



00361
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

"*Vibrio parahaemolyticus* bacteria de ambientes acuáticos, presenta genes que se han relacionado con enfermedades en humanos"

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

PRESENTA

Gabriela Carlos Hernández

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos

MEXICO, D.F.

Se hizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Gabriela Carlos Hernández

JUNIO, 2003

FECHA: 6 de Junio de 2003
LUGAR: La Grulla de la UNAM

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres

A mis hijas

A mi esposo

A mis hermanos

*Gracias por su colaboración
y en especial a Gabriela, Adriana y Cristina*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo, se realizó en el laboratorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina, UNAM.

Agradezco al M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos por la asesoría y apoyo en la dirección de la tesis.

Agradezco al jurado Dr. Alejandro Rafael Cravioto, Dr. Angel Hipólito Manjarrez Hernández, Dr. Pedro Ramírez García, y a la Dra, Irma Aurora Rosas Pérez por su colaboración y revisión.

A la M. en C. Biomédicas (Bacteriología) Alma Edna Inzunza Montiel y al M. en C. con Especialidad en Microbiología Luis Manuel Perea Mejía, del Laboratorio de Epidemiología Molecular del Departamento de Salud Pública, agradezco su amplia asesoría en la técnica de PCR.

A la Biól. Maritofña Ramírez, al M. en C. Armando Navarro Ocaña, y a los que laboran con él en el Laboratorio de Microbiología Ambiental gracias por su apoyo.

Al biól. Jorge Moreno Hernández, gracias por el tiempo dedicado a la parte de estadística.

En especial a la M.P.A. Ana María Román de Carlos, al Lic en Biblioteconomía Francisco Pazos Hernández y al Lic en Pedagogía Arturo Durázno López del Área de informática de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia por la búsqueda constante de material bibliográfico.

Por último agradezco a todos el tiempo y los aportes a este trabajo.

C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Indice

Resumen	
Abstract	
Introducción.....	1
Hábitat.....	1
Distribución.....	3
Patogenicidad.....	3
Epidemiología y modo de transmisión.....	6
Sensibilidad antibiótica.....	9
Antecedentes Mundiales.....	9
Antecedentes en México.....	10
Objetivo.....	13
Objetivos particulares.....	13
Justificación.....	14
Hipótesis.....	15
Métodos.....	16
Identificación Bioquímica.....	16
Prueba para Hemolisinas.....	16
Detección de Genes de Virulencia.....	17
Obtención de DNA.....	17
Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	18
Resultados.....	21
Caracterización por biotipos.....	24
Prueba de urea.....	24
Prueba de hemolisinas.....	26
Detección de genes de virulencia.....	26
Discusión.....	30
Conclusiones.....	40
Referencias.....	41

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadros

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para los genes <i>ure</i> , <i>trh</i> y <i>tdh</i>	19
Cuadro 2. Biotipos identificados en los aislados de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> de la Laguna de Mecocacán, Tabasco.....	25
Cuadro3. Prueba de ureasa y fenómeno de Kanagawa en cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> aislados de diferentes sustratos.....	28
Cuadro 4. Relación entre pruebas metabólicas para urea y hemólisis y presencia de los genes <i>ure</i> , <i>tdh</i> y <i>trh</i> determinadas por PCR.....	29

Figuras

Figura 1. Casos de cólera y gastroenteritis mal definidos en Tabasco.....	22
Figura 2. Laguna de Mecocacán, Tabasco. Los números indican los sitios en los que se localizan las diferentes estaciones de muestreo.....	23
Figura 3. Prueba de hemólisis en agar Wagatsuma. A, no hemólisis; B, hemólisis a las 24 horas; C hemólisis después de 24 horas.....	35
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% revelado con bromuro de etidio. La fotografía se obtuvo con un amplificador de imágenes (Kodak ID Image Analysis Software, 2000). En los carriles 2,3,4, se presentan resultados de la cepa control, el gene <i>ure</i> (615pb), <i>trh</i> (460pb) y <i>trh</i> (380pb), Carriles 7 y 11 se observan cepas positivas a los genes <i>ure</i> , <i>trh</i>	38

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

La Laguna de Mecoacán, Tabasco, se localiza en el Golfo de México y tiene gran importancia económica para la región dado su uso para fines recreativos y de producción ostrícola. En México la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en las costas y estuarios ha sido poco estudiada. El objetivo de este estudio fué conocer la incidencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* de diferentes muestreos y sitios localizados en la Laguna Costera de Mecoacán. Una vez identificadas las bacterias, a los aislamientos se les practicaron pruebas bioquímicas y se determinó la capacidad para producir hemolisina (Fenómeno de Kanagawa), y la detección de genes de virulencia mediante un ensayo de amplificación en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En seis sitios diferentes de la laguna, se tomaron muestras de agua, ostión y sedimento en dos épocas del año (lluvias y secas) *V. parahaemolyticus* se encontró en todas las estaciones de muestreo, en los dos periodos. De los 208 aislamientos, 59% correspondieron a la época de lluvias y 41% a la de secas. Las bacterias se aislaron de agua (45%), de ostión (31%) y de sedimentos (23%).

Los aislamientos se analizaron comparando sus propiedades bioquímicas y su capacidad hemolítica. Las pruebas de Kanagawa y ureasa fueron positivas en el 48 y 8% de los aislamientos, observándose ambas pruebas positivas en el 35%.

El análisis por PCR se realizó solo en 68 aislados, en este ensayo se encontró un aislamiento positivo para los genes *tdh* y *trh*, otra para los genes *ure* y *trh*, seis (9%) para el gene *trh*, y 14 (21%) únicamente al gene *ure*.

Los resultados muestran la existencia de *V. parahaemolyticus* con factores de virulencia en la Laguna de Mecoacán, Tabasco. Lo anterior sugiere la necesidad de realizar estudios de vigilancia epidemiológica en la Laguna, así como proponer la búsqueda de la bacteria en casos de diarrea con el propósito de establecer su importancia en la región.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract

In this study were analyzed 208 isolations from the Mecoacan Lagoon, in the Gulf of Mexico during two seasons, 59% were in rainy season and 41% in dry season. The bacteria were isolated from water (45%), oyster (31%) and sediment (24%). The biochemical properties and haemolytical capacity of isolations were analyzed. The fenomen Kanagawa and Ureasa were positives in 48% and 8% each, and both positives in 35%. The PCR analysis was done in 65 isolations, genes *tdh*⁺/*trh*⁺ and *ure*⁺/*trh*⁺ were found for 1%, for *trh*⁺ 9% and 21% for *ure*⁺. Our results show the presence of *V. parahaemolyticus* in the Mecoacan Lagoon with virulence characteristics.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción

Dentro del género *Vibrio*, se encuentran diversas especies como son: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. angillarum*, *V. harveyi*, *V. marinus*, *V. costicola*, *V. metschnikovii*, *V. campbellii*, *V. natriegens*, *V. neresis*, *V. splendidus*, *V. pelagius*, *V. nigrripulchritudo*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. proteolyticus*, *V. gazogenes*, ellas son bacterias de vida libre que habitan en aguas marinas y salobres, para su desarrollo requieren cloruro de sodio. Algunos "vibrios" pueden ocasionar gastroenteritis a humanos, pero también hay vibrios capaces de utilizar la quitina de invertebrados como fuente de carbono.

Hábitat

Esta bacteria, frecuentemente se aísla de los estuarios y ambientes marinos debido a que constituye su hábitat natural. En estuarios puede encontrarse adherido a, plancton, peces, materia suspendida y sedimento del cuerpo de agua. En este hábitat, puede encontrarse en formas patógenas y no patógenas. Durante la temporada de frío, los organismos se encuentran en los sedimentos marinos y durante la época de calor están en aguas litorales, peces y mariscos (Kaneko y Colwell, 1978).

Sarkar (1983), menciona que *V. parahaemolyticus* no forma parte de la microflora autoctona de agua dulce, ya que es un organismo medianamente halófilo. Sin embargo el concluye, que *V. parahaemolyticus* se encuentra en los cuerpos de agua dulce de Calcuta, India, debido a casos ambulatorios o portadores que llegaron a esta zona y a que *Vibrio* puede sobrevivir en asociación con el plancton de agua dulce y de ahí su importancia en la diseminación de esta enfermedad por el agua en la región de Calcuta.

En Alejandría y Egipto en 1982, se realizaron estudios en el agua, sedimento y ostión, en

ellos se encontró que el número de organismos es mayor en primavera que en invierno. Además encontraron que el número de bacterias de *V. parahaemolyticus* es mayor en invertebrados que en sedimentos y agua de mar, sin embargo, Thompson y Vander (1976), reportaron que la concentración es más alta en sedimento que en ostión y en los dos estudios se reportó que es menor el número de *V. parahaemolyticus* encontrados en agua.

También es conocido, que las bacterias constituyen parte de la dieta alimenticia de organismos filtradores marinos colonizando el integumento e intestino, además los organismos simbióticos son comunes en todos los organismos marinos. De esta forma, los organismos acumulan gran cantidad de microorganismos marinos como son *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Escherichia* entre otros. Estos organismos pueden ser patógenos o no, además se ha observado que especies de *Vibrio* persisten en la hemolinfa del ostión después de haberlos sometido a tratamientos con luz ultravioleta (UV) (Olafsen *et al.* 1993 y Bell y Carmeli 1994).

En la naturaleza, el efecto osmótico es de interés para los hábitats con altas concentraciones de sales. Las aguas marinas contienen entre 33 y 39 gramos de sal por litro (33-39gr/lit) esta concentración no es constante, sino que varía de un mar a otro, además de contener pequeñas cantidades de algunos otros minerales y elementos. En general, los microorganismos que habitan el mar, tienen requerimientos específicos de concentraciones del ion sodio, a tales organismos se les conoce como halófilos. A los organismos que habitan lugares donde hay baja concentración de cloruro de sodio, aproximadamente 3% (30gr/lit, o una concentración de 15mM) se les conoce como halófilos ligeros, a este grupo pertenece *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*; los organismos halófilos moderados son los que soportan concentraciones de 9% de cloruro de sodio (90gr/lit, o bien 45mM) un ejemplo es *Vibrio alginolyticus*; y halófilos extremos los que habitan sitios con concentraciones mayores a 15% de cloruro de sodio (150gr/lit, o bien 75mM) como es el caso de *Halobacterium salinarium* (Edwards, 1990).

Distribución

Vibrio parahaemolyticus se identificó por primera vez en 1950 en la ciudad de Osaka Japón en un brote de gastroenteritis originado a partir de la ingesta de alimentos marinos y desde entonces es considerado como un importante agente causante de gastroenteritis.

Se han reportado casos esporádicos y brotes en fuentes comunes en muchas partes del mundo, en particular en Japón, Asia Sudoriental y los Estados Unidos. Sin embargo, se le ha aislado en otros países como Australia, Africa (costas de Sudáfrica), Israel, Indonesia, Malasia, República de Maldivas (localizada en el Archipiélago del Océano Indico), Covington, Corea, Calcuta, Togo, Gran Bretaña, Inglaterra, Nueva Zelanda, Panamá, Canadá, Alaska, Estados Unidos y México.

En Asia, *V. parahaemolyticus* es causa común de enfermedad. En los Estados Unidos, no se le reconoce como patógeno frecuente, particularmente porque en los laboratorios clínicos usan poco el medio selectivo para identificar este organismo. Dentro de Estados Unidos, no todos los estados reportan esta enfermedad al departamento de salud y al Centro de Control de Enfermedades (CDC), solo lo hacen los estados de Alabama, Florida, Louisiana, Maryland y Texas y monitorean el número de casos de infecciones de *Vibrio* en esta región que es parte del Golfo de México.

Patogenicidad

Sakurai *et al.* (1973), dividieron a *Vibrio parahaemolyticus* en dos grupos por la actividad hemolítica sobre el medio Wagatsuma: 1) las cepas con beta hemólisis (β hemólisis) sobre el medio Wagatsuma las llamaron fenómeno Kanagawa positivo (KP⁺) y 2) las que no mostraron hemólisis sobre el medio Wagatsuma fueron llamadas fenómeno Kanagawa negativo (KP⁻). Chun *et al.* (1975), mostraron que las altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) influyen en el factor Kanagawa el cual se observa mejor cuando se utiliza una concentración de cloruro de sodio al 3%.

Se han identificado 20 grupos distintos de antígenos "O" y 60 antígenos "K". Las cepas patógenas suelen ser capaces de producir una reacción hemolítica característica (fenómeno Kanagawa). Las dos formas de antígenos de este microorganismo pueden distinguirse por el fenómeno de "Kanagawa" el cual determina la hemólisis sobre medio agar sangre Wagatsuma. El fenómeno de Kanagawa es causado por la acción de la hemolisina directa termoestable (TDH), y se ha referido que en la mayoría de los casos clínicos los aislados de *Vibrio parahaemolyticus* son Kanagawa-positivos, mientras que la mayoría de los aislados del ambiente son Kanagawa-negativos.

La hemolisina termoestable directa (TDH) es llamada así, por su estabilidad al calor (Suthienkul *et al.* 1995); existe además, otra hemolisina TRH llamada hemólisis relativa termoestable (Honda *et al.* 1988).

A partir de un brote de gastroenteritis que se presentó en la República de Maldivas, Honda *et al.* (1988), observaron que las cepas aisladas presentaban el fenómeno Kanagawa negativo, de éstas, caracterizaron la hemolisina TRH. Por otro lado, también observaron que el cloruro de sodio al 3% inducía la producción de TDH, pero inhibía la producción de TRH. Una situación contraria se presentaba cuando se disminuía la concentración de cloruro de sodio al 0.5% la cual era favorable para la producción de TRH pero no para TDH.

Nishibuchi (1985), utilizó una prueba de hibridación en 19 especies de Vibrios, para analizar la presencia del gene *tdh* mostró que solo *V. hollisae* y *V. parahaemolyticus* lo presentan, con estos resultados se demostró que los otros vibrios aunque producían la hemolisina esta no era codificada por el mismo gene. La explicación que Nishibuchi mostró, a la presencia de este gene *tdh* en *V. parahaemolyticus* y *V. hollisae*, fue que se debía al resultado de una divergencia evolutiva de un ancestro común o bien a una transferencia interespecies. La homología del ADN de estos dos vibrios es menor al 4%, lo cual apoya la primera posibilidad. La segunda posibilidad es soportada con la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

explicación de la participación de un plásmido con el gene *tdh*. Sin embargo Nitsubishi (1986) comprobó que la secuencia de nucleótidos eran similares pero no iguales en la región probada del gene *tdh*.

Nishibuchi *et al.* (1989), compararon y analizaron los genes *tdh* y *trh* y observaron que tienen una homología del 68.6 % en la secuencia de nucleótidos, lo cual sugiere que derivan de un ancestro común y desarrollaron por alguna razón una separación clonal. También establecieron que existen cepas que presentan solo uno o dos genes, hecho que sugiere que ambos genes derivan de un ancestro común, y que ambos genes o uno solo fueron heredados por varias cepas. Shirai (1990), comprueba que los genes *tdh* y *trh* son factores de virulencia importantes de *V. parahaemolyticus*.

En el mismo año este autor (1990) Kaysner, estableció que el gene *tdh* tiene dos secuencias homólogas (*tdhA* y *tdhS*) y que la homología es de 97.2%. Kishishita (1992), estudió la secuencia del gene *trh* y observó la existencia de los genes *trh1* y *trh2*, los cuales tienen una homología de 84%. El *trh2* ha sido poco detectado en cepas ambientales. En cuanto a la actividad hemolítica, observó que las cepas con el gene *trh1* presentaron mayor actividad hemolítica en eritrocitos de humano, conejo, oveja y ternera; mientras que la actividad de genes con *trh2* fue menor en eritrocitos de humano y conejo.

En 1994 Kayner y Abeta también, describen que la TDH es una hemolisina secretada por *Vibrio parahaemolyticus*, con peso molecular de 46, 000 y presenta una toxina mutante denominada R7 (con una simple substitución de aminoácido en glicina 62). Esta toxina R7 es importante porque tiene la habilidad de unirse al eritrocito, pero no producir el halo hemolítico en los eritrocitos.

Nagayama (1995), señala que el fenómeno de Kanagawa es ocasionado por la hemolisina TDH/I, y que la mayoría de los casos clínicos son positivos a este fenómeno,

mientras que las cepas de tipo ambiental, son negativas. Sin embargo, detectaron cepas que presentan TDH que producen gastroenteritis, pero no dan el fenómeno de hemólisis. Lo anterior lo llevó a realizar estudios sobre esta hemolisina y a confirmar que existe *tdh/II* y que ésta se encuentra en un plásmido y *tdh trh tdh/I* están en el cromosoma.

Kaysner (1990), consideró que la producción de hidrólisis de urea era positiva para aislados de algunas regiones, pero negativa en otras.

En un estudio realizado en el noroeste del Pacífico, por Kayner y Abeta (1994), mencionan que la prueba de urea puede ser utilizada como una prueba tamiz para la predicción de cepas patógenas, ya que de 836 aislamientos ambientales (agua, ostión y sedimento), 298 (35.6%) presentaron la urea positiva y de estas solo 6 aislamientos de ostiones (28.6%) presentaron ambos genes (*ure* y *tdh*).

Iida *et al.* (1997), reportaron que en Tailandia se obtuvieron 489 aislamientos clínicos de *V. parahaemolyticus* y de ellos, el 8% fueron ureasa negativas (*ure*⁻), el fenotipo coincidió con la presencia del gene *trh* en estas muestras. Este descubrimiento sugiere que la producción de ureasa puede ser considerada como un indicio de virulencia (posesión del *trh*) en diagnósticos clínicos (Suthienhul, 1995). Sin embargo, ellos concluyen que la presencia o ausencia del gene "*ure*" es completamente coincidente con el gene *trh* en *V. parahaemolyticus*. Iida *et al.* (1995) identificaron que los genes *ure* y *trh* se localizan en el mismo fragmento Not I, en el DNA cromosómico, esto indica que el gene *ure* se localiza en el cromosoma y no en plásmido.

Epidemiología y modo de transmisión

Vibrio parahaemolyticus, es una bacteria que se asocia a enfermedades de tipo gastrointestinal, pero no todos ocasionan gastroenteritis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha observado que *Vibrio parahaemolyticus* en el humano, ocasiona trastornos intestinales caracterizados por diarrea acuosa y cólicos abdominales, en ocasiones con náusea, vómito, dolor de cabeza, fiebre y escalofrío. Las heces pueden presentar moco con o sin sangre, con número elevado de leucocitos. Es una enfermedad de gravedad moderada que en ocasiones requiere hospitalización. La duración media de la enfermedad es de 2 a 5 días, aunque en ocasiones persiste hasta por 7 días y rara vez llega a ocasionar la muerte.

El modo de transmisión es por ingestión de mariscos crudos o mal cocidos o por cualquier otro alimento expuesto a contaminación cruzada por la manipulación de mariscos crudos en el mismo ambiente, o después de enjuagarlo con agua de mar contaminada. En todos los casos de enfermedad, los alimentos involucrados son los camarones, ostiones, jaibas, langostinos, peces y alimentos preparados a base de arroz y mariscos como el sushi.

En un estudio que analizó 209 casos de infección por *Vibrio parahaemolyticus* se observó que solo una persona falleció después de ingerir ostiones. Se ha sugerido que el incremento de temperatura en el agua, es un factor que favorece la enfermedad. Al respecto se ha observado que el número de casos se incrementa durante los meses de julio y agosto, manteniéndose constantes durante el resto del año (CDC, 1998).

La probabilidad de infección en los meses cálidos del año también puede deberse a una refrigeración inapropiada de los alimentos contaminados con estos organismos los que continúan su proliferación e incrementan la probabilidad de infección. Hasta ahora, no se ha identificado que se pueda transmitir de persona a persona en forma directa. El periodo de incubación es de 4 a 96 horas después de haber ingerido el alimento contaminado, con una media de 15 horas. La enfermedad se origina cuando el organismo coloniza el intestino delgado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estudios epidemiológicos y microbiológicos realizados durante 1997 (CDC, 1998) mencionan que la dosis infectiva puede ser mayor o igual a 100,000 Unidades Formadoras de Colonias ($\geq 100,000$ UFC), los Estados Unidos y Canadá permiten la venta de ostiones si ellos tienen $< 10,000$ UFC de *Vibrio parahaemolyticus* por gramo de ostión.

El diagnóstico de la enfermedad se confirma por el aislamiento del organismo en las heces del paciente. Los métodos utilizados para aislar la bacteria de los alimentos son similares a los utilizados en los casos de diarrea. Aunque la demostración de la prueba de Kanagawa positiva ha sido considerada como indicativo de patogenicidad, en la actualidad esto es incierto.

El tratamiento indicado para la gastroenteritis ocasionada por *Vibrio parahaemolyticus* es la rehidratación oral y/o intestinal así como la administración de tetraciclina.

Algunas de las recomendaciones preventivas que proporciona la OPS son:

- Asegurar que todos los mariscos cocidos lleguen a temperaturas adecuadas para destruir al organismo (puede sobrevivir a $60^{\circ}\text{C}/140^{\circ}\text{F}$ incluso 15 minutos y a $80^{\circ}\text{C}/176^{\circ}\text{F}$ varios minutos).
- Manipular los mariscos cocidos de manera que se evite la contaminación con mariscos crudos o con agua marina contaminada.
- Conservar en refrigeración adecuada todos los mariscos, crudos o cocidos, antes de consumirlos.
- Educar a manipuladores y elaboradores de los mariscos respecto de estas medidas preventivas.
- Evitar el uso de agua de mar en las zonas en que se manipulen mariscos, es decir, en cruceros.
- Educar respecto de los riesgos que conlleva la ingestión de mariscos crudos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estudios realizados a este organismo, han mostrado que es capaz de sobrevivir después de hervir por cinco minutos el agua que contiene cangrejos inoculados con *Vibrio parahaemolyticus*. También es capaz de sobrevivir a bajas temperaturas en los refrigeradores.

Sensibilidad Antibiótica

Estudios realizados en Calcuta (1980), mostraron que *Vibrio parahaemolyticus* es sensible a la gentamicina (92.2%) y cloranfenicol (92.0%), moderadamente susceptible a la tetraciclina (42.2%) y doxociclina (17.8%).

Antecedentes Mundiales

Vibrio parahaemolyticus, fue aislado e identificado por primera vez en Osaka, Japón, en el año de 1950, por Fujino y colaboradores, a raíz de un brote de gastroenteritis originado por la ingestión de alimentos marinos. En un principio, se consideró limitado a Japón y a los mariscos como la causa principal de intoxicación alimentaria ya que el 73 por ciento de todos los brotes y el 60 por ciento de todos los casos, era originado por dicha bacteria. Se considera como una de las principales causas de enfermedad intestinal en el Japón, por el consumo de pescado crudo.

En 1973, fue descrito por primera vez en la Gran Bretaña, se presentó como una intoxicación masiva en la tripulación y pasaje de un vuelo internacional de Bangkok a Londres por la ingesta de bocadillos de cangrejo blanco contaminados con *Vibrio parahaemolyticus* (Gil et al. 1974).

En Estados Unidos, se identificó por primera vez en 1969. Un brote por *V. parahaemolyticus* se presentó en un barco crucero, donde noventa y uno de los 1059 pasajeros fueron afectados por una enfermedad transmitida por consumo de alimentos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

marinos. Este brote se caracterizó por un incremento rápido en el número de casos (CDC, 1998). Los organismos pueden ser aislados frecuentemente de aguas marinas, sedimentos, ostiones, crustáceos y plancton.

Asimismo se han presentado brotes de gastroenteritis ocasionados por *Vibrio parahaemolyticus* en diferentes partes del mundo como Canadá, Panamá, Inglaterra, Togo, Australia, Malasia, Florida, Calcuta, Bretaña, Mariland, Costas de Sudáfrica, Indonesia, Alaska, Korea, Covington, Nueva Zelanda y México. Además, se han realizado estudios en Israel, encontrándosele en agua, en las Costas del Atlántico y en sedimento.

Antecedentes en México

En México, fue aislado por primera vez en la Ciudad de Puebla, por Gil-Peral, López y Ruíz Reyes en el año de 1974, en casos de gastroenteritis y en moluscos.

En 1974, Gil Recasens y colaboradores, aislaron dos cepas a partir de 777 muestras de heces humanas. Dichas cepas se aislaron de dos adultos del sexo masculino con cuadro clínico de gastroenteritis aguda, con antecedentes de ingestión previa de ostiones crudos.

En el año de 1976, el Centro de Enfermedades de Atlanta (CDC) realizó un estudio de 107 personas que viajaron a México. Al regreso de los viajeros el aislamiento de bacterias de las heces mostró un individuo con *V. parahaemolyticus* y otros con bacterias tales como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*. (Morris *et al.* 1976).

En 1980, Pérez Memije y colaboradores, realizaron una búsqueda de *V. parahaemolyticus* en el Puerto de Acapulco, observaron que de 275 muestras de heces de personas manipuladoras de alimentos marinos, solo en dos casos se aisló el microorganismo.

Nava Fernández y colaboradores, en 1981 analizaron 200 muestras de ostiones procedentes del mercado de mariscos del Distrito Federal. Los resultados revelaron 10 muestras positivas *V. parahaemolyticus*, 7 de estas se recolectaron en verano y 3 en invierno. Los autores propusieron un mejor control en las zonas de cultivo y en la manipulación, ya que son factores que hacen que este alimento sea peligroso para el consumidor.

En 1983, Molina García y colaboradores, realizaron la búsqueda de anticuerpos contra *V. parahaemolyticus* en 100 manipuladores de alimentos, de estos 17 fueron positivos. Diez de los manipuladores fueron de alimentos marinos y 90 manipuladores de alimentos no marinos. De estos cultivos, 12 tuvieron anticuerpos contra *V. parahaemolyticus*. En dicho estudio se utilizaron dos cepas aisladas de casos de gastroenteritis como antígenos.

En 1987, Franco Monsreal y Flores Abuxapqui, realizaron un estudio sobre la prevalencia de *V. parahaemolyticus* en alimentos marinos de restaurantes de la ciudad de Mérida, Yucatán. Con este estudio, ellos probaron que los alimentos de origen marino representan una fuente potencial de infección.

En 1989, Franco y Flores, aislaron una cepa del microorganismo a partir de 26 muestras de heces de manipuladores de alimentos marinos en la ciudad de Progreso de Castro en Yucatán.

En 1989, Abbott y colaboradores aislaron *V. parahaemolyticus* de heces de 45 humanos e hicieron pruebas para identificar los aislamientos incluyendo cultivo, actividad bioquímica, propiedades serológicas y criterios fisiológicos. El 71 por ciento de las muestras (32 de las 45) tuvieron actividad de ureasa positiva. Diecinueve de ellas (59 %) estuvo asociada al serovar O4:K12 que se relaciona con el fenotipo ureasa positiva. El historial médico indicó que diez de los individuos infectados habían ingerido ostras y los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

otros dos habían viajado recientemente a México. Se sospechó que las ostras fueron el vehículo de transmisión de este agente originado en las granjas locales o recibido de localidades de la costa oeste (Washington y México). Por otro lado, la mayoría de los aislamientos ureasa positivo o negativo se obtuvieron de individuos que habían viajado al sureste de Asia o México. Los perfiles proteicos revelaron algunas diferencias entre ocho cepas examinadas, todas las variedades O4:K12 tenían perfiles proteicos idénticos. Otros cuatro aislamientos tenían O,K,Uh en combinaciones fácilmente distinguibles y el grupo O4:K12 Uh+ se distinguió por la presencia o ausencia de una o más proteínas. Esta investigación establece la emergencia de una serovar (O4:K12) asociada con un marcador fenotípico poco común (la hidrólisis de la urea) como causa predominante de *V. parahaemolyticus* asociado a gastroenteritis en Estados Unidos y México.

Franco y Flores en 1991, reportaron la prevalencia de *V. parahaemolyticus* en heces de manipuladores de alimentos marinos, así como la prevalencia de anticuerpos contra *V. parahaemolyticus* en los sueros de dichos manipuladores. El estudio se realizó entre el 1° de marzo y el 31 de agosto de 1989. Los resultados mostraron que solo dos tenían anticuerpos contra *V. parahaemolyticus*, por lo que concluyen que el estado de portador asintomático es de corta duración y que existe contacto e infección de *V. parahaemolyticus* entre los manipuladores de alimentos marinos.

Objetivo

Conocer la frecuencia de aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* con factores de virulencia en muestras de agua, sedimento y ostión para determinar su importancia como agente etiológico de diarrea en México.

Objetivos particulares

1. - Caracterizar por pruebas bioquímicas las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* ureasa positivas.
2. Identificar por la prueba de Kanagawa las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* productoras de hemolisinas.
3. Determinar la presencia de los genes *ure*, *trh* y *tdh* en cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, con fenotipos urea⁺/hemólisis⁺, urea⁺/hemólisis⁻, urea⁻/hemólisis⁺, urea⁻/hemólisis⁻.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Justificación

Vibrio parahaemolyticus tiene como hábitat natural el ambiente marino por lo que se puede aislar de ostión y crustáceos, se ha determinado su presencia en plancton, columna de agua y sedimentos de estuario.

Su importancia para el humano, se debe a que se han reportado brotes epidémicos por el consumo de ostiones contaminados por el microorganismo. Se ha observado que el tipo de toxina que produce, puede ocasionar desde una simple diarrea hasta cuadros severos que llevan a la muerte (Altekruse, *et al.* 2000).

En 1992, se presentaron en la República Mexicana brotes de cólera después de casi 100 años de no haberse presentado en el continente americano. Lo anterior trajo como consecuencia un incremento en los estudios para buscar *Vibrio cholerae* O1 en agua y alimentos. Sin embargo, no se ha planteado la búsqueda de otras bacterias del género, como *Vibrio parahaemolyticus* que también tiene importancia médica y epidemiológica.

Una revisión bibliográfica en la que se analizó la información de los últimos 33 años, mostró que aunque se han realizado trabajos relacionados con *Vibrio parahaemolyticus*, estos no han sido dirigidos a la búsqueda del microorganismo en su hábitat natural. En este estudio proponemos la búsqueda de la bacteria en uno de los estados de la República, que presentó mayores problemas relacionados con el cólera, con el propósito de conocer la frecuencia en la que se puede aislar así como algunas de las propiedades de virulencia presentes en la bacteria, para determinar su posible participación como agente etiológico de la diarrea en México.

Hipótesis

La caracterización fenotípica y genotípica de *Vibrio parahaemolyticus* permitirá determinar si en México, las cepas existentes podrían constituir un problema de salud pública.

Métodos

Se analizaron 208 aislamientos a partir de muestras ambientales y una cepa tipo de *Vibrio parahaemolyticus* (10903) (Laboratorio Central de Salud Pública de Londres Inglaterra).

Los aislados se obtuvieron de un estudio previo realizado en el laboratorio del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.

La identificación de los aislados, se realizó por el sistema automatizado Vitek (Ramírez, 1999).

Identificación Bioquímica

- **Pruebas Bioquímicas Tradicionales.** Se utilizaron las siguientes substratos: Arginina, Citrato, Lisina, Manitol, ONPG, Ornitina, Sacarosa, Urea, Oxidasa, Indol, Voges Proskauer, Trealosa, Nitratos, Gluconato. Algunos de los substratos para las pruebas se encuentran en la tarjeta GNI (Vitek), sin embargo se repitieron, debido a que algunas bacterias tardan más de 24 horas en utilizar el medio.

Prueba para Hemolisinas

- **Prueba Kanagawa.** Para observar el fenómeno Kanagawa (Chun *et al.* 1975), se utilizó el agar sangre Wagatsuma (WBA) al cual se le adicionó 5% de eritrocitos humanos de tipo sanguíneo "O" positivo. El agar se dispuso en cajas petri, a las que se inoculó por medio de una picadura, se incubó a 35°C. Durante 24 horas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Detección de Genes de Virulencia

Obtención de ADN

Para la obtención del ADN, se probaron las técnicas de ebullición, fenol-cloroformo y sacarosa. (Methods for General and Molecular Bacteriology, 1994, Suthienkul *et al.* 1995. Iida *et al.* 1997).

Para la extracción de ADN las cepas se inocularon en 5 ml de caldo luria con cloruro de sodio al 3% y se incubaron con agitación (a 150 rpm) por 18 horas 35°C (Iida *et al.* 1997).

•Técnica de ebullición. El cultivo celular en caldo luria, se centrifugó a 8000 rpm, por 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el botón se resuspendió en agua bidestilada estéril. Después se hirvió a 100°C por 5 minutos y se centrifugó a 8000 rpm, por 5 minutos. El sobrenadante se almacenó a -20°C, hasta que se realizó PCR (Iida *et al.* 1997).

•Técnica de sacarosa. El cultivo se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, y se resuspendió en 200µl de buffer STET (Sacarosa 8% (w/v), Tritón X-100, al 0.1% (w/v), EDTA 50mM y TRIS-HCl 50mM (pH-8)). Se agregaron 4µl de lisozima (50µg/ml) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se hirvió 45 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos. Se retiró el botón formado y se agregó CTAB (5% w/v). Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos. Por último se desechó el sobrenadante y el botón formado se resuspendió en 100µl de agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20°C, hasta que se realizó el PCR.

•Técnica de fenol-cloroformo. El cultivo obtenido en caldo luria se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima de la centrifuga y el botón formado se resuspendió en 567µl de TE 1X, 30µl de SDS al 10% y 3µl de proteinasa K y se incubó 1 hora con

agitación. En seguida se agregaron 100 μ de NaCl (5M) y 80 μ l de CTAB/NaCl, se incubó 10 minutos a 65°C. Al término de esto se le agregó igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. Se le extrajo el sobrenadante y a éste se le agregó igual volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y a él se le adicionó igual volumen de alcohol isopropanol se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y al botón se le agregaron 600 μ l de alcohol etanol, se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm, se tiró el sobrenadante y el botón formado se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20°C, hasta que se realizó PCR.

El método seleccionado fue la extracción fenol-cloroformo

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Mezcla de amplificación

Los programas utilizados se estandarizaron basados en lo propuesto por Suthienkul *et al.* (1995), para la amplificación del gene *ure* y para los genes de las hemolisinas *tdh* y *trh* reportado por Iida *et al.* (1997)

Para preparar la mezcla de amplificación, se utilizaron las secuencias de los oligonucleótidos referidos por Suthienkul *et al.* (1995) para la detección del gene *ure* y para los genes *trh* y *tdh* señalada por Iida *et al.* (1997)(cuadro 1).

La mezcla de amplificación para *tdh* y *trh* se preparó con 2.85 μ l de solución pH 7, 0.595 μ l de dNTP's (10mM), 22 μ l de agua, 0.28 μ l de Taq ADN polimerasa (Gibco), 1.1428 μ l de oligonucleótidos (*trh* y *tdh* de cada uno) y 2.5 μ l de ADN muestra.

La muestra para la amplificación del gene *ure* fue: 2.85 μ l de solución pH 7, 0.595 μ l de dNTP's (10mM), 22.632 μ l de agua, 0.28 μ l de Taq ADN polimerasa (Gibco), 1.1428 μ l de oligonucleótidos (*ure*) y 2.5 μ l de ADN muestra.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para los genes *ure*, *tdh* y *trh*.

gene	Oligonucleótidos	Tamaño	Ref.
<i>ure</i> ₂	5'-CGTCGAATTC(A/T)(A/G)AT(A/T)(G/C)TIACIGC(T/C)G(G/C)IGGIATIGAT-3'	615pb	1
<i>ure</i> ₄	5'-GCTCGAATT-CA(G/A)(G/A)T(G/T)(G/A)TG(G/A)CAIACCATIAICAT(G/A)TC-3'		
<i>tdh</i>	5'-GTACCGATATTTGCAA-3'	382pb	2
<i>tdh</i>	5'-ATGTTGAAGCTGTACTIONTGA-3'		
<i>trh</i>	5'-CTCTACTTTGCTTTCAGT-3'	460pb	
<i>trh</i>	5'-AATATTCTG-GAGTTTCAT-3'		

1. J. Infect. Dis. 172: 1405-1408. 1995.
2. J. Med. Microbiol. 48: 638-645.

- **Condiciones para la amplificación**

Para determinar la presencia de los genes que codifican para las hemolisinas, genes *trh* y *tdh* se utilizó el termociclador HP-9700 (Hewlett Packard), con los programas, para *trh*, 1X 94° 5'; 35X 94° 1'50'', 48° 2', 72° 2'30''; 1X 72° 7' y para *tdh* 1X 94° 5'; 35X 94° 1'30'', 38° 1'40'', 72° 2'; 1X 72° 7'.

Para el gene *ure* se utilizó un termociclador HP-480 (Hewlett Packard) con el programa 1X 94° 5'; 35X 94° 1'30'', 55° 1'4'', 72° 2'; 1X 72° 7'.

- **Electroforesis**

Los productos obtenidos de la PCR, se corrieron en un gel agarosa (Gibco) al 1.5%, el cual contenía 3µl de bromuro de etidio (Zigma) por cada 100 ml de agarosa. El gel se colocó dentro de una cámara horizontal para electroforesis (modelo 192 Bio-Rad) que contenía solución TBE 1X [Tris Borato EDTA (5.4gr de Tris base, 2.7gr de ácido bórico y 20ml de EDTA 0.5Molar)]. En cada pozo del gel se depositaron 15µl de muestra. Al gel se le aplicó una corriente de 100Volts por 90 minutos aproximadamente. La observación de los amplificados se realizó en un documentador de imágenes (Kodak ID Image Analysis Software, 2000) donde se imprimieron las imágenes de los geles que se presentan en este estudio.

Resultados

El análisis de la información obtenida de los registros de la Secretaría de Salud, en el estado de Tabasco, durante los años de 1997, 1998 y 1999 mostraron que los casos de gastroenteritis eran más de 80 000 por año sin determinar la etiología de las enfermedades. Con respecto a las infecciones ocasionadas por *Vibrio cholerae* fueron menores al 1% en los tres años (figura 1). Aunque las cifras de enfermedades intestinales son altas la gran mayoría son de origen desconocido.

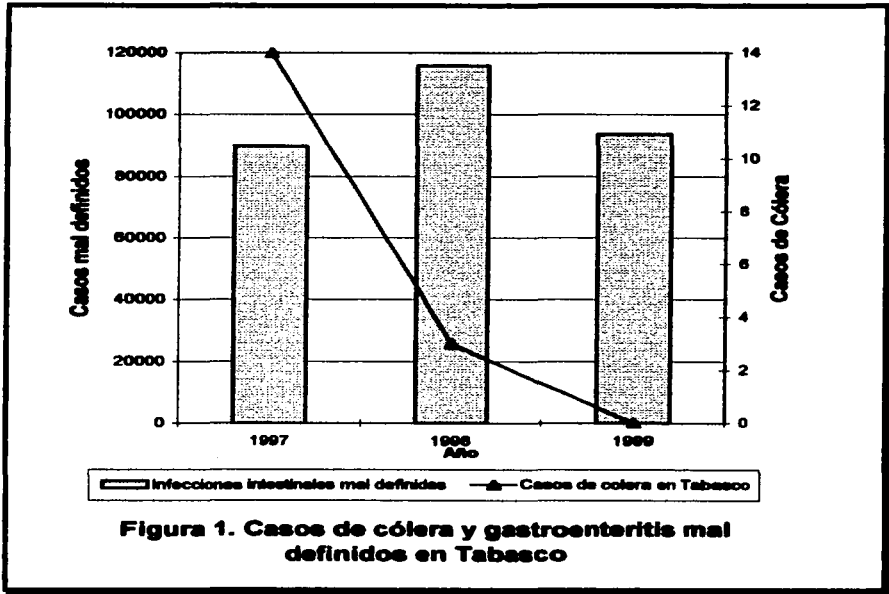
Para evaluar la posible participación de *Vibrio parahaemolyticus* en la etiología de este padecimiento, se realizó la búsqueda intencional de la bacteria en la Laguna de Mecoacán, Tabasco.

Durante un estudio previo para evaluar la presencia de *Vibrio cholerae*, se colectaron muestras de sedimento, agua y ostión en dos épocas del año, lluvias (septiembre, 1997) y secas (mayo, 1998), se muestreó en siete estaciones de la Laguna de Mecoacán, Tabasco (figura 2).

De estas muestras se obtuvieron 208 aislamientos identificados como *Vibrio parahaemolyticus*. El 59% (122) fueron obtenidos en la época de lluvias y el 41% (86) en secas. La distribución por tipo de substrato mostró 94 aislados de agua (45%), 65 de ostión (31%) y 49 de sedimento (24%).

Se observó además que tanto en agua como en ostión, el número de aislados fue similar en los dos periodos de estudio, mientras que en el sedimento, la cantidad de organismos fue mayor en la época de lluvias que en secas. Asimismo puede observarse, que el número de aislados por estación fue constante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



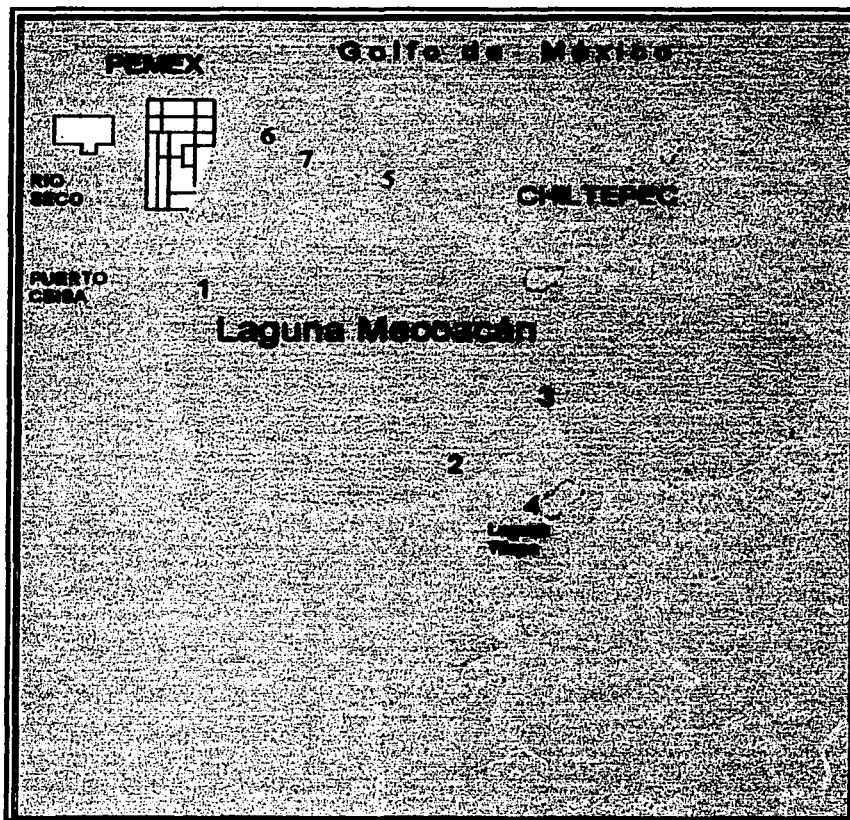


Figura 2. Laguna de Mecocán, Tabasco. Los números indican los sitios en que se localizan las diferentes estaciones de muestreo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caracterización por biotipos

Para corroborar algunos resultados de identificación se realizaron pruebas bioquímicas con diferentes sustratos. Cuando la identificación previa por el sistema Vitek se complementó con diferentes sustratos (pruebas bioquímicas) se observaron diferencias importantes. Al respecto se encontró que la hidrólisis de ornitina mostró diferencia de 19% de positividad mayor que la reportada por el sistema Vitek. Con la arginina el método tradicional reportó 27% de cepas que hidrolizaron el aminoácido contra solo 1% con Vitek. Al respecto la literatura refiere como negativa esta prueba. La utilización de citrato como fuente de carbono fue positiva solo en 1% de los aislamientos con el sistema automatizado, mientras que con la técnica tradicional fueron positivas el 38% de los aislamientos. La fermentación del manitol fue positiva en 97% de los aislados con Vitek y 68% con la prueba tradicional. Finalmente el 96% de los aislados fué positivo para el gluconato con Vitek y solo en el 0.5% con las pruebas tradicionales.

Con estos datos se procedió a analizar la posible existencia de biotipos en la zona de estudio. Para ello se consideraron las siguientes pruebas bioquímicas, Indol, Oxidasa, Voges Proskauer, Gluconato, Nitratos, Lisina, ONPG, Manitol, Citratos y Arginina.

El análisis de los resultados obtenidos con estas pruebas determinó la presencia de 5 biotipos diferentes, considerando como significativos por su abundancia a cinco, que representan el 84% de los 208 aislados (cuadro 2).

Prueba de urea

La producción de ureasa se considera importante ya que se ha reportado correlación con la prueba de hemólisis en cepas virulentas de aislados clínicos. En este estudio se observó que con el método automatizado solo el 1% de las cepas presentó la prueba positiva, mientras con la prueba tradicional el 43% (90/208) de las cepas hidrolizaron la urea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Biotipos identificados en los aislados de *Vibrio parahaemolyticus* de la Laguna de Mecoaacán, Tabasco.

No. de Biotipo	Kanagawa	Urea	Oxidasa	Trealosa	Orritina	Lisina	Nitratos	Indol	Arginina	Manitol	Citratos	ONPG	Sacarosa	Gluconato	Voges Proskauer	No. de Organismos	Frecuencia
Cepa control	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-		
1	(+/-)	(+/-)	+	+	+	+	+	+	-	(+/-)	(+/-)	-	-	-	-	123	59.13
2	(+/-)	(+/-)	+	+	+	+	+	(+/-)	+	(+/-)	-	-	-	-	-	54	25.96
3	(+/-)	(+/-)	+	+	+	+	+	+	+	(+/-)	(+/-)	-	-	-	-	26	12.49
4	(+/-)	(+/-)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	3	1.44
5	(+/-)	(+/-)	+	+	+	+	+	+	(+/-)	(+/-)	+	+	-	-	-	2	0.96
Total																208	99.98%

Prueba de hemolisinas

Se considera que las cepas virulentas son productoras de hemolisinas, en el estudio se encontró que la prueba de Kanagawa, en agar Wagatsuma fue positiva en 120/208 (82%), la prueba se repitió al observar que el porcentaje era alto, en este segundo ensayo, la lectura de la prueba se realizó a diferentes tiempos, observándose que el 70/208 (34%) de los aislamientos lisó los eritrocitos a las 24 horas mientras que en el resto de las cepas se observó el mismo efecto 50/208 (48%) a las 48 horas.

Al analizar la frecuencia con la que se presentaba las prueba de Kanagawa y urea positivas se encontró que el 35% del total de los aislamientos estudiados presentaron ambas pruebas positivas (cuadro 3).

Detección de genes de virulencia

- Obtención de ADN

Se utilizaron tres métodos de extracción de ADN para evaluar cuál podría ser más conveniente. Al respecto se observó que con la técnica de ebullición el ADN extraído no tenía mucha pureza. Lo anterior se determinó al analizar el gel en el que se realizó la electroforesis y se observó una imagen con banda difusa. Con la técnica de sacarosa aunque se observó poca difusión de las bandas en el gel, pero al almacenar la muestra el ADN presentó degradación importante. La técnica de extracción que dió mejores resultados fué la de fenol/cloroformo, con ésta, el ADN no presentó difusión de las bandas y se pudo almacenar por meses sin que este sufriera degradación.

- PCR para los genes *ure*, *tdh* y *trh*:

Se consideró importante evaluar la presencia de los genes *ure*, *tdh* y *trh* en diferentes aislados. La detección se hizo en 68 cepas (considerando este número representativo de las 208 cepas), con los fenotipos urea⁺/hemólisis⁺ (24), urea⁻/hemólisis⁺ (21), urea⁺/hemólisis⁻ (8), y urea⁻/hemólisis⁻ (15). Los resultados obtenidos mostraron que

ninguna de las cepas amplificó los tres genes, 14 fueron *ure*⁺, 6 *trh*⁺. En dos cepas diferentes se observó amplificación para dos de los genes una fué *ure*⁺ *lrh*⁺ y la otra *trh*⁺ *ldh*⁺ (cuadro 4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Pruebas de Ureasa y Fenómeno Kanagawa en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de diferentes substratos.

Ambiente	Ureasa		Kanagawa		Ureasa y Kanagawa	
	No.	%	No.	%	No.	%
Agua	3	1.44	51	24.52	31	14.90
Ostión	10	4.80	27	12.98	22	10.57
Sedimento	4	1.92	19	9.14	20	9.61
TOTAL	17	8.17	97	46.63	73	35.09

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Relación entre pruebas metabólicas para urea y hemólisis y presencia de los genes *ure*, *tdh* y *trh*, determinadas por PCR.

Ambiente	Estación No.	No. de cepas	Hidrólisis de urea	Hemólisis	Genes			
					<i>ure</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>	
Epoca de Lluvias								
Agua	1	1	+	+	-	+	-	
Agua	5	1	+	+	-	+	-	
Agua	6	1	-	+	+	-	-	
Agua	6	1	-	-	+	-	-	
Ostión	2	1	-	+	+	-	-	
Ostión	7	1	-	+	-	+	-	
Ostión	7	1	-	+	+	-	-	
Ostión	7	1	-	-	+	-	-	
Sedimento	1	1	+	+	+	-	-	
Sedimento	2	1	+	+	+	-	-	
Sedimento	3	1	+	+	+	-	-	
Sedimento	4	1	+	+	+	-	-	
Sedimento	6	1	+	+	-	+	-	
Sedimento	7	1	-	-	-	+	-	
Epoca de secas								
Agua	3	1	+	+	-	+	-	
Agua	3	1	+	+	+	+	-	
Agua	5	1	+	-	+	-	-	
Agua	6	1	+	+	-	+	+	
Agua	6	1	-	-	+	-	-	
Agua	7	1	-	+	+	-	-	
Ostión	5	1	-	+	+	-	-	
Ostión	7	1	-	+	+	-	-	
Total		22			15	8	1	

Discusión

Las bacterias del género *Vibrio* habitan aguas marinas, algunas especies como *Vibrio cholerae* O1 y O139 son patógenas para el humano. En México se han realizado estudios relacionados con la distribución ambiental y patogénesis de *Vibrio cholerae*. Sin embargo, poco se ha hecho con respecto a *Vibrio parahaemolyticus*, bacteria que se aisló en el Estado de Puebla en 1974, antes de la aparición de la epidemia de cólera que se inició en 1992.

Kaysner *et al.* (1990), encontraron una alta incidencia (71.5%) de *Vibrio parahaemolyticus* en agua, sedimento y ostión en Washington. Nuestro estudio coincide con lo anterior, ya que datos obtenidos en la Laguna de Mecoaacán, muestran que *Vibrio parahaemolyticus* está en mayor proporción que otras bacterias incluido *Vibrio cholerae* (Ramírez *et al.* 1999).

Colwell *et al.* (1981), en un estudio realizado en la Bahía de Chesapeake, E.U.A. encontraron que *Vibrio parahaemolyticus* se puede aislar del sedimento agua y ostión. Al igual que en el caso anterior, en nuestro trabajo se obtuvieron resultados similares ya que se realizó el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en los tres substratos antes mencionados.

Existen diferentes reportes en relación con los factores ambientales que influyen en el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus*. Kaneko *et al.* (1978), observaron que la bacteria se distribuye principalmente en regiones costeras y desembocaduras de los ríos. En relación entre la

asociación del aislamiento de la bacteria y las estaciones del año, los mismos autores encontraron que se presentan cambios estacionales en la población de *Vibrio parahaemolyticus* en el agua y sedimento, asociado con el cambio de temperatura en la superficie del agua. En dicho estudio la temperatura durante el invierno fue de -2°C y la máxima en Julio de 31.2°C. Sakazaki (1979), reportó que *Vibrio parahaemolyticus* crece entre los 15 y 42°C, obteniendo su máximo desarrollo entre los 30-35°C.

En este estudio los resultados obtenidos coinciden con lo antes referido ya que la Laguna de Mecoacán se localiza en la zona costera y en ella desemboca el río Seco. En cuanto al cambio estacional, se puede mencionar que en la Laguna, la temperatura promedio anual es de 26 ±6°C (Cortés *et al.* 2000). Lo anterior resulta importante por el hecho de que la bacteria se encontró presente en la Laguna, durante los dos periodos de estudio, sugiriendo que es factible aislarla en cualquier época del año. Sin embargo, existen otros factores que al parecer influyen en la proporción de aislamiento. El aislamiento de *V. parahaemolyticus* fue mayor en época de lluvias que en secas. Esta observación pudiera estar relacionada con el arrastre de materia orgánica, materia fecal hacia la Laguna así como incremento de temperatura. Al respecto, es importante señalar que en las márgenes de la laguna existen asentamientos humanos, por lo que las actividades antropogénicas participan de manera importante en la presencia de la bacteria en la laguna y a su incremento en la época de lluvias.

Sarkar *et al.*, (1983) mencionan que *V. parahaemolyticus* puede sobrevivir por tiempos prolongados dentro del plancton, ya que le sirve de protección cuando las condiciones del ambiente son desfavorables. Olafsen *et al.* (1993), mostraron que en la hemolinfa y tejido suave de

bivalvos se encuentran bacterias como *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, otras especies de *Vibrio* y *Aeromonas*. Williams (1984), muestra que la distribución en la frecuencia de Bdellovibrios en la columna de agua no está relacionada con parámetros como oxígeno disuelto, ya que a una profundidad de 13m donde la presencia de oxígeno disuelto era nula se aislaron Bdellovibrios, por lo que concluyen que la presencia de la bacteria se debe a los hospederos. Esto apoya porque se aisló *V. parahaemolyticus* en los tres ambientes. El haber aislado un número similar de *V. parahaemolyticus* en agua y ostión en las dos épocas del año, se debe probablemente a que *Vibrio* se encuentra asociado al plancton, en los ostiones, así como en la materia orgánica en suspensión. Por otro lado que la bacteria se haya encontrado en el sedimento en un mayor número en época de lluvias que en secas, pudiera estar relacionado, con los aportes de aguas residuales que recibe la laguna y los arrastres naturales ocasionados por las lluvias.

El Sahn *et al.* (1982), encontraron que en el Mar Alexandria, Egipto, el promedio de *V. parahaemolyticus* en los tres ambientes fue: en sedimentos de 0-23/g, en invertebrados de 0-150/g y en agua de mar de 0-11/mL. En la Laguna de Mecoaacán en promedio se aislaron en sedimento 6 org./estación en época de lluvias y <1 org./estación en época de secas. En ostiones 5org./estación en lluvias y en secas, mientras que en agua 6org./estación en lluvias y 7 org./estación en secas. Con ello se observa que el número de organismos aislados en la Laguna de Mecoaacán es menor que el encontrado por mililitro en otras partes del mundo como Egipto. Esto nos conduce a considerar que esta pudiera ser la razón por la cual en México *V. parahaemolyticus* no ha ocasionado epidemias como en Japón, India, etc.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es importante mencionar que en Tabasco que fue zona endémica de cólera, el número de casos reportados disminuyó con el tiempo (figura 1). Sin embargo la incidencia de diarreas y gastroenteritis mal definidas se mantuvo elevada. Es factible que muchos de estos casos se relacionen con infecciones por *V. parahaemolyticus*.

Con 208 aislamientos se conformaron cinco biotipos de los cuales 3 fueron los más importantes por su abundancia (cuadro 2).

Los resultados por biotipos permitieron identificar una gran variabilidad en las cepas aisladas en la época de lluvias. Esta observación pudiera deberse a los aportes de agua de lluvia y aguas residuales que transportan una mayor variedad de microorganismos excretados por individuos colonizados.

No existe en la literatura reportes de biotipos característicos de *Vibrio parahaemolyticus*, al respecto solo se han reportado las bioquímicas características y la producción de ureasa positiva (Lam, 1980). En este estudio se incluyen ambas pruebas que se han relacionado con cepas virulentas. Aunque se requieren más estudios al respecto el empleo de biotipos para caracterizar a la bacteria puede ser un procedimiento útil.

Diferentes propiedades metabólicas han sido descritas para *Vibrio parahaemolyticus*, algunas de ellas son la capacidad de hidrolizar urea y la de producir hemólisis. Estas propiedades han sido estudiadas debido a que han sido relacionadas con infecciones gastrointestinales. Sakazaki *et al.* (1963) mostraron que de 1700 cepas, solo el 4% era capaz de hidrolizar urea. Colwel, (1974) analizó 30 cepas aisladas en Japón, de ellas el 97% expresaron la ureasa. Twedt *et al.* (1975) compararon la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

prueba de ureasa en cepas aisladas en Estados Unidos y otros aislados en Japón, al respecto el 7.6% de las aislados en Japón presentaron la prueba positiva y ninguna de las de Estados Unidos. West *et al.* (1986) estudiaron 60 cepas ambientales, estableciendo que el 25% producía ureasa. Abbott *et al.* (1989), señalan como un biotipo a las cepas ureasa positivas aisladas en la costa Oeste de Estados Unidos y de la parte norte del Golfo de México.

En este estudio, el 43% de los aislados de *Vibrio* fueron capaces de hidrolizar la urea. Los resultados obtenidos muestran la existencia en la Laguna de Mecoaacán de cepas de *V. parahaemolyticus* con características de virulencia.

De manera general las cepas de origen clínico producen hemólisis β sobre agar Wagatsuma, sin embargo, muy pocas de origen ambiental dan la prueba positiva, por lo que, las cepas ambientales son consideradas como no patógenas (Gosh y Sehgal, 2001). Sin embargo Shirai *et al.* (1990), mostraron que entre el 1-2% de las cepas ambientales manifiestan el fenómeno Kanagawa positivo.

En los 208 aislamientos de este estudio se observó que 82% de ellos presentaron hemólisis positiva, dato superior a lo registrado en otros estudios. De estos el 55% presentó α hemólisis y el 27% β hemólisis. Por lo anterior se podría pensar que algunas de nuestras cepas provienen de pacientes y que muy probablemente se trata de cepas con genes patógenos (figura 3).

Kaneko, 1978, Salkar, 1983 y Olafsen, 1993, han sugerido la sobrevivencia de aislamientos kanagawa positivos en sedimentos debido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A



B



C

Figura 4. Prueba de hemólisis en agar Wagatsuma. A, no hemólisis; B, hemólisis de 24 horas; C, hemólisis después de 24 horas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a la asociación de las bacterias con otros organismos. Ello explica porque en la Laguna de Mecoacán, se obtuvieron aislamientos kanagawa positivos en sedimentos, agua y ostión.

Los aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus* de la Laguna de Mecoacán, por el hecho de presentar la prueba de ureasa y fenómeno de Kanagawa positivas, sugieren la presencia de cepas con propiedades de virulencia capaces de producir enfermedad.

Lo anterior plantea la necesidad de realizar estudios de vigilancia epidemiológica y el cultivo de heces de pacientes con cuadros de diarrea.

Nishibuchi *et al.* (1986), mostraron una asociación entre el fenómeno Kanagawa y el gene *tdh*, que está directamente asociado con enfermedades gastrointestinales. Nishibuchi *et al.* (1989) reportan que se puede encontrar uno o los dos genes (*tdh* y *trh*) en una misma cepa. Nuestros resultados coinciden aunque en baja proporción con lo reportado por dicho autor, ya que se observó una cepa con el gene *trh* y otra con ambos genes (*trh* y *tdh*).

Kayner *et al.* (1994) e Iida *et al.* (1997) consideraron que la prueba bioquímica de urea puede servir para predecir la posible virulencia de las cepas de *V. parahaemolyticus*, ya que se ha observado que la producción de urea está relacionada con la presencia del gene *tdh*⁺. Sehgal (2001), menciona que la producción de ureasa y la presencia del gene *trh*, indican virulencia. Kaufman *et al.* (2002), manifiestan que la producción de ureasa está ligada con la presencia de los genes *tdh* y *trh*. Dichos autores sugieren que la prueba de ureasa junto con la amplificación de

dichos genes por PCR pueden ser utilizadas para detectar cepas potencialmente patógenas.

Con respecto a lo anterior, en nuestro estudio se observó una cepa clásica de virulencia, porque presentó las pruebas bioquímicas de urea y Kanagawa positivas y con la prueba de PCR se determinó la presencia de los genes *tdh/trh*. (fig.4)

También se encontró una cepa que presentó ureasa y kanagawa positivas y los genes de *ure* y *trh* presentes.

Kaysner (1990), observó existen cepas con el gene *trh1* con mayor actividad hemolítica en eritrocitos de humano que las cepas que presenta el gene *trh2*. La posible presencia de cualquiera de los genes *trh* en las cepas podría explicar la variabilidad de la hemólisis presente en las cepas y que una cepa presente el gene *trh*⁻ y la prueba de hemólisis negativa, o bien que presente la hemólisis positiva y el gene *trh*⁺.

En general se puede mencionar que en la Laguna de Mecoacán existen cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con propiedades de virulencia potencialmente patógenas para humanos.

Es importante considerar para estudios posteriores el empleo de otros iniciadores con el propósito de conocer si las pruebas metabólicas de hemolisinas corresponden a las hemolisinas descritas para *Vibrio parahaemolyticus* o estas cepas producen otro tipo de hemolisinas .

Los resultados llevan a considerar que a la Laguna de Mecoacán llegan aguas residuales de las zonas aledañas, como son los asentamientos en la

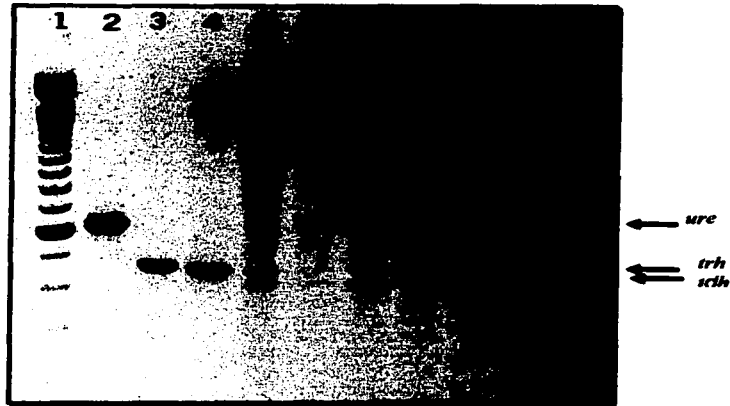


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% revelado con bromuro de etidio. La fotografía se obtuvo con un amplificador de imágenes (Kodak ID Image Analysis Software, 2000). En los carriles 2, 3 y 4, se presentan resultados positivos de la cepa control, el gene *ure* (615pb), *trh* (460pb) y *tdh* (380pb). Carriles 7 y 11 se observan cepas positivas a los genes *ure*, *trh*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ribera de la Laguna, así como también los aportes de los ríos que a lo largo de estos van acumulando materia orgánica con heces que llevan microorganismos. Entre éstos se puede mencionar *Vibrio parahaemolyticus* que es extraído de su hábitat a través del consumo de ostiones y regresado a su hábitat a través de en la materia orgánica donde puede permanecer por largos periodos, o establecerse nuevamente en ostiones.

El consumo de dichos alimentos podría estar relacionado con la alta incidencia de cuadros de gastroenteritis mal definidos.

Debido a los resultados obtenidos, sugerimos que con este antecedente se debe prevenir a la población de este organismo, ya que la Laguna de Mecoacán se puede considerar como un foco de infección hacia la población, como también un reservorio para *Vibrio parahaemolyticus* que presente propiedades de virulencia.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conclusiones

Se identificaron 5 biotipos de *Vibrio parahaemolyticus*, de estos, 3 fueron los más importantes. El número de biotipos varía con la época del año, y se sugiere está relacionada con los aportes que recibe la Laguna y los asentamientos humanos que existen a su alrededor.

En la Laguna de Mecoacán se encuentran cepas urea⁺/hemolisis⁺ urea⁺/hemolisis⁻, fenotipos que se pueden considerar virulentos aunque no presenten los genes.

El ensayo de PCR mostró cepas con genes de virulencia aunque la presencia podía o no coincidir con la prueba metabólica.

Los resultados en su conjunto, muestran la existencia en la Laguna de Mecoacán, cepas de *Vibrio parahaemolyticus* potencialmente virulentas que pueden ser responsables de muchos de los cuadros de gastroenteritis mal definidos que son reportados cada año en la entidad.

TESIS CON
DE ORIGEN

Referencias

1. Abbott, S. L., Powers, C., Kaysner, Ch. A., Takeda, Y., Ishibashi, M., Josheph, S. W. and Janda, M. 1989. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of Vibrio-associated gastroenteritis on the west coast of the United States and Mexico. *Journal Clinical Microbiology*. **27**(12) 2891-283.
2. Altekruise, S.F., Bishop, R.D., Baldy, L. M., Thompson, S. G., Wilson, S.A., Ray, B.J., y Griffin, P.M. 2000. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of México region: the role of raw oysters *Epidemiol. Infect.* **124**, 489-495.
3. Bell, R. y Carmelli, S. 1994. Vibriondole A, a metabolite of the marine bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*, isolated from the toxic mucus of the boxfish *Ostracion cubicus*. *Journal of Natural Products*; **57**(11) 1587-1590.
4. CDC. 1998. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters. *Pacific Northwest, MMWR*. 1997.; **47**: 457-462.
5. Chun, D., Chung, J., Tak, R., and Seol, S. Y. 1975. Nature of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **12** (1): 81-87.
6. Colwell R.R., Kaper J.B., Remmers E.F., Lockman H. 1981. Distributios of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay during the

summer season. *Estuaries*. **4**: 321-327.

7. Cortés, M. J. , Ramírez, G. P., Sánchez Ch. J. 2000 Ocurrance of *Vibrio cholerae* in the brackish water of a coastal lagoon on the Gulf of México. *Ecovision Worl Monograph Series*.ed. M. Munawar, S.G. Lawrence, I.F. Munawar. pp 257-271.
8. Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A., Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M., Puhr, N.D., Wells, J.G., Angulo, F.J. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in Raw Oysters. *JAMA*. **284** (12) 1541-1545.
9. Edwards Clive, 1990. *Microbiology of Extreme Environments*. ed. McGraw-Hill. United States. 218pp.
10. Elliot, E. Kaysner, C.A. Jakson, L. and Tamplin, M.L., 2001 *Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus, and other Vibrio spp.*"In *Bacteriological Analytical Manual Online*" 9th ed. pp.9.01-9.28 Washington, D.C.: Food and Drug Administration.
11. Franco, M. J. y Flores, A.J.J. 1989. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en alimentos marinos de restaurantes de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Salud Publica Méx.* **31**(3) 314-325.
12. Franco M, J. y Flores A, J.J. 1991. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* y de sus anticuerpos en manipuladores de alimentos marinos en Merida, Yucatán. *Sal Pub. Méx.* **33**(2) 173-177.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13. Gil, R.M., Peral López, A.M., Ruíz Reyes, G. 1974. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en casos de gastroenteritis y en mariscos crudos en la ciudad de Puebla. Rev. Lat. Am. de Microbiol. 16. 85-88.
14. Ghosh A.R. y Seghgal S.C. 2001. Detection of *idh* and *trh* genes in a urea hydrolysing environmental isolate of *Vibrio parahaemolyticus* from the Andamans. ICDDR. Reporte Corto.
15. Honda, T., Chearskul, S., Takeda, Y., y Miwatani, T. 1980. Immunological methods for detection of Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. J. of Clinical Microbiology. 11(6) 600-603.
16. Iida, T., Suthienkul, O., Park, K. S., Tang, G. Q., Yamamoto, R. K., Ishibashi, M., Yamamoto, K. and Honda, T. 1997. Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Med. Microbiol.; 46: 639-645.
17. Kaneko, T. y Colwell, R. 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. Microbial Ecology. New York. 4: 135-155.
18. Kaysner, Ch., Abeyta Jr, Stott, R., Lilja, J., Wekell, M. 1990. Incidence of urea- hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa bay, Washington. Applied and Environmental Microbiology. 56 (4): 904-907.
19. Kaysner, Ch., Abeyta, C., Trost, P.A., Wetherington, J., Jinneman, K., Hill, W., y Wekell., M. 1994. Incidence of urea- Hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa bay, Washington. Applied and

Environmental Microbiology. 60(8) 3020-3022.

20. Kaufman, G.E, Myers, M.L. Pass, C.L., Bej, A.K., Kaysner, C.A. 2002. Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. *Applied Microbiology. 34(3): 155-161.*
21. Kishishita, M., Matsuoka, N., Kumagai, K., Yamasaki, S., Takeda, Y., y Nishibuchi, M. 1992. Secuence variation in the thermostable direct hemolysin related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology. 58 (8) 2449-2457.*
22. Lam, S. y Yeo M. 1980, Ureasa Positive *Vibrio parahaemolyticus* Train. *Journal of Clinical Microbiology, 12 (1) 57-59.*
23. Molina, G. O., Martínez B. C., Pérez, M. C., Peral, L. A.M. 1983. Frecuencia de anticuerpos séricos anti- *Vibrio parahaemolyticus* en manejadores. *Salud Pública México 25: 273-278.*
24. Morris, G.K., Merson, M. H., Sack, D. A., Wells, J. G., Martin, W. T., dewitt, W. E., Felley, J. C., Sack, R. B., y Bessudo, D. M. 1976. Laboratory investigation of diarrhea in travelers to Mexico: Evaluation of methods for detecting enterotoxigenic *Echerichia coli*. 1976. *J. Clin. Microbiol. 3(5) 486 -495.*
25. Nava, F.L.M., Parrilla, C.M.C., Salcedo C. N. 1981. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* de ostiones en México, D.F. *Salud Pública México. 23(3) 275-279.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26. Nishibuchi, M., Ishibashi, M., Takeda, Y., and Kaper, J. 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infection Immunity*. 49(3) 481-486.
27. Nishibuchi, M., Hill, W., Zon, G., Payne, W., y Kaper, B. 1986. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanagawa phenomenon- positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal Clinical Microbiology*. 23(6) 1091-1095.
28. Nishibuchi, M., Taniguchi, T., Misawa T., Khacomanciam V., Honda T., Miwatani 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermoestable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 57: 2691-2697.
29. Okitsu, T. Osawa, R. Pornruangwong, S. Yamai, S. 1997. Urea Hydrolysis and Suppressed Production of Thermostable Direct Hemolysin (TDH) by *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Presence of TDH-Related Hemolysin Genes. *Current Microbiology*. 34: 314-317.
30. Olafsen J., Mikkelsen H., Giaever H., Hansen G. H. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at Low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (6):1848-1854.
31. Pace, J., y Chai, T. 1989. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* grown in estuarine water and rich medium. *Environmental Microbiology*. 55(8) 1877-1887.

32. Park, K.S., Iida, T., Yamaichi, Y., Oyagi, T., Yamamoto, K., Honda, T. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *irh* and *ure* genes of *V. parahaemolyticus*. *Infection and immunity* . **68** (10) 5742-5748.
33. Pérez, M.E., Vélez, G.M.L., Galván R. F. 1980. Búsqueda de *Vibrio parahaemolyticus* en heces de manejadores de alimentos en el puerto de Acapulco, Guerrero, *Rev. Lat. Amer Microbiol.* **22**:18.
34. Ramírez, M., Cravioto, A., Rosas, I., Eslava, C. 1999. Diversity of *Vibrio* species in a Coastal Lagoon of Gulf of Mexico, Mexico. Abstracts ASM, General Meeting Chicago May-June.
35. Sakazaki, R., 1979, *Vibrio* infections. In *Food-borne infections and intoxications*. 2nd ed. Edited by H. Riemans and F.L. Bryan. Academic Press, New York. pp173.
36. Sakurai, J., Matsuzaki, A., Takeda, Y. and Miwatani, T. 1974. Existence of two distinct hemolysins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infections and Immunity*. **9**(5) 777-780.
37. Sahn, M.A., El-Banna, A.A., Tabey Shehata, A.M. 1982. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in selected marine invertebrates, sediment, and seawater around Alexandria, Egypt. *Journal Microbiol.* **28**: 1261-1264.
38. Sarkar, B. L., Balakrish, N., Sircar, B.K., Pal, S.C. 1983. Incidence and level of *Vibrio parahaemolyticus* associated with freshwater plankton.. *Applied and Environmental Microbiology*. **46**(1) 288-290.

39. Shirai, H., Iti, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., Nishibushi, M. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of Thermostable Direct Hemolysin (TDH) and TDH- Related Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*. **58**(11) 3568-3573.
40. Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalap B., Makino, M., Honda, T. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand *J. Infect Dis*; **172**(172) 1405-1408.
41. Thompson, C.A., y C. Vander. 1976. Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. *J. Food.Sci.* **41**: 204 - 205.
42. Twedt, R. M., and Brown, D.F.D. Sclessinger (ed). 1975. Microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
43. Williams, H.N., Falkler, W. A. Jr 1984. Distribution of bdellovibrios in the water column of an estuary. *Can J. microbiol.* **30**: 971-974.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN