la virulencia y patogénesis de *V. vulnificus* se incluyen las proteasas extracelulares (Kothary y Kreger, 1987; Miyoshi *et al.*, 1987) solamente se ha identificado una metaloproteasa extracelular (designada como *Vvp*) y se ha demostrado

que existe una relación directa entre la expresión de la citolisina y la *Vvp* ya que se ha visto que las cepas a las cuales se les mutó el gen que codifica para *Vvp* muestran una mayor virulencia que aquellas cepas que no han sido mutadas, lo anterior posiblemente se deba a la sobreexpresión de la citolisina en ausencia de *Vvp*. Sin embargo, se requiere mayor información acerca de cómo se modulan y expresan los factores de virulencia y como se relaciona esto con la patogénesis (Shao y Hor, 2000; Choi *et al.*, 2002).

Hemolisina

La hemolisina purificada tiene una *Mr* de 36 kDa, presenta permeabilidad vascular, es termolábil, causa lisis de eritrocitos de una variedad de especies animales porque forma pequeños poros en la membrana citoplasmática, muestra actividad citolítica en líneas celulares y es tóxica para células CHO. Inyectada por vía intravenosa, la toxina purificada es letal para ratón a niveles de aproximadamente 3 µg/kg de peso. Es inhibida por el colesterol y cationes divalentes, es estable al oxígeno y agentes sulfhidrados (Kreger y Lockwood, 1981; Litwin y Byrne, 1998; Choi *et al.*, 2002).

El gen que codifica para la citolisina-hemolisina de *V. vulnificus* (*vvhA*) ya está secuenciado y se sintetizaron los oligonucleótidos iniciadores (primers) para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, se sabe que aparte del gen *vvhA* se codifica otro gen el *vvhB*, la función del *vvhA* es clara pero el producto del gen *vvhB* es desconocido (Choi *et al.*, 2002).

El gen *vvhA* comparte zonas de similitud con el gen estructural de *V. cholerae*: El Tor, hecho que indica un origen común (Yamamoto *et al.*, 1990; Hill *et al* 1991).

La producción de hemolisina está relacionada con la virulencia de la bacteria y es afectada por parámetros ambientales, de ellos los que más influencia tienen son la temperatura y la salinidad. Se ha visto que la cantidad de hemolisina producida es baja si el microorganismo crece en un ambiente con una salinidad del 25‰ y una temperatura de 25°C

mientras que si la salinidad es de 9‰ y la temperatura de 37°C el incremento en la toxina es mayor (Lee *et al.*, 2000).

Una salinidad de 25‰ y una temperatura de 25°C refleja las condiciones ambientales de un estuario, mientras que una salinidad de 9‰ y 37°C representa el medio interno del cuerpo humano. Cuando la bacteria invade al humano, el cambio en tipo y concentración de nutrientes da por resultado un incremento aproximado en la producción de hemolisina de 2.5 veces más, lo cual sugiere que el cambio de condiciones de un medio aumenta la virulencia del microorganismo (Lee *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002).

1.5 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS DEL GENERO

Vibrio

Se han realizado diversos estudios de purificación y caracterización bioquímica de las toxinas de diferentes especies del género *Vibrio*, de los cuales los más importantes se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1. Estudios de purificación y caracterización de toxinas de algunas especies del género *Vibrio*.

Especie	Toxina	Mr (kDa)	pI	Referencia
<i>V. cholerae</i>	Hemolisina	20	NP	Honda y Finkelstein, 1979
<i>V. vulnificus</i>	Hemolisina	38.5	NP	Kreger y Lockwood, 1981
<i>V. fluvialis</i>	Citolisina	135	5.1	Lockwood <i>et al.</i> , 1982
<i>V. cholerae</i>	Citolisina	60	5.7	Yamamoto <i>et al.</i> , 1984
<i>V. fluvialis</i>	Hemolisina	35	4.5	Wall <i>et al.</i> , 1984
<i>V. damsela</i>	Citolisina	57	5.7	Kreger, 1984
<i>V. vulnificus</i>	Hemolisina	38.5	3.8	Testa <i>et al.</i> , 1984
<i>V. vulnificus</i>	Citolisina	56	7.1	Gray y Kreger, 1985
<i>V. damsela</i>	Citolisina	69	5.6	Kothary y Kreger, 1985
<i>V. cholerae</i>	Hemolisina	18.5	NP	Yoh <i>et al.</i> , 1986
<i>V. metschnikovii</i>	Citolisina	50	5.1	Miyake <i>et al.</i> , 1988
<i>V. vulnificus</i>	Citolisina	50	NP	Yamanaka <i>et al.</i> , 1990
<i>V. vulnificus</i>	Citolisina	51	NP	Wright y Morris, 1991
<i>V. cholerae</i>	Citolisina	60	5.3	McCardell <i>et al.</i> , 1999
<i>V. cholerae</i>	Citolisina	58	NP	Walia <i>et al.</i> , 1999
<i>V. tubiashii</i>	Citolisina	59	5.3	Kothary <i>et al.</i> , 2001

NP: no probado.

pI: punto isoeléctrico.

Mr: Masa molecular relativa.

La tabla 1 nos muestra que existe una gran variedad de masas moleculares relativas reportadas para las diferentes especies del género *Vibrio*, de modo tal que podemos encontrar datos que van de 18.5 a 38.5 kDa para el caso de las hemolisinas, con pI entre 3.8 y 4.5. En lo

que respecta a las citolisinas las masas moleculares son mayores y varían de 50 a 135 kDa con pI entre 5.1 y 7.1.

Para el caso específico de *V. vulnificus* los datos de la tabla 1 muestran que en el caso de la hemolisina se reporta una masa molecular de 38.5 kDa con un pI de 3.8, los valores para la citolisina difieren un poco y se encuentran entre 50 y 56 kDa con un pI de 7.1. No se tiene conocimiento de estudios posteriores a 1991 en la purificación y caracterización de toxinas de *V. vulnificus*, mientras que el reporte más reciente de una toxina de este género es de *V. tubiashii* en el 2001.

2.0 JUSTIFICACIÓN

La purificación y caracterización de toxinas de *V. vulnificus* ya se ha realizado con muestras provenientes de diferentes aislados en otras partes del mundo. Sin embargo en México, hasta donde se recabó información, no se ha identificado el tipo de toxinas producidas por *V. vulnificus*, ni se ha llevado al cabo una caracterización bioquímica de estas.

Esta investigación está diseñada para informar si las cepas de *V. vulnificus* producen toxinas, el tipo de éstas, así como determinar algunas características bioquímicas de ellas. Esto permitirá señalar la existencia de cepas de esta bacteria con factores de virulencia que pueden causar daño a la salud; así se podrá establecer la variabilidad en los diferentes aislados al comparar los datos obtenidos con lo reportado en otros países.

3.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Purificar las toxinas de *V. vulnificus* mediante procedimientos fisicoquímicos para facilitar su caracterización bioquímica.

Objetivos específicos

- 1) Confirmar la pureza de las cepas de *V. vulnificus*.
- 2) Obtener las toxinas de *V. vulnificus*.
- 3) Estimar la masa molecular relativa de las toxinas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).
- 4) Caracterización de las toxinas mediante electroforesis bidimensional.
- 5) Corroborar el punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque.

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas estudiadas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, y fueron aisladas a partir de ostiones y pescado capturados en la Laguna de Pueblo Viejo en Veracruz.

4.1 IDENTIFICACIÓN DE *V. vulnificus*

Para determinar la pureza de las cepas, se llevó a cabo el procedimiento recomendado en el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (BAM-FDA) (Elliot *et al.*, 1998).

- 1) Las cepas se sembraron en agar infusión cerebro corazón (BHI) adicionado de NaCl al 3%. Se incubó por 18-24 h a 35-37°C.
- 2) Las cepas que presentaron crecimiento en BHI se sembraron en agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) por estría cruzada. Se incubó por 18-24 h a 35-37°C.
- 3) Las colonias verdes o azul verde, redondas y lisas se sembraron en agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC) por estría cruzada. Se incubó por 24-48 h a 39-40°C.
- 4) Se seleccionaron colonias amarillas aplanadas de aproximadamente 2 mm de diámetro, con centro opaco y periferia translúcida, y se realizaron pruebas de halofilismo en agar triptosa cloruro (T₁N₀) conteniendo 0, 3, 6, 8 y 10% de NaCl. Se incubó por 18-24 h a 35-37°C.
- 5) A las colonias crecidas en 3 y 6% de NaCl se les determinó la prueba de oxidasa. Se colocó una asada de colonia en un pedazo de papel filtro que contenía 2-3 gotas de reactivo para determinación de oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina al 1%). En una reacción positiva el cultivo bacteriano se torna morado oscuro en 10 segundos.
- 6) Se realizó un frotis a las colonias oxidasa positiva y se sometió a la tinción de Gram.

- 7) Las pruebas de identificación incluyeron: fermentación de hidratos de carbono (sacarosa, arabinosa, lactosa, glucosa), descarboxilación de aminoácidos (arginina, ornitina, lisina, fenilalanina), movilidad, producción de indol, gas, H₂S y citrato e hidrólisis de urea y gelatina.

4.2 OBTENCIÓN DE LA TOXINA (Dubey *et al.*, 1990; McCardell *et al.*, 1999)

- 1) Las cepas identificadas como *V. vulnificus* se sembraron en tubos con 15 mL de medio AKI; se incubó por 4 h a 35-37°C sin agitación.
- 2) Se pasó el volumen total de los tubos a matraces con 250 mL de medio AKI y se incubó 16-18 h en agitación (100 rpm) a la misma temperatura.
- 3) Se centrifugó (Centrífuga Beckman J2 HS) a 6000 x g 20 min y el sobrenadante se esterilizó por filtración con membrana 0.22 µm de diámetro de poro.
- 4) Se almacenó a -20°C. Como testigo negativo se usó medio AKI.

4.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA (Lockwood *et al.*, 1982; Miyake, *et al.*, 1988)

La determinación de la actividad de toxinas bacterianas se realizó sobre cultivo de tejidos *in vitro*. Se utilizó para el ensayo la línea celular CHO (células de ovario de hámster chino).

- 1) En una botella con una monocapa confluyente al 100%, se eliminó el medio de crecimiento y se adicionó 2 mL de solución de Pucks para disgregar las células.
- 2) Se incubó de 2-3 min a 37°C.
- 3) Se removieron las células de la superficie por parecentesis.
- 4) Se adicionaron 30 mL de medio F-12 con 10% de suero fetal de bovino y se disgregaron las células.
- 5) Usando una placa de 96 pozos se colocaron 100 µl de células resuspendidas por cada pozo.
- 6) La incubación se realizó por 48 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta confluencia del 100%.

- 7) Se lavó la placa con solución reguladora de fosfatos (PBS) estéril y se inoculó la placa con 80 μ l de medio F-12 y 20 μ l de toxina (4 μ g toxina/ ml de medio) por triplicado para cada una de las muestras.
- 8) Se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, evaluando 2 tiempos 10 y 18 h.
- 9) Se realizó la tinción con colorante de Giemsa.
- 10) Se observaron los cultivos usando un microscopio invertido detectando efecto morfológico y porcentaje de destrucción de la monocapa. Se incluyeron testigos negativos como punto de referencia y comparación.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA (Bradford, 1976)

- 1) Se hizo una curva patrón con albúmina sérica bovina.
- 2) A 100 μ l de la muestra problema se adicionó 1 mL de azul de Coomassie (0.01% de azul brillante de Coomassie G-250, 5% etanol al 95%, 10% de H₃PO₄ al 85%).
- 3) Se midió la absorbancia a 595 nm (Espectrofotómetro Beckman DU640), luego de 5 min.

4.5 PRECIPITACIÓN CON SALES (Nomura *et al.*, 1988)

Todos los pasos se realizaron a 4°C.

- 1) La toxina soluble en el medio AKI se precipitó con sulfato de amonio a las siguientes concentraciones de saturación: 25, 50, 75 y 100%.
- 2) Se agitó 30 min con agitación magnética.
- 3) El precipitado se colectó centrifugando a 10,000 x g 10 min.
- 4) El sobrenadante se decantó y resuspendió con 1 ml de agua desionizada.
- 5) Se dializó 24 h en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0 con 2 cambios del mismo amortiguador.

4.6 PRECIPITACIÓN CON ACETONA

- 1) A 300 μ l de muestra se agregaron 1200 μ l de acetona fría gota a gota en baño de hielo.
- 2) Se dejó reposar 30 min.

- 3) La centrifugación se realizó 10 min a 14,000 x g.
- 4) La acetona se decantó y se guardó el precipitado a -20°C .

4.7 ELECTROFORESIS (Laemmli, 1970; Yamamoto *et al.*, 1983)

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a una concentración de 14% (p/v) para el gel separador, en condiciones desnaturizantes a una corriente de 200 V en una cámara E-C 135 Apparatus Corporation.

- 1) Antes de la electroforesis las muestras fueron incubadas a 100°C por 4-5 min en regulador con β -mercaptoetanol (0.06M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.025% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol).
- 2) Se aplicaron 0.06 μg de toxina a los carriles y 5 μl de los marcadores:

PROTEINA	Mr (kDa)
Fosforilasa B	97.4
Albúmina sérica	66.2
Ovoalbúmina	45.0
Anhidrasa carbónica	31.0
Inhibidor de tripsina	21.5
Lisozima	14.4

- 3) Terminada la corrida se fijó el gel con solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético).
- 4) Se tiñó con azul de Coomassie (0.25% azul brillante de Coomassie G-250, 50% metanol, 10% ácido acético).
- 5) Para retirar el exceso de color se utilizó solución decolorante (50% metanol, 10% ácido acético).
- 6) Posteriormente se secaron los geles entre 2 hojas de papel celofán.
- 7) Los geles se analizaron utilizando la paquetería Quantity One de BioRad.

4.8 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La determinación del punto isoeléctrico de la toxina se determinó mediante isoelectroenfoque en gradientes de pH inmovilizados, en una cámara protean IEF de BioRad.

- 1) Para rehidratar se colocó 700 µl de muestra y se disolvió con 125 µl de regulador.
- 2) Se mezcló y colocó a lo largo de una celda en la cámara de rehidratación.
- 3) Se colocó encima una bandeleta de pH 5-8.
- 4) La rehidratación se realizó 16 h a 15°C.
- 5) Luego de rehidratar se colocó la bandeleta en la cámara IEF y se focalizó a las siguientes condiciones: 15 min a 250 V, 2 h hasta 4000 V/h, 5 h hasta 20,000 V/h. Se mantuvo la temperatura a 15°C.
- 6) Se realizó una electroforesis SDS-PAGE monodimensional de acuerdo al método de Laemli (1970) a concentración 13% (p/v) para el gel separador a 200 V en una cámara E-C 135 Apparatus Corporation.
- 7) Terminada la corrida se fijó el gel (40% metanol, 10% ácido acético).
- 8) Se realizó una tinción con plata (0.2% AgNO₃, se reveló con Na₂CO₃ 3.5% y formaldehído 0.05%).
- 9) Se enjuagó con agua desionizada.
- 10) Para secar el gel se utilizaron dos hojas de papel celofán.

4.9 ENFOQUE ISOLECTRICO

El enfoque isoeléctrico se realizó basándose en los procedimientos marcados en el Manual de PhastSystem de Pharmacia, utilizando un kit para determinación de pI, en un gel de poliacrilamida PhastGel IEF pH 3-9 adicionado de anfolitos.

- 1) Prefocalización 2000 V hasta 75 V/h.
- 2) Aplicación de muestra 200 V hasta 15 V/h.
- 3) Focalización 2000 V hasta 410 V/h.

- 4) La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie y la decoloración con 30% etanol-10% ácido acético, manteniendo la temperatura constante a 15°C a lo largo del experimento.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de *V. vulnificus*

De las 211 cepas que se analizaron, 27 fueron identificadas como *V. vulnificus*. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de pureza y tamiz realizadas para descartar las cepas contaminadas o que no correspondieron a la especie buscada.

TABLA 2. Identificación de las cepas del género *Vibrio*

ENSAYO	Cepas descartadas
BHI al 3% NaCl	43
TCBS	40
mCPC	87
Oxidasa	14
TOTAL	184

Con los ensayos anteriores se eliminó el 87% de las cepas iniciales, el 13% restante (27 cepas) se identificó como *V. vulnificus* y se confirmó bioquímicamente.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Thampuran y Surendran en 1998 quienes al realizar un estudio con pescado y marisco colectados en la India encontraron que el 13.75% de las muestras analizadas son positivas para *V. vulnificus*. Sin embargo, diversos estudios realizados indican que el porcentaje de cepas positivas de *V. vulnificus* de muestras provenientes de productos de la pesca es muy variable ya que depende de factores físicos y biológicos como la salinidad y temperatura del agua, lo que regula la abundancia de este microorganismo en la naturaleza (DePaola *et al.*, 1998). Por ejemplo, en 1986 se realizó

un estudio en ostiones crudos provenientes de un restaurante de Nueva Orleans obteniendo que el 5.5% de las muestras analizadas contenían a *V. vulnificus* (Lowry *et al.*, 1989). En Taiwán se reportó que el 5.74% de productos del mar resultaban contaminados con este patógeno (Wu *et al.*, 1996). Por otro lado Ghinsberg *et al.*, (1999) realizaron 2 estudios de muestras provenientes de las costas del Mediterráneo, para el primero el 6.9% de muestras ensayadas resultaron positivas para *V. vulnificus*, sin embargo, en un segundo estudio obtienen resultados mas altos: 32.8% de las muestras analizadas contenían a *V. vulnificus*.

Algunos estudios concuerdan en que durante los meses de verano la población de *V. vulnificus* en las costas del Golfo de México está presente en alta cantidad, lo que no ocurre durante los meses de invierno (Motes *et al.*, 1998; Bang y Drake, 2002) ya que la densidad del *Vibrio* decrece cuando la temperatura del agua desciende por debajo de 20°C (Ama *et al.*, 1994; Hesselman *et al.*, 1999). Se sabe que ostiones provenientes del Golfo de México contienen de 10^3 - 10^4 células de *V. vulnificus*/g durante los meses de abril a octubre y son mucho menores a 10 células/g durante otros meses (DePaola *et al.*, 1998). Del 13% de cepas que se identificaron como *V. vulnificus* el 73.7% se obtuvieron entre los meses de abril a octubre y el 26.3% de los meses restantes. Lo anterior está acorde con lo reportado por Ghinsberg *et al.*, (1999), quienes concluyeron que donde más frecuentemente se obtienen cepas positivas para *V. vulnificus* es en los meses de julio, agosto y septiembre. Por su parte Oliver y Kaper (1997), demostraron que durante el verano las ostras obtenidas de las costas de Estados Unidos pueden tener altos niveles de contaminación con *V. vulnificus*.

De las pruebas de pureza y tamiz realizadas para descartar aquellas cepas que no correspondieran a la especie buscada podemos decir que:

Para la identificación de *V. vulnificus* proveniente de mar y/o productos marinos se utilizan métodos desarrollados para la identificación de otras especies de *Vibrio*. Típicamente estos métodos incluyen la incubación de las muestras en un medio de enriquecimiento (Tamplin, *et al.*, 1991; Rodrigues, *et al.*, 1992 y García y Langraf, 1998); en nuestro caso se utilizó BHI al 3% de NaCl, de esta manera se buscó eliminar aquellas especies contaminantes

que al no ser halofílicas no presentaron crecimiento en este medio. De ahí que se eliminaran el 20% de las cepas iniciales al no crecer en BHI al 3% de NaCl.

El agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) fue originalmente desarrollado para el aislamiento de *Vibrio spp* y ha sido altamente recomendado para el aislamiento de *V. vulnificus* de muestras clínicas, pero también ha sido frecuentemente usado como medio de aislamiento primario en estudios ecológicos (West *et al.*, 1982). Es un medio ampliamente usado para el aislamiento en productos marinos y aguas de estuarios, ya que permite eliminar al máximo la flora contaminante (Harris *et al.*, 1996); el TCBS es un medio diferencial y selectivo que se basa en la utilización de la sacarosa para dividir al género *Vibrio* en dos:

- Colonias grandes (2 a 4 mm de diámetro), ligeramente aplanadas, amarillas, con centro opaco y periferia translúcida. El color amarillo se debe a la fermentación de la sacarosa del medio.

- Colonias verdes o azul verde de 2-3 mm de diámetro, redondas, lisas, opacas. El color verde se debe a que no se fermentó la sacarosa del medio como es el caso de *V. vulnificus* (CDC/NCID, 1994).

Se descartó el 19% de las cepas iniciales ya que resultaron positivas en la fermentación de sacarosa en TCBS.

Debido a que varias especies del género *Vibrio* muestran morfología similar en TCBS y que el crecimiento de *V. vulnificus* en este medio presenta variaciones, es conveniente disponer de algún otro medio de cultivo selectivo para el aislamiento del microorganismo (West *et al.*, 1982).

Se han reportado diversos medios de cultivo usados en el aislamiento e identificación de *V. vulnificus* entre los cuales podemos mencionar el agar dodecil sulfato de sodio-polimixina B-sacarosa (SDS-SPS), el agar celobiosa-polimixina B-colistina (CPC), el agar

modificado con celobiosa-polimixina B-colistina (mCPC), el agar celobiosa-colistina (CC), el agar *V. vulnificus* (VV) y el agar *V. vulnificus* modificado (VVM) (Cerdeza *et al.*, 2000).

La utilización del agar mCPC permitió aumentar la posibilidad de poner en evidencia a *V. vulnificus*, debido a que en este medio sólo crecen dos tipos de microorganismos: *V. vulnificus* y *V. cholerae*.

Massad y Oliver desarrollaron este medio en 1987, el cual permite separar a las cepas en dos:

- Las que fermentan la celobiosa (*V. vulnificus*), colonias de 1-2 mm de diámetro, amarillas, aplanadas, opacas, redondas.

- Las que no fermentan la celobiosa (*V. cholerae*) colonias verde-café claro que viran el medio de cultivo (inicialmente verde olivo) a púrpura (Parker *et al.*, 1994).

Este medio es efectivo para confirmar la presencia de *V. vulnificus* y *V. cholerae* y ha tenido éxito en el aislamiento y diferenciación sobre todo de *V. vulnificus* en pruebas de laboratorio en aguas de estuarios y moluscos. Sin embargo, para mantener la selectividad del agar la incubación debe ser de 39-40°C, ya que si la incubación se realiza a 37°C como ocurre en la mayoría de los medios de cultivo pueden crecer varias especies que hidrolizan celobiosa; tal es el caso de *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* o *V. campbellii* (Massad y Oliver, 1987).

La etapa de purificación se continuó con las cepas que fermentan celobiosa, descartando el 41% porque no crecieron en mCPC o no fermentaron la celobiosa.

Diversos estudios reportan que más del 90% de las cepas de *V. vulnificus* fermentan la celobiosa, que se utiliza como un criterio de diferenciación y su resistencia a los antibióticos colistina y polimixina B. Estas propiedades no son comunes entre los miembros de la familia *Vibrionaceae*, ya que sólo pocas especies de *Vibrio* que crecen a 37°C fermentan celobiosa y

son resistentes a colistina y polimixina, hecho que se aprovechó para el desarrollo del medio CPC (Alsina y Blanch, 1994). Este medio inhibe el crecimiento de muchos otros vibrios. En muchos estudios el agar CPC fue efectivo en monitoreos ambientales y fue superior a TCBS y SDS-SPS (Oliver *et al.*, 1992; Sun y Oliver, 1995).

Tamplin *et al.*, (1991), desarrollaron una modificación del agar CPC, el mCPC que presenta una reducción en la concentración de colistina, el mCPC ha sido muy utilizado al tener una mayor eficiencia (cerca del 100%) que el CPC (76%) en el aislamiento de *V. vulnificus* de fuentes ambientales (Tamplin *et al.*, 1991; Tamplin y Capers, 1992; Dalsgaard y Hoi, 1997).

V. vulnificus es un microorganismo halófilo ya que requiere para su crecimiento que el medio de cultivo contenga alta concentración salina. Intervalos de 7-16‰ son los adecuados para su crecimiento (Bang y Drake, 2002). La prueba de halofilismo consistió en cultivar al microorganismo en medio nutritivo triptosa cloruro (T₁N₀) conteniendo 0, 3, 6, 8 y 10% de NaCl. Se reporta que *V. vulnificus* no crece en el medio con 0, 8, y 10% de NaCl, sólo al 3 y 6% (Elliot *et al.*, 1998). Con esta prueba no se descartó ninguna cepa ya que todas presentaron crecimiento al 3 y 6% de NaCl y ninguna a 0, 8 y 10%.

La prueba de oxidasa está basada en la producción de enzimas oxidasas. Los organismos aeróbicos o anaerobios facultativos como *Vibrio* son oxidasa positivo, ya que utilizan el oxígeno como aceptor de hidrógeno para reducir el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno, el último enlace de la cadena respiratoria (McFaddin, 1984).

La realización de la prueba de oxidasa es importante por que se sabe que los bacilos gramnegativos como *Vibrio* reaccionan positivos, en tanto que todas las enterobacterias son negativas. Sin embargo como una excepción a *Vibrio*, *V. metschinovii* da resultado negativo (Kelly *et al.*, 1991). Mediante esta prueba se eliminó el 7% de las cepas analizadas al dar oxidasa negativo.

Los microorganismos purificados y aislados se confirmaron mediante reacciones bioquímicas. Algunas de las pruebas de identificación incluyeron: producción de indol, fermentación de hidratos de carbono, pruebas de descarboxilación y movilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Características bioquímicas de las cepas identificadas.

PRUEBA	Cepas	
	identificadas	Literatura*
Rojo de metilo (NaCl 1%)	+	+
Voges-Proskauer (NaCl 1%)	-	-
Citrato de Simmons	+	+
Hidrólisis de urea	-	-
Descarboxilación de aminoácidos:		
Arginina (NaCl 1%)	-	-
Lisina (NaCl 1%)	+	+
Fenilalanina	-	-
Ornitina (NaCl 1%)	+	+
Hidrólisis de gelatina (NaCl 1%)	+	+
Producción de ácido de:		
Sacarosa	-	-
L-Arabinosa	-	-
Lactosa	+	+
D-Glucosa	+	+
Tinción de Gram	-	-
Movilidad (36°C)	+	+
Producción de indol (NaCl 1%)	+	+
Producción de H ₂ S en TSI	-	-
Producción de gas en TSI	-	-

* (Kelly *et al.*, 1991)

Podemos observar en la Tabla 3, que los resultados obtenidos con la aplicación de las pruebas bioquímicas a las 27 cepas identificadas coinciden con lo reportado en la literatura para confirmar la presencia de *V. vulnificus* (Kelly *et al.*, 1991).

5.2 Citotoxicidad

En los ensayos de citotoxicidad se probaron inicialmente 18 horas de incubación (Lockwood *et al.*, 1982) en la línea celular CHO. Los resultados indicaron que el porcentaje de destrucción de la monocapa fue del 100% en las 27 cepas aisladas, de modo que no fue posible apreciar cambios en la morfología de la línea celular a ese tiempo de incubación. A las 10 horas de incubación (Miyake *et al.*, 1988) se observó que el porcentaje de destrucción de la monocapa fue variable. Tres cepas presentaron un porcentaje de destrucción entre 20 y 40%, 18 entre 40 y 60%, 2 entre 60 y 80% y 4 entre 80 y 100% de destrucción de la monocapa. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4. Citotoxicidad del medio de cultivo de cepas de *V. vulnificus* en células CHO

no. CEPAS	Destrucción monocapa (%)
3	20-40
18	40-60
2	60-80
4	80-100
Total 27	

El efecto citotóxico de las cepas sobre la línea celular se caracteriza por cambio en la morfología de las células (necrosis, elongación o redondeo) y destrucción de la monocapa. De acuerdo con los resultados obtenidos, el efecto que la toxina tiene sobre la línea CHO en el 100% de los casos fue elongación celular tal y como se observa en la Figura 2.

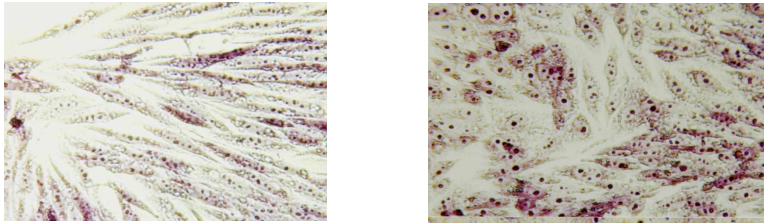


Figura 2. Efecto citotóxico en células CHO. La fotografía de la izquierda muestra la elongación de las células CHO causada por la presencia de la toxina. Se muestran células CHO normales en la fotografía de la derecha.

Comentario: no importa, luego me las enseñas.

Se ha informado que el alargamiento celular se puede observar a las 18 (Lockwood *et al.*, 1982) y a las 24 horas (Walia *et al.*, 1999). En nuestro trabajo y como ya se mencionó, a las 18 horas se observó destrucción del 100% de la monocapa con la toxina de las 27 cepas aisladas. A las 10 horas se pudieron apreciar los cambios morfológicos en las células CHO. Miyake *et al.*, (1988) utilizaron 10 horas de incubación pero reportaron el efecto en términos de destrucción de monocapa, no de cambios sobre la morfología.

Por otro lado, Kreger y Lockwood (1981), reportan que a las 24 horas de incubación observaron un efecto de arredondamiento de las células. En el presente estudio no se vio este efecto en ninguna de las cepas analizadas, únicamente alargamiento en un tiempo menor (10 horas).

Las condiciones (tiempo, temperatura de incubación, pH del medio y nutrientes) en la producción y tipo de toxina varían dentro de un mismo género y especie. Se ha señalado que bastan 10 pg toxina/ml para poner en evidencia al microorganismo en la línea celular CHO (Wachsmuth, 1984). El hecho de que la actividad citotóxica sea evidente a las 10 h de incubación, nos podría indicar que la toxina analizada es más activa, ya que en otras investigaciones parecidas, se reportan tiempos mayores para ver efecto sobre la morfología celular (Lockwood *et al.*, 1982; Walia *et al.*, 1999).

5.3 Electroforesis

La precipitación diferencial salina con sulfato de amonio se realizó a concentraciones de 25, 50 y 75% de saturación a las cepas identificadas como *V. vulnificus* y se realizó con cada una de ellas la electroforesis correspondiente (Figura 3).

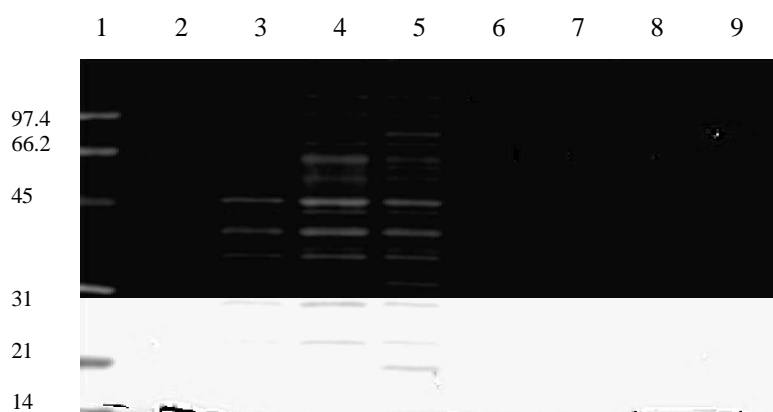


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de toxinas de *V. vulnificus* y testigos. Carriles: **1**, marcadores de masa molecular conocida, en kDa; **2**, extracto crudo; **3**, preparación precipitada al 25% con sulfato de amonio; **4**, preparación precipitada al 50%; **5**, preparación precipitada al 75%; **6**, Medio de cultivo (AKI) sin inóculo; **7**, AKI precipitado al 25%; **8**, AKI precipitado al 50%; **9**, AKI precipitado al 75%. El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie R-250.

El análisis de los geles de electroforesis permitió verificar que el medio AKI no aportara bandas de proteína como las que se muestran en la Figura 4, ya que no se aprecia bandas pertenecientes al medio cuando se trata esta solución con sulfato de amonio en ninguna de las concentraciones utilizadas.

Por otro lado, las muestras presentan varias bandas de proteína a las distintas fracciones de precipitación: 25, 50 y 75%, cuestión que no se esperaba ya que de acuerdo con la bibliografía *V. vulnificus* presenta únicamente dos toxinas: la hemolisina con masa molar relativa (M_r) de aproximadamente 36 kDa y la citolisina con un M_r de aproximadamente 56 kDa (Gray y Kreger, 1985; Litwin y Byrne, 1998). Sin embargo, este comportamiento no se presentó en todas las muestras ya que hubo 3 que presentaron una banda de proteína a concentración de saturación del 50%, con estas 3 muestras se realizó una precipitación diferencial salina más selectiva utilizando porcentajes de saturación de 25 a 75% con la finalidad de apreciar a que porcentaje de saturación se observa claramente la banda de interés y posteriormente analizar resultados (Figura 4).

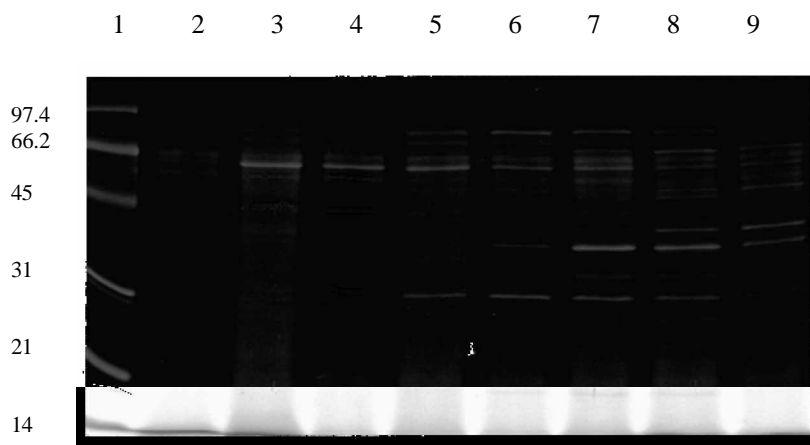


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de toxinas de *V. vulnificus*. Carriles: **1**, marcadores de masa molecular conocida, en kDa; **2**, muestra al 25% de saturación; **3**, muestra al 45% de saturación; **4**, muestra al 50% de saturación; **5**, muestra al 55% de saturación; **6**, muestra al 60% de saturación; **7**, muestra al 65% de saturación; **8**, muestra al 70% de saturación; **9**, muestra al 75% de saturación. El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie R-250.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es en las fracciones de 45 y 50% de saturación donde se encuentra una banda de proteína, cosa que no ocurre en todos los demás porcentajes de saturación que muestran diversas bandas.

TABLA 5. Análisis de SDS-PAGE

Fracción precipitada	Masa molecular relativa (kDa)	Rf
45%	60.4	0.241
50%	60.0	0.244

Comentario: quisiera que hicieras una tabla en dónde se analicen las bandas de todas las fracciones.

En la Tabla 5 se muestran los resultados para las fracciones 45 y 50%, ya que como se mencionó antes, es en estas fracciones donde se concentran las bandas de interés; el resultado de *Mr* y *Rf* permite ver que la diferencia entre los distintos valores para cada uno de los parámetros analizados es mínima ya que el *Mr* para 45% es 60.4 kDa y para 50% es 60.0 kDa, mientras que el *Rf* es 0.241 y 0.255 para 45 y 50% respectivamente.

Los resultados anteriores concuerdan con los datos de Gray y Kreger, (1985) quienes reportaron una citolisina para *V. vulnificus* de 56 kDa. Yamamoto *et al.*, (1990) y Wright y Morris (1991) mencionan en sus experimentos una citolisina de *V. vulnificus* de 50 y 51 kDa respectivamente. Como puede verse los resultados obtenidos experimentalmente son parecidos a lo mencionado previamente en otros estudios, sin embargo, es importante mencionar que en ninguno de los experimentos realizados se obtuvo alguna banda del orden de 36 kDa que de acuerdo con lo reportado por Litwin y Byrne, (1998), correspondería a hemolisina. Por lo que se puede decir que en nuestros experimentos los datos no muestran evidencia de hemolisina.

La presencia de una toxina no necesariamente va acompañada de otra, como lo menciona Okada *et al.*, (1987), quienes al analizar 16 cepas de *V. vulnificus* mediante SDS-

PAGE concluyeron que las 16 contenían una hemolisina de 36 kDa, sin embargo no en todas se presentó la banda de 56 kDa correspondiente a la citolisina, lo que indica que en sus experimentos la toxina común a todas las cepas fue la hemolisina y no la citolisina, en nuestro caso la toxina común a las cepas es citolisina y no hemolisina.

Cabe aclarar que el porcentaje de precipitación al cual se puede concentrar la banda de interés es muy variable, ya que por ejemplo: Wall *et al.*, (1984), utilizaron 45% de saturación, mientras que Dubey *et al.*, (1990), reportaron 90% de saturación; en su mayoría los estudios reportados utilizaron un máximo de precipitación de 60% (Yamamoto *et al.*, 1984; Kothary y Kreger, 1985; McCardell *et al.*, 1990).

Con la finalidad de corroborar que la banda de proteína encontrada corresponde a la citolisina se realizó el análisis de actividad citotóxica a las fracciones de 45 y 50% de saturación, resultados que junto con los valores de proteína se presentan en la Tabla 6.

TABLA 6. Citotoxicidad de las fracciones del medio de cultivo de *V. vulnificus*

Condición		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad citotóxica (%)
Extracto crudo		4.73	40
Precipitación salina (%)	45	3.22	50
	50	3.84	60

La Tabla 6 nos indica que la actividad citotóxica aumenta de 50% en la fracción de 45% de saturación a 60% en la fracción de 50% de saturación, mientras que la diferencia en la concentración de proteína entre una fracción y otra es únicamente de 0.62 $\mu\text{g/ml}$.

5.4 Electroforesis bidimensional

Con base en los resultados anteriores observamos que la actividad citotóxica y la proteína se concentran al porcentaje de saturación de 50%, y al tener un M_r coincidente con la bibliografía, se puede decir que la banda de proteína obtenida a la fracción de 50% de saturación corresponde a una citolisina, a la cual se le determinó el punto isoelectrico mediante electroforesis bidimensional. La Figura 5 muestra estos resultados.

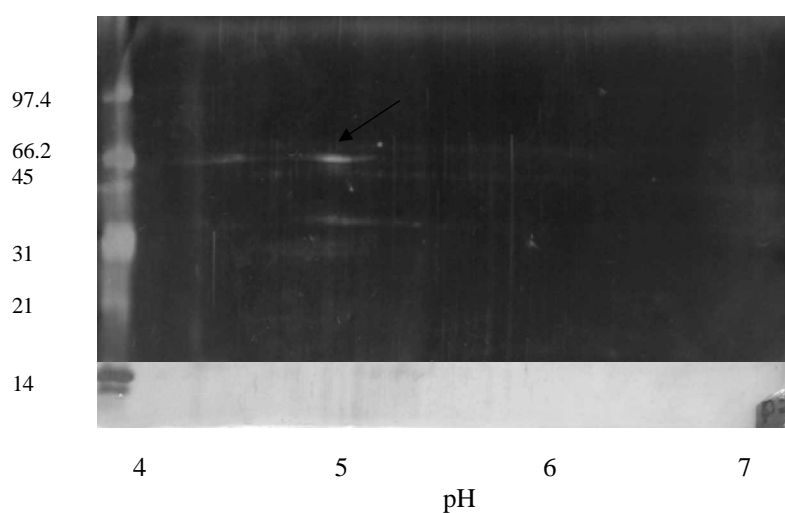


Figura 5. Toxina de *V. vulnificus* analizada por electroforesis bidimensional. La flecha indica la proteína de interés. En los márgenes se indican los marcadores de masa molecular conocida, en kDa y el pH aproximado en el gel.

5.5 Enfoque isoelectrico

Los resultados de electroforesis bidimensional muestran que la toxina de *V. vulnificus* presenta un pI estimado de 5.0. Para corroborar el resultado anterior se realizó la determinación del pI de la toxina de *V. vulnificus* mediante enfoque isoelectrico en gel de poliacrilamida (Figura 6).

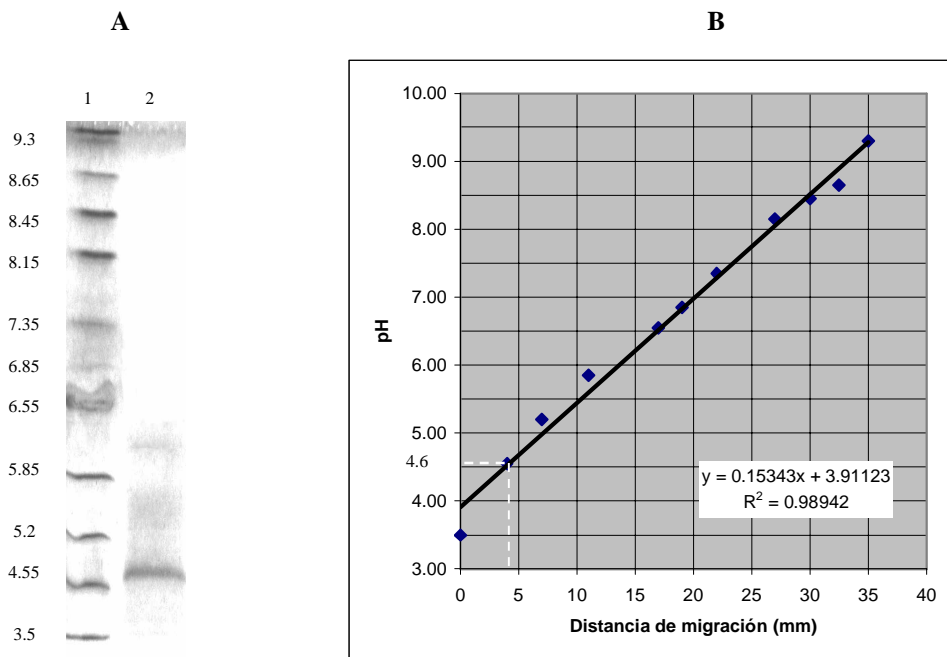


Figura 6. Determinación de pI de la toxina de *V. vulnificus* mediante enfoque isoelectrico en gel de poliacrilamida. (A) Gel teñido con azul brillante de Coomassie R-250. Carriles: **1**, marcadores de pI; **2**, toxina de *V. vulnificus*. (B) Estimación de pI.

La movilidad electroforética de los marcadores de pI, se muestra en la Figura 6. Por interpolación en la curva de calibración, el pI de la toxina de *V. vulnificus* fue estimado en 4.6. El valor reportado es un promedio de diferentes mediciones en el gel con una incertidumbre de ± 0.2 .

El valor de pI estimado en 4.6 no es parecido al reportado por Gray y Kreger en 1985 para la citolisina de *V. vulnificus* que fue de 7.1; de hecho es más coincidente a lo mencionado por Testa *et al.*, (1984) para la hemolisina que es de 3.8. No se cuenta con datos recientes que

permitan hacer una comparación más amplia entre los valores reportados en la bibliografía con lo obtenido en los experimentos.

Los resultados experimentales de pI, tienen mayor semejanza con lo reportado por otros autores para citolisinas de especies diferentes a *vulnificus*, ya que por ejemplo: Kothary y Kreger, (1985) reportaron una citolisina de *V. damsela* con un pI de 5.6, Miyake *et al.*, (1988) encontraron una citolisina de *V. metschnikovii* con un pI 5.1, mientras que McCardell *et al.*, (1999) y Kothary *et al.*, (2001) reportan un mismo valor de 5.3 para citolisinas de *V. cholerae* y *V. tubiashii* respectivamente. Como podemos ver los valores de pI para las citolisinas son parecidos e inclusive iguales como en el caso de los dos últimos datos aun cuando no sean de la misma especie.

6.0 CONCLUSIONES

- a) De las 211 cepas trabajadas, 27 se identificaron bioquímicamente como *V. vulnificus* presentando estas cepas actividad citotóxica clara a partir de las 10 h de incubación, tiempo menor que el reportado en investigaciones parecidas para este microorganismo. En el medio de cultivo virgen no se detectó actividad citotóxica.
- b) En tres cepas de *V. vulnificus* se presentó una banda de proteína en SDS-PAGE con M_r promedio de 60 kDa correspondiente a citolisina. El medio de cultivo virgen no aportó bandas de proteína.
- c) En ninguno de los experimentos realizados se obtuvieron bandas del orden de los 36 kDa que corresponderían a hemolisina. La presencia de una toxina no necesariamente va acompañada de otra, sin embargo, en reportes parecidos se ha visto que en general la toxina común a las cepas de *V. vulnificus* es hemolisina y no citolisina como en el caso de nuestro estudio.
- d) Se caracterizó la naturaleza eléctrica de la citolisina mediante electroforesis bidimensional y enfoque isoeléctrico obteniendo un pI estimado de 4.6. Dato que aunque no es parecido a lo reportado para *V. vulnificus* en investigaciones realizadas en otras partes del mundo, si es comparable con citolisinas de otras especies de *Vibrio*.

7.0 PERSPECTIVAS

Un estudio que complementarí­a la caracterización de la citolisina de *V. vulnificus*, aportando mayor información de ella y que contribuirí­a a evaluar el papel que esta toxina tiene en la patogénesis causada por *V. vulnificus*, incluirí­a las siguientes determinaciones:

- a) Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de la toxina purificada tales como efecto de iones de metales, lípidos como el colesterol e inhibición enzimática, así como intervalo de pH y temperatura óptimos.
- b) Ensayo de lisis de eritrocitos en algunas especies de animales (ratón, conejo, etc.) así como pruebas biológicas *in vivo* como dosis letal en ratón.
- c) Por último, métodos de biología molecular como es la secuenciación de aminoácidos, proporcionaría información para la identificación del gen de la toxina de *V. vulnificus* de cepas obtenidas de productos de la pesca de las Costas del Golfo de México, información que hasta donde se sabe, no se conoce en México.

8.0 BIBLIOGRAFÍA

- Achenson, D. 1992. Enterotoxins in acute infective diarrhoea. *J. Infect.* 24:225-245.
- Alsina, M., y A. R. Blanch. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76:79-85
- Ama, A., M. Handy, y R. Toledo. 1994. Effects of heating, pH and thermoradiation on inactivation of *Vibrio vulnificus*. *Food Microbiol.* 11:215-227.
- Amaro, C., y E. G. Biosca. 1996. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4): 1454-1457.
- Amaro, C., B. Fouz, E. G. Biosca, y R. Collado. 1997. The lipopolysaccharide O side chain of *Vibrio vulnificus* serogroup E is a virulence determinant for eels. *Infect. Immun.* 65(6):2475-2479.
- Banerjee, S., S. Pandian, E. Tood, y J. M. Farber. 2002. A rapid and improved method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* strains grown on hydrophobic grid membrane filters. *J. Food Prot.* 65(6):1049-1053.
- Bang, W., y M. A. Drake. 2002. Resistance of cold –and starvation- stressed *Vibrio vulnificus* to heat and freeze-thaw exposure. *J. Food Prot.* 65(6):975-980.
- Baumann, P., y R. H. W. Schubert. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Biosca, E. G., J. D. Oliver, y C. Amaro. 1996. Phenotypic characterization of *Vibrio vulnificus* biotype 2, a lipopolysaccharide-based homogeneous O serogroup within *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3):918-927.

Biosca, E. G., C. Amaro, J. L. Larsen, y K. Pedersen. 1997. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio vulnificus*: proposal for the substitution of the subspecific taxon biotype for serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4):1460-1466.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades y Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (CDC/NCID). 1994. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Programa Especial de Publicaciones en Español, Organización Panamericana de la Salud (OPS), Washington, D.C.

Cerda-Cuellar, M., J. Jofre, y A. R. Blanch. 2000. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2):855-859.

Chin, K., M. Love, M. Tong, y A. Koehler. 1987. *Vibrio vulnificus* infection after raw oyster ingestion in a patient with liver disease and acquired immune deficiency syndrome-related complex. *Gastroenterology.* 92:796-799.

Choi, H.K., N.Y. Park, D. Kim, H. J. Chung, S. Ryu, y S.H. Choi. 2002. Promoter analysis and regulatory characteristics of *vvhBA* encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus*. *J. Biol. Chem.* 277(49):47292-47299.

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

DePaola, A., M. L. Motes, A. M. Chan, y C. A. Suttle. 1998. Phages infecting *Vibrio vulnificus* are abundant and diverse in oysters (*Crassostea virginica*) collected from the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1):346-351.

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

Dalsgaard, A., y L. Hoi. 1997. Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. *J. Food Prot.* 60:1132-1135.

Dubey, R., M. Lindblad, y J. Holmgren. 1990. Purification of El Tor cholera enterotoxins and comparisons with classical toxin. *J. Gen. Microbiol.* 136:1839-1847.

Eastaugh, J., y S. Shepherd. 1989. Infectious and toxic syndromes from fish and shellfish consumption. *Arch. Intern. Med.* 149:1735-1740

Elliot, E. I., C. A. Kaysner, L. Jackson, y M. L. Tamplin. 1998. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio spp.* *En Bacteriology Analytical Manual Food and Drug Administration. Chap. 9 Association of Analytical Chemistry, Washington, D.C.*

Gander, R.M., y M.T. La Rocco. 1989. Detection of piluslike structures on clinical and enviromental isolated of *Vibrio vulnificus*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1015-1021.

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

Ghinsberg, R. C., R. Dror, y Y. Nitzan. 1999. Isolation of *Vibrio vulnificus* from sea water and sand along the Dan region coast of the Mediterranean. *Microbios.* 97(386):7-17

Glass, R. I., S. Becker, M. I. Huq, B. J. Stoll, M. V. Khan, M. H. Merson, J. V. Lee, y R. E. Black. 1982. Endemic cholera in rural Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 116:959-970

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

Hacknery, C. R., y A. Dicharry. 1988. Sea food-borne bacterial pathogens of marine origin. *Food Tech.* 42(3):104-109.

Harris, L., L. Owens, y S. Smith. 1996. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9):3548-3550.

Hayat, U., P. Reddy, A. Bush, J. Johnson, A. Wrigth, y G. Morris. 1993. Capsular types of *Vibrio vulnificus*: An analysis of strains from clinical and environmental sources. *J. Infect. Dis.* 168:758-762.

Hesselman, D., M. Motes, y J. 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(11):1266-1269

Hill, W., S. Keasler, M. Trucksess, P. Feng, Ch. Kaysner, y K. Lampel. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(3):707-711.

Hijarrubia, M. J., B. Lazaro, E. Suñen, y A. F. Astorga. 1996. Survival of *Vibrio vulnificus* under pH, salinity and temperature combined stress. *Food Microbiol.* 13:193-199.

Hlady, W.G. 1997. *Vibrio* infections associated with raw oyster consumption in Florida, 1981-1994. *J. Food Prot.* 60:353-357.

Hoi, L., J. L. Larsen, I. Dalsgaard, y A. Dalsgaard. 1998. Ocurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine enviroments. Appl. Environ. Microbiol. 64(1): 7-13.

Hollis, D., R. E. Weaver, C. N. Baker, y C. Thornsberry. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 3:425-431.

Honda, T., y R.A. Finkelstein. 1979. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholera* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. Infect. Immun. 26(3):1020-1027.

Hor, L. I., Y. K. Chang, C. C. Chang, H. Y. Lei, y J. Tou. 2000. Mechanism of high susceptibility of iron-overloaded mouse to *Vibrio vulnificus* infection. Microbiol. Immunol. 44(11):871-878

Hoyer, J., E. Engelman, R. M. Liehr, A. Distler, H. Hahn, y T. Shimada. 1995. Septic shock due to *Vibrio vulnificus* serogroup 04 wound infection acquired from the Baltic Sea. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14:1016-1018.

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

Johnson, J., F. Calia, D. Musher, y A. Goree. 1984. Resistance of *Vibrio vulnificus* to serum bactericidal and opsonizing factors: relation to virulence in suckling mice and humans. J. Infect. Dis. 150: 413-418.

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

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

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

Kaysner, C.A., C. Abeyta, K. Jinnemand, y W. Hill. 1994. Enumeration and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* by DNA-colony hybridization using the hydrophobic grid membrane filtration technique for isolation. *J. Food Prot.* 52(2): 163-165.

Kelly, M. T., F. W. Hickman-Brenner, y J. J. Farmer III. 1991. *Vibrio*. p. 384-395. *En* Balows, A., W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, y H. J. Shadomy. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Klontz, K., S. Lieb, M. Schreiber, H. Janowski, L. M. Baldy, y R. A. Gunn. 1988. syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann. Intern. Med.* 109:318-323.

Koo, J., A. DePaola, y D. Marshall. 2000. Impact of acid on survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage. *J. Food Prot.* 63(8):1049-1052.

Kreger, A., L. DeChatelet, y P. Shirley. 1981. Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes: association of virulence with resistance to phagocytosis. *J. Infect. Dis.* 144: 244-248.

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

Kreger, A. S. 1984. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. Infect. Immun. 44:326-331.

Kothary, M. H., y A. S. Kreger. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. Infect. Immun. 49(1):25-31.

Kothary, M. H., y A. S. Kreger. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus* . J. Gen. Microbiol. 133:1783-1791.

Kothary, M. H., R. B. Delston, S. K. Curtis, B. A. McCardell, y B. D. Tall. 2001. Purification and characterization of a vulnificolysin-like cytolysin produced by *Vibrio tubiashii*. Appl. Environ. Microbiol. 67(8):3707-3711.

Kwon, K., J. Yang, D. Ryu, H. Rho, J. Kim, J. Park, H. Kim, y B. Park. 2001. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. J. Biol. Chem. 276(50):47518-47523.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lee, S. E., S. H. Shin, S. Y. Kim, Y. R. Kim, y D. H. Shin. 2000. *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA*. J. Bacteriol. 182(12):3405-3415.

Litwin, Ch., y B. Byrne. 1998. Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. Infect. Immun. 66(7):3134-3141.

Lockwood, D. E., A. S. Kreger, y S. H. Richardson. 1982. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. Infect. Immun. 35(2):702-708.

Lowry, P. W., L. M. McFarland, B. H. Peltier, N. C. Roberts, H. B. Bradford, J. L. Herndon, D. F. Stroup, J. B. Mathison, P. A. Blake, y R. A. Guun. 1989. *Vibrio* gastroenteritis in Louisiana: a prospective study among attendees of a scientific congress in New Orleans. *J. Infect. Dis.* 160(6):978-983.

Mac Faddin, J. F. 1984. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. México.

Massad, G., y J. D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(9):2262-2264.

McCardell, B. A., M. H. Kothary, y J. M. Madden. 1999. Two-step purification and partial characterization of a variant of the *Vibrio cholerae* non-01 hemolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 180. 177-182.

Miyake, N., T. Honda, y T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. *Infect. Immun.* 56(4):954-960.

Miyoshi, N., C. Shimizu, S. Miyoshi, y S. Shinoda. 1987. Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. *Microbiol. Immunol.* 31:13-25.

Miyoshi, S., H. Nakazawa, K. Kawata, K. Tomochika, K. Tobe, y S. Shinoda. 1998. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect. Immun.* 66(10):4851-4855.

Motes, M. L. y A. DePaola. 1996. Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3875-3877.

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

Nishibuchi, M., K. Muroga, y M. Jo. 1980. Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. *Vibrio* serological studies. Fish Pathol. 14:117-1245.

Nomura, S., M. Fujino, M. Yamakawa, y E. Kawahara. 1988. Purification and characterization of salmolysin, an extracellular hemolytic toxin from *Aeromonas salmonicida*. J. Bacteriol. 170(8):3694-3702.

Okada, K., S. Miake, T. Moriya, M. Mitsuyama, y K. Amaro. 1987. Variability of haemolysin(s) produced by *Vibrio vulnificus* J. Gen. Microbiol. 133:2853-2857.

Okujo, N., M. Saito, S. Yamamoto, T. Yshida, S. Miyoshi, y S. Shinoda. 1994. Structure of vulni bactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. Biometals 7:109-116.

Oliver, J. D., J. E. Wear, M. B. Thomas, M. Warner, y K. Lin. 1986. Production of extracellular enzymes and cytotoxin by *Vibrio vulnificus*. Diag. Microbiol. Infec. Dis. 5:99-111.

Oliver, J. D y J. B. Kaper. 1997. *Vibrio* species. p. 228-264. *En Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Oliver, J. D., L. Nilsson, y J. Kjelleberg. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. Appl. Environ. Microbiol. 57:2640-2644.

Oliver, J. D., K. Guthrie, J. Preyer, A. C. Wrigth, L. M. Simpson, R. Siebling, y J. G. Morris. 1992. Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:737-739.

Parker, R.W., E. M. Maurer, A. B. Childers, y 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.

Pfeffer, C. S., M. F. Hite, y J. D. Oliver. 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in estuarine waters of eastern north Carolina. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6):3526-3531.

Porras, G., J. J. Viana, B. Chávez, y J. Sierra. 1994. *Vibrio vulnificus* en México: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev. Invest. Clin.* 46:495-498.

Powell, J. L., A. C. Wrigth, S. S. Wasserman, D. M. Hone, y J. G. Morris. 1997. Release of tumor necrosis factor alpha in response to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in vivo and in vitro models. *Infect. Immun.* 65:3713-3718.

Reyes, A. L., B. K. Boutin, J. T. Peeler, y R. Twedt. 1985. Adherence and hemagglutination of mammalian cell distinct strains 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, y H. R. Kim. 2002. Cytotoxic mechanism of *Vibrio vulnificus* cytolysin in CPAE cells. *Life Sci.* 70(16):1923-1934.

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

Sakazari, R. 1992. Bacteriology of *Vibrio* and related organisms. *En Current topics in infections disease: Cholera*. Plenum Med. B, London.

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

Shao, C. P., y L. I. Hor. 2000. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* in mice. *Infect. Immun.* 68:3569-3573.

Simpson, L. M., V. K. White, S. F. Zane, y J. D. Oliver. 1987. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 55:269-272.

Sun, Y., y J. D. Oliver. 1995. Value of cellobiose-polymyxin B-colistin agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from oysters. *J. Food Prot.* 58:439-440.

Tamplin, M. L., A. L. Martin, A. D. Ruple, D. W. Cook, y C. W. Kaspar. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1235-1240.

Tamplin, M. L., y 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.

Testa, J., L. Daniel, y A. Kreger. 1984. Extracellular phospholipase A₂ and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 45(2):458-463.

Thampuran, N., y P. K. Surendran. 1998. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* in tropical fish and shellfish from Cochin (India). *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 110-112.

Wachsmuth, I. 1984. Laboratory detection of enterotoxins. *En Infectious diarrheal disease: current concepts and laboratory procedures*. P D Eliner. (ed.), Marcel Dekker. Inc, New York.

Walia, K., S. Ghosh, H. Singh, G. B. Nair, A. Ghosh, G. Sahni, H. Vohra, y N. K. Gonguly. 1999. Purification and characterization of a novel toxin produced by *Vibrio cholerae* 01. *Infect. Immun.* 67(10):5215-5222.

Wall, V. W., A. S. Kreger, y S. H. Richardson. 1984. Production and partial characterization of a *Vibrio fluvialis* cytotoxin. *Infect. Immun.* 46(3):773-777.

West, P.A., E. Russek, P. R. Brayton, y R. R. Colwell. 1982. Statistical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agars. *J. Clin. Microbiol.* 16:1110-1116.

Whitesides, M. D., y J. D. Oliver. 1997. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1002-1005.

Wright, A. C., L. M. Simpson, y J. D. Oliver. 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* 34:503-507.

Wright, A. C., y G. Morris Jr. 1991. The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect. Immun.* 59(1):192-197.

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

Wong, H., W. Shieh, y Y. Lee. 1993. Toxigenic characterization of *Vibrios* isolated from foods available in Taiwan. *J. Food Prot.* 56(11):980-982.

Wu, H. S., D. P. Liu, C. H. Hwang, M. J. Chen, J. L. Hwang, Y. Liu, L. C. Shankuan, C. S. Lin, y T. N. Wu. 1996. Survey on the distribution of Vibrionaceae at the seaport areas in Taiwan, 1991-1994. *J. Clin. Microbiol.* 29(4):197-209.

Yamamoto, K., Y. Takeda, T. Miwatani, y J. Craig. 1983. Purification and some properties of a Non-01 *Vibrio cholerae* enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin. *Infect. Immun.* 39(3):1128-1135.

Yamamoto, K., M. A. L-Omani, T. Honda, Y. Takeda, y T. Miwatani. 1984. Non-01 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. *Infect. Immun.* 45(1):192-196.

Yamamoto, K., A. C. Wrigth, J. B. Kaper, y J. Morris. 1990. The cytolysin gen of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gen. *Infect. Immun.* 58(8):2706-2709.

Yamanaka, H., K. Sumiyama, H. Furuta, S. Miyoshi, y S. Shinoda. 1990. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity. *J. Med. Microbiol.* 32:39-43.

Yoh, M., T. Honda, y T. M. Watani. 1986. Purification and characterization of a Non-01 *Vibrio cholerae* hemolysin that cross-reacts with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 52(1):319-322.

Yoshida, S., M. Ogawa, y Y. Mizuguchi. 1985. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 47: 446-451.

APENDICE

MEDIOS DE CULTIVO

1. Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Proteasa peptona o polipeptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.0
D-glucosa	2.0

pH final 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, distribuir en volúmenes adecuados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2. Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Proteasa peptona o polipeptona	10.0
Cloruro de sodio	30.0
Fosfato disódico	2.5
D-glucosa	2.0

Agar 15.0

pH final 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada. Calentar y agitar frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar 45–50 °C y distribuir en cajas de Petri estériles.

3. Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de levadura	5.0
Proteosa peptona	10.0
Sacarosa	20.0

Tiosulfato de sodio	10.0
Citrato de sodio	10.0
Sales biliares	3.0
Bilis de buey	5.0
Cloruro de sodio	10.0
Citrato férrico	1.0
Azul de bromotimol	40 mg
Azul de timol	40 mg
Agar	15.0

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor. No esterilizar. Enfriar a 50 °C y distribuir en cajas Petri estériles.

4. Agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Solución 1

Peptona de caseína	10.0
Extracto de carne	5.0
Stock de colorantes 1000X	1 mL
Agar	15.0
Cloruro de sodio	20.0
Agua destilada	900.0 mL

pH final 7.6

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución 2

Celobiosa	10.0
Colistina (Polimixina E)	400,000 UI
Polimixina B	100,000 UI
Agua destilada	100 mL

PREPARACIÓN

Disolver la celobiosa por calentamiento en el agua destilada. Enfriar y agregar los antibióticos. Esterilizar por filtración (membrana 0.22 µm). Agregar la solución 2 a la 1 enfriada a 48-55 °C, mezclar y distribuir en cajas Petri estériles.

Solución stock de colorantes 1000X

Azul de bromotimol	4.0
Rojo de cresol	4.0
Etanol al 95%	100 mL

PREPARACIÓN

Disolver los colorantes en etanol. Agregar 1 mL de esta solución a cada litro de agar mCPC.

5. Agar tripsosa cloruro T₁N₀, T₁N₁, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈ y T₁N₁₀

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Triptona o tripticasa	10.0
Cloruro de sodio	0, 10, 30, 60, 80 ó 100
Agar	20.0

pH final 7.2 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, para T₁N₀ no agregar el cloruro de sodio, para T₁N₁ usar 10 g de cloruro de sodio; así respectivamente. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

6. Base de caldo rojo de fenol

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.018

pH final 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, agregar 5 gramos del carbohidrato que se desea utilizar y distribuir en tubos. Esterilizar de 116-118 °C (no más de 12 libras de presión) durante 15 minutos.

7. Caldo base para descarboxilación de aminoácidos.

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	3.0
D-glucosa	1.0
Cloruro de sodio	10.0
Púrpura de bromocresol (1.6%)	1 mL

pH final 6.5 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, agregar 5 gramos de L-aminoácido, disolver y distribuir en tubos. Esterilizar a 121 °C durante 10 minutos.

8. Agar Hierro Lisina (LIA)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
D-glucosa	1.0

L-Lisina	10.0	
Citrato de hierro y amonio		0.5
Tiosulfato de sodio		0.04
Púrpura de Bromocresol		0.02
Cloruro de sodio	10.0	
Agar	13.5	

pH final 6.7 ± 0.1

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada. Mezclar bien y calentar, agitar frecuentemente hasta ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

9. Medio de Movilidad Indol Ornitina (MIO)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de levadura		3.0
Peptona de gelatina		10.0
Peptona de caseína		10.0
L-ornitina		5.0
D-glucosa		1.0
Púrpura de Bromocresol		0.02
Cloruro de sodio		10.0

pH final 6.8 ± 0.1

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada y calentar hasta disolver completamente. Se distribuye en tubos en proporciones de 5 mL y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

10. Base para gelatina nutritiva

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de carne		3.0
Peptona		5.0
Gelatina		120.0
Cloruro de sodio		10.0

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

11. Caldo Urea

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Fosfato monopotásico		0.091
Fosfato disódico		0.095
Extracto de levadura		0.1
Urea	20.0	
Rojo de fenol		0.01

pH final 6.8 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, pasar a través de un filtro bacteriológico estéril. Se distribuye en tubos estériles. También se puede esterilizar el medio en autoclave de 5 a 8 libras de presión durante 15 minutos.

12. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas		20.0
Cloruro de sodio		5.0
Lactosa		10.0
Sacarosa		10.0
Dextrosa		1.0
Sulfato de amonio férrico		0.2
Tiosulfato de sodio		0.2
Rojo de fenol		0.025
Agar		13.0

pH final 7.4 ± 0.1

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Se distribuye en tubos y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

13. Agar Citrato de Simmons

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Fosfato deshidrogenado de amonio		1.0
Fosfato dipotásico		1.0
Cloruro de sodio		5.0
Citrato de sodio		2.0
Sulfato de magnesio		0.2
Agar	15.0	
Azul de Bromotimol		0.08

pH final 6.9 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada. Mezclar bien y calentar, agitar frecuentemente hasta ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

14. Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM-VP)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	7.0
D-glucosa	5.0
Fosfato de potasio	5.0
Cloruro de sodio	10.0
pH final 6.9 ± 0.2	

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, mezclarlos perfectamente. Si es necesario calentar un poco hasta disolverlos, distribuir en tubos y esterilizar entre 118 a 121 °C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

15. Medio AKI

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona biotripticasa	15.0
Extracto de levadura	4.0
Cloruro de sodio	5.0
Bicarbonato de sodio	3.0
pH final 7.4	

PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en el agua destilada, distribuir en recipientes. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

16. Medio F-12

FORMULACIÓN

Medio F-12 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.

REACTIVOS

1. Reactivo de Kovac's

COMPOSICIÓN

p-dimetil-aminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico	75 mL
Ácido clorhídrico concentrado	25 mL

PREPARACIÓN

Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehido en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en un frasco ámbar.

2. Solución de alfa naftol

COMPOSICIÓN

Alfa naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

PREPARACIÓN

Disolver el alfa naftol en el alcohol etílico absoluto. Almacenar en frascos ámbar.

3. Solución de rojo de metilo

COMPOSICIÓN

Rojo de metilo	0.10 g
Alcohol etílico	300 mL
Agua destilada	500 mL

PREPARACIÓN

Disolver el rojo de metilo en el agua destilada y agregar el alcohol etílico. Almacenar en frascos ámbar.

4. Solución de Pucks

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESIONIZADA

Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.40
Bicarbonato de sodio	0.35
EDTA	0.336
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.

5. Solución reguladora de fosfatos (PBS)

FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESIONIZADA

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

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 °C/ 15 libras de presión.

6. Reactivo para prueba de oxidasa

COMPOSICIÓN

N, N, N, N-tetrametil-p-fenilendiamina	1 g
Agua destilada	100 mL

PREPARACIÓN

Disolver el N, N, N, N-tetrametil-p-fenilendiamina en el agua destilada. Conservar en un frasco ámbar entre 5-10 °C.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó
la comunicación de resultados que presentó:

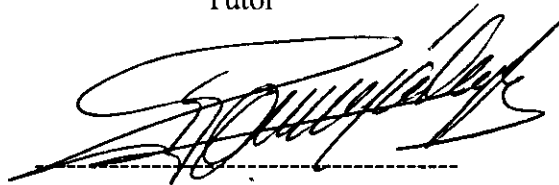
María Alejandra Reyes Mendoza

El día 27 de julio de 2004.



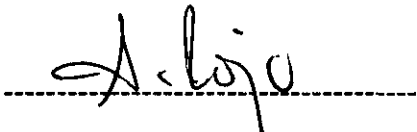
Dr. Carlos Vázquez Salinas

Tutor



Dr. Humberto González Márquez

Vocal



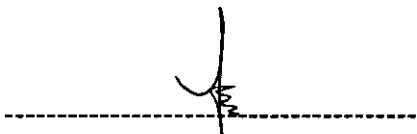
Dr. Arturo Rojo Domínguez

Vocal



Dr. José Mariano García Garibay

Secretario



Dr. Edmundo Bonilla González

Presidente