Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

INCIDENCIA DE Vibrio parahaemolyticus EN MOLUSCOS BIVALVOS CULTIVADOS EN BAJA CALIFORNIA

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

EDGAR GALVAN ANGELES

ENSENADA BAJA CFA. MEXICO DICIEMBRE DE 2004

TESIS DEFENDIDA POR

Edgar Galván Ángeles

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Director del Comité

Dr Alexei Fedórovish Licea Navarro
Miembro del Comité

Dr. Oscar Sosa Nishizaki
Miembro del Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Coordinador del programa de posgrado en Acuicultura y Biotecnología Marina

Dr. Federico Graef Ziehl
Director de Estudios de Posgrado

16 de Diciembre de 2004

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

INCIDENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EN MOLUSCOS BIVALVOS CULTIVADOS EN BAJA CALIFORNIA

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

EDGAR GALVÁN ÁNGELES

Ensenada, Baja California, México, Diciembre de 2004.

ABSTRACT of the thesis presented by **Edgar Galván Ángeles** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. December 2004.

INCIDENCE OF Vibrio parahaemolyticus IN BIVALVE MOLLUSKS HARVESTED IN BAJA CALIFORNIA

Vibrio parahaemolyticus is a Gram negative bacteria, ubiquitous in marine and stuarine environments. In recent years, some strains of *V. parahaemolyticus* have been related as a possible cause of gastroenteritis in humans, due to the consumption of raw or partially cooked shellfish.Two proteins secreted by *V. parahaemolyticus*, the Thermostable Direct Haemolysin (TDH) and the TDH-related haemolysin (TRH), are known as the main virulence factors. Thus, all virulent strains of *V. parahaemolyticus* has been found to be either positive for TDH, TRH or both.

In this work, we analized a total of 24 lots of bivalve mollusks harvested in 4 aquaculture farms located in the coastals of the Baja California peninsula. The objective was to evaluate the presence or absence of pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus.* The period of sampling was from February 4 and July 21 of 2004.

For the identification of *V. parahaemolyticus* strains, we used the amplification of the highly conserved fragment R72H by the Polymerase Chain Reaction (PCR). With this methodology, all identified strains were subjected for the amplification of the *tdh* and *trh* genes, which encoded the main virulence factors

A number of 34 strains were identified as *V. parahaemolyticus,* nevertheless, any of them were positive to haemolysins TDH or TRH. Therefore, shellfish harvested in the studied farms do not represent a risk for human health as long as *V. parahaemolyticus* is concerned.

Keywords: Vibrio parahaemolyticus, Thermostable Direct Haemolysin (TDH), TDH related-haemolysin (TRH). Bivalves mollusk.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por sus más grandes herencias en vida: su amor, su presencia y mi educación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito otorgada para mis estudios de posgrado y la realización de este proyecto.

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida por su invaluable apoyo y paciencia durante la dirección de este trabajo.

Al Dr Oscar Sosa Nishizaki y al Dr. Alexei Licea Navarro por su participación en el comité de tesis.

Al Dr. Bruno Gómez Gil del Centro de Investigación en Alimentación y desarrollo (CIAD) unidad Mazatlán y al Dr. Jean Michel Fournier del Centre Nacional de Reférence des Vibrions et du Choléra del Institut Pasteur de París Francia; por la donación de las cepas control utilizadas en este proyecto.

A Lupita Vargas por su apoyo y colaboración en el Laboratorio de Biotecnología Marina de CICESE.

A los representantes de las empresas acuícolas que proporcionaron los molucos bivalvos y siempre mostraron disposición e interés en la realización de este proyecto: Oc. Juan Carlos Lapuente (Acualap S.A. de C.V.), Sres. Francisco y Alfonso Aguirre (Agromarinos S.A.de C.V.), Sr. Philippe Danigo (Marimex S.A. de C.V.) y al Sr.Pedro Noriega (Sol Azul S.A. de C.V.).

Y muy especialmente a mi esposa Verónica Páez, mi compañera, socia y amiga, que sin su apoyo mis estudios de posgrado no hubieran sido posibles.

A todos mil gracias.

CONTENIDO

Página

I. INTRODUCCIÓN **1**
I.1.Antecedentes 1
I.2. Objetivos 2
I.2.1. Objetivo general 2
I.2.2. Objetivos particulares 2

II. GENERALIDADES **3**
II.1. Riesgos para la salud por consumo de moluscos bivalvos contaminado por bacterias 3
II.2. El género Vibrio 3
II.3.Características generales de Vibrio parahaemolyticus 4
II.3.1 Ecología de *Vibrio parahaemolyticus* 6
II.3.2 Genoma de *Vibrio parahaemolyticus* 7
II.3.3 Islas de patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* 9
II.4 Identificación de Vibrio parahaemolyticus 10
II.4.1 Patrón bioquímico 10
II.4.2 Tipificación serológica 12
II.5 Vibrio parahaemolyticus como causante de enfermedad en humanos 13
II.5.1 Epidemiología de la infección causada por *Vibrio parahaemolyticus* 13
II.5.2 Manifestación clínica de la enfermedad 15
II.5.3 Hemolisina Directa Termoestable (TDH) 15
II.5.4 Hemolisina Relacionada a la TDH (TRH) 19
II.6 Pruebas para la identificación molecular de Vibrio parahaemolyticus Basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR 20
II.6.1 Amplificación del fragmento R72H por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 21
II.6.2 Detección de la Hemolisina Directa Termoestable (TDH) y la Hemolisina Relacionada a TDH (TRH) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 23

III MATERIALES Y MÉTODOS **26**

III.1 Validación de metodología microbiológica por medio de infección de ostiones con Vibrio parahaemolyticus 26
III.1.1 Efecto del enriquecimiento con agua peptonada en el aislamiento de *V. parahaemolyticus* en ostiones artificialmente infectados 26
III.1.2 Efecto de la temperatura 28
III.1.3 Efecto del tiempo de incubación 29

CONTENIDO (continuación)

	Página
III.2 Protocolo de detección de V. parahaemolyticus en moluscos bivalvos	30
III.2.1 Procesamiento de las muestras	33
III.2.2 Extracción de ADN Bacteriano para análisis por PCR	35
III.3 Detección de la secuencia específica R72H de Vibrio Parahaemolyticus	36
III.4 Detección de las secuencias de las hemolisinas TDH Y TRH	37
IV RESULTADOS	**39**
V DISCUSIÓN	**45**
APÉNDICE	**53**

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Célula *swimmer*.	5
2	Célula *swarmer*	5
3	Representación circular del genoma de *Vibrio parahaemolyticus.*	8
4	Efecto del enriquecimiento con agua peptonada alcalina (APA) en el aislamiento de cepas de *V.parahaemolyticus* en ostiones artificialmente infectados	28
5	Gráfica que muestra el efecto de la temperatura de incubación en el aislamiento de cepas de *V. parahaemolyticus* en ostiones artificialmente infectados	29
6	Gráfica que muestra que a 24 horas de incubación, se recuperó la mayor cantidad de cepas que no fermentaban sacarosa.	30
7	Ubicación geográfica de las granjas acuícolas participantes en el proyecto	31
8	Diagrama de flujo para asilamiento e identificación bioquímica de cepas sospechosas de ser *Vibrio parahaemolyticus.*	34
9	Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por mes de muestreo.	41
10	Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por granja acuícola	42
11	Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por granja acuícola y por mes.	42
12	Gel de agarosa con amplificados del fragmento R72H de *V. parahaemolyticus* por PCR.	43
13	Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por su amplificación del fragmento R72H.	43
14	Gel de agarosa con amplificados de los genes *tdh* y *trh* de *V. parahaemolyticus* por PCR.	44

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Debido a que los moluscos bivalvos como ostiones, mejillones y almejas, se alimentan mediante la filtración del agua que los rodea, la concentración de microorganismos en su interior es elevada. La seguridad microbiológica de los bivalvos como alimento humano, depende directamente de la calidad del agua en la que son cultivados. Su cultivo en aguas que han sido contaminadas con desechos de origen animal o humano, han sido la base de muchos brotes infecciosos de enfermedades entéricas y envenenamientos con alimentos. La seguridad de la calidad de los alimentos, también depende de la contaminación de estos por especies bacterianas que se multipliquen en niveles infecciosos durante operaciones de almacenamiento y distribución.

En los últimos años, algunas cepas de *V. parahaemolyticus* han sido relacionadas como causantes de gastroenteritis en humanos, asociadas al consumo de moluscos crudos o mal cocidos. Dos proteínas secretadas por *V. parahaemolyticus*: la hemolisina directa termoestable (TDH) y la hemolisina relacionada a TDH (TRH) son reconocidas como los principales factores de virulencia, de modo que las cepas de *V. parahaemolyticus* patógenas para humanos son positivas para TDH, TRH o ambas.

Con este trabajo se pretende dejar evidencia sobre la presencia o ausencia de cepas toxigénicas de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados en costas de la península de Baja California, los cuales son productos de alto valor comercial en el mercado interno y de exportación.

I.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Determinar la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados en Baja California.

1.2.2 Objetivos particulares

- Evaluar la presencia o ausencia de los genes de las hemolisinas TDH y TRH en las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de moluscos bivalvos, intercalibrando nuestra metodología para la identificación molecular de esta bacteria, con las utilizadas en el Instituto Pasteur de París, Francia.

- Evaluar la presencia o ausencia de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados en Baja California y establecer si su consumo representa un riesgo para la salud.

- Prestar un servicio a los acuicultores de Baja California, utilizando los resultados de este trabajo para demostrar la calidad bacteriológica de su producto y que esto sea de utilidad para su exportación.

II. GENERALIDADES

II.1 Riesgos para la salud por consumo de moluscos bivalvos contaminados por bacterias

Cuando los moluscos bivalvos cultivados no son microbiológicamente limpios, los consumidores de estos alimentos de origen marino mal cocidos o crudos se encuentran en riesgo de contraer infecciones ocasionadas por diversas bacterias, entre ellas las pertenecientes al género *Vibrio,* donde algunas especies son las principales causantes de gastroenteritis asociada al consumo de alimentos de origen marino en el mundo. Además de los moluscos bivalvos, otros tipos de mariscos como el camarón y cangrejos pueden estar involucrados como causantes de enfermedad por presentar altas concentraciones de bacterias patógenas pertenecientes al género *Vibrio* (DePaola, A. et al 2003).

II.2 El género Vibrio

Los miembros del género *Vibrio* son bacterias acuáticas que se encuentran en una amplia variedad de sitios como el océano, estuarios, lagos y estanques. *Vibrio spp.* es un elemento natural en un medio marino equilibrado, y su asociación con organismos proporciona efectos benéficos en la retención de sal como en los copépodos y otros organismos que juegan un papel vital en la cadena alimenticia.

La concentración de los *Vibrio* varía directamente con la temperatura, alcanzando altas concentraciones en aguas con temperaturas entre los 17 a 35°C y que contengan de 5 a

25‰ de salinidad. Los *Vibrios* halofílicos requieren ión sodio para su crecimiento y pueden alcanzar concentraciones muy altas en aguas con salinidad de 5 a 8 ‰ (Janda et al. 1988).

II.3 Características generales de *Vibrio parahaemolyticus.*

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria Gram negativa, que vista al microscopio aparece como bacilo recto y en ocasiones curvo con extremos redondeados, usualmente se presenta como célula única pero ocasionalmente forma cadenas. La forma de vida libre de *V. parahaemolyticus*, la célula *swimmer* (Figura 1), está bien adaptada para la locomoción en ambientes líquidos. La bacteria es eficientemente impulsada por un flagelo polar único. Como un organelo propulsivo, el flagelo polar permite a la bacteria aproximarse a las superficies y tal vez superar las interacciones electrostáticas negativas. El crecimiento en superficies o en ambientes viscosos induce la diferenciación a la célula *swarmer* (Figura 2), la septación cesa y la célula se alarga, usualmente hasta 30μm en longitud. La inducción de un segundo sistema de motilidad, el sistema lateral, conduce a la elaboración de numerosos flagelos en arreglos perítricos. La célula *swarmer* está adaptada para el movimiento en superficies o a través de ambientes altamente viscosos. El flagelo polar funciona pobremente en un medio de alta viscosidad mientras que el flagelo lateral propela eficientemente a la bacteria en este ambiente. Los flagelos laterales son completamente distintos del flagelo polar (McCarter L. 1999).

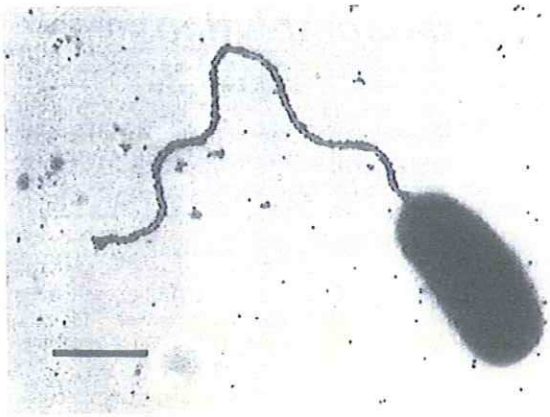

Figura 1. Célula *swimmer*.

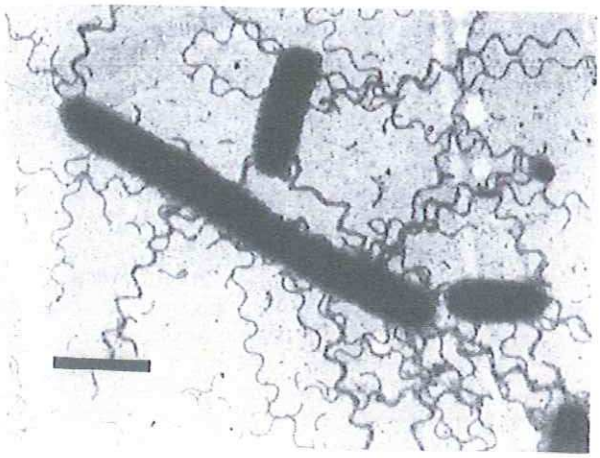

Figura 2. Célula *swarmer*

II.3.1 Ecología de *Vibrio parahaemolyticus*

El hábitat común de *V. parahaemolyticus* son ambientes marinos y estuarinos, puede existir planctónicamente o adherida a superficies sumergidas inertes o animadas, incluyendo materia suspendida y organismos marinos. En la mayoría de las áreas donde se conoce la presencia de *V. parahaemolyticus*, la incidencia de este organismo sigue un ciclo estacional, con altas concentraciones en verano y otoño y menores concentraciones en invierno (Joseph et al 1983). En países tropicales, el ciclo estacional de *V. parahaemolyticus* está correlacionado con estaciones lluviosas o secas. En Vietnam, las concentraciones más altas ocurren en los meses lluviosos de marzo y abril, las concentraciones más bajas ocurren en meses secos de diciembre a febrero (Chowdhury et al. 2004).

V. parahaemolyticus crece dentro de un intervalo de temperatura típico de los mesófilos, con una temperatura mínima de crecimiento de entre 9 y 10° C, una temperatura máxima de crecimiento de aproximadamente 44° C y una óptima entre 35 y 37° C. *V. parahaemolyticus* generalmente es aislado de aguas cercanas a la costa o en estuarios y es raramente aislado en regiones pelágicas de los océanos Se ha observado que la incidencia de *V. parahaemolyticus* en agua marina disminuye con la profundidad de la costa, además se han recuperado pocas bacterias de sedimentos profundos Además de la temperatura y de la salinidad, la variación estacional de *V. parahaemolyticus* también puede estar influenciada por sus interacciones con el plancton y con organismos superiores (Joseph et al 1983).

II.3.2 Genoma de *V. parahaemolyticus*

El genoma de *V. parahaemolyticus* consta de 4832 secuencias codificantes en dos cromosomas, el cromosoma 1 está compuesto por 3´288,558 bp y el cromosoma 2 de 1´877,212 bp, con un contenido de G+C de 45.4% cada uno (Figura 3), La mayoría de los genes esenciales requeridos para el crecimiento y viabilidad y los genes para todas las proteinas ribosomales se encuentran en el cromosoma 1. Varios genes involucrados en rutas metabólicas esenciales como la glucólisis están localizadas solo en el cromosoma 2, lo que sugiere que el cromosoma 2 también es esencial para el crecimiento y viabilidad. El cromosoma 2 parece contener genes más relacionados a la regulación transcripcional y transporte de varios sustratos que el cromosoma 1, estos genes tiene un papel en la respuesta a cambios ambientales, sugiriendo que el cromosoma 2 juega un papel en el cambio ambiental. Los genes para el flagelo polar (constitutivamente expresado) se encuentran en el cromosoma 1, mientras que los genes para el flagelo lateral se encuentran en en el cromosoma 2, de nuevo sugiriendo que el cromosoma 2 contiene los genes para la adaptación bacteriana (Makino et al. 2003).

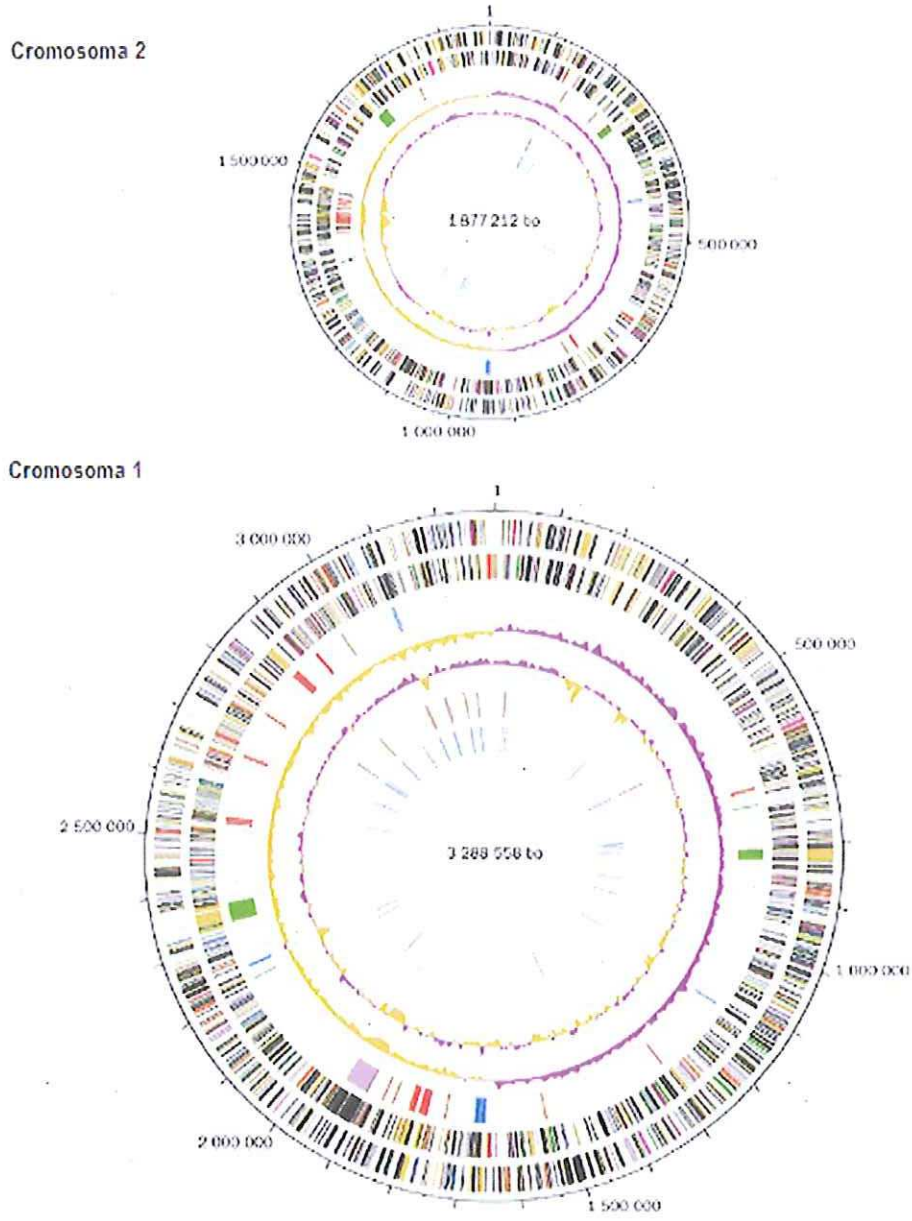

Figura 3. Representación circular del genoma de *Vibrio parahaemolyticus.*

De fuera hacia adentro: el primer y segundo circulos muestran regiones codificantes de proteínas en las hebras (+) y (-). Los colores corresponden a las principales clases de genes; Negro denota proteínas hipotéticas incluyendo proteinas conservadas y no conservadas en otras bacterias. El tercer círculo muestra genes relacionados con transposones (negro), fagos (azul), super integrón (rosa), flagelo (verde) y patogénesis incluyendo pili y adhesisnas (rojo). El cuarto círculo muestra la G-C. el quinto círculo muestra el porcentaje de G+C en relación a la G+C media para el genoma. El sexto y séptimo círculo son rRNA y tRNA respectivamente.

II.3.3 Islas de patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus*

Se identificaron las islas de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* en el cromosoma 2, la cual consta de 80 Kb. El contenido G+C de la región es de 39.8%, obviamente menor al porcentaje G+C del genoma completo, lo cual es una característica de las islas de patogenicidad. La isla incluye varios genes relacionados a la virulencia como los homólogos del factor necrosante citotóxico de *Escherichia coli* y la exoenzima T de *Pseudomonas*. Además se ha demostrado la presencia de los genes de la hemolisina directa termoestable (TDH) y el gen de la hemolisina relacionada a la TDH (TRH) dependiendo de la cepa de *V. parahaemolyticus* (Makino et al. 2003).

Dentro de la isla de patogenicidad en el cromosoma 2 de *V. parahaemolyticus*, se identificó un grupo de genes para el sistema de secreción tipo III (TTSS). Los patógenos bacterianos que causan enfermedades por interacciones íntimas con células eucariotas, como *Salmonella sp, Shigella sp, Yersinia sp* y patógenos de plantas, tienen este sistema de secreción. Se ha encontrado que las cepas de *V. parahaemolyticus* productoras de TDH (fenómeno Kanagawa positivo) poseen exclusivamente los genes para TTSS, lo que sugiere que la presencia de TTSS está fuertemente relacionada a la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* en seres humanos. Algunos de los productos codificados en la isla de patogenicidad son homólogos a las proteinas efectoras de otros patógenos, como YopP de *Yersinia sp*, así que la isla de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* puede también contener proteínas efectoras secretadas por el TTSS (Makino et al. 2003).

Al menos otros 50 genes posiblemente involucrados en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* fueron identificados en el genoma. Estos incluyen genes para la adherencia bacteriana y formación de biofilmes, como los genes para la biosíntesis de diversos pilis y los genes *tad*, y para varias toxinas homólogas incluyendo una toxina RTX. Otro grupo de genes para TTSS (al menos 30) fueron identificados en la posición 1.77 – 1.81 Mb a partir del origen de replicación del cromosoma 1 de *V. parahaemolyticus*. Estos genes se encuentran tanto en cepas patógenas y no patógenas de *V. parahaemolyticus*, a diferencia del TTSS localizado en la isla de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* en el cromosoma 2, la región TTSS en el cromosoma 1 posee un porcentaje G+C similar al del resto del genoma (Makino et al. 2003, Tagomori et al. 2002).

II.4 Identificación de *Vibrio parahaemolyticus*

II.4.1 Patrón bioquímico

V. parahaemolyticus, como otros vibrios, es un anaerobio facultativo, posee tanto metabolismo oxidativo como fermentativo (Tabla I). Produce catalasa y citocromo oxidasa. *V. parahaemolyticus* fermenta la glucosa sin la producción de gas y no produce acetoina por lo que es Voges-Proskauer negativo, fermenta la galactosa, levulosa, maltosa, manitol, manosa y ribosa; pero no fermenta lactosa, melizitosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sorbosa, sorbitol, sacarosa, xilosa, adonitol, dulcitol, eritrol e inositol. Variaciones entre cepas pueden observarse en la fermentación de arabinosa, celobiosa y melibiosa. *V. parahaemolyticus* es positivo para la producción de indol, y posee lisina y orinitina

descarboxilasas, reduce nitritos y degrada gelatina, quitina, almidón, caseína y lecitina. Generalmente es negativo en la actividad de la arginina dehidrolasa (Joseph et al. 1983),

Tabla I. Características bioquímicas mínimas para la identificación de *V. parahaemolyticus.*

Prueba	Resultado
Bacilo Gram negativo.	+
Oxidasa.	+
Ácido a partir de glucosa bajo una capa de aceite mineral.	+
Gas a partir de glucosa.	-
Ácido a partir de manitol.	+
Ácido a partir de sacarosa.	-
Acetilmetilcarbinol	-
Sulfúro de hidrógeno	-
L-lisina descarboxilasa	+
L-ornitina descarboxilasa	+
L-arginina dehidrolasa	-
Crecimiento en caldo triptona al 1%	-
Crecimiento en caldo triptona al 1% con 8% de NaCl	+
Crecimiento en caldo triptona al 1% con 10% de NaCl	-
Crecimiento a 42°C	+

La identificación de *Vibrio parahaemolyticus* mediante el cultivo en medio sólido, es realizada en el medio selectivo TCBS (agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares). Este medio inhibe a la mayor parte de otras especies bacterianas debido a la presencia de sales biliares, citrato de sodio y un pH alcalino de 8.6. Una buena diferenciación de especies de *Vibrio* es proporcionada por la reacción de la fermentación de la sacarosa contenida en el medio TCBS. *V. cholerae* y *V. alginolyticus* fermentan la sacarosa, produciendo colonias amarillas, indicada por el cambio de color en el azul de bromotimol y azul de timol que están incluidos en el medio. *V. parahaemolyticus* generalmente no fermenta la sacarosa, por lo que aparece como una colonia azul-verde. Su identificación es completada con pruebas bioquímicas (Joseph et al. 1983. Daniels et al. 2000).

II.4.2 Tipificación serológica

La tipificación serológica de *V. parahaemolyticus* (Tabla II) está basada en dos estructuras antigénicas: el antígeno somático O y el antígeno polisacárido capsular K. Los antígenos H o flajelares son comunes a todas las cepas de *V. parahaemolyticus* y por eso no han sido utilizados para la tipificación.

Existen 59 antígenos K y 12 antígenos O. Los antígenos K son substancias que contienen considerables cantidades de hexosamina y grupos acetilo, se han descubierto numerosos componentes de azúcares que varían en porcentajes entre los antígenos K descubiertos. Los antígenos O son lipopolisacáridos que contienen glucosa, galactosa, glucosalina, heptosa, fósforo, ácidos grasos esterificados y compuestos nitrogenados. La predominancia del serotipo varía dentro de las regiones geográficas año con año así como entre las áreas mismas. Hasta el momento no se ha demostrado una relación entre una característica en particular y el serotipo de una cepa de *V. parahaemolyticus* (Joseph et al. 1983).

Tabla II Esquema antigénico de *Vibrio parahaemolyticus*

Antígenos O	Antígenos K
1	1,25,26,32,38,41,56,58
2	3,28
3	4,5,6,7,29,30,31,33,37,43,45,48,54,57,59
4	4,8,9,10,11,12,13,34,42,49,53,55
5	15,17,30,47
6	18,46
7	19
8	20,21,22,39
9	23,44
10	24
11	36,40,50,51
12	52

II.5 El género *Vibrio* como causante de enfermedad en humanos.

El género *Vibrio* hasta hace poco tiempo ha sido sinónimo de la enfermedad causada por el grupo 01 de *Vibrio cholerae*, debido a la asociación única de esta especie con las epidemias y pandemias de cólera. En la primera edición de el Manual de Microbiologia Clínica (1970) y en la octava edición del manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (1974), solo dos especies de *Vibrio* eran reconocidos como patógenos humanos: *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* biotipos 1 y 2 (*V. alginolyticus).* Debido principalmente a los avances realizados en el área de taxonomía del género *Vibrio*, actualmente se conocen 11 especies que han sido aisladas de muestras clínicas: *V. alginolyticus, V. cholerae, V. cincinnatiensis, V. damselaa, V. fluvialis, V. furnissii, V. hollisae, V. metschnikovii, V. fnimicus, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* (Janda et al 1988).

II.5.1 Epidemiología de la infección causada por *Vibrio parahaemolyticus.*

Vibrio parahaemolyticus ha sido la especie del género *Vibrio* más comúnmente aislada en humanos, y es el principal causante de gastroenteritis asociada al consumo de alimentos de origen marino en el mundo. *V. parahaemolyticus* es una bacteria cosmopolita, primero fue identificada en Japón y posteriormente se han reportado aislamientos en brotes infecciosos en otros países del continente asiático como Corea, Tailandia, Indonesia, Vietnam, China, India, Irán, Rusia y Australia en Oceanía. En Europa ha sido reportada en Holanda, Gran Bretaña, Dinamarca, España, Francia, Italia, Escocia y en los mares Báltico, Negro, Mediterráneo y del Norte. En África existen reportes de Togo y Madagascar; en

América en Canadá, Estados Unidos, Brasil, Chile y Panamá. Hasta el momento no existen estudios que relacionen la presencia de *V. parahaemolyticus* con brotes infecciosos en México (Mead et al. 1999).

Un clón perteneciente al serotipo O3:K6 ha emergido recientemente como responsable de las infecciones pandémicas en muchas partes de Asia, incluyendo Japón, Taiwán y los Estados Unidos desde 1995. Diarreas causadas por un nuevo serotipo, O4:K68, han sido notificadas entre viajeros internacionales en India, Bangladesh y Japón desde 1997. La cepa O1:K intipificable (O1:KUT) ha sido aislada particularmente de pacientes de Bangladesh y la India en 1997 y 1998. Se cree que todas estas cepas tienen un origen clonal común (Hin-chung 2000, Chowdhury et al. 2000).

Entre 1973 y 1998, los CDC (Centers for Disease Control) recibieron reportes de 40 brotes de infecciones por *V. parahaemolyticus* en 15 estados de E.E.U.U., estos brotes resultaron en 1064 casos. La mayoría de los brotes ocurrieron en los meses cálidos. Doce (30%) de los 40 brotes por *V. parahaemolyticus* fueron reportados entre 1997 y 1998 lo que sugiere un resurgimiento del patógeno (Daniels et al. 2000).

Entre 1988 y 1997, un total de 345 casos de infecciones por *V. parahaemolyticus* fueron reportados a los CDC en los Estados Unidos, de los 345 casos, 202 (59%) tuvieron gastroenteritis, 118 (34%) tuvieron heridas infectadas y 17 (5%) tuvieron septicemia. Otras ocho infecciones fueron reportadas, incluyendo infecciones oculares, óticas, de vías urinarias y peritoneales. Entre 88 pacientes con gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* con

historia alimenticia conocida, 77 (88%) reportaron haber comido ostras crudas dentro de la semana en que se presentó la enfermedad. El síntoma más común fue la diarrea, aunque solo el 30% de los casos presentó diarrea sanguinolenta. Entre los 11 pacientes con septicemia e historia alimenticia conocida, 10 (91%) consumieron moluscos crudos. De los casos reportados, 12 pacientes fallecieron como consecuencia de la infección, 10 (83%) tenían una condición médica preexistente: alcoholismo, enfermedad hepática, enfermedad renal, enfermedad vascular y diabetes. Todos los síndromes de infecciones por *V. parahaemolyticus* fueron más comunes en los meses cálidos (Daniels et al. 2000).

II.5.2 Manifestación clínica de la enfermedad y mecanismo de patogenicidad.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *V. parahaemolyticus* incluyen diarrea, cólicos abdominales, nausea, vómito, diarrea sanguinolenta, dolor de cabeza, fiebre y celulitis localizada, con un periodo de incubación de 4 a 96 horas. La diarrea generalmente es líquida de color café y sin presencia de leucocitos ni sangre. En casos más severos, la diarrea es mucoide y sanguinolenta y se presenta una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares (Morris J.G. 2003)

II.5.3 Hemolisina Directa Termoestable

En Octubre 20 y 21 de 1950, ocurrió un brote por envenenamiento alimenticio en los suburbios de Osaka, Japón. De 272 pacientes que sufrieron de gastroenteritis aguda, 20 murieron. Los síntomas que estos pacientes presentaron fueron dolor abdominal agudo, vómito y diarrea, con heces acuosas y en algunos casos sanguinolentas. La bacteria

causante del brote fué identificada y posteriormente nombrada como *Vibrio parahaemolyticus* (Joseph et al. 1983).

En estudios epidemiológicos posteriores, se descubrió que las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas del brote de 1950 producían una β-hemólisis en un agar que contiene sangre de conejo y es especialmente preparado (agar Wagatsuma), mientras que cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de alimentos de origen marino no eran hemolíticas. A la hemólisis producida por *V. parahaemolyticus* en agar Wagatsuma se le dio el nombre de fenómeno Kanagawa positivo, de este modo se aceptó que el fenómeno Kanagawa está relacionado a la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* (Takeda Y. 1982).

Desde que se estableció la relación entre el fenómeno Kanagawa positivo y la enteropatogenicidad en humanos de cepas de *V. parahaemolyticus*, se intentó aislar a la sustancia causante de la hemólisis. Fue hasta 1971 que se logró aislar una proteina termoestable a partir de un filtrado de cepas de *V. parahaemolyticus* fenómeno Kanagawa positivo y supuso que esta era la hemolisina responsable del fenómeno. Se acuñó el nombre de Hemolisina Directa Termoestable (TDH, por sus siglas en inglés), ya que esta hemolisina no es inactivada cuando es sometida a calentamiento de 100°C por 10 minutos ni requiere la adición de sustancias para causar hemólisis (Joseph et al. 1983).

La TDH es una proteína libre de carbohidratos y de lípidos, con un peso molecular de 42,000 Da, está compuesta de 2 subunidades de aproximadamente 21,000 Da cada una. La TDH purificada posee varias actividades biológicas como actividad hemolítica, actividad

citotóxica en varias células cultivadas y toxicidad letal en ratas y ratones (Takeda, Y. 1982).

El mecanismo de la hemólisis inducida por la TDH involucra la unión de la hemolisina al eritrocito actuando como porina (formadora de poros) en la membrana plasmática del eritrocito y permitiendo la entrada de líquido extracelular, provocando un desequilibrio osmótico y como consecuencia la destrucción del eritrocito o hemólisis. Existen datos de que la TDH actúa de la misma forma tanto en las membranas plasmáticas de eritrocitos como en las de enterocitos y fibroblastos de diferentes células animales.

Es sabido que la TDH es capaz de inducir la secreción de iones cloruro en monocapas de células epiteliales de colon humano (Caco2), las cuales son un modelo aceptado del epitelio intestinal humano. Este efecto directo en la fisiología epitelial es mediado por iones calcio. Existe evidencia electrofisiológica, bioquímica y morfológica de que a altas concentraciones la TDH produce un efecto citotóxico en las células epiteliales del intestino, Aunque el mecanismo de acción preciso de la TDH en la producción de diarrea aún no ha sido establecido, la evidencia disponible permite proponer tres pasos para explicarlo. El primer paso consiste en la unión de la toxina a un receptor específico (aún desconocido) que se encuentra en la porción apical de las células epiteliales del intestino. En el segundo paso, la unión de la TDH a su receptor provoca la entrada inespecífica de cationes debido a la formación de poros en la membrana celular. A pesar de que la secuencia de aminoácidos de la TDH no posee homología significativa con las toxinas formadoras de poros conocidas, la evidencia demuestra que la TDH posee la capacidad

innata de formar poros. También se ha demostrado que el incremento en la concentración del calcio intracelular tanto por el influjo proveniente del exterior como el liberado desde las reservas interiores causa la activación de la proteincinasa C (PKC). Como consecuencia de la activación de la PKC y del incremento de la concentración de calcio intracelular, algunos de los canales de cloro dependientes de la concentración de iones calcio intracelular (se desconoce cual de los varios sistemas de canales que poseen las células intestinales) son activados, provocando una secreción de estos iones por las células epiteliales intestinales, causando la secreción de fluido o diarrea (Takahashi et al. 2000a, Hardy S.P. et al. 2004)

Se han reportado casos, en que una infección gastrointestinal causada por *V. parahaemolyticus*, ha generado una septicemia. El hecho de que la septicemia se presente, sugiere que *V. parahaemolyticus* puede invadir el epitelio intestinal (Akeda Y. et al. 1997). En el intestino se encuentran altas concentraciones de ácidos biliares que incrementan la producción de TDH. Cuando la TDH se encuentra en grandes cantidades, esta puede jugar un papel importante en la destrucción de la barrera celular y permitir que *V. parahaemolyticus* penetre hasta el torrente sanguíneo estableciendo una infección generalizada en el íleo, y diseminándose hacia el hígado, bazo y páncreas. Esto refuerza la idea de que la TDH es un factor importante en la patogénesis de *V. parahaemolyticus* en humanos, aunque esto no excluye la posibilidad de que otros factores estén involucrados (Raimondi, F. et al 2000).

II.5.4 Hemolisina Relacionada a la TDH (TRH)

En 1985, se presentó un brote de gastroenteritis en la república de Maldivas ubicada en el sudeste asiático, de dónde se aislaron cepas de *V. parahaemolyticus* que eran negativas al fenómeno Kanagawa (KP-) (Hondo et al. 1987). Estas cepas no poseían el gen *tdh*, pero si producían una hemolisina inmunológicamente similar a la TDH, pero con propiedades fisicoquímicas y hemolíticas diferentes. Esta hemolisina fué llamada Hemolisina Relacionada a la TDH (TRH por sus siglas en inglés) (Honda, T. et al. 1988).

En un estudio posterior, se encontró que las cepas aisladas de Maldivas poseían secuencias homólogas pero no idénticas a las del gen *tdh*. La homología fue estimada en más de 72.5% pero menor al 80% en base a las condiciones de hibridación. Se supuso que la secuencia homóloga se trataba del gen *trh* La comparación de los mapas de restricción de los fragmentos de ADN que contienen los genes *trh* y copias del gen *tdh* indican que las secuencias de nucleótidos que rodean el gen *trh* y aquellas que rodean las copias de los genes *tdh* no son similares. Esto sugiere que el gen *trh* no fue generado por una simple mutación del gen *tdh* ni viceversa (Nishibuchi et al. 1985, Nishibuchi et al. 1989).

El peso molecular de la TRH es de 48 kDa y está compuesta de 2 subunidades de aproximadamente 23kDa cada una de ellas. El punto isoeléctrico de la TRH es de 4.6. La TRH es inmunológicamente similar a la TDH ya que se presenta reacción cruzada con antisuero anti-TDH con la TRH purificada como antisuero anti-TRH con TDH purificada en pruebas como la inmunodifusión en gel Ouchterlony como en inhibición de la hemaglutinación. La TRH produce hemólisis de una forma semejante a la TDH en

eritrocitos de algunos animales. Al igual que la TDH, la TRH no produce hemólisis en eritrocitos de caballo. La TRH a diferencia de la TDH, pierde su actividad hemolítica si es sometida a 60°C o más durante 10 minutos (Yoh, M. et al. 1992).

Está demostrado que la TRH induce en células del epitelio intestinal humano (Caco2), la secreción de iones cloruro a partir del incremento de la concentración del ión calcio intracelular de forma similar a la TDH (Takahashi et al. 2000b).

II.6 Pruebas para la identificación molecular de *Vibrio parahaemolyticus* basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Anteriormente, la identificación de un microorganismo patógeno requeria de técnicas microbiológicas laboriosas, consumidoras de tiempo y en algunas ocasiones incapaces de diferenciar al causante de la enfermedad. Con el advenimiento de la biología molecular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado ser una metodología que ofrece rapidez y especificidad en la detección de patógenos.

Se han desarrollado diversos métodos moleculares para la detección de cepas de *V. parahaemolyticus* en productos marinos utilizando como blanco a genes diferentes (Lin et al 1993, Bej et al. 1995, Venkateswaran 1998). Sin embargo posteriormente se reportó que algunas cepas de *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* generaban amplicones no específicos (Kim et al 1999, Robert-Pillot et al. 2002).

El fragmento de ADN R72H está altamente conservado en cepas de *V. parahaemolyticus* y también puede ser usado como marcador específico para la especie (Lee et al 1995), aunque su función aún es desconocida, (Robert-Pillot et al. 2002).

II.6.1 Amplificación del fragmento R72H por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Debido a que la mayoría de las cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* no poseen los genes de las hemolisinas TDH o TRH que si son encontradas en la mayoría de las muestras clínicas, existía la necesidad de una prueba específica que identificara *V. parahaemolyticus* sin importar su origen. Con este objetivo, Lee y colaboradores desarrollaron una sonda (VP5) de ADN a partir del conocimiento de la secuencia de 1,275 bp del gen de la TDH (Nishibuchi et al. 1985). Esta sonda hibridó específicamente con diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* tanto de origen clínico como de origen ambiental, y no hibridó con cepas diferentes a *V. parahaemolyticus* (Lee et al. 1992).

En un estudio posterior, se identificó y aisló el fragmento de ADN cromosomal donde la sonda VP5 hibridaba, con su clonación se obtuvo un fragmento de 0.76 Kb al que le designó pR72H. Este fragmento demostró estar altamente conservado entre las cepas de *V. parahaemolyticus* (Lee et al. 1995a).

Con la secuenciación del fragmento pR72H, no se encontraron sitios de inicio traduccional, posibles marcos de lectura abiertos, ni la secuencia consenso Shine-Dalgarno. Análisis de las secuencias que se encuentran a ambos lados del fragmento R72H muestran que este

fragmento está localizado después de un operón de rARN y está compuesto de una región no codificante y de un gen de fosfatidilserina sintetasa. No se encontró homología significativa de pR72H y los genes de hemolisinas *dvh*, *tdh*, *trh*, o *tlh;* así como para genes 5S o 16S rARN de *V. parahaemolyticus* (Lee et al. 1995a, Wu et al. 1998).

La secuenciación del fragmento pR72H permitió, posteriormente el diseño y síntesis de iniciadores para ser utilizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las secuencias diseñadas fueron: 5'TGCGAATTCGATAGGGTGTTAACC-3' (designada VP33) y 5'-CGAATCCTTGAACATACGCAGC-3' (designada VP32). Los valores de *Tm* de los iniciadores fueron 71.3 y 69.3 °C, respectivamente. El producto de amplificación esperado era de 387 bp. (Lee et al. 1995b).

En un estudio posterior, se demostró que además de la amplificación del fragmento pR72H de 387 bp, en algunas cepas de *V. parahaemolyticus* se amplifica un fragmento de 320 bp (figura 4), este fragmento más pequeño muestra en su secuencia una homología de 81 % en comparación con el amplificado de 387 bp, posiblemente debido a pérdida de un pequeño fragmento o a un rearreglo de ADN. Sin embargo, la amplificación del fragmento 387 ó 320 bp debe considerarse como específico de *V. parahaemolyticus* (Robert-Pillot et al. 2002).

II.6.2 Detección de la Hemolisina Directa Termoestable (TDH) y la Hemolisina Relacionada a TDH (TRH) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El efecto patógeno en humanos que sigue a la infección por *V. parahaemolyticus* ha sido asociado con aquellas cepas que producen la Hemolisina Directa Termoestable (TDH) o la Hemolisina Relacionada a la TDH (TRH).

Seguido al aislamiento de una cepa de *V. parahaemolyticus*, la producción de TDH por esta cepa ha sido identificada por la hemólisis β en agar sangre Wagatsuma y es referida como fenómeno Kanagawa positivo. Sin embargo, la prueba del fenómeno Kanagawa consume mucho tiempo, el medio de cultivo es laborioso para preparar y la prueba puede no ser determinante debido a que varias cepas aisladas de muestras clínicas son Kanagawa negativos y no producen TDH (Takeda 1982).

De igual forma, el empleo de métodos inmunológicos, han demostrado ser menos laboriosos y altamente sensibles en detectar la TDH, pero fallan en identificar cepas clínicas que carecen de la TDH. Además, actualmente no existe una prueba *in vitro* que demuestre la producción de TRH en *V. parahaemolyticus* (Honda et al. 1980, Honda et al. 1982, Bej et al. 1999).

Con el paso del tiempo se han desarrollado sondas de ADN y de oligonucleótidos dirigidas específicamente a los genes *tdh* y *trh* demostrando una fuerte correlación entre cepas clínicas y la presencia de cualquiera de estos genes, sugiriendo que tanto el gen *tdh* o el *trh*

son factores de virulencia en *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, se ha demostrado que estas sondas reaccionan positivamente con cepas de *V. parahaemolyticus* y con cepas de otros Vibrios como *V. hollisae*, *V. mimicus*, y *V. cholerae* no-O1 (Tada et al. 1992, Lee et al. 1995a).

En estudios posteriores basados en la amplificación por PCR, un número de cepas virulentas fueron *tdh* positivo pero *trh* negativo, mientras algunos mostraron amplificación para trh pero no para *tdh* (Lee y Pan, 1993).

La hibridación ADN-ADN, usando sondas específicas para *tdh* o *trh* (Nishibuchi et al.., 1985; Nishibuchi et al. 1986), o el uso de polimorfismo de grandes fragmentos de restricción (RFLP) de los genes de *tdh y trh* (Marshall S. et al. 1999) produjeron resultados comparables a los del estudio de la PCR. Además, la hibridación ADN-ADN usando al gen *tdh* como sonda mostró hibridación positiva con el gen semejante a *tdh* en cepas de vibrios no *parahaemolyticus* como *V. hollisae*, *V. mimicus y V. cholerae* no-O1 (Nishibuchi et al.1985, Nishibuchi et al. 1986)

Por lo tanto, el uso del gen *tdh* exclusivamente como sonda para hibridación ADN-ADN no es confiable para la detección específica de *V.parahaemolyticus*. En estudios separados, la metodología de amplificación por PCR fue usada para detectar *V.parahaemolyticus* al identificar solamente un fragmento del gen *tdh* (Lee y Pan, 1993)

La necesidad de identificar cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* en un solo paso, llevó a la optimización de un procedimiento basado en la amplificación por PCR de los genes *tdh, trh* o ambos (Bej et al. 1999).

Para la realización de esta metodología se diseñaron un par de iniciadores para amplificar un fragmento del gen *tdh*: L-*tdh*: 5′-GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC-3′ y R-*tdh*: 5′-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC-3′ con valores de *Tm* de 48.58 y 52.37 °C respectivamente. El producto esperado de la amplificación es de 269 bp.

Para la amplificación de un fragmento del gen *trh*, se diseñaron los siguientes iniciadores: L-*trh*: 5′-TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3′ y R- *trh*: 5′-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3′ con valores de *Tm* de 51.37 y 58.32 °C respectivamente. El producto de amplificación esperado es de 500 bp.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Validación de metodología microbiológica por medio de infección de ostiones con *Vibrio parahaemolyticus.*

Con el objetivo de validar la técnica de aislamiento e identificación de *V. parahaemolyticus* en muestras de moluscos bivalvos, se procedió a analizar el efecto de la temperatura, tiempo de incubación y de enriquecimiento en los cultivos bacterianos; para de acuerdo a los resultados obtenidos, confirmar que las condiciones establecidas en el protocolo a emplear eran apropiadas para la realización del proyecto (DePaola et al. 1995, Vargas et al. 1993).

Como controles se emplearon dos cepas de *V. parahaemolyticus*, la cepa tipo ATCC 17802 que no posee genes de patogenicidad *tdh* o *trh* y la cepa toxigénica 729 TDH positiva TRH negativa, cedida amablemente por el Dr. Bruno Gómez Gil del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidad Mazatlán.

Se utilizaron cuatro grupos de 3 ostiones *C. gigas* obtenidos del mercado de mariscos local, de los cuales el primer grupo fué colocado en un recipiente con 2 litros de agua de mar y se les agregó 12 ml de una suspensión de la cepa de *V. parahaemolyticus* no toxigénica con una concentración de 1 x 10^8 bacterias/ ml y se mantuvieron en esas condiciones toda la noche. El segundo grupo se le aplicaron las mismas condiciones, excepto que fue inoculado con la cepa toxigénica de *V. parahaemolyticus*. Al tercero y cuarto grupo se les mantuvo en agua de mar pero no recibieron inoculación de cepas de *V. parahaemolyticus*.

Por la mañana, los 4 grupos de ostiones fueron procesados según el procedimiento establecido (Vargas et al. 1993), las conchas de los ostiones, se lavaron bajo el chorro del agua con un cepillo. Los ostiones se abrieron insertando un cuchillo en la abertura bisal, las valvas se separaron y se inclinaron para drenar el líquido intervalvar. El líquido y la carne de cada uno de los moluscos se depositaron dentro de un vaso de licuadora estéril. Las muestras se homogenizaron durante un minuto en la licuadora.

Al homogenizado del grupo 3 se les adicionó 5 ml de una suspensión de *V. parahaemolyticus* toxigénico a una concentración de 1 x 10^4 bacterias/ml, el cuarto grupo se utilizó como control negativo.

Cada homogenizado fué procesado independientemente y 25 g de cada uno fueron colocados en 4 matraces con 225 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) respectivamente, Además, se tomó 0.1 ml de cada homogenizado y se depositó directamente sobre placas de agar TCBS incubando a 30°C por 18 y 24 horas. Las colonias de color verde-azules, sospechosas de ser *V. parahaemolyticus*, fueron sometidas a las pruebas de oxidasa, A las colonias oxidasa positiva, se le realizaron pruebas de arginina dehidrolasa (ADH), Ornitina descarboxilasa (ODC) y lisina descarboxilasa (LDC).

Siguiendo los pasos establecidos en el protocolo inicial, se procedió a la recuperación de las cepas de *V. parahaemolyticus* cultivadas bajo las diferentes condiciones.

III.1.1 Efecto del enriquecimiento con agua peptonada en el aislamiento de *V. parahaemolyticus* en ostiones artificialmente infectados

Los homogenizados incubados con enriquecimiento de agua peptonada alcalina mostraron un mayor desarrollo de colonias de *V. parahaemolyticus* y un menor desarrollo de colonias sacarosa positivas comparadas con las muestras no enriquecidas, independientemente de la temperatura y el tiempo de incubación (Figura 4). Confirmando que el enriquecimiento es importante para la recuperación de *V. parahaemolyticus.*

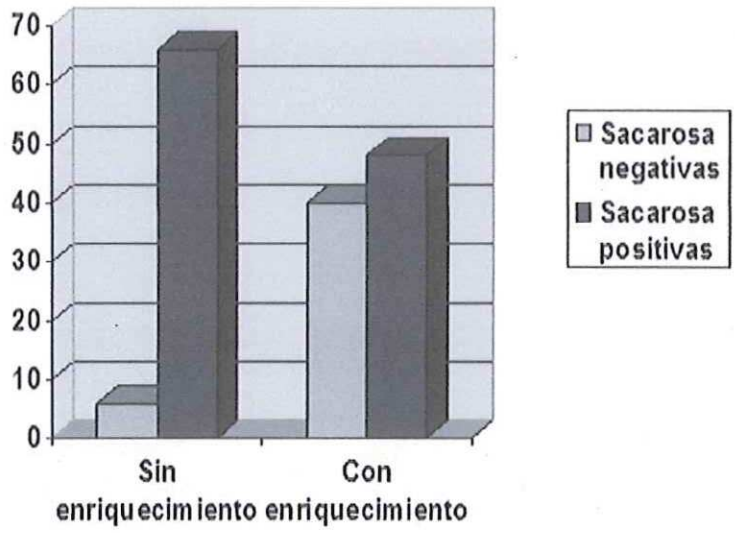

Figura 4. Gráfica que muestra el efecto del enriquecimiento con agua peptonada alcalina (APA) en el aislamiento de cepas de *V. parahaemolyticus* de ostiones artificialmente infectados. La temperatura de incubación fue de 37°C.

III.1.2 Efecto de la Temperatura

Las cepas enriquecidas de *V. parahaemolyticus*, fueron recuperadas en las tres temperaturas de incubación, 30, 37 y 41 °C, confirmando que esta bacteria puede

desarrollarse en este amplio margen de temperatura. A 37 °C se observó que las cepas sacarosa negativas crecieron en mayor cantidad que en las otras tres temperaturas,por lo que esta temperatura fue elegida como temperatura de incubación, a pesar de que en esta temperatura las cepas sacarosa positiva eran más abundantes. El efecto contrario lo observamos a la temperatura de 41 °C, donde se observa un menor crecimiento de ambas cepas, pero la relación de cepas sacarosa negativas es mayor que las positivas. (Figura 5). Considerando que tanto a 30°C como a 41 °C, las cepas sacarosas negativas crecen de forma semejante, consideramos también utilizar 41 °C, pues es evidente que en la última temperatura existe un menor desarrollo de cepas sacarosa positiva.

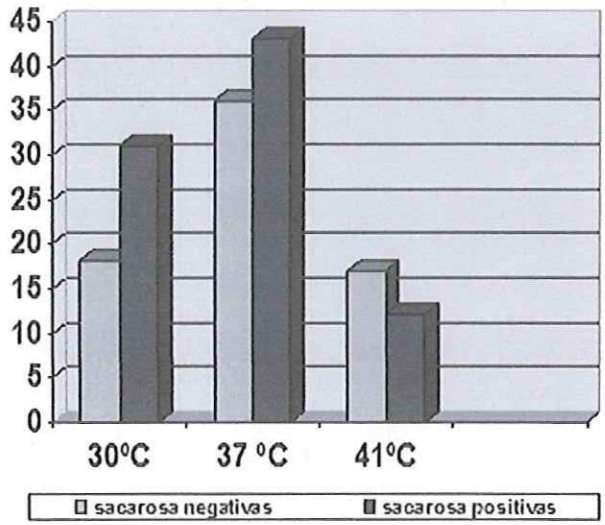

Figura 5. Gráfica que muestra el efecto de la temperatura de incubación en el aislamiento de cepas de *V. parahaemolyticus* en ostiones artificialmente infectados

III.1.3 Efecto del tiempo de incubación

En todos los casos de enriquecimiento, se observó un buen desarrollo de la bacteria entre las 18 y 24 horas de incubación (FIgura 6).

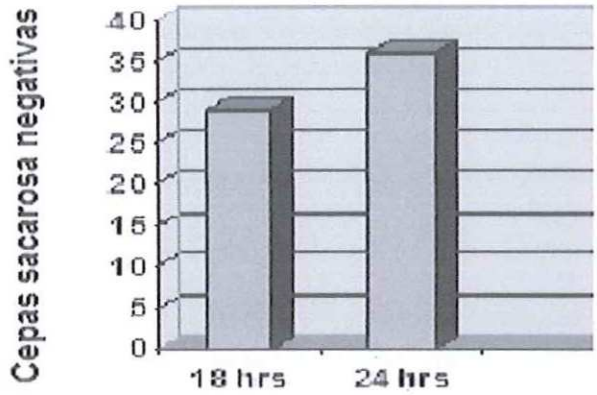

Figura 6. Gráfica que muestra que a 24 horas de incubación, se recuperó la mayor cantidad de cepas que no fermentaban sacarosa.

Con estos resultados, se confirmó que las condiciones establecidas en la metodología a emplear en el proyecto, eran adecuadas para el aislamiento e identificación de cepas de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados.

III.2 Protocolo de detección de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos.

Los moluscos bivalvos fueron proporcionados por tres granjas acuícolas ubicadas en el estado de Baja California y una más en el estado de Baja California Sur (Tabla III y figura 7), México. Se estableció un convenio con dichas granjas, para que de forma calendarizada (Tabla IV) se cosecharan dos docenas de su producto y se enviaran al laboratorio de Biotecnología Marina del CICESE. En total se recibieron 24 lotes de moluscos bivalvos, obtenidos en 24 muestreos realizados entre el 4 de febrero al 21 de julio de 2004.

Tabla III. Granjas acuícolas participantes en el proyecto

Granja	Ubicación	Producto
Agromarinos S.A. de C.V.	San Quintín B.C.	Ostión
Aqualap S.A. de C.V.	Ensenada B.C.	Ostión y mejillón
Sol Azul S.A. de C.V.	Laguna San Ignacio B.C.S.	Ostión
Marimex S.A. de C.V.	Laguna Manuela B.C.	Almeja mano de león

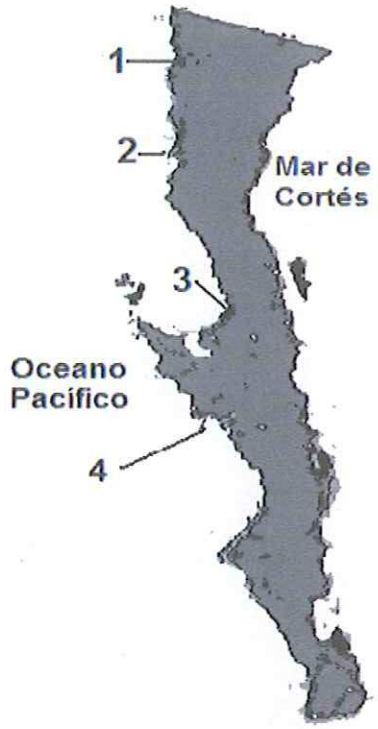

Figura 7. Ubicación geográfica de las granjas acuícolas participantes en el proyecto: 1, Ensenada B.C. (Acualap S.A. de C.V.); 2, San Quintín B.C. (Agromarinos S.A.de C.V.); 3, Laguna Manuela B.C. (Marimex S.A. de C.V.) y 4, Laguna San Ignacio B.C.S. (Sol Azul S.A. de C.V.)

Los moluscos se mantuvieron en bolsas de plástico herméticamente cerradas, dentro de hieleras a temperaturas menores de 10 °C y se analizaron dentro de las siguientes 6 horas, sin exceder las 24 horas después de su cosecha. Se rechazó cualquier muestra en la que se encontraran las valvas abiertas. De cada muestreo se utilizó una docena de moluscos

bivalvos por granja acuícola, cantidad suficiente para obtener una muestra representativa, lo que proporciona aproximadamente 200 g de carne y líquido intervalvar.

Tabla IV. Calendario de muestreos para detección de *V. parahaemolyticus*

Mes	Dia	Granja	Clave
Febrero	4	Sol Azul, Marimex	I-1,2,3,4
	11	Agromarinos	II-1, 2,
	18	Ensenada (Aqualap)	III-1, 2, 3,4
Marzo	3	Sol Azul, Marimex	IV – 1,2,3,4
	10	Agromarinos	V-1, 2
	17	Ensenada (Aqualap)	VI–1,2,3,4
Abril	7	Sol Azul, Marimex	VII-1, 2, 3,4
	14	Agromarinos	VIII-1,2
	21	Ensenada (Aqualap)	IX-1,2,3,4
Mayo	5	Sol Azul, Marimex	X-1, 2,3, 4
	12	Agromarinos	XI-1- 2
	19	Ensenada (Aqualap)	XII-1,2,3,4
Junio	2	Sol Azul, Marimex	XIII-1,2,3,4
	10	Agromarinos	XIV-1,2
	16	Ensenada (Aqualap)	XV-1,2,3,4
Julio	7	Sol Azul, Marimex	XVI-1,2,3,4
	15	Agromarinos	XVII-1,2
	21	Ensenada (Aqualap)	XVIII-1,2,3,4

Antes de iniciar el procedimiento establecido (Vargas et al. 1993), las conchas de los productos marinos, se lavaron bajo el chorro del agua con un cepillo. Los moluscos se abrieron insertando un cuchillo en la abertura bisal, las valvas se separaron y se inclinaron para drenar el líquido intervalvar. El contenido de cada uno de los moluscos se depositó dentro de un vaso de licuadora estéril. Las muestras se homogenizaron durante un minuto en la licuadora.

III.2.1 Procesamiento de las muestras

1. Una vez obtenido el homogenizado, se toman dos porciones de 25 g de este y se depositan en dos matraces que contengan 225 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) cada uno (dilución 1:10).
2. Incubar cada uno de los matraces por 18 a 24 horas a 37 y 41.5 °C
3. Realizar un aislamiento sobre tres cajas de agar TCBS de cada cultivo. No agitar el matraz antes del muestreo. Incubar 24 horas (48 si fuera necesario) a 30 °C.
4. Observar la presencia de colonias sacarosa negativas características (azul-verde). En caso de estar presentes aislar al menos 5 colonias.
5. Cultivar cada colonia aislada en agar Luria-Bertoni. Incubar 18 a 24 horas a 30 °C.
6. Realizar la prueba de oxidasa a cada aislamiento. Para las colonias oxidasa positiva, realizar pruebas de arginina dehidrolasa (ADH), Ornitina descarboxilasa (ODC) y lisina descarboxilasa (LDC). Incubar de 24 a 48 horas a 37 °C. El patrón bioquímico de cepas sospechosas de ser *V. parahaemolyticus* será:
    - Lisina descarboxilasa positivo
    - Arginina dehidrolasa negativo
    - Ornitina descarboxilasa positivo
7. Las cepas que por sus características físicas y bioquímicas demuestren ser *V. parahaemolyticus* serán conservadas en agar Luria-Bertoni, para ser sometidas a las pruebas moleculares: fragmento R72H para confirmar que la cepa sea *V. parahaemolyticus* y a las cepas positivas a R72H, se les somete a la búsqueda de los genes de las hemolisinas TDH y TRH para descartar su toxigenicidad.

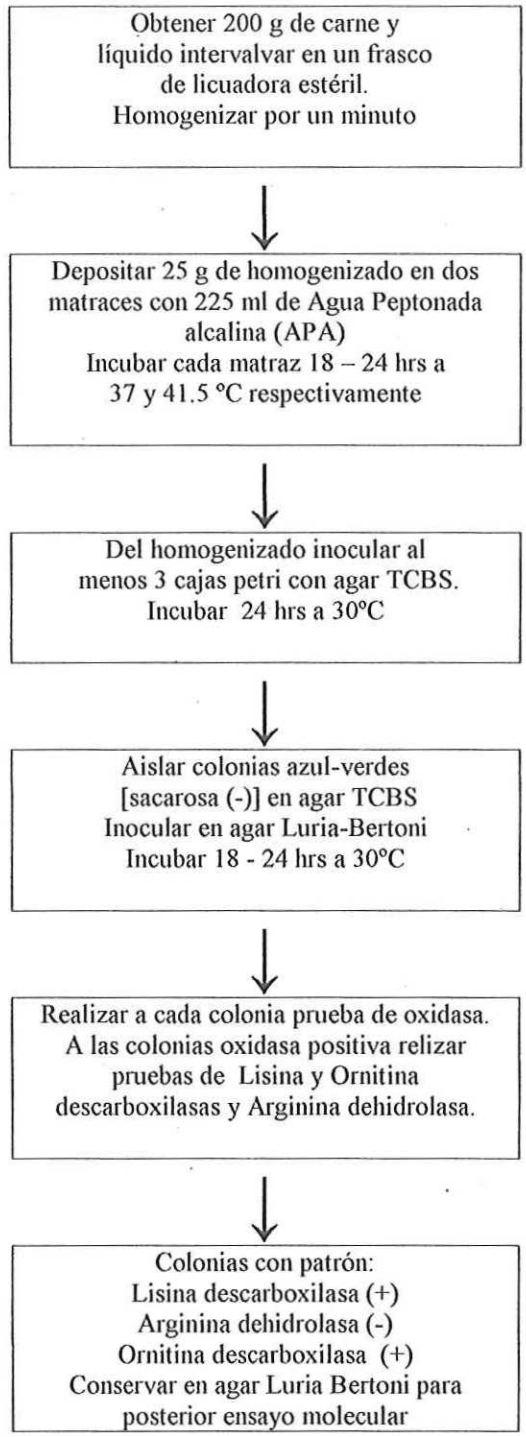

Figura 8. Diagrama de flujo para aislamiento e identificación bioquímica de cepas sospechosas de ser *Vibrio parahaemolyticus.*

III.2.2 Extracción de ADN bacteriano para análisis por PCR

Todo el ADN bacteriano fué obtenido por un método de extracción basado en la unión del ADN a columnas con membranas de gel de sílice (DNeasy Tissue kit, QIAGEN Inc. Valencia CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bacterias aisladas fueron reinoculadas en placas de agar Luria-Bertoni e incubadas a 37 °C por 24 horas. Dos o tres colonias fueron directamente resuspendidas en 180 µl de buffer ATL (proporcionado en el kit) contenidos en un tubo de 2.5 ml y a esta suspensión se le adicionaron 20µl de proteinasa K. La suspensión fue incubada a 55°C en baño maría por 2 horas hasta completar la lisis celular. Una vez obtenida la lisis, se agregó a la suspensión 200µl de buffer AL (proporcionado por el kit), se mezcló con vórtex y se incubó a 70°C por 10 minutos. A esto se le agregaron 200µl de etanol al 96% y se mezcló vigorosamente con el vórtex.

La mezcla fue transferida a una minicolumna de separación colocada en un tubo nuevo de 2.0 ml (proporcionados por el kit), se agregaron 500µl de buffer AW1 (incluido en el kit) y se centrifugó por 1 minuto a 8000 r.p.m. en microcentrífuga (eppendorf 5415 D). Se descartó la solución filtrada y el tubo.

La minicolumna se deposita en otro tubo nuevo de 2.0 ml, se agregan 500 µl de buffer AW2 (incluido en el kit) y se centrifuga por 3 minutos a 8,000 r.p.m. Se descarta la solución filtrada y el tubo. Se coloca la minicolumna en un tubo nuevo de 1.5 ml y se adicionan 200µl de buffer AE (incluido en el kit). Se incuba por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 8,000 r.p.m. por 1 minuto. La elusión obtenida se transfiere a un

tubo nuevo y es conservada a -20°C hasta su análisis. La eficiencia de la extracción fue evaluada con un espectrofotómetro Smart spec 3000 (BIORAD Inc.)

Las cepas de referencia (Tabla V) utilizadas como controles fueron las siguientes: control negativo CNRVC 950768 (R72H -, TDH - , TRH -), y las cepas control positivo CNRVC 010089 (TDH+, TRH +, R72H + 387 bp) y CNRVC 020234 (320 bp), fueron amablemente donadas por el Dr. Jean-Michel Fournier del Centre Nacional de Reférence des Vibrions et du Choléra del Institut Pasteur de París Francia.

Tabla V. Cepas de referencia utilizadas en el proyecto

Cepa		Fragmento R72H	Genes tdh	trh
V. parahaemolyticus	CNRVC 010089	387 bp	+	+
V. parahaemolyticus	CNRVC 020234	320 bp	-	-
V. alginolyticus	CNRVC 950768	-	-	-

III.3 Detección de la secuencia específica R72H de *Vibrio parahaemolyticus.*

La identificación de cepas de *V. parahaemolyticus*, se realiza mediante la amplificación de un fragmento de 320 o 380 bp de ADN cromosomal llamado R72H, utilizando la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa empleando el siguiente par de iniciadores: 5′-CGA ATC CTT GAA CAT ACG CAG C-3′ y 5′- TGC GAA TTC GAT AGG GTG TTA ACC-3′ (Lee et al. 1995).

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: la mezcla de reacción (volumen final,

50µl) consistió de 1µl de la solución que contiene el ADN, 5µl de la solución tampón de amplificación10X (Promega Inc.), 5µl de solución de $MgCl_2$ 25mM, 0.5µl de la solución de la *Taq* polimerasa (5 U/µl), 5µl de la solución de trifosfatos de desoxinucleósidos (8 mM), 2.5 µl de solución de cada iniciador, y 28.5 µl of agua destilada estéril. Las reacciones fueron realizadas con un termociclador PTC 200 (MJ Research Inc.): 10 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 60°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

El ADN amplificado fué sujeto a electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % (p/v) (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ USA). Los geles fueron corridos en un buffer Tris-Borato-EDTA 10x (Sigma Chemical co. St Louis MO) a 80V por 1 hora 40 minutos con un marcador molecular de 100 bp (PROMEGA Madison WI USA). Los geles fueron inmersos en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados por transiluminación UV.

III.4 Detección de las secuencias de las hemolisinas TDH y TRH.

La identificación de cepas toxigénicas *V. parahaemolyticus*, se realiza mediante la amplificación de los genes *tdh* y/o *trh*, utilizando la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa empleando dos pares de iniciadores: para *tdh* 5'-GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC-3′ y 5′-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC3′ con un amplificado de 269 bp; para trh 5′-TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3′ y 5′-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3′ con un amplificado de 500 bp (Bej et al. 1999).

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: la mezcla de reacción (volumen final, 50µl) consistió de 1µl de la solución que contiene el ADN, 5µl de la solución tampón de amplificación10X (Promega Inc.), 5µl de solución de $MgCl_2$ 25mM, 0.5µl de la solución de la *Taq* polimerasa (5 U/µl), 5µl de la solución de trifosfatos de desoxinucleósidos (8 mM), 2.5 µl de solución de cada iniciador, y 23.5 µl of agua destilada estéril. Las reacciones fueron realizadas con un termociclador PTC 200 (MJ Research Inc.): 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 58°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

El ADN amplificado fué sujeto a electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % (p/v) (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ USA). Los geles fueron corridos en un buffer Tris-Borato-EDTA 10x (Sigma Chemical co. St Louis MO) a 80V por 1 hora 40 minutos con un marcador molecular de 100 bp (PROMEGA Madison WI USA). Los geles fueron inmersos en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados por transiluminación UV.

IV RESULTADOS

Para la determinación de la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados, se emplearon técnicas microbiológicas de enriquecimiento en medio líquido y de cultivo en placa con medio selectivo para aislamiento de cepas sospechosas. Se utilizaron técnicas de amplificación de un fragmento de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmación de la especie *Vibrio parahaemolyticus* y la búsqueda e identificación de los genes de las hemolisnas TDH y TRH.

Se realizaron 24 muestreos (tabla IX) de las granjas acuícolas participantes en un periodo de seis meses, se emplearon un total de 360 piezas de moluscos bivalvos de tres especies diferentes: 216 piezas del ostión *Crassostrea gigas*, 72 piezas del mejillón *Mytilus galloprovincialis y* 72 piezas de la almeja *Nodipecten subnodosus.* Las muestras fueron homogenizadas en licuadora e inoculadas en el medio de eriquecimiento agua peptonada alcalina (APA) e incubadas por duplicado a temperaturas de 37°C y 41 °C. Después del enriquecimiento, se inocularon cajas con medio de cultivo TCBS y se incubaron a 30°C.

En total se analizaron 1,200 colonias con coloración verde-azul en el medio TCBS, de éstas se aislaron 440 cepas que fueron confirmadas como no fermentadoras de sacarosa mediante la resiembra en el medio selectivo TCBS y fueron sometidas a la prueba de citocromo oxidasa. Las cepas citocromo oxidasa positivas [100% (440/440)] fueron sometidas a las pruebas bioquímicas de lisina y ornitina descarboxilasas y arginina dehidrolasa. Se obtuvieron 150 cepas [34.09% (150/440)] que mostraron un patrón bioquímico

correspondiente a *V. parahaemolyticus* (Tabla VI). Estas muestras fueron conservadas en agar Luria-Bertoni a temperatura ambiente hasta su análisis por PCR.

Tabla VI. Origen de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas durante el estudio

Mes (2004)	No. de muestras analizadas	No. de colonias sacarosa negativas	No. de cepas analizadas por PCR	No. de cepas confirmadas por fragmento R72H	Lugar de muestreo	Tipo de muestra	No. de cepas
Febrero	60	104	35	26	San Ignacio B.C.S.	Ostión	9
					Laguna Manuela B.C.	Almeja	12
					San Quintín B.C.	Ostión	5
					Ensenada B.C.	Ostión	0
						Mejillón	0
Marzo	60	93	82	7	San Ignacio B.C.S.	Ostión	0
					Laguna Manuela B.C.	Almeja	3
					San Quintín B.C.	Ostión	4
					Ensenada B.C.	Ostión	0
						Mejillón	0
Abril	60	74	15	1	San Ignacio B.C.S.	Ostión	0
					Laguna Manuela B.C.	Almeja	1
					San Quintín B.C.	Ostión	0
					Ensenada B.C.	Ostión	0
						Mejillón	0
Mayo	60	64	7	0	San Ignacio B.C.S.	Ostión	0
					Laguna Manuela B.C.	Almeja	0
					San Quintín B.C.	Ostión	0
					Ensenada B.C.	Ostión	0
						Mejillón	0
Junio	60	63	11	0	San Ignacio B.C.S.	Ostión	0
					Laguna Manuela B.C.	Almeja	0
					San Quintín B.C.	Ostión	0
					Ensenada B.C.	Ostión	0
						Mejillón	0
Julio	60	42	0	0	San Ignacio B.C.S.	Ostión	0
					Laguna Manuela B.C.	Almeja	0
					San Quintín B.C.	Ostión	0
					Ensenada B.C.	Ostión	0
						Mejillón	0
Total	360	440	150	34			34

V. parahaemolyticus fue aislado en 6 de los 24 muestreos (25.0%), Estos hallazgos ocurrieron durante los meses de febrero, marzo y abril, y no se aislaron cepas de *V.*

parahaemolyticus durante los meses de mayo, junio y julio (Tabla IX y figura 9). En orden decreciente las zonas donde *V. parahaemolyticus* fue aislado frecuentemente fueron: Laguna Manuela B.C., San Quintín B.C. y San Ignacio B.C.S. No se aisló *V. parahaemolyticus* en Ensenada B.C (Tabla IX y figuras 10 y 11).

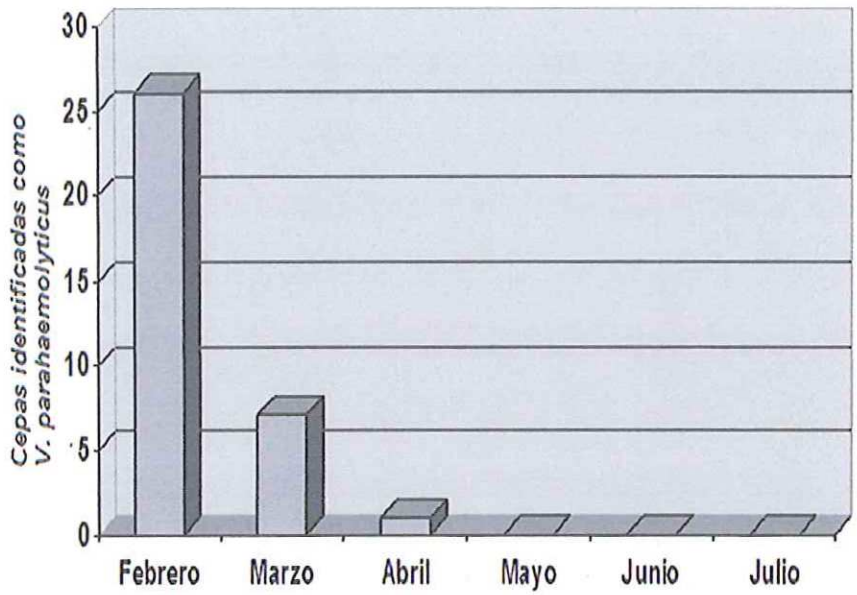

Figura 9. Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por mes de muestreo.

De las 150 cepas sospechosas por su patrón bioquímico de ser *V. parahaemolyticus*, 34 (22.6%) fueron positivas para la amplificación del fragmento R72H (Figura 12), el cual es específico para *V. parahaemolyticus*; 15 (44.12%) de estas cepas presentaron amplificación del fragmento de 320 bp y 19 (55.88%) el de 387 bp (Figura 13). Todas las cepas identificadas fueron aisladas a 37°C. Ninguna de estas cepas de *V. parahaemolyticus* fue portador de los genes de las hemolisinas TDH, TRH o ambas (Figura 14).

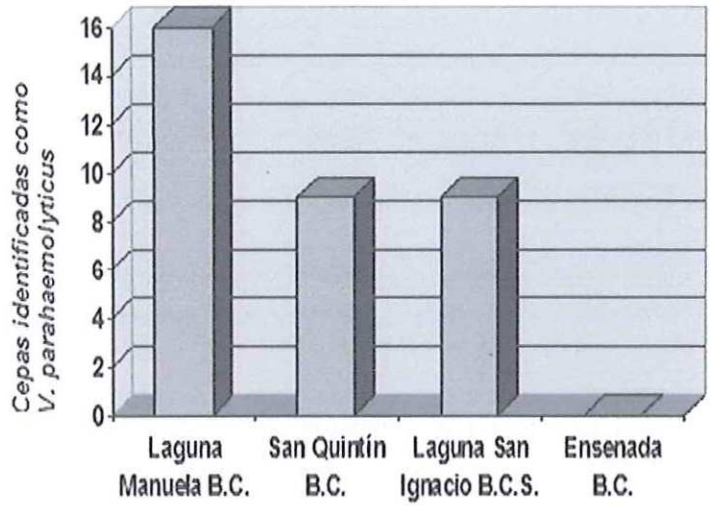

Figura 10. Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por granja acuícola

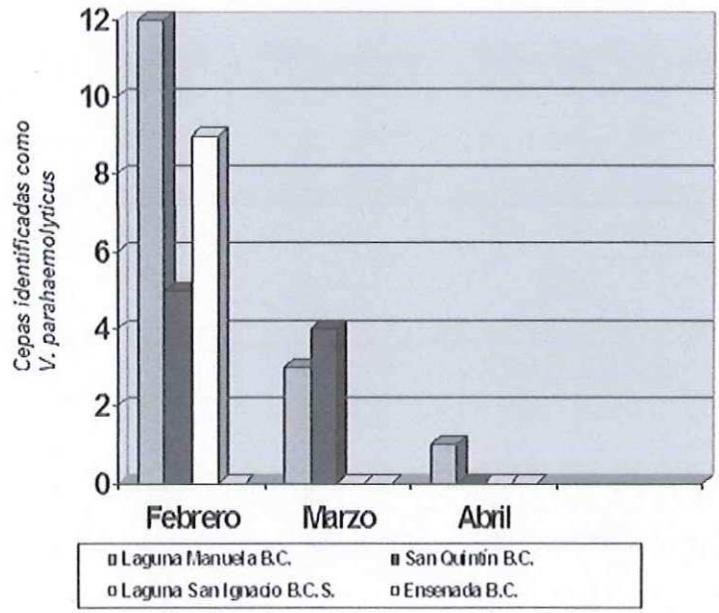

Figura 11. Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por granja acuícola y por mes.

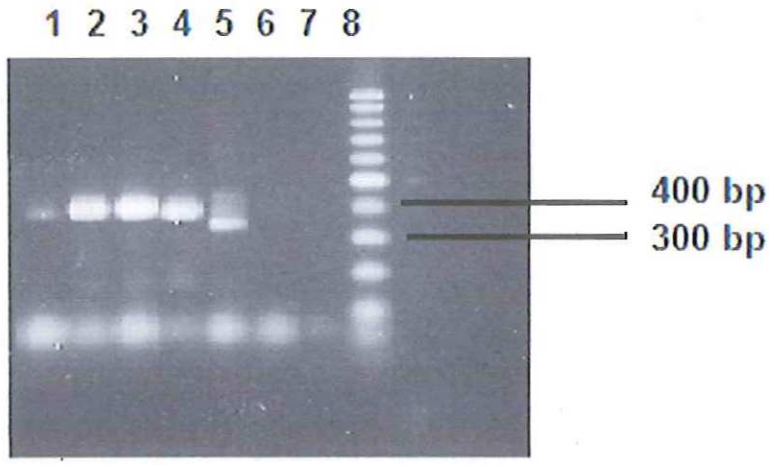

Figura 12. Gel de agarosa con amplificados del fragmento R72H de *V. parahaemolyticus* por PCR. Los iniciadores amplificaron fragmentos de 320 y387 bp. Carriles 1,2 y 3 cepas experimentales; carril 4, cepa control *V. parahaemolyticus* CNRVC 010089 (387 bp); carril 5, cepa control *V. parahaemolyticus* CNRVC 020234 (320 bp); carril 6, cepa control negativo *V. alginolyticus* CNRVC 950768; carril 8 marcador molecular 100 bp.

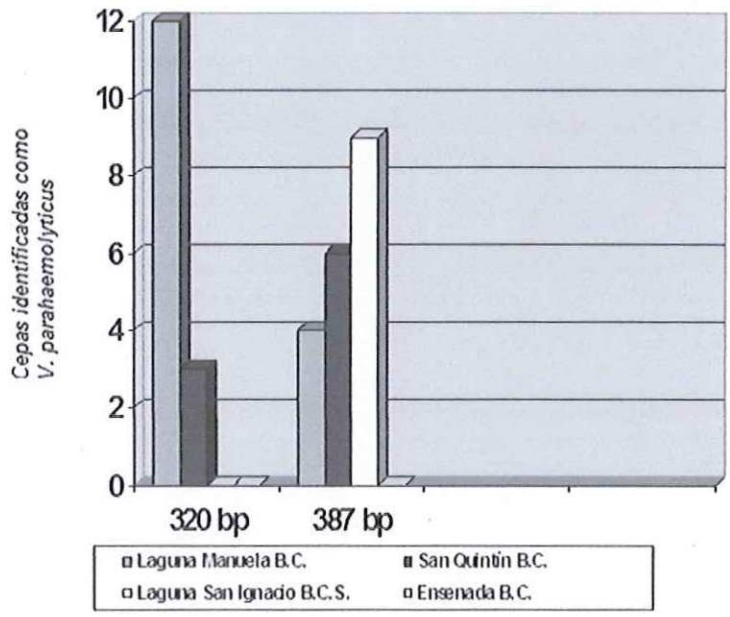

Figura 13. Gráfica representativa del número de cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* por su amplificación del fragmento R72H.

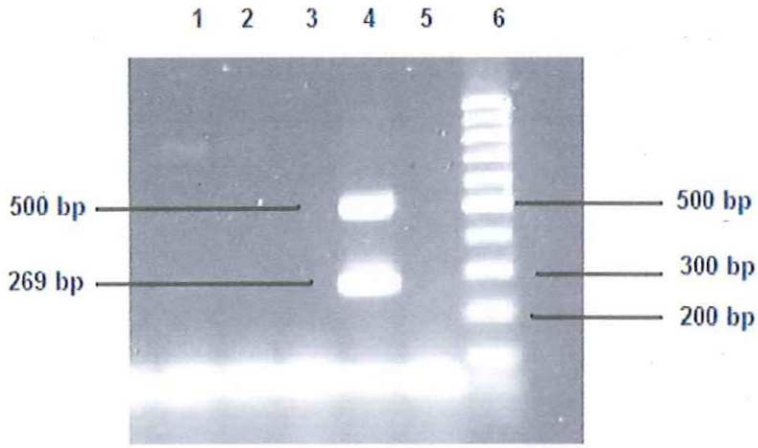

Figura 14. Gel de agarosa con amplificados de los genes *tdh* y *trh* de *V. parahaemolyticus* por PCR. Los iniciadores amplificaron fragmentos de 269 (*tdh*) y 500 (*trh*) bp. Carriles 1,2 y 3 cepas experimentales. Carril 4, cepa control *V. parahaemolyticus* CNRVC 010089 (*tdh* + *trh* +); carril 5, cepa control negativo *V. alginolyticus* CNRVC 950768; Carril 6 marcador molecular 100 bp.

V. DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron los principales moluscos bivalvos cultivados en algunas de las granjas acuícolas localizadas en la península de Baja California y confirmó que *Vibrio parahaemolyticus* es un habitante común del ambiente marino y estuarino, ya que se demostró la presencia de *V. parahaemolyticus* en el 25 % (6/24) de los muestreos realizados.

Existen trabajos que señalan que la frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* depende de la estación del año y los aislamientos más importantes de *V. parahaemolyticus* se presentan en los meses lluviosos, dependiendo de la región que se estudia (Chowdhury et al. 2004, DePaola et al. 2003, Alam et al. 2002). Los hallazgos de *V. parahaemolyticus* en la península de Baja California coincidieron con la temporada de lluvias de la región, durante tres de los primeros cuatro meses del año (febrero-abril).Un estudio muy reciente elaborado en aguas del golfo de México, demuestran un patrón de aislamiento de *V. parahaemolyticus* semejante al de este estudio, con el mayor aislamiento en el mes de marzo (Cabrera-García M.A. et al. 2004), Sin embargo, no tenemos información que permita correlacionar estadísticamente si la incidencia de *V. parahaemolyticus* en Baja California está influenciada por las lluvias en la zona.

V. parahaemolyticus fue aislado e identificado en tres de cuatro de las granjas acuícolas participantes (San Quintín B.C., Laguna San Ignacio B.C.S. y Laguna Manuela B.C.), con predominio en una región geográfica (Laguna Manuela B.C.). No se identificó *V. parahaemolyticus* en la granja acuícola ubicada en la ciudad de Ensenada B.C. La única

diferencia entre estas granjas es que en la granja de Ensenada, los moluscos son sometidos a recambio de agua antes de ser cosechados para su venta. Es sabido que los moluscos bivalvos cultivados que se encuentren contaminados por bacterias, pueden ser seguros para consumo humano mediante un proceso de purificación.

De las cepas que bioquímicamente podían ser consideradas como *V. parahaemolyticus*, solo el 22.6 % (34/150) fueron confirmadas como tal, mediante la amplificación del fragmento R72H, lo que pone de manifiesto que existen limitantes en la identificación bacteriana mediante el usos de pruebas bioquímicas y la utilidad del empleo de técnicas moleculares para obtener una identificación específica de una especie bacteriana. Hasta el momento no se ha establecido una relación entre el tamaño del amplificado del fragmento R72H (320 y 387 bp) con la virulencia o el origen de las cepas de *V. parahaemolyticus*.

En nuestro estudio no se aisló ninguna cepa de *V. parahaemolyticus* portadora de los genes toxigénicos *tdh* o *trh*. La posibilidad de resultados falsos negativos es escasa, ya que se utilizaron cepas control que amplificaron todos los fragmentos esperados en cada corrida. A la par de este trabajo, se está realizando otro estudio similar de búsqueda de cepas toxigénicas de *V. parahaemoliticus* en granjas de cultivo de moluscos bivalvos en las costas de la península y golfo de California, en el que hasta el momento no se han detectado cepas toxigénicas (Cabanillas, H. y Gómez Gil, B. comunicación personal).

La razón por la cual las cepas toxigénicas de *V. parahaemolyticus* no son frecuentemente aisladas en muestras ambientales o de productos marinos aún es desconocida. Se piensa que

esto se debe a un proceso de selección natural, donde las cepas no toxigénicas sobreviven mejor en el ambiente y en el que las cepas toxigénicas sobreviven mejor en el intestino de mamíferos, de modo que sus heces contaminan las aguas de las costas y los moluscos que habitan esas zonas se contaminan para posteriormente infectar al hombre (Joseph et al. 1983, DePaola et al. 2003).

En septiembre de 2004, apareció un brote de gastroenteritis aparentemente causado por *V. parahaemolyticus* en personas que consumieron camarón mal cocido en la ciudad de Mazatlán Sinaloa (Cabanillas, H. y Gómez Gil, B. 2004). Días antes, en la ciudad de Carlsbad, California E.E.U.U; se presentó una alerta sanitaria por la FDA (Food and Drugs Administration) en la que se sospechaba de que el consumo de ostiones crudos cultivados en una granja de esa ciudad, eran la causa de un brote de gastroenteritis y que la bacteria implicada era *V. paraahaemolyticus* (California Department of Health Services 2004).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, demuestran la calidad bacteriológica de los moluscos bivalvos cultivados. Sin embargo, los recientes reportes de brotes de gastroenteritis causados por moluscos bivalvos y crustáceos contaminados, en regiones cercanas a Baja California, son evidencia de que en cualquier momento se pueden presentar brotes infecciosos en el estado, por lo que es importante difundir la importancia epidemiológica de *V. parahaemolytics,* pues esta bacteria aún no ha sido considerada como un problema de salud por las autoridades sanitarias. La implementación de la identificación de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos y en muestras clínicas, puede ser importante para prevenir problemas sanitarios que pueden afectar a la población.

El presente trabajo, por lo tanto ha dejado un precedente de que *Vibrio parahaemolyticus* es un habitante común de las aguas marinas y estuarinas de la región. Que es posible que las condiciones ambientales existentes, permitan que cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* puedan en cualquier momento ser un riesgo potencial para la salud de los consumidores de moluscos bivalvos, a pesar de que durante el periodo en que se desarrolló este proyecto no se identificó ninguna cepa toxigénica de *V. parahaemolyticus* en la región. Las alertas sanitarias en regiones cercanas a la península, por la aparición de brotes de gastroenteritis por consumo de productos marinos donde se sospecha la presencia de *V. parahaemolyticus* confirman lo anterior.

Por medio del vínculo académico y tecnológico establecido entre CICESE y el Instituto Pasteur, el cual forma parte de la comisión de la Unión Europea que trabaja en la implementación de normas para el control y prevención de enfermedades por consumo de productos de origen marino, se logró implementar una metodología que permite identificar cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* en productos de origen marino, de forma rápida y económica. Gracias a esto se logró prestar un servicio a los productores de moluscos bivalvos de la región, demostrando que durante la realización de este trabajo, sus productos no representaron un riesgo para la salud de los consumidores, y que en caso de que se establezca como requisito para exportación demostrar la ausencia de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* en los productos marinos, esta prueba estará a su disposición.

LITERATURA CITADA

Akeda Y., Nagayama K., Yamamoto K. y Honda T. 1997. Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Infect. Dis 176:822–4

Alam M.J., Tomochika K.I., Miyoshi S.I. y Shinoda S. 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-inland Sea, Japan. FEMS Microbiol Lett. 208(1):83-7.

Bej A.K., Patterson D.P., Brasher C.W., Vickery M.C.L., Jones D.D. y Kaysner C.A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl, tdh* and *trh*. J. Microbiol Methods (36) 215-225.

Cabanillas H. y Gómez Gil B. 2004. Descubren bacteria causante de la intoxicación por ingesta de camarón. El Imparcial octubre 16.

Cabrera García M.E., Vázquez Salinas C. y Quiñones Ramírez E.I. 2004. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. Appl Environ Microbiol. 70 (11) 6401 - 6406

California Department of Health Services. 2004. Consumers advised not to eat sport'harvested bivalve shellfish from Humboldt and Del Norte counties. Health warning 4-32. http://www.dhs.ca.gov

Chowdhury N.R., Chakraborty S., Ramamurthy T., Nishibuchi M., Yamasaki S., Takeda Y. y Nair GB. 2000. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. Emerg. Infect. Dis. 6 (6) 631- 636

Chowdhury A.,Ishibashi M., Dhin Tiem V., Thi Ngoc D. y Tuyet D.T., 2004. Emergence and serotipe transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. Microbiol. Immunol 48 (4) 319-327.

Daniels N.A. MacKinnon L., Bishop R., Altekruse S., Ray B., Hammond R.M., Thompson, Wilson S., Bean N.H., Griffin P.M. y Slutsker L. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. J. Infect. Dis 181 1661- 1666

DePaola A. y Hwang GC. 1995. Effect of dilution, incubation time, and temperature of enrichment on cultural and PCR detection of *Vibrio Cholerae* obtained from the oyster *Crassostrea virginica.* Molecular and Cellular Probes (9) 75-81.

DePaola A., Ulaszek J., Kaysner C.A. , Tenge B. T., Nordstrom J. L., Wells J., Puhr N. y Gendel S.M. 2003 Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. Appl. Environ. Microbiol 69 (7) 3999 - 4005

De Sousa O.V., Vieira R.H., Meneze F.G. Dos Reis C.M. y Hofer E. 2004. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster Crassostrea rhizophorae, collected from a natural nursery in the Cocó river estuary Fortaleza, Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 46(2):59-62,

Hardy S.P., Nakano M., e Iida T. 2004. Single channel evidence for innate pore-formation by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct haemolysin (TDH) in phospholipid bilayers. FEMS Microbiology Letters (240) 81–85

Wong H.C., Liu S.H., Wang T.K., Lee C.L., Chiou C.S., Liu D.P., Nishibuchi M. y Lee B.K. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. App. Env Microbiol. 66 (9) 3981 – 3986

Honda, T., Chearskul, S., Takeda, Y. y Miwatani, T., 1980. Immunological methods for the detection of Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Clin. Microbiol. 11, 600–603.

Honda T., Sornchai C., Takeda Y. y Miwatani T. 1982. Immunological detection of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus* on modified selective media. J Clin Microbiol. 16(4):734-6.

Honda, T., Y. Ni, and T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. Infect. Immun. 56:961-965.

Hondo S., Goto I., Minematsu N., Ikeda N., Asano M., Ishibashi Y., Kinoshita M., Nishibuchi T., Honda T., y Miwatani T. 1987. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticuis*. Lancet i:331-332.

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

Joseph S.W., Colwell R.R. y Kaper, J.B. 1983. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. CRC Crit Rev Microbiol 10, 77 - 124

Lee C.Y., Chen L.H., Liu M.L., y Su, Y.C. 1992. Use of a oligonucleotide probe to detect *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated oysters. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3419-3422

Lee C. y Pan SF. 1993. Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction. J Gen Microbiol. 139(12):3225-31.

Lee C.Y., Chen C.H. y Chou Y.W.. 1995a. Characterization of a cloned pR72H probe for *Vibrio parahaemolyticus* detection and development of a nonisotopic colony hybridization assay. Microbiol. Immunol. 39 (3), 177-183

Lee C.Y., Pan S.F. y Chen C.H. 1995b. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* for in shellfish with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61 (4) 1311-1317.

Mac Faddin J.F. 1993. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana pp 60-62, 154-155.

Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M. e Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. Lancet 361 743-749

McCarter L. 1999. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. J Mol. Microbiol Biotechnol. 1 (1) 51-57.

Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McGaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M. y Tauxe R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607–625.

Morris J.G. 2003. Cholera and other types of Vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clinical Infectious Diseases 37:272–80

Nishibuchi M., Ishibashi M., Takeda Y., y Koper J. B. 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences by the DNA colony hybridization test. Infect. Immun. 49:481-486.

Nishibuchi M., Hill W.E., Zon G. Payne W.L. y Kaper JB. 1986 Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. J Clin Microbiol.6:1091-5.

Nishibuchi M., Taniguchi T., Misawa T., Khaeomanee V., Honda T., y Miwatani T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* 57 (9): 2691 – 2697

Nishibuchi M., Fasano A., Rusell R.G. y Kaper J.B. 1992. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding Thermostable Direct Hemolysin. Infect Immun 60 (9): 3539-3545

Raimondi F., Joseph P., KAO Y., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A. y Fasano A. 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin in in vitro systems. Infect Immun. 68 (6): 3180-3185

Robert-Pillot A., Guénolé A. y Fournier J.M. 2002. Usefullness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio algynolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. FEMS Microbiology Letters (2002) 215 1-6

Robert-Pillot A., Guénolé A., Lesne J., Delesmont R., Fournier J.M. y Quilici M.L. 2004. Occurrence of the tdh and trh genes in Vibrio parahaemolyticus isolates from waters and raw shellfish collected in two french coastal areas and from seafood imported into France. International Journal of Food Microbiology (91)319– 325

Tagomori K, Iida T, Honda T. 2002. Comparison of genome structures of Vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *J Bacteriol* 184: 4351–58.

Takahashi A., Sato Y., Shiomi Y., Cantarelli V., Ilda T., Lee M. y Honda T. 2000a Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. J. Med. Microbiol. (49) 801-810.

Takahashi A., Kenjyo N., Imura I., Myonsun Y. y Honda T. 2000b. Cl^- secretion in colonic epithelial cells induced by the *Vibrio parahaemolyticus* hemolytic toxin related to Thermostable Direct Hemolysin. Infect Immun. 68 (9) 5435 - 38

Takeda, Y., 1982. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Pharmocol. Ther. 19, 123–146.

Vargas M.G., Lizarraga-Partida M.L. y Portillo A. 1993.Manual de prácticas de laboratorio del curso: Bacteriología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).47 - 49.

Wu, M.S. y Lee, C.Y. 1998 Sequence analysis of the flanking regions of Vibrio parahaemolyticus R72H fragment. In: 98thGeneral Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA.

Yoh M., Miwatani T. y Honda T. 1992. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin (Vp-TRH) produced by environmental and clinical isolates. FEMS Microbiology Letters 92 157 – 162.

APENDICE.

Procedimientos de pruebas moleculares realizadas.

Detección de la secuencia R72H de *Vibrio parahaemolyticus* (Lee et al. 1995).

Reactivos empleados para la amplificación del fragmento R72H

Nombre	Condiciones de almacenamiento
• Taq DNA polimerasa 5U/µl (Promega Inc. Madison MA)	-20°C
• Solución tampón de amplificación 10X, conteniendo 15mM de $MgCl_2$ (Promega Inc. Madison MA)	
• Solución de $MgCl_2$ 25 mM (Sigma Chemical co. St Louis MI)	
Agua destilada estéril para biología molecular (Fisher scientific co. Fair Lawn NJ)	Temperatura ambiente
Solución stock de dNTP 8mM (2mM cada uno) (Promega Inc. Madison MA)	-20°C
Solución stock de Iniciador VP32 20µM Solución stock de Iniciador VP33 20µM (Sigma genosys Woodlands TX)	-20°C

Secuencias de oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la amplificación del fragmento R72H

Iniciadores	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del fragmento amplificado
VP32	CGA ATC CTT GAA CAT ACG CAG C	320 ó 387 pb
VP33	TGC GAA TTC GAT AGG GTG TTA ACC	

Preparación de la mezcla de reacción

- Preparar una mezcla de reacción calculando los volúmenes en función del número de muestras +3 (2 testigos positivos y un testigo negativo) +2 (margen de error debido al pipeteo).
- Permita descongelar el tampón de amplificación 10X, al $MgCl_2$, los dNTP y los iniciadores, después colóquelos dentro de un recipiente con hielo molido.
- Antes de iniciar, centrifuge 10 segundos en microcentrífuga los tubos que contienen los reactivos utilizados para la PCR. Mantener fríos los tubos de reactivos así como los tubos en los que será preparada la mezcla en el hielo mientras dure la manipulación.

Mezclar en el siguiente orden, dentro de la campana de PCR:

Reactivos		Concentración inicial	Volumen (µl)/tubo	Concentración final
H_2O destilada estéril			28.5	
Tampón de amplificación		10X	5	1X (conteniendo 1.5 mM $MgCl_2$)
$MgCl_2$		25 mM	5	2.5 mM
DNTPs		8 mM	5	800 µM (200µM por cada dNTP)
iniciadores	VP32	20 µM	2.5	1 µM por cada iniciador
	VP33	20 µM	2.5	
Taq polimerasa*		5 U/µl	0.5	2.5 U/50µl

* La Taq polimerasa debe ser colocada a -20°C inmediatamente después de su utilización

Distribuir la mezcla en microtubos de 0.5 mL colocados dentro de una gradilla refrigerada, a razón de 49µl/tubo. Cerrar los tubos.

Sacar la gradilla de la campana, meter los tubos en la segunda gradilla refrigerada.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl)/tubo	Concentración final
ADN blanco	100 a 200 µg/ml	1	0.1 a 0.2 µg /50µl
Volumen final / muestra:		50 µl	

Testigo negativo: Emplear 1 µl del ADN de la cepa de *V. alginolyticus* CNRVC 950768 como control negativo, o puede ser reemplazado por 1µl de agua destilada estéril.

Testigo positivo: 1 µl del ADN de la cepa de *V. parahaemolyticus*: CNRVC020234 (producto de amplificación de 320pb) o CNRV010089 (producto de la amplificación de 387 pb).

Amplificación

- Centrifugar los tubos unos segundos en una microcentrífuga.
- Colocar los tubos en el termociclador PTC 200 MJ RESEARCH (Waltham MA) y seguir el programa de amplifiación:

	T°C	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	10	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	60	1	35
Polimerización	72	1	
Elongación final	72	10	1

Mantener las muestras a 4ºC en el termociclador o en refrigeración antes de la migración. Congelar a -20ºC para conservar las muestras por un periodo prolongado.

El ADN amplificado fué sujeto a electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % (p/v) (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ USA). Los geles fueron corridos en un buffer Tris-Borato-EDTA 10x (Sigma Chemical co. St Louis MO) a 80V por 1 hora 40 minutos con un marcador molecular de 100 bp (PROMEGA Madison WI USA). Los geles fueron inmersos en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados por transiluminación UV.

Detección de las secuencias de las hemolisinas TDH y TRH (Bej et al 1999).

Reactivos empleados para la amplificación de los genes *tdh* y *trh.*

Nombre	Condiciones de almacenamiento
• Taq DNA polimerasa 5U/µl (Promega Inc. Madison MA) • Solución tampón de amplificación 10X, conteniendo 15mM de $MgCl_2$ (Promega Inc. Madison MA) • Solución de $MgCl_2$ 25 mM (Sigma Chemical co. St Louis MI)	-20°C
Agua destilada estéril para biología molecular (Fisher scientific co. Fair Lawn NJ)	Temperatura ambiente
Solución stock de dNTP 8mM (2mM cada uno) (Promega Inc. Madison MA)	-20°C
Solución stock de Iniciador L-tdh 20µM Solución stock de Iniciador R-tdh 20µM Solución stock de Iniciador L-trh 20µM Solución stock de Iniciador R-trh 20µM (Sigma genosys Woodlands TX)	-20°C

Secuencias de oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la amplificación de los genes *tdh* y *trh.*

Iniciadores	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del fragmento amplificado
TDH	L-tdh GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC R-tdh TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	269 pb
TRH	L-trh TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT R-trh CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G	500 pb

Preparación de la mezcla de reacción

- Preparar una mezcla de reacción calculando los volúmenes en función del número de muestras +3 (2 testigos positivos y un testigo negativo) +2 (margen de error debido al pipeteo).
- Permita descongelar dentro de la campana al tampón de amplificación 10X, al $MgCl_2$, los dNTP y los iniciadores, después colóquelos dentro del hielo.
- Antes de iniciar, centrifuge 10 segundos en la microcentrífuga colocada dentro de la campana los tubos que contienen los reactivos utilizados para la PCR. Mantener fríos los tubos de reactivos así como los tubos en los que será preparada la mezcla en el hielo mientras dure la manipulación.

Mezclar en el siguiente orden, dentro de la campana de PCR:

Reactivos		Concentración inicial	Volumen (µl)/tubo	Concentración final
H_2O destilada estéril			23.5	
Tampón de amplificación		10X	5	1X (conteniendo 1.5 mM $MgCl_2$)
$MgCl_2$		25 mM	5	2.5 mM
DNTPs		8 mM	5	800 µM(200µM por cada dNTP)
iniciadores	L-tdh	20 µM	2.5	1 µM por cada iniciador
	R- tdh	20 µM	2.5	
	L- trh	20 µM	2.5	
	R- trh	20 µM	2.5	
Taq polimerasa*		5 U/µl	0.5	2.5 U/50µl

- La Taq polimerasa debe ser colocada a -20°C inmediatamente después de su utilización

Distribuir la mezcla en microtubos de 0.5 mL colocados dentro de una gradilla refrigerante, a razón de 49µl/tubo. Cerrar los tubos.

Sacar la gradilla de la campana, meter los tubos en la segunda gradilla refrigerante.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl)/tubo	Concentración final
ADN blanco	100 a 200 µg/ml	1	0.1 a 0.2 µg /50µl
Volumen final / muestra:		50 µl	

Testigo negativo: Emplear 1 µl del ADN de la cepa de *V. alginolyticus* CNRVC 950768 como control negativo, o puede ser reemplazado por 1µl de agua destilada estéril.

Testigo positivo: 1 µl de ADN de la cepa de *V. parahaemolyticus* CNRV010089 (*tdh*+, *trh*+).

Amplificación

- Centrifugar los tubos unos segundos en una microcentrífuga.
- Colocar los tubos en el termociclador PTC 200 MJ RESEARCH (Waltham MA) y seguir el programa de amplifiación:

	T°C	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	58	1	30
Polimerización	72	1	
Elongación final	72	5	1

Mantener las muestras a 4°C en el termociclador o en refrigeración antes de la migración, a -20°C para conservar las muestras por un periodo prolongado

El ADN amplificado fué sujeto a electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % (p/v) (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ USA). Los geles fueron corridos en un buffer Tris-Borato-EDTA 10x (Sigma Chemical co. St Louis MO) a 80V por 1 hora 40 minutos con un marcador molecular de 100 bp (PROMEGA Madison WI USA). Los geles fueron inmersos en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados por transiluminación UV.