



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**FENOTIPIFICACION DE CEPAS DE *Vibrio*
mimicus AISLADAS DE AGUA Y PRODUCTOS DE LA
PESCA**

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

Q.B.P. ERIKA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

TUTOR: DR. CARLOS VAZQUEZ SALINAS
ASESOR: M. en. C. OSCAR RODOLFO RODAS SUAREZ.

MEXICO, D. F. DICIEMBRE 2006

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Carlos Vázquez Salinas

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

**POR DARME LA FUERZA PARA SEGUIR ADELANTE EN TODO LO QUE
HAGO.**

A MIS PAPAS:

**QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO SU APOYO Y POR QUE NUNCA HAN
DEJADO DE ALENTARME PARA QUE YO SIGA MIS PROYECTOS.**

A MIS HERMANOS:

**QUE SIEMPRE ESTAN APOYANDOME, POR SU CARÍÑO Y
COMPRESION.**

A MI GRUPO DE AMIGOS:

**QUE ME HAN AYUDADO A SACAR ESTE TRABAJO, POR SU APOYO
MORAL QUE SIEMPRE HACE FALTA Y SOBRE TODO POR LA AMISTAD
QUE TENEMOS Y ESPERO QUE PERDURE POR MAS AÑOS.**

A MIS MAESTROS:

**PORQUE SIEMPRE ME APOYARON EN TODO, LES DOY LAS GRACIAS
PORQUE PERSONAS COMO USTEDES NO SE ENCUENTRAN
FRECUENTEMENTE, LOS QUIERO MUCHO Y FUE UN PLACER
TRABAJAR CON USTEDES.**

INDICE GENERAL.

INDICE GENERAL .	I
INDICE DE CUADROS	II
INDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS.	III

I. INTRODUCCION

- I.1 ANTECEDENTES**
- L.2 CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO**
- L.3 HABITAT Y RESERVORIOS.**
- L.4 DISTRIBUCION GEOGRAFICA**
- I.5 EPIDEMIOLOGIA.**
- I.6 PATOGENESIS**
- I.7 SIGNOS Y SINTOMAS**
- I.8 FACTORES DE VIRULENCIA**

II JUSTIFICACION

III. OBJETIVOS

IV. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

V. METODOLOGIA

- V.1 CARACTERISTICAS DE LA ZONA DE MUESTREO**
- V.2 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS**
- V.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**
- V.4 ANALISIS MICROBIOLÓGICO**
- V.5 PRUEBAS ENZIMATICAS**
- V.6 ENSAYOS DE ADHERENCIA E INVASIVIDAD**
- V.7 TITULACION DE LA TOXINA**

VI. RESULTADOS

VII DISCUSION

VIII. CONCLUSION

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

X. ANEXOS

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. COMPARACION DE AFECCIONES CAUSADAS POR ESPECIES DE VIBRIO.

CUADRO 2. FRECUENCIA DE AISLAAMIENTO DE VIBRIO MIMICUS DE SEPTIEMBRE A JUNIO EN MUESTRAS DE OSTION, AGUA Y PESCADO.

CUADRO 3. VARIACION DE LA SALINIDAD Y TEMPERATURA POR MES Y PUNTO DE MUESTREO.

CUADRO 4. PORCENTAJE DE CEPAS POSITIVAS CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

CUADRO 5. ENSAYOS DE ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE LAS CEPAS DE *Vibrio mimicus* EN LA LINEA CELULAR HEp-2 Y CITOTOXICIDAD EN CELULAS CHO.

CUADRO 6. TITULACION DE LA TOXINA OBTENIDA DE LAS CEPAS DE *Vibrio mimicus*.

INDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS.

FIGURA 1. LOCALIZACION DE LA LAGUNA DE PUEBLO VIEJO VERACRUZ.

FIGURA 2. MAPA DE LA LAGUNA Y LAS CIUDADES CERCANAS

FIGURA 3. UBICACIONES DE LOS PUNTOS DE MUESTREO ESTABLECIDOS POR LA COOPERATIVA DE PESCADORES.

FIGURA 4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN AGAR GELATINA.

FIGURA 5. ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN AGAR LECHE DESCREMADA.

FIGURA 6. HEMOLISIS EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y CONEJO.

FIGURA 7. PRESENCIA DE LA ACTIVIDAD DE LECITINASA.

FIGURA 8. LIPASA EN AGAR YEMA DE HUEVO.

FIGURA 9. ACTIVIDAD DE LIPASA EN CALDO TWEEN 80.

FIGURA 10. ACTIVIDAD DE NUCLEASA.

FIGURA 11. ACTIVIDAD DE TERMONUCLEASA.

FIGURA 12. ACTIVIDAD AMILOLITICA EN AGAR ALMIDON.

FIGURAS 13 Y 14. PRESENCIA DE CAPSULA CON TINCION DE ROJO CONGO.

FIGURA 15. TESTIGO DE CELULAS CHO.

FIGURA 16. TESTIGO DE CELULAS HEp-2.

FIGURA 17. EFECTO CITOTOXICO EM CELULAS CHO.

FIGURA 18. INVASIVIDAD EM CELULAS HEp-2.

FIGURA 19. ADHERENCIA DE *Vibrio mimicus* EN CELULAS HEp-2.

GRAFICA 1. NUMERO DE AISLADOS CON RESPECTO A LA VARIACION DE LA SALINIDAD.

GRAFICA 2. NUMERO DE AAISLADOS CON RESPECTO A LA VARIACION DE LA TEMPERATURA.

INTRODUCCIÓN

El control de las enfermedades transmitidas por los alimentos, es un desafío actual en el ámbito mundial dado que no se conoce su incidencia real. La OMS ha estimado que, dependiendo del país, entre el 15% y el 70% de los casos de diarrea en individuos menores de 5 años de edad se debe a alimentos contaminados.

En los Estados Unidos, el Consejo de Ciencias Agrícolas y Tecnológicas (CAST) realizó un estimado del impacto de las enfermedades transmitidas por los alimentos y concluyó que anualmente pueden ocurrir entre 6.5 a 33 millones de casos y hasta 9 000 muertes.

Con relación a la producción, procesamiento y venta de alimentos en los países en vías de desarrollo, por las condiciones socioeconómicas desfavorables, se ha creado una industria informal que cubre un alto porcentaje de la población con un alto riesgo de contraer y transmitir enfermedades por alimentos.

Los datos recogidos durante el período de 1995-1998 por el Sistema Regional de Información y Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, que coordina la Organización Panamericana de la Salud, indican que ocurrieron 3411 brotes con 107,146 personas que enfermaron, y entre éstos un total de 205 muertos.

Teniendo en cuenta la subnotificación de casos y brotes, se puede observar la magnitud del problema de la transmisión de enfermedades por alimentos en países de América Latina y del Caribe (OPS, 1997).

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

Es difícil estimar con precisión las consecuencias de los alimentos contaminados para la salud pública, por no existir información sobre la calidad

de los alimentos entre los diversos sectores que tienen que ver con el abastecimiento (SS,1993).

Los productos del mar (peces, moluscos, crustáceos, entre otros), son de gran importancia para el ser humano, tanto como fuente de alimento (en el 2002 hubo una producción mundial cercana a las 96,029,000 toneladas), como por razones económicas (ganancias en el 2002 por \$548,933,000 dólares)(SAGARPA 2003)

Dentro de los productos alimenticios involucrados como causantes de ETAs se encuentran los productos de la pesca como los moluscos que son animales sésiles, que se alimentan filtrando el agua en donde se cultivan, concentrando los microorganismos y sustancias presentes en el medio, convirtiéndose en vehículos de enfermedades, aumentando su peligrosidad al ser consumidos crudos o ligeramente cocidos (Tamplin y Capers, 1992).

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

Dada su abundancia en el agua, las especies de *Vibrio* son comúnmente aisladas en bivalvos y productos de la pesca. Entre las más de 30 especies del género *Vibrio*, algunas se han reportado como patógenas para el hombre y se han asociado como causantes de brotes de enfermedades (Chakraborty et al., 1997), entre las que sobresalen como agentes etiológicos están *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Janda, et al., 1998).

Los vibrios se encuentran distribuidos en el ambiente acuático a nivel mundial, generalmente en aguas cálidas cuando la temperatura se encuentra alrededor de 17°C y diversos intervalos de salinidad dependiendo de la especie (Wright et al., 1996). Los vibrios causantes de enfermedades en el hombre son bacterias de vida libre o asociados con el fitoplancton, zooplancton, crustáceos y moluscos en las costas y ambiente estuarino (Lipp et al., 2002).

Existe una gran cantidad de reportes sobre cepas de *V. cholerae* con reacciones bioquímicas atípicas, tradicionalmente estas cepas se han

reportado con designaciones tales como *V. cholerae* lisina descarboxilasa negativo, *V. cholerae* sacarosa negativo; Davis y colaboradores (1981) estudiaron seis cepas representativas de estos biogrupos poco usuales utilizando hibridación con DNA y realizando análisis fenotípicos; según los estudios resultaron cepas atípicas de *V. cholerae*; sin embargo, el grupo de las cepas sacarosa negativo se relacionó del 24 al 54% con *V. cholerae*, basándose en estos resultados y en las diferencias fenotípicas se propuso una nueva especie *V. mimicus* por el hecho de que las cepas imitan a *V. cholerae* (Davis et al., 1981).

CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO

Al estar *V. mimicus* muy emparentado con *V. cholerae*, comparten múltiples características fenotípicas y genotípicas, como son: habitar en agua dulce, aglutinar con un mismo anticuerpo monoclonal dirigido contra el flagelo (Simonson & Siebeling 1988), tener dos cromosomas (Okada et al, 2005) e incluso son capaces de transferirse mutuamente información genética. (Boyd et al, 2000). En estudios recientes, se ha comprobado que estas dos especies dentro del género *Vibrio*, son las que filogenéticamente están más relacionadas entre si (Thompson et. al, 2004).

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

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

(Madigan et al, 2002)

Vibrio mimicus es una bacilo curvo Gram negativo, oxidasa positivo, móvil con un flagelo polar (Fig. 1.) (Shandera, 1983; Miyoshi, 1997), considerado un no fermentador de la sacarosa (Fig. 2), es un microorganismo halotolerante, crece en intervalos de cloruro de sodio de 0 a 3%, es catalasa positivo, fermenta la glucosa sin producción de gas, Voges-Proskauer negativo, se produce ácido a partir de sacarosa, galactosa, maltosa, manitol y manosa, pero no de arabinosa, celobiosa, arginina y sorbitol, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C incubándolos de 18 a 24 horas siendo su máxima 45°C, pero es capaz de sobrevivir de -30 a 4°C, en un pH de 5-11, con una actividad mínima de agua de 0.737. En presencia de NaCl crece óptimamente hasta una concentración de 17 Unidades Prácticas de Salinidad (UPS), pero crece también en ausencia de esta sal (Wong, Chen & Ming Yu., 1994).

HÁBITAT Y RESERVORIOS

V. mimicus es reconocido como un patógeno humano, de crustáceos y algunos peces de importancia económica (Shandera, et. al, 1983, Miyoshi et. al, 1997, Vandenberghe et al, 1999, Wong et al, 1995). Es de hábitat acuático; se ha aislado de costas, estuarios, ríos, lagos y lagunas de agua dulce y salada de las zonas templadas o cálidas (Chowdhury et al, 1989).

Se encuentra formando parte de la microbiota del zooplancton; la manera que tiene de persistir en el medio ambiente no ha sido estudiada, pero se cree que al igual que *V. cholerae* es capaz de formar biofilms sobre la superficie de plantas acuáticas, algas filamentosas, insectos (o sus huevecillos), copépodos, crustáceos y moluscos que se alimentan por filtración (Vieira et al, 2001, Reidl & Klose 2002) debido a la gran similitud que hay entre estos dos microorganismos.

Se sabe además que algunas especies de este género (incluyendo algunas patógenas para el hombre), se encuentran formando parte de la microbiota normal de los bivalvos (Thompson et. al, 2004) por lo cual es probable que entre ellas este *V. mimicus*. También se le ha encontrado en el sedimento en las épocas de frío y en raíces de plantas acuáticas (Chowdhury et. al., 1989).

Es un contaminante importante en agua no potable y productos de la pesca como pescados, crustáceos, huevos de tortuga, y moluscos bivalvos, en donde puede ser causa del deterioro de los mismos. (Wong et al, 1993).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las poblaciones de este microorganismo no se mantienen constantes a lo largo de todo el año, debido a factores ambientales como son el pH del agua, la salinidad, la temperatura y nutrientes orgánicos (Vieira et al., 2001). Se ha reportado que en verano aumenta la concentración de estos microorganismos y a su vez el número de casos clínicos causados por esta bacteria, todo esto debido a que el calor promueve la proliferación de las poblaciones de microorganismos, y en cambio en invierno cuando disminuye la temperatura de la columna de agua las poblaciones disminuyen (Vieira et al., 2001, Chowdhury et al, 1989). La quitina así como algunos aminoácidos y péptidos muestran un efecto protector a bajas temperaturas en algunas especies de *Vibrios* (Amako, et al 1987; Karunasagar, Venugopal and Segar, 1986); aunque también se ha observado que bajo condiciones no favorables pasan a un estado de disminución de la actividad respiratoria llamado “viable no cultivable” y por ello, puede no ser detectado en los recuentos (Okada et al, 2005).

Existen reportes que nos indican la presencia de este microorganismo prácticamente en las aguas de casi todo el mundo, hay aislamientos en las aguas del océano pacífico, atlántico, Índico y del mar mediterráneo, en países como Japón (Alam et al, 1996, Shinoda et al, 2004, Chowdhury et al, 1989, Muiyoshi et al, 1997), Taiwán (Wong et al, 1993), China (Chowdhury et al, 1989), e India (Chowdhury et al, 1989, Davis et al, 1981, Albert et al, 1992) en el continente Asiático, Nueva Zelanda, Filipinas (Davis et al 1981) y Australia (Payne et al, 2004, Wong et al, 1995) en Oceanía, Egipto (Davis et al 1981), y Senegal (Schandevyl et al, 1984) en África, España (Pérez et al, 2001), Francia (Hervio-Heath et al, 2002), Italia (Baffone et al, 2001) y Rumania (Janda et al, 1988) en Europa, y en Perú (Cabezas et al, 2005), Brasil (Vieira et al, 2001), Cuba (Leyva et al, 1996), Ecuador (Vandenberghe et al, 1999), Costa Rica

(Campos et al, 1996, Acuña et al , 1999), México (Davis et al, 1981, Vandenberghe et al, 1999), Estados Unidos (Davis et al, 1981, Marano et al, 2000, CDC 2004), y Canadá (Davis et al, 1981) en América.

EPIDEMIOLOGÍA

A partir de 1981 que se identificó a *V. mimicus* como una especie distinta a *V. cholerae*, se comenzaron a tener reportes sobre la posible patogenicidad de la misma, uno de los primeros reportes es de Bangladesh en 1981, en donde se informa que *V. mimicus* se vio involucrado dos casos de otitis, uno en una persona de 39 años y el otro en un niño, ambos causados por la exposición al agua de mar; otro de estos reportes es el de 17 casos de gastroenteritis en adultos que habían consumido ostiones crudos; así, otros padecimientos como infección de heridas expuestas al agua de mar, también fueron causados por esta bacteria (Davis et al., 1981).

Con el paso del tiempo, se han reportado mas casos en otras partes del mundo, por ejemplo, en 1991 hubo una epidemia de cólera en América latina (que corresponde a la séptima pandemia), durante ésta, se asociaron casos de diarrea severa debido a la presencia de *V. mimicus* en Costa Rica (Campos et al, 1996); otros reportes como el que reporta Albert et al, en 1992 en donde hubo varios casos de diarrea severa y un caso de bacteriemia en un niño; también en la parte norte de Brasil se informaron casos de diarrea, identificando cepas atípicas de *Vibrio cholerae* sacarosa negativo, confirmando posteriormente a *Vibrio mimicus* (Vieira et al., 2001).

El 12 de febrero del año 2005 después de una fiesta de carnavales en Cuncashca provincia de Carhuaz en Perú, se produjo un brote de diarrea aguda afectando a 32 personas de las cuales 31 eran mayores de 5 años y sólo un menor de 5 años, en los que se determinó que *V. mimicus* fue el agente causal (Cabezas et al, 2005).

Los alimentos que principalmente están involucrados en su transmisión son; ostras, ostiones, huevos de tortuga, camarón y pescado que se consumen crudos o poco cocidos, además de la exposición al agua de mar. (Wong 1994, Campos et al, 1996).

PATOGÉNESIS

V. mimicus es capaz de causar varios cuadros clínicos, como son: gastroenteritis, otitis, infección de heridas, diarrea tipo cólera, disentería, y en muy raras ocasiones septicemia.

La dosis infectiva aún se desconoce, pero se ha considerado que puede ser similar a la de *Vibrio cholerae* (10^4 a 10^9 UFC) debido a la estrecha relación entre ambos (Reidl & Klose, 2002).

El periodo de incubación puede variar de persona a persona desde unas cuantas horas después de ingerir el alimento hasta tres a cuatro días después dependiendo del inóculo con el que se halla tenido contacto y el estado inmune de la persona.

SIGNOS Y SÍNTOMAS

Los síntomas de la infección intestinal incluyen diarrea, náusea, vómito y dolores abdominales acompañados algunas veces de fiebre, cuando se trata de disentería a todo lo anterior le acompaña diarrea sanguinolenta (Shandera 1983).

En el caso de la diarrea tipo cólera, los síntomas son: diarrea frecuente en cantidad y frecuencia, líquidas y de blanquecinas (agua de arroz) hasta amarillentas, con olor característico a pescado o marisco, acompañada de vómito, y gran afección general, piel fría, mucosas secas e hipotensión. (Pérez *et al*, 2001).

En los casos de otitis por lo general se presenta malestar general, mareos, fiebre y en casos severos supuración (Shandera *et al*, 1983).

El tratamiento antimicrobiano está indicado en cuadros extra intestinales graves y crónicos, el tratamiento de elección es la tetraciclina, que es el antibiótico que ha demostrado una mayor eficacia, así como el cloramfenicol (García *et al.*, 2000).

En el caso de la diarrea y gastroenteritis se usa terapia de rehidratación y ya que es una afección autolimitante, no requiere el uso de antibióticos, pero en casos severos se pueden usar (Pérez *et al*, 2001).

Cuadro 1 . Comparación de afecciones causadas por especies de vibrio.

Especies de Vibrio	Gastroenteritis(%)	Infección de heridas(%)	Septicemia(%)	Mixtas(%)
<i>V. mimicus</i>	85	3	3	----
<i>V.alginoliticus</i>	5-12	71	1	10-15
<i>V. vulnificus</i>	5	45	43	7
<i>V. cholerae no-01</i>	67	9	15	----
<i>V. parahemoliticus</i>	59	34	5	2

Fuente: Pavia *et al.*, 1989.

FACTORES DE VIRULENCIA

Los miembros del género *Vibrio spp.* tienen una alta actividad catabólica, producen una gran variedad de enzimas líticas extracelulares, como son quitinasas, lipasas, proteasas entre otras (Okada *et al.*, 2005), asimismo se han descrito diversos factores de virulencia entre los que destacan los factores de colonización de células huésped (adhesinas, hemaglutininas, cápsula, flagelo, pilis, entre otros), hemolisinas, proteasas (colagenasas, elastasas, mucinasas, metaloproteasas, entre otras), sideróforos, toxinas, citolicinas, fosfolipasas, lipasas, nucleasas, entre otros (Wong *et al.*, 1993, García & Landgraf 1998, Janda *et al.*, 1988, Baffone *et al.*, 2001, Reidl & Klose 2002).

En el caso de *Vibrio mimicus* no se sabe con precisión cual es su mecanismo de patogenicidad, pero se han descrito factores de virulencia, entre ellos tenemos principalmente una hemolisina termolábil, llamada VMH, la cual está altamente conservada en la especie, estrechamente relacionada a la hemolisina termolábil de *V. cholerae* la cual funciona como enterotoxina (Bi *et al.* 2001, Li *et al.*, 2005); también se ha encontrado una hemolisina

termoestable la Vm-TDH, estrechamente relacionada con la TDH de *V. parahaemolyticus*, esta toxina le da la capacidad de producir diarrea tipo disentería; *V. mimicus* obtiene este gen por transferencia horizontal de DNA, ya que el gen de la TDH se encuentra en un transposón (Terai *et al*, 1991).

Se han descrito además en *V. mimicus* la enterotoxina termoestable (Vm-ST), la enterotoxina termolabil (Vm-LT) y toxina tipo cólera (CT), relacionadas estructuralmente con las producidas por *Vibrio cholerae* (Spira *et al*, 1984, Shi *et al*, 2000). La CT producida por *V. mimicus* es fisicoquímica, biológica, funcional e inmunológicamente indistinguible de la sintetizada por *V. cholerae*, lo que indica que las cepas toxigénicas de *V. mimicus*, son reservorios de los genes de la toxina colérica (Kaper *et al*, 1986), al ser susceptibles a la infección por el fago CTX ϕ (Boyd *et al*, 2000)

Asimismo, se ha descrito la presencia de proteasas, una de ellas además de la actividad proteolítica es una hemaglutinina (Vm-HA/proteasa) y ayuda a la adherencia (Alam *et al*, 1997), otra que es capaz de cambiar la permeabilidad de los vasos sanguíneos y generar edema, así como de causar la acumulación de fluido en asa ligada de conejo la VMP (Chowdhury *et al*, 1991) y en últimas fechas se ha descrito otra que tiene capacidad de colagenasa VMC (Lee *et al*, 2005).

Además, se han caracterizado varias hemaglutininas, relacionadas con la adherencia a la mucosa intestinal, entre ellas el lipopolisacárido (Vm-LPSHA), y una proteína de membrana (Vm-OMPHA) (Alam *et al*, 1997).

En el caso de los sideróforos se ha visto que ocurre algo contrario a lo esperado, ya que se ha descrito que las bacterias del género *Vibrio spp.* por lo general producen vibriobactina como el mayor sideróforo, pero *V. mimicus* presenta aerobactina como mayor sideróforo, que está más relacionado con las enterobacterias y con el género *Aeromonas*. (Moon *et al*, 2004).

En *V. cholerae*, se ha descrito que las lipasas, principalmente la fosfolipasa es capaz de causar secreción intestinal (Fiore *et al*, 1997) en *V. mimicus* se describió una fosfolipasa A que es citotóxica para línea celular de peces (Lee *et al*, 2002), pero su rol en la patogenicidad humana se desconoce.

Dentro de la familia *Vibrionaceae* se han descrito otro tipo de factores de virulencia que no han sido descrito en *V. mimicus*, como la cápsula, la cual es juega un papel muy importante en la patogenicidad de *V. vulnificus*, y *V. cholerae* O139, tanto para la colonización como para la sobrevivencia dentro y fuera del huésped (Wright *et al*, 1999, Nesper *et al*, 2002).

Así mismo otros autores refieren a las nucleasas como otras enzimas extracelulares importantes en la virulencia, principalmente en *V. vulnificus* (García & Landgraf 1998).

III. JUSTIFICACIÓN

Los alimentos como los productos de la pesca pueden ser vehículos de transmisión de microorganismos patógenos causantes de gastroenteritis, entre los que se puede encontrar a *Vibrio mimicus*. En México no existe información publicada sobre el aislamiento de este microorganismo en alimentos de la pesca como los ostiones que se extraen con fines comerciales en la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz y si se considera que en el país las gastroenteritis ocupan el segundo lugar desde el punto de vista de la salud pública, se contempló la importancia de llevar a cabo la investigación sobre *Vibrio mimicus* en pescados, agua y ostiones así como la detección de algunos factores implicados en la virulencia.

OBJETIVO GENERAL

Fenotipificar cepas de *Vibrio mimicus* aisladas de agua, pescado y ostiones mediante la producción de enzimas y ensayos celulares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar a *Vibrio mimicus* de agua, pescado y ostión.
- Evaluar el efecto de la temperatura y salinidad en el aislamiento de *Vibrio mimicus*.
- Evaluar la producción de enzimas como factores de virulencia.
- Realizar ensayos de biología celular en las líneas CHO y HEP-2 para evaluar el efecto citotóxico, adherencia e invasividad.

IV. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Recolección de la Muestra



Determinación de factores ambientales



Tratamiento de la muestra



Análisis microbiológico



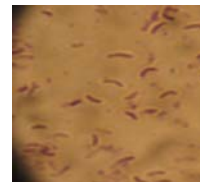
Aislamiento e identificación



Evaluación enzimática



Ensayos de adherencia
e invasividad



METODOLOGÍA

Se analizaron un total de 340 muestras, en un periodo de tiempo comprendido entre Septiembre del 2005 a Junio del 2006, (de las cuales 11 de ostión, 11 de pescado y 12 de agua por mes) procedentes de la laguna de Pueblo Viejo.

V.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE MUESTREO

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

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

Los asentamientos humanos más importantes situados en sus márgenes son Cd. Cuahutémoc y Tampico Alto en Veracruz. El sistema lagunar tiene una profundidad máxima de 1.5 m durante la época de lluvias, y una mínima de 0.75 m en época de estiaje, la flora circundante corresponde a la selva baja aunque debido a la acción del hombre actualmente predominan los pastizales y matorrales, la temperatura del agua se mantiene entre 16.6 y 30.4° C en verano, y la salinidad varía entre 1.19 y 27.3 UPS, el pH del agua se encuentra entre los 7.4 y 8.7.

La principal actividad comercial es la pesca, y la cosecha de ostiones, ya que la laguna ocupa el segundo lugar en producción del estado de Veracruz.

Actualmente la laguna se ve afectada por las descargas de aguas residuales provenientes de los asentamientos humanos aledaños y de la ciudad de

Tampico Tamaulipas, motivo por el cual la calidad de los productos ha ido disminuyendo con el paso del tiempo (Contreras 1985).



Fig. 1 Localización de la laguna de Pueblo Viejo



Fig. 2 Mapa de la laguna y las ciudades cercanas

SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para el desarrollo de este proyecto, se contemplaron 12 estaciones de colecta en los puntos que se consideraron críticos, de acuerdo a las Cooperativas y al Ayuntamiento de la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. Se realizó el muestreo de Septiembre del 2005 a Junio del 2006, los puntos de muestreo fueron: El Bajo (1), Punta de Buda (2), Santa Clara (3), Ensenada (4), El Ciruelo (5), Cruz de Piedra (6), Isleta de Corralillo (7), Isleta de Tomates (8), Medianía (9), Tamales (10), Punta de Malagana (11), El Puente (12) Para el caso de los ostiones solo se trabajaron 11 estaciones, ya que, el puente tiene una profundidad de aproximadamente 30 m. Por lo que la recolección fue de 11 muestras de ostión, 11 de pescado y 12 de agua por mes.

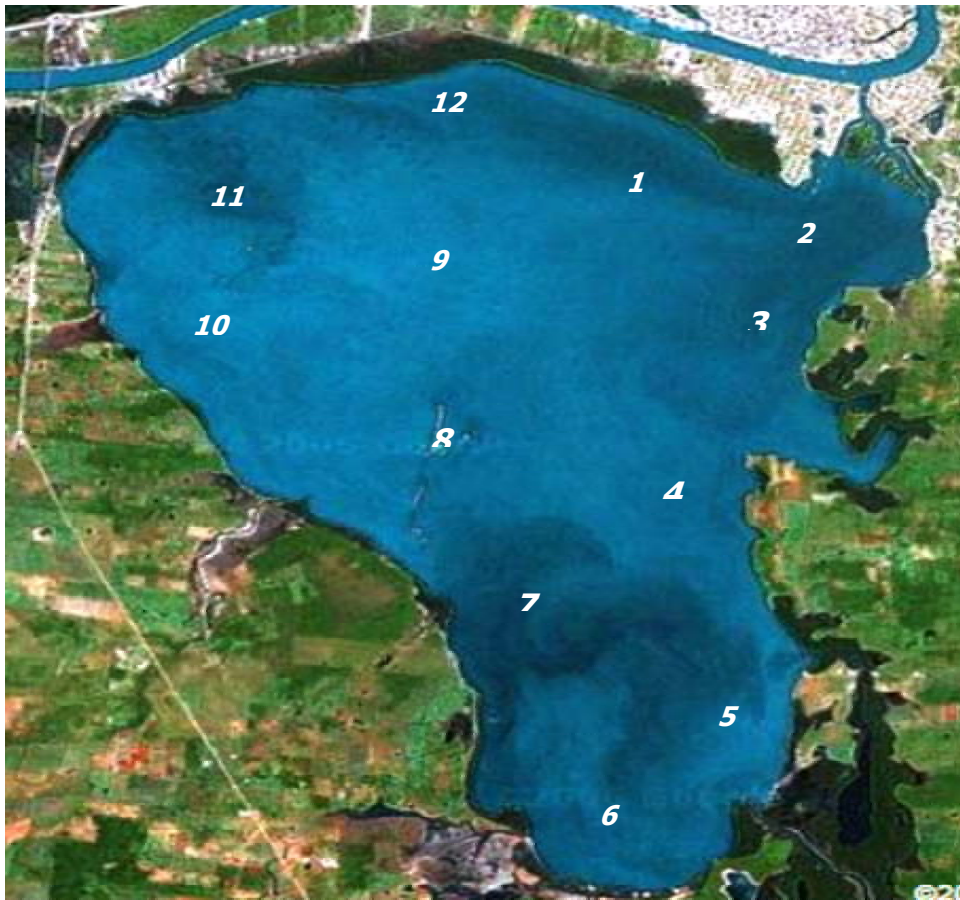


Fig. 3 Ubicaciones de los puntos de muestreo establecidos por la cooperativa de pescadores

V.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

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

Las muestras de ostiones (40 ejemplares por muestra), obtenidas de cada punto de muestreo, se lavaron con un cepillo y abundante agua, para eliminar

el lodo y las algas, posteriormente se desconcharon en condiciones asépticas (Elliot, et al., 1995) y se homogeneizaron en licuadora de manera aséptica. Para la muestra de pescado (3 a 4 piezas por estación) se cortó cabeza y cola homogenizándose de igual manera que para el ostión.

V.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

La metodología utilizada para el aislamiento e identificación de *Vibrio mimicus* a partir de ostiones, pescados y de agua, fue la descrita en el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (BAM_FDA) (Elliot, et al., 1995).

De cada homogeneizado de ostiones, se pesaron 50g en matraces que contenían 450 mL de agua peptonada alcalina (APA) (pH 8.5-9), para obtener la dilución 10^1 . De las muestras de agua se transfirieron 25 mL a matraces que contenían 225 mL de APA, para tener la dilución 1:10. Se hicieron diluciones decimales hasta 10^3 por duplicado en APA. Se incubaron a 35-37° y 42° C por 6 y 18 horas. Cada tubo con crecimiento, se sembró en placas de Petri con agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS) por estría cruzada, y se incubaron a 37°C por 18-24 horas. A tres colonias de cada placa, sacarosa negativo (verdes), circulares de 2 a 3 mm de diámetro, se les realizó la identificación, mediante las pruebas de halofilismo en agar triptosa cloruro (T_1N_n), conteniendo 0, 3, 6, 8 y 10 % de NaCl (T_1N_0 , T_1N_1 , T_1N_3 , T_1N_6 , T_1N_8 y T_1N_{10}). Se incubó por 18-24 h a 35-37° C. A las colonias que crecieron en 0 y 3% de NaCl, se les hizo la tinción de Gram y la prueba de oxidasa. La identificación fenotípica, solo se realizó a las colonias oxidasa positiva y a las que, mediante la tinción fueron bacilos curvos Gram negativos. Las pruebas de metabolismo que se realizaron: movilidad indol ornitina (MIO), triple azúcar hierro (TSI), agar hierro lisina (LIA), caldo glucosa Hugh-Leifson, producción de ácido a partir de sacarosa, arabinosa, celobiosa, lactosa, sorbitol, manitol y manosa, producción de acetil metil carbinol en el medio de Voges Proskauer, descarboxilación de la ornitina y lisina, y la arginina dihidrolasa, citrato de Simóns, y ONPG, además se utilizó el API 20E.

Se determinó la salinidad en cada punto de muestreo mediante un refractómetro de mano ATAGO H-50/H-80, con una escala: Brix 0.0-50.0 % (H-50, Brix 30.0-80.0 % (H-80). La temperatura se determinó mediante un termómetro de campo, con envoltura de acero inoxidable, permitiendo solo ver la escala de temperatura, teniendo en uno de los extremos una cuerda que permitió deslizarlo y sumergirlo hasta aproximadamente 75 cm de profundidad.

IV.7.Detección de enzimas

Las cepas que bioquímicamente se identificaron como *V. mimicus* se les determinó la presencia de algunos factores de virulencia. Las cepas de *V. mimicus* se crecieron en tubos con caldo soya tripticasa con 2% de NaCl. Se incubó por 18-24 horas a 35-37 °C. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y como testigos de *V. mimicus* una muestra clínica y una ambiental, que fueron donadas por el INDRE.

IV.7.1.Proteasa (Sizemore and Stevenson, 1970).

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

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

1. Se creció en caldo BHI (infusión cerebro corazón) por 18-24 horas a 35-37 °C
2. Se sembró por estría cruzada en agar base sangre con 5% de eritrocitos de carnero y de conejo
3. Se incubaron por 18-24 horas a 35- 37°C,
4. Se observó la destrucción de los glóbulos rojos

IV.7.3.Lecitinasa y Lipasa (West and Colwell 1984).

1. Se utilizaron cultivos de 18-24 horas incubados a 35-37 °C en caldo BHI para la producción de lipasas y lecitinasas por *Vibrio mimicus*
2. Se sembró en agar nutritivo que contenga el 10% (v/v) de yema de huevo
3. Se incubo por 7 días a 35-37 °C.
4. Zonas de precipitado alrededor de la colonia demostró la producción de lecitinasa y zonas claras indican la producción de lipasa.

IV.7.3.1.Lipasa con tween 80

5. Se utilizaron cultivos de 18-24 horas incubados a 35-37 °C en caldo BHI para la producción de lipasas.
6. Se sembró en agar nutritivo que contenía en concentración final de tween 80 (polioxietilen sorbitan mono oleato) de 1%
7. Se incubo por 7 días a 35-37 °C.
8. Zonas claras alrededor de la colonia demostrarán la producción de lipasa

IV.7.4.Dnasa (West and Colwell, 1984).

1. Se utilizaron cultivos de *Vibrio mimicus* de 18-24 horas incubados a 35-37 °C en caldo BHI, dos por cepa
2. Uno de los tubos se calentó en baño con agua a ebullición por 1 minuto para evaluar la DNasa termoestable.
3. El otro sin ningún tratamiento térmico.
4. A las placas Petri con agar DNA de timo de Carnero con 1% del colorante de azul de toluidina.
5. Al agar se les realizo un hoyo con pipeta Pasteur con el fin de colocar en cada perforación la muestra tratada y sin tratar.

-
6. Se incubo a 35-37°C por 18-24 horas. La observación se realizará cada hora.
 7. Se observo si se degradaba el DNA mediante un halo color de rosa.

Hidrólisis de la gelatina (2% DE NaCl)

1. Se utilizaron cultivos de *Vibrio mimicus* de 18-24 horas incubados a 35-37 °C en caldo BHI,
2. Se inoculo el medio por picadura y se incubó por 18-24 horas a 35-37°C.
3. La prueba es positiva si al refrigerar por 5 minutos el medio se conserva líquido.

Presencia de cápsula

1. Se utilizaron cultivos de 18-24 horas incubados a 35-37 °C en caldo BHI
2. Se sembró en agar gelosa glicero al 2% de NaCl por estría cruzada
3. Se incubo a 35- 37°C por 18-24 horas.
4. La prueba es positiva al hacerse un frotis del crecimiento
5. Se realizo la tinción por la técnica de tinta china y rojo congo para demostrar la presencia de cápsula.

Evaluar el efecto de la toxina en cultivos celulares (Elliot, *et al*, 1995; Kreger y Lockwood, 1981).

IV.9.1.Obtención de la toxina

1. En un tubo con 15 mL de caldo AKI (sin traducción), se sembrarán las cepas de *V. mimicus*, se incubarán por 4 horas sin agitación a 37°C.
2. Se transferirá el volumen total del tubo a un matraz con 250 mL del medio, se incubará durante 16 horas en agitación (200 rpm), a 37°C.
3. El cultivo se centrifugará en refrigeración a 900 xg por 30 minutos.

-
-
4. El sobrenadante se esterilizará por filtración utilizando una membrana 0.22 μm .
 5. Como testigo positivo se utilizó una cepa de *Vibrio cholerae* ATCC 11623 Y como testigo negativo una cepa de *Escherichia coli* 25922.

IV.9.2.Obtención de la monocapa

1. Se obtendrá un crecimiento confluyente de células de ovario de hámster chino (CHO), en medio F12 con suero fetal de bovino (SFB), al 5%, en condiciones de 5% de CO_2 incubadas a 35-37° C.
2. Se eliminará el suero y el medio. Se agregará un mililitro de pucks (NaCl, KCl, NaHCO_3 y EDTA, se esterilizara por filtración), para lavar la monocapa y se eliminara también. Se añadirá otro mililitro y se incubara 2 minutos a 37°C.
3. Se bajara la monocapa por paracentesis
4. Se agregara 10 mL del medio F12 mas 5% (0.5 mL) de SFB, se disgregara la monocapa (subiendo y bajando con la pipeta).
5. Se transfiriera a otra botella para cultivo 2.5 mL y se agregara 12.5 mL de medio F12 mas 15 % de SFB (1.9 mL), se incubara a 37 °C por 24-48 horas hasta confluencia
6. Se eliminará el medio y suero, se lavará con 1 mL de pucks y con otro mililitro se bajará la monocapa con paracentesis, se agregara 12 mL de medio F12 y 15% (1.8 mL) de SFB y se disgregara la monocapa con la pipeta.

IV.9.3.Efecto de la toxina

7. En una placa de 96 pozos se colocara a cada uno 100 μL de la monocapa con medio F12 y 15 % de SFB. Se incubara a 37° C con 5% de CO_2 por 24 horas. Se realizara por triplicado.

-
8. Se eliminará el medio y suero y se lavará tres veces con regulador salino de fosfatos ((PBS) (NaCl, KCl, NaHPO₄ y K₂HPO₄ 0.1 M, pH 7.2), estéril.
 9. Se agregara por pozo 80 µL de medio F12 y 20 µL del sobrenadante de la toxina (1:5). Se incubara a 37°C, 5% de CO₂ hasta observar el efecto.
 10. Se eliminará el medio y el sobrenadante, se lavará tres veces con PBS estéril, se agregará metanol absoluto hasta cubrir los pozos e inmediatamente se eliminara para luego, volver a lavar otras tres veces con PBS
 11. Se realizará una tinción con colorante de Giemsa cubriendo los pozos, durante 20 minutos, Se recuperará el colorante y se lavará con agua destilada hasta no observar eliminación de colorante.
 12. Se observa en el microscopio invertido y se toman fotos.
 13. Se determina cual es el tiempo en que se tiene la destrucción de la monocapa.
 14. Al determinar el tiempo, se realiza por triplicado.

IV.9.4. Adherencia en la línea celular HEp-2

1. Se sembrará una asada de cada cultivo en tubos con 3 mL de caldo triptona con manosa al 1%, se incubará a 37 °C/ 18 horas/ 100 rpm. Se centrifugara a 2500 rpm/ 20 min/ 4 °C.
2. Se eliminará el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de PBS estéril. Esta es la suspensión bacteriana que se utilizará para el ensayo.
3. Preparación de la microplaca.
4. Las microplacas de 24 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células Hep-2 (células cáncer laríngeo humano), crecidas sobre un cubreobjetos estéril., serán lavados 3 veces con PBS estéril y se eliminará el último lavado.
5. Se colocará en cada pozo 975 µL de medio MEM + 25 µL de la suspensión bacteriana.
6. Se incubará la microplaca a 37 °C/5 % CO₂/ 3 horas.

-
-
7. Se eliminará el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
 8. Se fijaran las células con metanol durante 1 minuto.
 9. Se lavará 3 veces con PBS estéril.
 10. Se realizara una tinción con Giemsa durante 20 minutos y se lavarán los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.
 11. Se deshidratarán las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol. Se montarán las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permount.
 12. Se observará al microscopio con en el objetivo de inmersión (100x).

IV.9.5 Invasividad en la línea celular HEp-2

1. Se sembró una asada de cada cultivo en tubos con 3 mL de caldo triptona con manosa al 1%, se incubaron a 37 °C/ 18 horas/ 100 rpm. Luego se centrifugaron a 2500 rpm/ 20 min / 4 °C.
2. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de PBS estéril.
3. Las microplacas de 24 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células Hep-2 (células cáncer laringeo humano), crecida sobre un cubreobjetos estéril. Fueron lavados 3 veces con PBS estéril y se eliminó el último lavado.
4. Se colocó en cada pozo 975 µL de medio MEM + 25 µL de la suspensión bacteriana.
5. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO₂/ 3 horas.
6. Posteriormente se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
7. Se colocó en cada pozo 1000 µL de medio MEM + Gentamicina (90 µg/mL) + Lizosima (300 µg/mL).
8. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO₂/ 3 horas.
9. Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.

-
10. Se fijaron las células con metanol durante 1 minuto.
 11. Se lavó 3 veces con PBS estéril.
 12. Se tiñó con Giemsa durante 20 minutos y se lavaron los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.
 13. Se deshidrataron las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol. Se montaron las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permunt.
 14. Se observó al microscopio con en el objetivo de inmersión (100x).

IV.9.6. Titulación de la toxina

15. A partir del punto 8 de V.6.3, se agregará en la primera línea de pozos 180 μL de medio F12 mas 20 μL de la toxina (dilución 1:10), se realizarán diluciones subsecuentes, transfiriendo 100 μL a la 2a línea de pozos, y así sucesivamente hasta la línea de pozos 12. A partir de los pozos de la segunda línea hasta la doceava se pusieron 100 μL de medio F12, por lo que se tuvieron las diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240, 1:20480. Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ hasta observar el efecto.
16. Se continuara la metodología a partir del punto 10.

RESULTADOS.

De las 340 muestras analizadas 35 fueron positivas, trabajándose con 1012 UFC sacarosa negativo en el agar TCBS, confirmándose 40 cepas, de las cuales 22 fueron de ostión, 11 de pescado y 7 de agua. En cuanto a la frecuencia de aislamiento, estos se tuvieron durante todo el periodo del muestreo, como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio mimicus* de Septiembre a Junio en muestras de ostión, agua y pescado.

MES	Analizadas	positivas	confirmadas	TIPO DE MUESTRA
Septiembre	11	1	1	OSTIONES
	12	1	1	AGUA
	12	1	2	PESCADO
Octubre	11	1	1	OSTIONES
	12	0	0	AGUA
	12	0	0	PESCADO
Noviembre	11	1	1	OSTIONES
	12	1	1	AGUA
	12	0	0	PESCADO
Diciembre	11	2	2	OSTIONES
	12	0	0	AGUA
	12	0	0	PESCADO
Enero	11	0	0	OSTIONES
	12	1	1	AGUA
	12	2	2	PESCADO
Febrero	11	2	2	OSTIONES
	12	0	0	AGUA
	12	1	1	PESCADO
Marzo	11	3	3	OSTIONES
	12	0	0	AGUA
	12	1	1	PESCADO
Abril	11	3	4	OSTIONES
	12	1	1	AGUA
	12	1	2	PESCADO
Mayo	11	1	2	OSTIONES
	12	2	2	AGUA
	12	2	1	PESCADO
Junio	11	5	6	OSTIONES
	12	1	1	AGUA
	12	1	2	PESCADO
Total	350	35	40	

En el Cuadro 3. se muestra como fue variando la temperatura y la salinidad en la Laguna de Pueblo Viejo Veracruz a lo largo del período de muestreo, donde a partir del mes de Septiembre a Diciembre la salinidad fue incrementando y posteriormente se mantuvo en un intervalo poco variable hasta el mes de Junio.

Con respecto a la temperatura, ésta se mantuvo relativamente constante en el período de muestreo donde la temperatura más baja fue de 17°C en el mes de Febrero y la máxima fue de 32°C en el mes de Mayo y Junio.

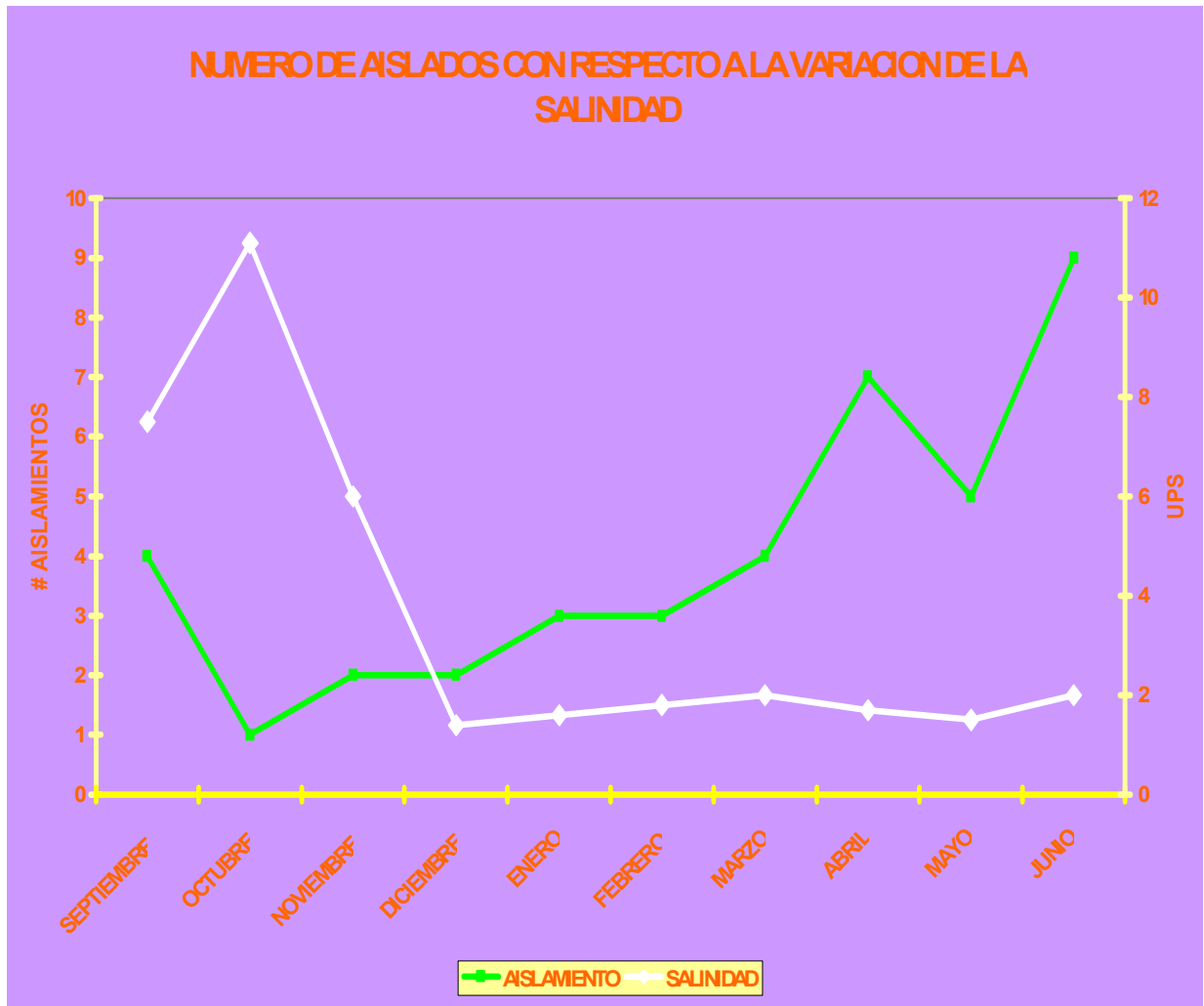
Cuadro 3. Variación de la salinidad (‰) y temperatura por mes y punto de muestreo.

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

- 1.-EL BAJO
- 2.-PUNTA DE BUDA
- 3.-SANTA CLARA
- 4.-ENSENADA
- 5.- EL CIRUELO
- 6.- CRUZ DE PIEDRA

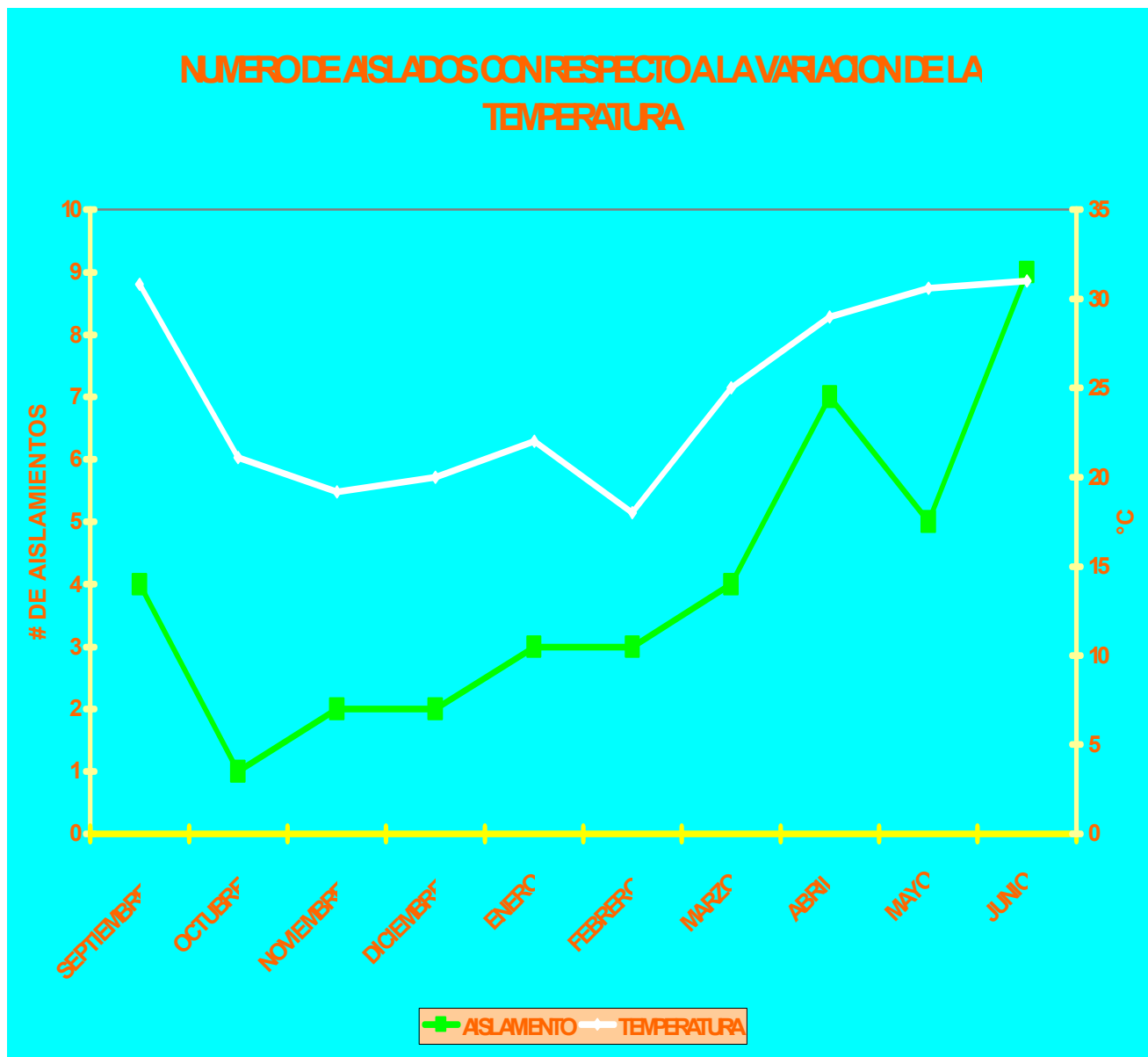
- 7.- ISLETA DE CORRALILLO.
- 8.- ISLETA DE TOMATES.
- 9.- MEDIANIA.
- 10.- TAMALES
- 11.- PUNTA DE MALAGANA.
- 12.- PUENTE HONDO.

Grafica 1.



En la gráfica 1. Se observa que conforme aumenta la salinidad en el mes de Octubre, el aislamiento es menor y conforme esta va disminuyendo en los meses siguientes los aislados van incrementando. La salinidad máxima fue de 21.5‰ en el mes de Junio y la mínima de 3.5‰ en el mes de Noviembre.

Gráfica 2.



Como se muestra en la gráfica 2. *Vibrio mimicus* se aisló a lo largo de todos los meses, siendo mayor el número de aislados cuando la temperatura es más alta, como lo es en los meses de Abril a Junio y el mes de Septiembre con una máxima de 32°C., a pesar de que este parámetro es independiente de la salinidad, otros factores como son: pH, nutrientes orgánicos, entre otros van a afectar el aislamiento del microorganismo.

Cuadro 4. Porcentaje de cepas positivas con respecto a la actividad enzimática.

ENZIMA	% DE CEPAS POSITIVAS
PROTEASAS	100
AMILASAS	35
HEMOLISINAS	100
LECITINASA	100
LIPASAS	100
DNAsa	100
DNAsa/ calor	47.5
CAPSULA	100

Como se observa en el Cuadro 4. Todas las cepas (40/40) mostraron producción de lipasa en el medio Tween 80, la presencia de un halo transparente alrededor del crecimiento en agar yema de huevo, la actividad de proteasa se puso de manifiesto en todas las cepas al manifestar halos transparentes alrededor del crecimiento en agar leche descremada y en agar gelatina. En cuanto a la hemólisis todas las cepas presentaron la destrucción de los eritrocitos, lo cual se manifiesta en una hemólisis beta en ambos tipos de hematófíes. Con respecto a la nucleasa el 100% de las cepas hidrolizo el DNA, en cambio para la termonucleasa solamente el 47.5%. La presencia de cápsula se observo en el 100% de las cepas y por último sólo el 35% mostró actividad amilolítica.



Fig. 4. Actividad proteolítica en agar gelatina.

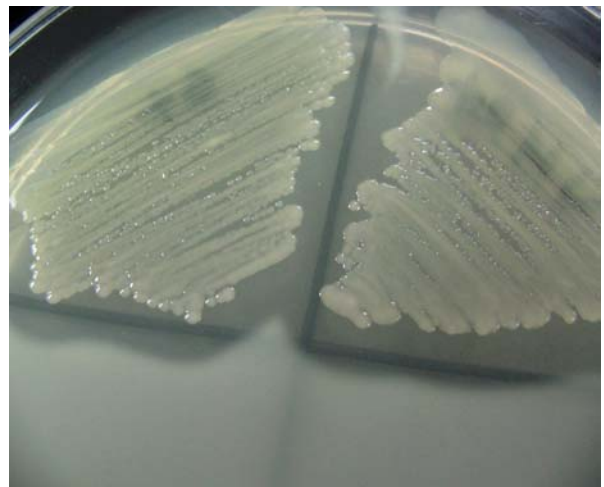


Fig. 5. Actividad proteolítica en agar leche descremada.

La principal proteína de la leche es la caseína, por lo tanto si el microorganismo probado es capaz de producir proteasas extracelulares, éstas actuarán sobre la caseína y la degradaran hasta péptidos, siendo positiva la prueba, zonas claras alrededor del crecimiento, lo cual indica la digestión (fig. 5). Debido a que los metales pesados tienen la capacidad de desnaturizar las proteínas, se uso solución de mercurio como revelador para precipitar a las proteínas presentes en el medio que se encuentran intactas, formando un péptido visible de color blanco en el agar como se muestra en la fig. 4. (García y Landgraf, 1998; MacFaddin, 2003).



Fig. 6 Hemólisis en agar sangre de conejo y carnero

Dependiendo de las características metabólicas de cada microorganismo, se presentan diferentes fenómenos en agar sangre: la hidrólisis gamma, en la cual no hay lisis de los eritrocitos, la hemólisis alfa en la cual la hemoglobina liberada por la ruptura de la membrana del eritrocito es oxidada hasta que se genera biliverdina, dando una coloración verdosa al medio y la hemólisis beta en donde la digestión del grupo hemo de la hemoglobina es total apareciendo un halo transparente alrededor de la colonia (fig. 6). (García y Landgraf, 1998; MacFaddin, 2003).

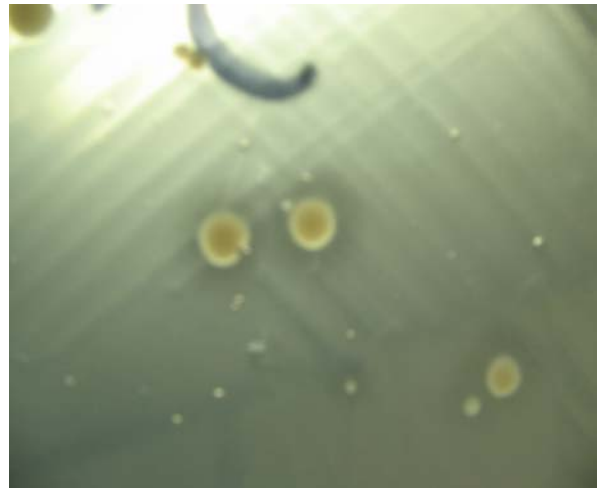


Fig. 7 y 8 Presencia de actividad de lecitinasa y lipasa en agar yema de huevo a las 48 horas de incubación.

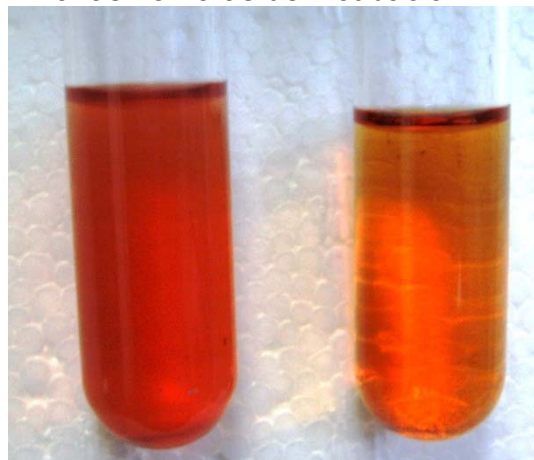


Fig. 9 Actividad de lipasa en caldo Tween 80 (a la derecha testigo negativo)

Algunos microorganismos tienen la capacidad para liberar el ácido olèico esterificado contenido en el Tween 80, por medio de una lipasa o estereasa que da lugar a la liberación de ácido olèico y sorbitol polioxietilado y a un cambio de color en el sustrato debido a que se modifican las características ópticas rotatorias del mismo, dando roja la prueba positiva (fig.9). En tanto la lecitina es uno de los principales componentes en la yema de huevo, esta compuesta por glicerol que tiene eterificados en sus grupos hidroxilo dos ácidos grasos y una fosforilcolina; las más comunes son la A y la C, estas tienen diferentes sitios de corte, las de tipo A separan el ácido graso que está unido al carbono alfa, mientras que la C separa la fosforil colina del resto de la molécula, estos cortes generan un precipitado formando halos opacos (fig. 7). Las lipasas rompen enlaces de los triglicéridos, generando glicerol y ácidos grasos libres; los halos transparentes alrededor del crecimiento indican la digestión de los triglicéridos en la yema de huevo (fig. 8). (García y Landgraf, 1998; MacFaddin, 2003).



Fig. 10. Actividad de nucleasa

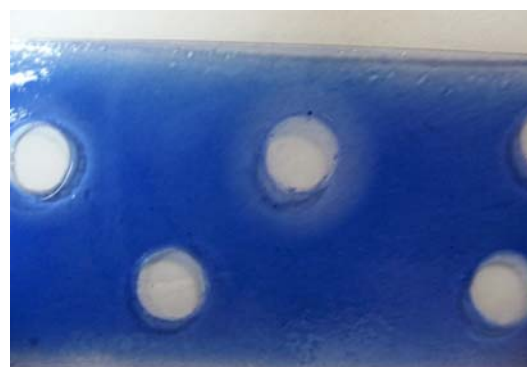


Fig. 11. Actividad de termonucleasa

En la determinación de nucleasas la prueba fue positiva si alrededor de un halo hay un halo rosa lo cual indica la hidrólisis del DNA, esto debido a que en el medio el colorante azul de ortotoluidina y el DNA integro forman un complejo de color azul; cuando el DNA es hidrolizado por la acción de una nucleasa el complejo cambia a un tono rosa (fig. 10 y 11). (Lachica, *et al.* 1971)

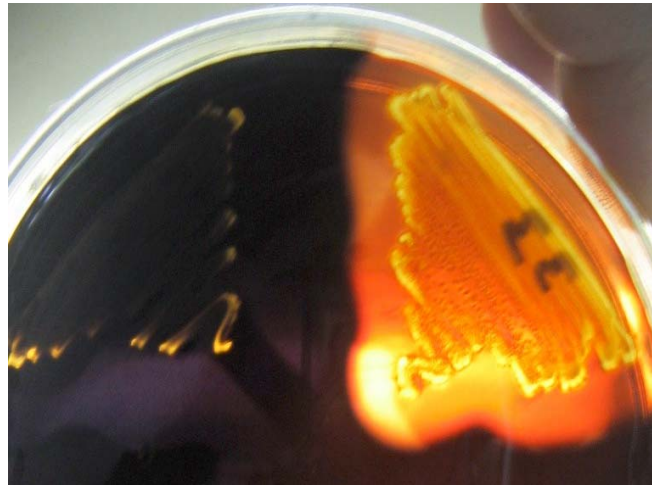


Fig. 12. Actividad amilolítica en agar almidón

La prueba es positiva si al adicionar lugol al crecimiento se aprecian zonas transparentes o amarillas; algunas de estas enzimas degradan el almidón hasta oligosacáridos y glucosa (halo transparente) y algunas otras lo degradan hasta dextrinas (halos amarillos). El color se debe a que el yodo se adsorbe sobre las hélices no ramificadas del almidón, lo que genera el complejo de color azul, a menor número de hélices menor será la interacción y por tanto a mayor digestión el color va desapareciendo (fig. 12). (Dhawale, et al. 1982; MacFaddin,2003).

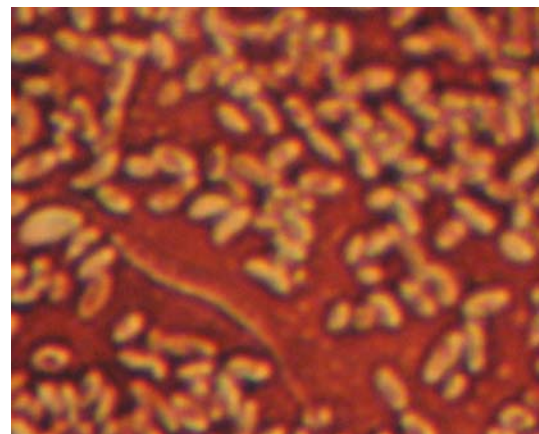
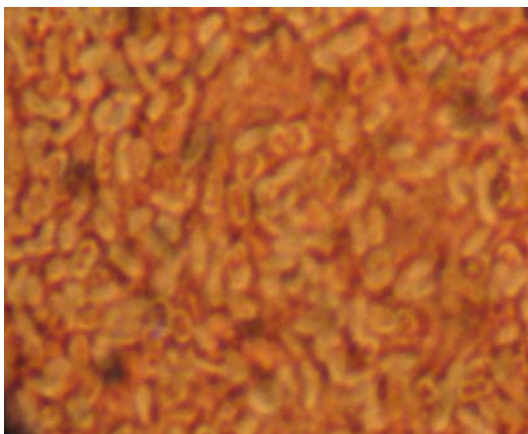


Fig. 13 y 14 Presencia de cápsula con tinción de rojo congo.

Los colorantes ácidos son útiles para observar las estructuras que se encuentran por encima de la pared de las bacterias, debido a que no tiñen a las células, entre estas estructuras esta la capsula, haciéndose evidente por medio de una tinción negativa, como el método de rojo congo, debido a que las partículas del colorante no pueden penetrar a través de la cápsula, pero el resto si lo hace por la acción del mordente; por tanto la prueba es positiva si al observar al objetivo de inmersión se ven halos sin color alrededor de los bacilos teñidos de rojo sobre un fondo azul (Manual de microbiología práctica, 2003).

Cuadro5. Ensayos de adherencia e invasividad de las cepas de *Vibrio mimicus* en la línea celular Hep-2 y citotoxicidad en células CHO.

Cepa	Adh	Inva	Cito	Adh	Cepa	Inva	Adh	Cito
Vm 1	-	-	+	+	Vm21	-	+	+
Vm2	+	-	+	+	Vm22	-	+	+
Vm3	+	-	+	+	Vm23	-	+	+
Vm4	+	-	+	+	Vm24	-	+	+
Vm5	+	-	+	-	Vm25	-	-	+
Vm6	+	+	+	+	Vm26	-	+	+
Vm7	-	+	+	+	Vm27	-	+	-
Vm8	+	-	+	+	Vm28	-	+	+
Vm9	+	-	+	+	Vm29	-	+	+
Vm10	-	+	+	+	Vm30	-	+	+
Vm11	+	-	+	+	Vm31	-	+	+
Vm12	+	-	+	-	Vm32	+	-	+
Vm13	+	-	+	-	Vm33	-	-	+
Vm14	-	-	+	+	Vm34	-	+	+
Vm15	+	-	+	+	Vm35	-	+	+
Vm16	-	-	+	-	Vm36	+	-	+
Vm17	-	+	+	+	Vm37	-	+	+
Vm18	+	+	+	+	Vm38	+	+	+
Vm19	+	+	+	+	Vm39	-	+	+
Vm20	+	-	+	+	Vm40	-	+	+

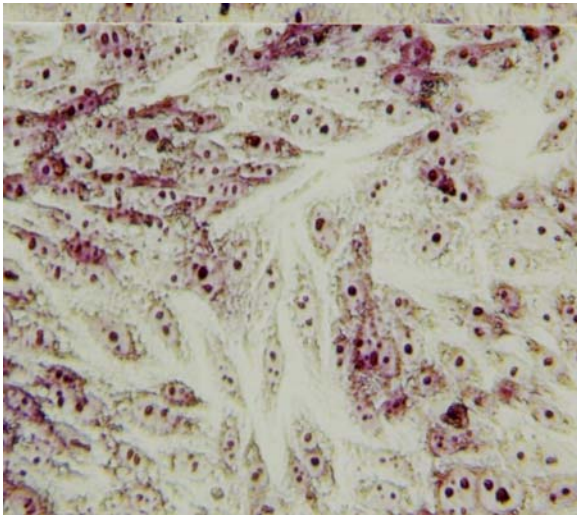


Fig.15 Testigo de células CHO.

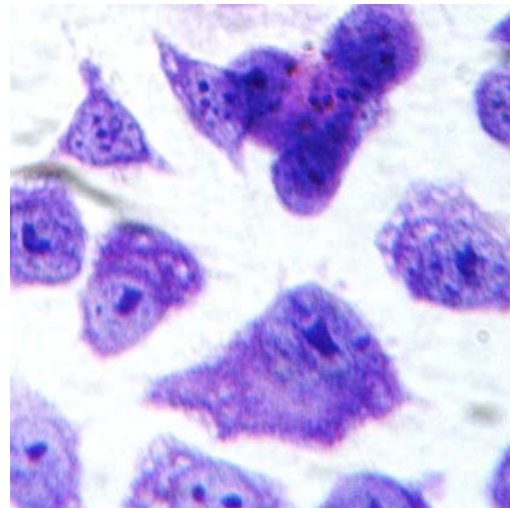


Fig. 16 Testigo de células Hep-2.

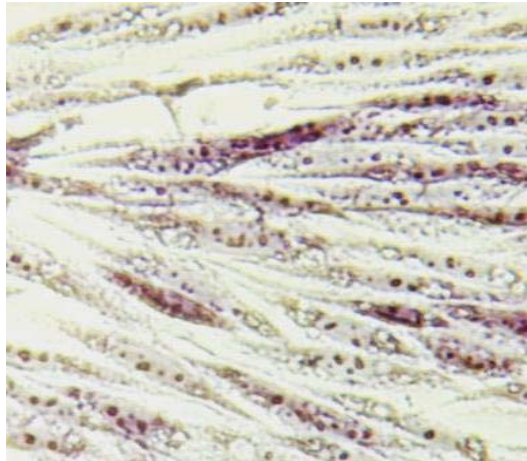


Fig.17 Efecto citotòxico en células CHO demostrado por la elongaciòn de las células comparadas con el testigo (Fig. 15).

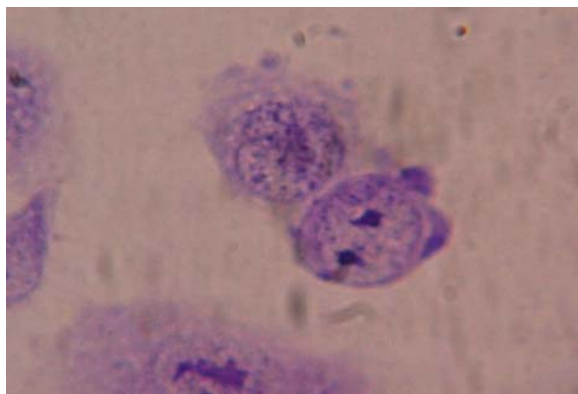


Fig. 18. Invasividad en células Hep-2, vease las bacterias dentro de la célula.

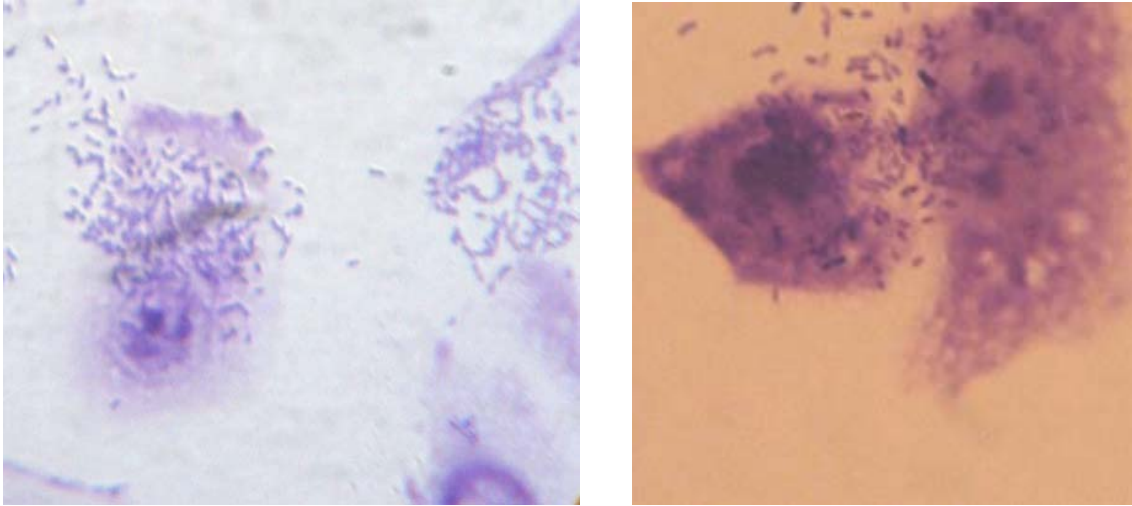


Fig. 19. Adherencia de *Vibrio mimicus* en cèlulas Hep-2.

Cuadro 6. Titulación de la toxina obtenida de las cepas de *Vibrio mimicus*

Cepa	Titulo	Cepa	Titulo
Vm1	1:40	Vm21	1:20
Vm2	1:20	Vm22	1:10
Vm3	1:20	Vm23	1:10
Vm4	1:20	Vm24	1:20
Vm5	1:40	Vm25	1:40
Vm6	1:20	Vm26	1:20
Vm7	1:10	Vm27	1:10
Vm8	1:10	Vm28	1:10
Vm9	1:20	Vm29	1:60
Vm10	1:40	Vm30	1:20
Vm11	1:20	Vm31	1:40
Vm12	1:10	Vm32	1:10
Vm13	1:10	Vm33	1:40
Vm14	1:20	Vm34	1:10
Vm15	1:40	Vm35	1:20
Vm16	1:10	Vm36	1:10
Vm17	1:40	Vm37	1:20
Vm18	1:10	Vm38	1:10
Vm19	1:20	Vm39	1:20
Vm20	1:10	Vm40	1:40

DISCUSION.

V. mimicus se aisló en el 11.8 % (40/340) de las muestras colectadas en la Laguna de pueblo Veracruz, el 55% (22/40) correspondió a ostión, el 27.5% (11/40) para pescado y 17.5% (7/40) en agua; a pesar de que en México no se cuenta con información que nos de un índice de calidad microbiológica de mariscos que se consumen crudos como los ostiones que se extraen con fines comerciales. Datos reportados en Puerto Rico informan sobre el aislamiento de *V. mimicus* en el 16.5 % de almejas, en ostiones el 19%, en agua de almejas y ostiones el 8% y 15% respectivamente (Fontánéz, 2005). Wong *et al*, (1994) informaron que recuperaron del 3.5 al 36% de vibrios en alimentos congelados (pescados, ostiones, almejas entre otros). En japòn se ha recuperado en muestras de pescado crudo (Chowdhury *et al*, 1989).

La literatura ha evidenciado que estos organismos pueden ser vectores de bacterias y virus entéricos, dado el modo de alimentación que poseen y a que estos no reciben un proceso de descontaminación antes de su consumo (Pruzzo *et al*, 2005). Moléculas que ayudan a la colonización y mantenimiento en los tejidos del bivalvo e incluso ser capaces de resistir la acción bactericida de su hemolinfa, por ello se les llega a considerar como parte de la microbiota normal (Pruzzo *et al*, 2005).

Esta documentado que la distribución de los vibrios se ve afectada por la temperatura del agua (Nelly, 1982; Roberts *et al*, 1982; Williams y LaRock, 1985), las concentraciones de vibrios en la columna de agua generalmente es baja en los meses de invierno debido a la sensibilidad de la bacteria a bajas temperaturas y la densidad aumenta durante el verano (Esther *et al* 1994; Chowdhury *et al*, 1989). En este estudio *V. mimicus* se encuentra presente en el medio ambiente a lo largo del periodo de muestreo (Septiembre 2005 a Junio 2006), en el caso del mes de Octubre a Diciembre los aislamientos son escasos, datos comparables con Fontanéz (2005) quién menciona que es menor la densidad de vibrios en ostiones, almejas y en agua en el período de

Octubre a Enero, esto no indica que esta bacteria no estuviera presente en el medio ambiente, sino que es resultado de la baja frecuencia en el aislamiento, dato que concuerdan con lo informado por el CDC (2004) el cual reporta una tasa baja de aislamientos para *V. mimicus* en las costas del golfo de México.

En otros casos el microorganismo se puede encontrar en un estado de viable pero no cultivable (Johnston & Brown, 2002), respuesta de sobrevivencia a condiciones de estrés tales como bajas temperaturas y pocos nutrientes.

Este microorganismo sigue un ciclo estacional distinto, el cual varía con el tipo de zona climática, los recuentos más altos de este microorganismo en las muestras se dieron en los meses de primavera-verano, datos comparables con los reportados por Fontanéz (2005) en Puerto Rico; quién menciona que en los meses de verano la superficie del agua provee la temperatura y nutrientes favorables para el crecimiento del microorganismo, lo que nos indica que *Vibrio mimicus* se encuentra formando parte del zooplancton o fitoplancton (Tamplin *et al.*, 1990; CECODES, 1988), datos que concuerdan con lo reportado por Chowdhury *et al.*, en 1989 y Reidl & Klose en 2002, donde mencionan que *V. mimicus* se ha aislado con frecuencia del agua de los lagos, ríos y lagunas; la forma en que *V. mimicus* se mantiene en el medio acuático no esta del todo descrita, pero se puede decir que lo hace de la misma forma que *Vibrio cholerae*, formando un biofilm sobre la superficie de algunos crustáceos como los copépodos o otros organismos como algunas algas, y sobre las raíces de las plantas acuáticas. Campos *et al.*, 1996 describió la importancia que tiene el agua como fuente de esta bacteria en casos de contaminación cruzada, reportando casos por consumo de huevos de tortuga.

Se ha reportado que *Vibrio mimicus* se ve afectado por la cantidad de nutrientes orgánicos (Tamplin & Colwell, 1986) y metales (Mackie & Birkbeck., 1992). En ambientes estuarinos el hierro esta presente en su estado mas oxidado, por lo que no puede ser utilizado por las bacterias (Koga & Takumi., 1995), la limitación del hierro en estos ambientes provoca que microorganismos como los vibrios estén obligados a sintetizar sideróforos haciéndolo disponible para el microorganismo a través de proteínas receptoras específicas de membrana (Wolf & Crosa., 1986). Esta presencia de hierro pudo favorecer la

presencia de *V. mimicus* en los ostiones. Carranza (1986) menciona que las concentraciones de hierro más altas están en el sedimento lugar en que son cultivadas las almejas y ostiones; posiblemente este metal mantenga la viabilidad de la bacteria en los meses de frío para la síntesis de proteínas.

Boneta (2001), estudió que *V. parahaemolyticus* crece eficientemente en altas concentraciones de hierro, entonces en medios de cultivo sin hierro la bacteria crece limitada debido a que no alcanza la fase logarítmica, esto lleva a pensar que la competencia entre las poblaciones bacterianas por los metales y nutrientes puede afectar la supervivencia y distribución de este microorganismo.

La literatura sugiere que la densidad de los vibrios se correlaciona con los incrementos de salinidad del agua (Joseph *et al.*, 1983); este aumento se atribuye al alto índice de evaporación y la poca precipitación pluvial que existe en los meses de verano (Rivera & Hazen, 1998) como se muestra en los resultados obtenidos (Cuadro 3). Se estima que el intervalo de salinidad óptimo que favorece el crecimiento de los vibrios en la columna del agua oscila entre 16-42 Unidades Prácticas de Salinidad (UPS) (Bockemuhl & Triemer, 1974; Joseph, 1974). Está descrito que *V. cholerae* crece óptimamente a una concentración de 5-15 UPS, pero también en ausencia de sal; debido a la semejanza que existe entre ambos se puede inferir que es similar.

Vibrio mimicus ha sido aislado con mayor frecuencia en sitios con baja salinidad (Singleton *et al.*, 1982). Estos datos no concuerdan del todo con lo obtenido, ya que en los meses de diciembre a Junio donde la salinidad fue en continuo aumento hasta casi ser 10 veces mayor (Cuadro 3), fenómeno que está relacionado con la época de lluvias y con ello la afluencia de agua dulce al cuerpo de agua disminuye, además la presencia de tormentas tropicales (que por esta época del año atacan a las costas del golfo) provoca la entrada de agua salada del mar hacia la laguna por acción del viento, aumentando la salinidad hasta 16.5 ‰, concentración a la cual *V. mimicus* se desarrolla óptimamente, ya que su límite de tolerancia a la sal es de hasta 60‰. (Elliot *et al.*, 1998). Por lo tanto los cambios en la salinidad son de importancia, pero no representan condiciones adversas para la bacteria en estudio, al contrario al

haber más iones Na^+ se estimula su crecimiento (Wong & Ming 1994), motivo por el cual se aisló mayormente durante los meses de Marzo a Junio donde la concentración de sales fue mayor, como se ve en la (Tabla 3) aunque se puede inferir que la temperatura y la salinidad son parámetros independientes en el aislamiento de *Vibrio mimicus* ya que este puede tolerar temperaturas bajas y altas salinidades (Kaspar et al, 1993). Factores adicionales como el pH, concentración de nutrientes, la presencia de fagos líticos o la competencia de poblaciones bacterianas puede afectar la supervivencia y distribución de esta bacteria en el ambiente (Wright et al, 1996).

La distribución de los aislamientos de acuerdo a la zona de muestreo se muestra en la Figura 3, donde se indica el tipo de producto de donde se está aislando, y la ubicación geográfica del punto de muestro, en donde vemos que *V. mimicus* esta distribuido en prácticamente toda la laguna, aunque los aislamientos mas representativos son los de ostiones, ya que estos al ser sedentarios, nos dan una idea de las microbiota que comúnmente se encuentra en esa zona de la laguna.

Vibrio mimicus se ha aislado de muestras clínicas así como de ambientales, siendo responsable de varias infecciones humanas; por ello nos dimos a la tarea de comprobar la posible patogenicidad de las cepas aisladas de *Vibrio mimicus* montando pruebas para poner de manifiesto la producción de enzimas con actividad asociada a la virulencia, por medio de medios de cultivo capaces de demostrar dicha actividad.

De las 40 cepas aisladas de Septiembre a Junio se obtuvieron los siguientes resultados; el 100% (40/40) tienen la capacidad de producir proteasas; para determinar la presencia de proteasas, usamos dos tipos de proteínas como sustrato, la caseína y la gelatina, esto para ver si las proteasas producidas por *V. mimicus* tiene alguna especificidad por enzimas complejas como la caseína o por proteínas más sencillas como la gelatina y obtuvimos una lisis total de ambos sustratos en todas las cepas, estos resultados son semejantes a los de Alam *et al*, 1996 el cual menciona que el 95% de las cepas de *V. mimicus* son positivas a la producción de proteasas. Esto nos hace pensar que las cepas

aisladas tienen por lo menos una de las 3 proteasas descritas hasta la fecha en este organismo, aunque no se ha descrito con exactitud el papel que tienen estas enzimas en la virulencia; hay estudios donde indican que tienen diversas actividades, entre ellas tenemos a la HA/proteasa, la cual es una hemaglutinina con actividad de proteasa, esta ayuda a colonizar la pared del intestino, además con su doble acción puede contribuir a la destrucción del moco que está cubriendo el epitelio intestinal (Alam *et al*, 1996), otra proteasa descrita es la VMC, que es una metaloproteasa con actividad de colagenasa, dándole la capacidad a la bacteria de poder destruir la matriz extracelular de las células del intestino y al tener una alta similitud con otras colagenasas descritas en otros *Vibrios*, se considera un importante factor de virulencia (Lee *et al*, 2005); y por último tenemos a la VMP, la cual es también una metaloproteasa capaz de cambiar la permeabilidad vascular, y causar la acumulación de fluido en asa ligada de conejo y funcionar un momento dado como una toxina (Chowdhury *et al*, 1991). Booth *et al*; (1984) menciona que las proteasas juegan un papel importante en la activación de la toxina tipo colérica cuando estas son secretadas al medio. La metaloproteasa de *Vibrio cholerae* aumenta la actividad de la enterotoxina colérica, ya que esta rompe la capa del epitelio mucoso incrementando la colonización (Crowther *et al*, 1987).

Aunque se desconoce el papel de las toxinas o sustancias tóxicas de este microorganismo podemos aseverar que esta enzima juega un papel similar en *Vibrio mimicus*.

Otra enzima muy importante descrita en el género *Vibrio* como factor de virulencia, es la hemolisina, *V. parahaemolyticus* posee como principal factor de virulencia la TDH (Terai *et al*, 1991), en nuestro caso todas las cepas analizadas presentaron una hemólisis β con eritrocitos de carnero y de conejo, mostrando que las hemolisinas presentes no tienen distinción por algún receptor en la superficie de los eritrocitos para su actividad, dato mencionado por Alam *et al* 1996, el cual obtuvo un 80% de cepas altamente hemolíticas en eritrocitos de conejo, datos también comparables con los de Miyoshi *et al* 1997 en el que reporta que *V. mimicus* lisa eritrocitos de caballo, carnero y humano. La principal hemolisina presente en esta especie es la VMH, la cual ha sido caracterizada y se encuentra relacionada en un 76% con la hlyA de *V. cholerae*

el Tor, es capaz de formar poros sobre la superficie de las células, también promueve la producción de AMPc, causando diarrea; esta hemolisina está presente del 97 al 99% de las cepas ambientales de *V. mimicus* (Bi *et al*, 2001, Li *et al*, 2005), datos que concuerdan con lo obtenido en este estudio (40/40 cepas), aunque existen otras hemolisinas descritas en *V. mimicus*, que no se encuentran en las cepas de origen ambiental como lo son las hemolisinas Vm-TDH (Terai *et al*, 1991), y la hlx (Shi *et al*, 2000) que se encuentran frecuentemente en aislamientos de casos clínicos (Shinoda *et al*, 2004). Shi *et al*, 2000, menciona que todas las cepas de *V. mimicus* ya sean ambientales o de origen clínico tienen por lo menos 1 gen que codifique para una hemolisina.

De las cepas aisladas el 100% presento actividad de lipasa y lecitinasa, datos que contradicen lo reportado por Davis *et al*, en 1981 que indican que solo el 10% son positivas para la lipasa, esta divergencia en los datos quizá se deba al sustrato usado, la diferencia en la actividad se pudo deber a la afinidad de esta lipasa con respecto al sustrato usado; sin embargo datos más actuales, indican que cerca del 95% de *V. mimicus* tienen actividad de lipasa (Fiore *et al*, 1997); lo que concuerda con nuestros datos. De acuerdo a la bibliografía, la lecitinasa de *V. mimicus* es una fosfolipasa A (phIA), con capacidad de ser toxica en línea celular de peces y de lisar eritrocitos (Kang *et al*, 1998, Lee *et al*, 2002). Fiore, además propone, que la actividad conjunta de estas 2 enzimas, favorece la colonización y forman parte de una serie de enzimas usadas por el microorganismo para dañar las membranas de las células a las que se adhiere.

Se ha sugerido que la lipasa puede proveer nutrientes y energía al microorganismo, se considera un factor de virulencia por incrementar los movimientos de los granulocitos humanos o afectando el funcionamiento del sistema inmunológico a través de la generación de ácidos grasos de cadena larga insaturada por actividad lipolítica; estudios en *Pseudomonas aeruginosa* han demostrado que la lipasa juega un papel importante en la virulencia ya que puede degradar los fosfolípidos de la superficie del pulmón lo que promueve la invasión por este microorganismo (Konig *et al.*, 1996), lo que sugiere que las lipasas pueden tener un papel importante en la patogénesis de *Vibrio mimicus*.

La presencia de DNAasa se verificó en 100% de las cepas de *V. mimicus* aislados, no se mencionan datos en la bibliografía acerca de la presencia de esta enzima en *V. mimicus*, pero se ha descrito desde hace mucho tiempo la presencia de este tipo de enzimas en las bacterias de este género (Maeda & Taga 1976), comprobado en la actualidad, que la mayoría de las cepas de *V. vulnificus* y *V. cholerae* son positivas para la destrucción del DNA (Rodríguez *et al*, 1992, Focareta *et al*, 1991) lo que nos lleva a pensar que es posible que haya una relación en la presencia de esta enzima en *V. mimicus* con respecto a la virulencia, siendo la DNAasa una enzima favorecedora del crecimiento de la bacteria durante el proceso de infección y destrucción de las células, proveyéndole una fuente de C y N que le permiten multiplicarse (Wu *et al.*, 2001). Se sabe que la DNAasa de *V. cholerae* es extracelular y la secreta al medio circundante (Focareta *et al*, 1991), motivo por el cual al analizar nuestro resultados casi podemos asegurar que en *V. mimicus* existe una enzima similar que es la causante de la lisis del DNA en nuestras pruebas.

Las muestras se sometieron a un tratamiento térmico para determinar si ésta nucleasa es resistente a la temperatura, por ello, al ver que después de sometidas al proceso térmico, solamente el 45.7% (19/40) mantuvieron la actividad, lo que nos indica que entre las cepas de *V. mimicus* existe variación en la secuencia de aminoácidos de esta proteína, ya que algunas si son termoresistentes y otras no, lo cual nos habla de la diversidad genética que hay entre las cepas de esta misma especie; o en otro caso nos indica la presencia de nucleasas con distintas características distribuidas de forma diversa entre miembros de la misma especie.

Otro factor de virulencia que no esta reportado en *V. mimicus* es la presencia de cápsula, la cuál esta relacionada con la resistencia a la fagocitosis y a la opsonización por anticuerpos IgA presentes en la luz del intestino, pero además se ha descrito que en *V. cholerae* O139 la presencia de la cápsula es fundamental para la colonización del epitelio intestinal, debido a que facilita la formación de las microcolonias (Nesper *et al*, 2002), por otro lado la presencia de esta estructura en *V. vulnificus*, es ideal para sobrevivir a la acción del

complemento, y evadir la fagocitosis cuando se encuentra circulando en el torrente sanguíneo (Wright *et al*, 1999).

Se obtuvo el 100% de cepas positivas a la presencia de ésta estructura celular, es un indicativo de dos importantes situaciones, una nos indica que tiene un mecanismo más para colonizar el intestino y aun más probabilidades de sobrevivir, ya que la cápsula lo protege de la respuesta inmune innata existente en el intestino y la segunda nos acerca más a la idea de que *V. mimicus* es capaz de formar biofilms sobre las superficies de diversos organismos que se encuentren en el medio ambiente e incluso las raíces de plantas acuáticas, al igual que lo hace *V. cholerae* (Reidl & Klose 2002), ya que esta habilidad, le permite persistir en el medio ambiente en mejores condiciones que si se encontrara solamente suspendida en la columna de agua e incluso al estar en contacto estrecho con otras bacterias, de esta manera se favorece la transmisión horizontal de genes, y con ello la posibilidad de adquirir otros factores de virulencia. Chowdhury *et al* en 1989 menciona que aisló a *V. mimicus* en forma abundante en las raíces de las plantas acuáticas, con lo cual la posibilidad de la formación de un biofilm es mas cercana.

Las raíces de las plantas, son ricas almidón, por ello para comprobar la capacidad de nuestras cepas de sobrevivir asociadas a éstas, las inoculamos en el medio de agar almidón y notamos que solo el 35% (14/40) de las cepas tienen actividad amilolítica, lo cual indica que no todas las cepas de *V. mimicus* tienen la capacidad para asimilar dicho sustrato, aunque se ha reportado la presencia de una amilasa, en una bacteria psicrófila, del genero *Vibrio* spp. a la cual no se le identificó, y que se le atribuyó un potencial uso industrial (Hamamoto & Horikoshi 1991).

Con respecto al efecto citotóxico publicaciones en Blangadesh, Calcuta y los E.U. han reportado que sólo del 10 al 35% cepas clínicas de *Vibrio mimicus* producen la toxina colérica (Dotevall, *et al*, 1985); en este estudio el 97.5% de las cepas mostraron actividad citotóxica en células CHO observado a las 10h de incubación; Campos y col. (1996) investigaron la producción de la toxina en

cepas clínicas, utilizando células Y-1, pero les fue difícil ya que había una fuerte actividad citolítica.

Baffone y col. (2001) determinaron diversos factores de virulencia en diferentes especies de *Vibrios* en el que menciona que la citotoxicidad fue variable en las cepas analizadas, pero las de *Vibrio cholerae* non-01 fueron fuertemente citotóxicas muy parecido a los resultados obtenidos.

Wong y col. (1993) realizaron pruebas de citotoxicidad en células CHO en las que tuvieron destrucción de la monocapa alrededor del 30% con elongación de las células.

No se cuenta con referencias bibliográficas en línea celular HEP-2 para adherencia e invasividad por este microorganismo, pero el 75% (30/40) de las cepas de *Vibrio mimicus* tienen adherencia en la línea celular HEP-2, se desconoce cual es el mecanismo por el cual se adhiere esta bacteria, pero se ha descrito (Alam *et al.*, 1996) que las hemaglutininas sirven a este microorganismo para la adhesión a las células así como otros factores que contribuyen como son las hemolisinas, proteasas, entre otros.

La invasividad fue del 22.5% (9/40), se desconoce el mecanismo de invasión sin embargo, estudios desarrollados en otros miembros del género *Vibrio* como es el caso de la patogenia del cólera este mecanismo de invasión comprende la ingestión de *Vibrio cholerae*, movilidad de los vibriones, quimiotaxis, penetración a la capa mucosa de la superficie intestinal, y producción de la toxina colérica (Afsar, *et al.*, 2002).

Estos resultados señalan la probable capacidad virulenta que tiene las cepas de *Vibrio mimicus* aisladas de agua, pescados y ostiones en la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, y que tanto las condiciones ambientales como la expresión de algunos factores extracelulares de esta bacteria, como las hemolisinas, proteasas, lipasas entre otras, son una clara muestra de el rol que juega o pueden jugar las cepas ambientales de este microorganismo en las enfermedades por contacto con el agua estuarina o por el consumo de alimentos de la pesca.

A nivel mundial se ha observado que el consumo de mariscos crudos puede culminar en casos de enfermedades gastrointestinales (Tuyet *et al.*, 2002) tal es el caso de un brote en Florida en 1992 (Hlady *et al.*, 1996) donde el 12% de esas enfermedades gastrointestinales se le atribuye a *V. mimicus*; Quiñónez *et al.*, (2002) menciona que las almejas pueden estar implicadas en este tipo de enfermedades, ya que la gente acostumbra consumirlas crudas.

Con frecuencia las infecciones causadas por vibrios no se reportan a las autoridades de salud pública por lo que la condición aparenta ser poco común y su incidencia es subestimada (Fontáñez., 2005). En México se sabe que las gastroenteritis ocupan el segundo lugar por agentes etiológicos desconocidos los cuales no se reportan al médico. Los brotes de gastroenteritis por el consumo de ostiones esta bien documentado (Davis, *et al.*, 1981, Vieira, *et al.*, 2001); aunque en almejas no se han realizado estudios sobre este microorganismo, a través de este trabajo se demuestra la presencia en las almejas, las cuales pueden ser vehículo en la transmisión de este microorganismo

En nuestro país se desconoce aún el papel que juega *V. mimicus* en la etiología de las enfermedades transmitidas por las almejas, sin embargo, los datos obtenidos en esta investigación permiten evidenciar que el microorganismo se encuentra presente en este producto.

IX. CONCLUSIÓN

La investigación demostró la presencia de *Vibrio mimicus* en ostiones, pescado y agua de la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz.

El consumo de moluscos y bivalvos crudos, u otros productos de la pesca que pudieran estar contaminados con *Vibrio mimicus* es un motivo de preocupación, aunado al hecho de que se puso en evidencia durante los meses de primavera-verano.

Se demostró que *Vibrio mimicus* posee diversos factores de virulencia, lo que le da la capacidad a este microorganismo de provocar un cuadro gastrointestinal.

X. BIBLIOGRAFIA

1.-Acuña, M. Diaz, G. Bolaños, H. Barquero, C. 1999 Sources of *Vibrio mimicus* Contamination of Turtle Eggs Appl. Environ. Microbiol. 65:1 336-338.

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

2.-Alam, M., Miyoshi, S., Yamamoto, S., Tomochika, K., Shinoda, S.1996. Expression of Virulence-Related Properties by, and Intestinal Adhesiveness of *Vibrio mimicus* Strains Isolated from Aquatic Enviroments. Appl. Environ Microbiol. 62: 3871-3874.

3.-Alam, M., Miyoshi, S., Tomochika, K., Shinoda, S. 1996. Purification and Characterization of Novel Hemagglutinins from *Vibrio mimicus*: a 39- Kilodalton Major Outer Membrane Protein and Lipopoyasaccharide Infect. Immun. 64: 4035-4041.

4.-Alam, M., Miyoshi, S., Tomochika, K., Shinoda, S. 1997. *Vibrio mimicus* Attaches to the Intestinal Mucosa by outer Membrane Hemagglutinins Specific to Polypeptide Moieties of Glycoproteins. Infect. Immun. 65: 3662-3665.

5.-Albert M. J. Karbir I. Neogi P.K. 1992 *Vibrio mimicus* bacteraemia in a child J. Diarrhoeal Dis. Res. 10 : 1 34-40.

6.-Anonimo. 1982. Plan de desarrollo urbano de Pueblo Viejo, Veracruz (PDUPVV). Gobierno del estado de Veracruz. H. Ayuntamiento de Pueblo Viejo. 388 p.

7.-Baffone, W. Citterio, B. Vittoria, E. 2001 Determination of several potential virulence factors in *Vibrio spp.* Isolated from sea water. Food Microbiology 18; 479-488.

8.-Bi, K., Miyoshi, S., Tomochika, K., and Shinoda, S. 2001. Detection of virulence associated genes in clinical strains of *Vibrio mimicus*. Microbiol. Immunol. 45:613-616.

9.-Bockemuhl, J. and. Triemer, A. 1974. Ecology and epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the coast of Togo. Bull. World Health Org. 51: 353-360.

10.-Boneta-Alcover, I. 2001. Comparación del efecto inhibitorio del extracto de *Rhizophorae mangle* L. (mangle rojo) en organismos productores de

sideróforos y en *Vibrio parahaemolyticus* aislado de *Crassostrea rhizophorae* Guilding (ostión de mangle). Tesis M. S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P. R.

11.-Boyd, E.F. Moyer, K.E. Shi, L. Waldor, M.K. 2000 Infectious CTX ϕ and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infect. Immun.* 68:3 1507-1513.

12.-Cabezas C. Vargas J. Suarez V. 2005 Confirmación de aislamientos de *vibrio mimicus* del brote de intoxicación alimentaria en Cuncashca Carhuaz Boletín del Instituto Nacional de Salud del Perú Año 2 # 11

13.-Campos, E; Bolaños, H; Acuña, M. T., Diaz, G., Matamores, M. C; Raventos, H; Sánchez, O; Barquero, C. and Red nacional de laboratorios para cólera, Costa Rica. 1996. *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. *Appl. And Environ. Microbiol.* 62:1141-1144.

14.-Carranza, E; Rosales-Hoz, L; Lozano, S. R. 1986. Estudio de metales en arenas de playa de San Antonio del mar, Baja California México. *An. Centro de ciencias del mar y limnología. Univ. Nal. Auton. México.* 8p.

15.-Chakraborty, S., G.B. Nair, & S. Shinoda. 1997. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Reviews in Environmental Health.* 12:63-80.

16.-Centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC), Centro nacional de enfermedades infecciosas (NCID), Organización panamericana de la salud (OPS). 2004. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*.

17.-Centro de Ecodesarrollo y Secretaria de Pesca (CECODES) 1988. Las lagunas costeras mexicanas. México, D.F. 263p.

18.-Chen, Y., Chang, M., Chuang, Y. and Jeang, C. 2005. Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Current. Microbiol.* 49: 175-179.

19.-Chowdhury, M. A. R; Yamanaka, H; Miyoshi, S; Aziz, S. K. M. And Shinoda, S. 1989. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic Environments. *Appl. Microbiol.* 55: 2073-2078.

20.-Crowther, R.S., N. W. Roomi, R. E. F. Fahim, and J. F. Forstner. 1987. *Vibrio cholerae* metalloproteinase degrades intestinal mucin and facilitates enterotoxin-induced secretion from rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 393-402.

21.-Contreras F. 1985 "Las lagunas Costeras Mexicanas" primera edición Centro de Ecodesarrollo Secretaria de Pesca. México.

- 22.-Davis, B, R., Madden, J. M; Steigerwalt; Bradford, A. G., Smith, B. H; Jr H.L. and Brenner, J. D. 1981. Caracterización of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J. Clin. Microbiol. 14:631-639.
- 23.-Dhawale. M.R., J.J. Wilson, G.G. Khachatourians. 1982. Improved method for detection of starch hydrolysis. Appl. Environ. Microbiol. 44:747-750.
- 24.-Doyle M. P. and Cliver D. O. 1990. *Vibrio* sp. 242-245. En: Dean O. Cliver. Food borne Diseases. Academic Press. Inc. U.S.A.
- 25.- Elliot, E.I., Kaysner, C. A., Jackson, I. and Tamplin, M.I. 1995. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Chap 9. IN: Bacteriology Analytical Manual. Food and Drug Administration, Association of Analytical Chemistry C. I. F. Washington, D.C.
- 26.-Elliot, E.I., Kaysner, C. A., Jackson, L and. Tamplin, M.L. 1998. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Chap 9. IN: Bacteriology Analytical Manual. Food and Drug Administration, Association of Analytical Chemistry C. I. F. Washington, D.C.
- 27.-Fiore, A. Michalsky, J. Russel, R. 1997 Cloning, Characterization, and Chromosomal Mapping of a Phospholipase (Lecithinase) Produced by *Vibrio cholerae* Infect. Immunol. 65 (8) 3112-3117.
- 28.-Focareta T, Manning PA. 1991 Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system Mol Microbiol. 1991 Oct;5(10):2547-55.
- 29.- Fontáñez, B. Y. 2005. Determinación del perfil microbiológico de la almeja (*Lucina pectinata* Gmelin, 1791), del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828) y las aguas de extracción de Bivalvos de la zona suroeste de Puerto Rico. Tesis. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.
- 30.-Garcia M. and Landgraf M. 1998 Virulence Factors and Pathogenicity of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated from Seafood. J. Appl. Microbiol. 64 : 747-751.
- 31.-Genthner, F. J., Volety, A. K., Oliver, L. M and Fisher, W. S. 1999. Factors influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea Virginica*). Appl. Environ. Microbiol. 65: 3015-3020.
- 32.-Hamamoto T., horikoshi K., 1991 Characterization of an amylase from a psychrotrophic *Vibrio* isolated from a deep-sea mud sample FEMS Microbiol. Lett. 84 79-84.

- 33.-Hervio-Heath, D. Colwell, R.R. Derrien, A. Robert-Pillot, A. 2002 Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France J. Appl. Microbiol. 92 1123-1135
- 34.-Hlady. W. C., and Klontz, K. C. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. J. Infect. Dis. 173:1176-1183.
- 35.-Johnston, M. D. and Brown, M.H.2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. J. Appl. Microbiol. 92:1066-1077.
- 36.-Joseph, S. 1974. Observations on *Vibrio parahemolyticus* in Indonesia. In Fujino, T., Sakasaki, R. and Takeda, Y. International Symposium on *Vibrio parahemolyticus*. Saikon Publishing Co., Tokio. Pp. 35-39.
- 37.-Joseph, S., R. Colwell and Kaper, J. 1983. *Vibrio parahemolyticus* and related halophilic vibrios. Crit. Rev. Microbiol. 10: 77-123.
- 38.-Kang J., Lee J., Park J., 1998 Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus* Biochim. Biophys. Acta. 1394 85-89
- 39.-Kaper, J. Nataro, J. Roberts, N. 1986 Molecular Epidemiology of Non-O1 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* in the U.S. Gulf Coast Region J. Clin. Microbiol. 23 :3 652-654
- 40.-Kaspar, C.W and M.L. Tamplin. 1993. Effect of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Appl. Environ Microbiol. 59:2425-2429.
- 41.-Koga, T. and Takumi, K. 1995. Siderophore production and outer membrane protein synthesis of *Vibrio parahaemolyticus* strain with different serotypes under iron limited condition. J. Gen. Appl. Microbiol. 41: 221-228.
- 42.-Lachica, R.V.F.,C. Genigiogis and Hooeprich. 1971. Metachromatic agar-diffusion method for detection of staphylococcal nuclease activity. Appl. Environ. Microbiol. 12: 1367-1380.
- 43.-Lee, J. Ahn, S. Lee, E. 2005 The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen FEBS Lett. 579 (11) 2507-2513.
- 44.-Leyva, V. Valdés, E. Cisneros, E. Pérez, B. 1996 Aislamiento de vibrios patógenos y valoración de la calidad sanitaria de ostiones frescos cosechados en Cuba Revista Cubana Aliment Nutr. 10:2
- 45.-Li, Y; Okamoto; Takahashi, E; Miyoshi, S; Shinoda, Sumio; Tsuji, T. and Fujii, Y. 2005. A Hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce

ATP and cyclic AMP which. Appear to be secretory mediators. Microbiol. Immunol. 49:73-78.

46.-Mackie, C. and Birkbeck, T. 1992. Siderophore produced by *Vibrio anguillarum* in vitro and in infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 15: 37-45.

47.-MacFaddin. J.F. 2003 Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de interés clínico 3 a edición Editorial medica Panamericana. México.

48.-Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. 2001 "Brock Biología de los Microorganismos" 8 edición revisada Prentice hall INC. España.

Maeda M., Taga N., 1976 Extracellular nuclease produced by a marine bacterium, II. Purification and properties of extracellular nuclease from a marine *Vibrio* sp. Can. J. Microbiol. Vol. 22. 1443-1452

49.-Manual de microbiología práctica, 2003. Tercera edición. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología del Instituto Politécnico Nacional.

50.-Marano, N. N., Nicholas, A. D., Easton, A. N., Mcshan. R. B., Wells. J. G., Griffin. M. P., Angulo. J. F. 2000. A survey of stool culturing practices for *Vibrio* species at clinical laboratories in gulf coast states. J. Clinical. Microbiol. 38:2267-2270.

51.-Miyoshi S., Sasahara K., Akamatsu S., Rahman M., Katsu T., Tomochika K. And Shinoda S. 1997 Purification and Characterization of a Hemolysin Produced by *Vibrio mimicus* Infect. Immun. 65: 1830-1835.

52.-Moon, Y. Tanabe, T. Funahashi, T. 2004 Identification and Characterization of Two Contiguous Operons Required for Aerobactin Transport and Biosynthesis in *Vibrio mimicus* Microbiol. Immunol. 48 (5) 389-398.

53.-Nesper, J. Schild, S. Lauriano C. 2002 Role of *Vibrio cholerae* O139 Surface Polysaccharides in Intestinal Colonization Infect. Immun. 70 (11) 5990-5996

54.-Okada, K. Iida, T. Kita-Tsukamoto, K. Honda, T. 2005 *Vibrios* Commonly Possess Two Chromosomes J. Bacteriol. 187:2 752-757

55.-Olafsen, J. A., Fletcher, T. C. and Grant, P. T. 1992. Agglutinin Activity in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. Dev. Comp. Immunol. 16: 123-138.

56.-Olafsen, J., Mikkelsen, H., Gjaever, H. and Hansen, G. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1848-1854.

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

58.-Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1982. Control sanitario de los alimentos. Publicación científica OPS No. 421. 108, 463-467.

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

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

61.-Payne, M. Oakey, J. and Owens, L. the ability of two different *Vibrio spp.* Bacteriophages to infect *Vibrio Harveyi*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. 2004 J. Appl. Microbiol. 97 663-672

62.-Pavia, A.T., Bryan, J.A., Maher, K.L., Hester, T.R. Jr. and Farmer, J.J. 1989. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. Ann. Intern. Med. 111:85-86.

63.-Pérez, P. Mejias, R. Rivero, M. 2001 *Vibrio mimicus* Gastroenteritis report of two cases. Rev. Esp. Enfem. Dig. 93:1 60-61.

64.-Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. 2002. Plan Nacional de Inspección y Vigilancia para el control de los moluscos bivalvos. Comisión Federal de protección contra riesgos sanitarios. Comisión nacional de acuicultura y pesca.

65.-Quiñones E., Salinas C., Pedroche F., Sepúlveda L., Rodas O. 2000. Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. Hibrobiologica 10: 131-138.

66.-Reidl, J. Klose, K. 2002 *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host FEMS Microbiology Reviews 20 125-139

67.-Rivera, S., Lugo, T. and Hazen, T. 1998. Autoecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters. Tesis M. S. Universidad de Puerto Rico, Río Piedras, P. R.

68.-Rodríguez, D.P., Ribeiro, R.V. and Jofer, E. 1992. Análisis of some virulence factors of *Vibrio vulnificus* isolated from Rio de Janeiro, Brazil. Epidemiology and Infection.

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

70.-Schandevyl, P. Van Dyck, E. Piot, P. 1984 Halophilic *Vibrio* Species from Seafish in Senegal Appl. Environ. Microbiol. 48 : 236-238.

- 71.-Secretaria de Salud (SS).1993. Diagnóstico sobre la protección de los alimentos en México. Organización Panamèricana de la Salud. OMS. México.
- 72.-Shandera W. X., Johnston, J. M., Davis, B. R. and Blake, P. A. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus* a newly recognized *Vibrio* Species. *Ann. Intern. Med.* 99: 169-171.
- 73.-Shi, L. Miyoshi, S. Bi, K. Nakamura, M. 2000 Presence of Hemolysin Genes (*vmh*, *tdh* and *hix*) in isolates of *Vibrio mimicus* Determinated by Polymerase Chain Reaction *Journal of Health Science* 46 (1) 63-65.
- 74.-Shinoda, S. Nacagawa, T. Bi K. 2004 Distribution of Virulence-Associated Genes in *Vibrio mimicus* Isolates from Clinical and Enviromental Origins *Microbiol. Immunol.* 48: 7 547-551.
- 75.-Simonson, J.G. Siebeling, R.J. 1988 Coagglutination of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody *J. Clin. Microbiol.* 26: 10 1962-1966.
- 76.-Spira, W. and Fedorka-Cray P. 1984 Purification of Enterotoxins from *Vibrio mimicus* that Appear to be Identical to Cholera Toxin *Infection and Immunity* 45 (3) 679-684
- 77.-Singleton, F. L., Attwell, R., Jangi S. and Colwell, R. R. 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1047-1058.
- 78.-Sizemore, R.K. and Stevenson, H.L. 1970. Method for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Applied Microbiology* 20: 991-992.
- 79.-Tamplin, M.L., & G.M. Capers. 1992. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf coast oysters, exposed to seawater disinfected with UV light. *Applied and Environmental of Microbiology.* 58: 1506-1510.
- 80.-Tamplin, M. L. And Colwell, R. R. 1986. Effects of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 297-301.
- 81.-Tamplin, M. K., Gauzens, A. L., Huq, A., Sack, D. A. y Colwell, R. R. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup 01 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1997-1980.
- 82.-Terai, A. Baba, K. Shirai H. 1991 Evidence for Insertion Secuence-Mediated Spread of the Thermostable Direct Hemolysin Gene among *Vibrio* Species *J. Bacteriol.* 173:16 5036-5046.
- 83.-Thompson F. Iida T. 2004 Biodiversity of Vibrios *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 : 403- 431.

- 84.-Torres-Vietla, M, R. y Fernández, Escartin. 1993. Incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado, ostión y camarón crudos. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 35:267-272.
- 85.-Tuyet, D., Dinh, V., Seidleing, L., Chowdhury, A., Park, E., Canh, D., Trong, B., Van, T., Naficy, A., Raghav, M., Ali, M., Lee, H., Hung, T., Nichibuchi, M., Clemens, J. and Duc, D.2002. Clinical epidemiological and socioeconomic analysis of an outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khann Hoa Province, Vietnam. J. Infect. Dis. 186:161-163.
- 86.-Vandenbergh, J. Verdonck, L. Robles-Arozarena, R. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics 1999 Appl. Environ. Microbiol. 65:6 p. 2592-2597
- 87.-Vieira V., Teixeira L., Vicente A., Momen H., Salles C. 2001 Differentiation of Environmental and Clinical Isolates of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2360-2364.
- 88.-West, P.A. and Colwell, R.R. 1984. Identification and classification of Vibrionaceae and overview. In *Vibrios in the environment* ed. Colwell, R.R. pp. 258-363. New York: John Wiley.
- 89.-Wolf, M. and Crosa, J. 1986. Evidence of the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. J. Gen. Microbiol. 132: 2949-2952.
- 90.-Wong, F. Y. K. Fowler, K and Desmarchelier, P.M. 1995 Vibriosis due to *Vibrio mimicus* in Australian freshwater crayfish. Journal of Aquatic Animal Health 7: 284-291
- 91.-Wong, H., Chen, L. and Yu . 1994. Survival of Psychrotrophic *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio parahaemolyticus* in Culture Broth at Low Temperatures. J. Food Protection 57: 607-610.
- 92.-Wong, H. C., Shieh, W. R. and Lee, Y. S. 1993. Toxigenic characterization of vibrios isolated from foods available in Taiwan. J. Food Protec. 56: 980-982.
- 93.-Wright, A.C., R.T. Hill, J. A. Johnson, M.C. Roghman, R.R. Colwell, J.G. Morris. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 62:717-724.
- 94.-Wright, A. Powell J. Tanner M. 1999 Differential Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide Infection and Immunity 62 (5) 2250-2257.

ANEXOS

AGUA PEPTONADA ALCALINA.

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Fórmula en gramos por litro

Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g

- 1.- Disolver el cloruro y la peptona en el agua y ajustar a pH de 8.4
- 2.- Distribuir en cantidades de 9 ml en tubos con tapón de rosca.
- 3.- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

MEDIO DE TCBS (Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa)

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

Cantidad por litro de agua:

Tiosulfato de sodio	10 g.
Citrato de sodio	10 g.
Bilis de buey	5 g.
Colato de sodio	3 g.
Sacarosa	20 g.
Peptona de caseína	5 g.
Peptona de carne	5 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro de sodio	10 g.
Citrato férrico	1 g.
Azul timol	0.04 g.
Azul de bromotimol	0.04 g.
Agar seco	14 g.
pH final	8.6 ± 0.2

MÉTODO:

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

LECTURA:

Colonias amarillas: fermentadores de la sacarosa.

Colonias verde-azules: no fermentadores de la sacarosa

AGAR TRIPTONA CLORURO DE SODIO (T₁N_x)

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Fórmula en gramos por litro.

Triptona 10g

Agar 15g

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

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

Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de cerebro de ternera 200.0g

Infusión de corazón de res 250.0g

Proteasa peptona o polipeptona 10.0g

Cloruro de sodio 5.0g

Fosfato disódico 2.5g

Dextrosa 2.0g

pH final 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN

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

AGAR CITRATO DE SIMMONS

COMPOSICION DEL MEDIO.

FORMULA EN g/L

Ingredientes	Cantidades
Fosfato ácido de amonio	1
Fosfato dipotásico	1

Cloruro de sodio	5
Citrato de sodio	2
Sulfato de amonio	0.20
Azul de bromotimol	0.08
Agar	15

PH 6.9 -0.02

METODO.

- 1.- Sembrar por estría cerrada la cepa a probar
- 2.- Incubar a 37°C durante 24 horas.

LECTURA

- 1.- Observar el desarrollo bacteriano por el cambio de color del medio .
- 2.- Observar si hay desarrollo bacteriano sin cambio de color.

AGAR LISINA HIERRO (LIA)

COMPOSICION DEL MEDIO

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
Glucosa	1.0
L- lisina	10.0
Citrato férrico de amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	12.5

PH de 6.7

METODO:

1. Sembrar las cepas puras por estría sobre la superficie del pico de flauta.
2. Inocular por picadura con asa recta hasta 0.6 cm del fondo del tubo.
3. Incubar a 35°C de 18 a 24 horas.
4. Observar los resultados.

AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR (TSI)

COMPOSICION DEL MEDIO:

Cantidad por litro de agua:

Peptona de caseína	15 g
Peptona de carne	16 g

Extracto de carne	17 g
Extracto de levadura	18 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	11 g
Glucosa	12 g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.5 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agar	12 g

METODO:

1. Sembrar la cepa pura por estría sobre la superficie del medio.
2. Inocular por picadura con asa recta hasta 0.6 cm del fondo del tubo.
3. Incubar a 35°C de 18 a 24 horas.

MEDIO BASE DE DESCARBOXILASA DE MOLLER CON AMINOACIDOS

FUNDAMENTO BIOQUIMICO: El medio de Moeller es la base que se utiliza para determinar la capacidad de descarboxilación de los aminoácidos. El aminoácido se agrega a la base en una concentración del 1%.

La descarboxilación es el proceso por el cual, enzimas descarboxilasas específicas son capaces de utilizar a los aminoácidos actuando sobre su grupo carboxilo, dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. Existen tres enzimas descarboxilasas utilizadas para la identificación bacteriana: la ornitina, la lisina y la arginina descarboxilasa. Estas reacciones son un proceso anaeróbico irreversible y requieren de una coenzima que es el fosfatoto de piridoxal.

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO:

Base de descarboxilasa de moller

Fórmula en gramos por litro de agua destilada	
Peptona (pepsina)	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g
Rojo de cresol	0.005 g
Piridoxal	5.0 g
Glucosa	0.5 g
pH 6.0	

Ajustar el pH, aun cuando para la L-arginina y L-lisina no es necesario, L-ornitina es muy ácida por lo que hay que ajustar con hidróxido de sodio 10 N.

LECTURA

Los tubos que presenten color morado o púrpura son positivos y los tubos amarillos son negativos.

INTERPRETACION

PRUEBA POSITIVA: La aparición de un color púrpura intenso indica la descarboxilación del aminoácido adicionado. que da como resultado una alcalinización del medio debido a la liberación de CO₂ en la reacción y la consiguiente formación de HCO₃⁻.

PRUEBA NEGATIVA: Color amarillo por la acidificación del medio debido a la utilización de la glucosa.

PRUEBA DE TWEEN 80

FUNDAMENTO: Algunas especies del género *Mycobacterium* producen una lipasa que es capaz de hidrolizar el Tween 80 (detergente monooleato de polioxietilensorbitan) en ácido oleico y polioxietilsorbitol.

El Tween 80 se une al rojo neutro, se produce un pH mas ácido, tomando la mezcla una coloración ambar. Cuando el Tween 80 es hidrolizado, el medio se hace alcalino, lo cual se manifiesta con el vire del indicador a un color rosa-rojo.

SOLUCION DE REACCION

COMPONENTES

Solución reguladora de fosfatos M/15 pH 7.0

Solución a

Fosfato disódico	9.47
Agua destilada	1000 mL

Solución b

Fosfato monopotásico	0.7
Agua destilada	100 mL

Mezclar 61.1 mL de la solución a con 39 mL de la solución b.

Rojo neutro

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

SOLUCION

Amortiguador	98.5 mL
Rojo neutro	1.0 mL

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Tryptona-peptona 10.0

PREPARACIÓN

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

SOLUCIÓN DE PUCKS

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESIONIZADA

Cloruro de sodio 8.0

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.

MANOSA AL 10 %

FORMULACIÓN

Manosa

Agua desionizada estéril

10 g

100 mL

PREPARACIÓN

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

SOLUCIÓN DE GENTAMICINA

FORMULACIÓN

Gentamicina 90 mg

Agua desionizada estéril 10 mL

PREPARACIÓN

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

SOLUCIÓN DE LISOZIMA

FORMULACIÓN

Lisozima

Agua desionizada estéril

300 mg

10 mL

PREPARACIÓN

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

SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS (PBS)

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESIONIZADA

Cloruro de sodio 8.0

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 oC/ 15 libras de presión.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**FENOTIPIFICACION DE CEPAS DE *Vibrio*
mimicus AISLADAS DE AGUA Y PRODUCTOS DE LA
PESCA**

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

Q.B.P. ERIKA GONZÁLEZ VÁZQUEZ


TUTOR: DR. CARLOS VAZQUEZ SALINAS
ASESOR: M. en C. OSCAR RODOLFO RODAS SUAREZ.

MEXICO, D. F. DICIEMBRE 2006