

Lugar de trabajo: Gabinete de Biología Molecular y Microbiología, Dirección de Pesquerías Pelágicas y Ambiente Marino, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero – INIDEP. Mar del Plata, Argentina.

TESIS DE MAESTRÍA
AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE *Vibrio parahaemolyticus*
EN MUESTRAS DE AGUA, SEDIMENTO
Y MOLUSCOS BIVALVOS DE LA COSTA
ATLÁNTICA DE BUENOS AIRES

Autor:

Verónica Jurquiza

Director:

Sol González Fraga

Co-Director:

Marcela Costagliola

Mariana Pichel



Mar del Plata, 2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD**

CARRERA DE POSGRADO: MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE *Vibrio parahaemolyticus* EN MUESTRAS DE
AGUA, SEDIMENTO Y MOLUSCOS BIVALVOS
DE LA COSTA ATLÁNTICA
DE BUENOS AIRES**

AUTOR

VERÓNICA JURQUIZA

DIRECTOR

SOL GONZÁLEZ FRAGA

CO-DIRECTOR

MARCELA COSTAGLIOLA

MARIANA PICHEL

**Lugar de trabajo: Gabinete de Biología Molecular y Microbiología, Dirección
de Pesquerías Pelágicas y Ambiente Marino, Instituto Nacional de
Investigación y Desarrollo Pesquero – INIDEP**

Mar del Plata, Argentina

AÑO 2014

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me ayudaron a realizar este trabajo. Fue un camino difícil, pero también un camino lleno de satisfacciones, de aprendizajes, de crecimientos, de alegrías, de experiencias enriquecedoras inolvidables..., fueron muchas las personas que colaboraron, me ayudaron y apoyaron, y es por eso que hoy, quiero agradecerles muy especialmente:

A mi directora de tesis, Sol González Fraga, por su constante guía, apoyo, interés, generosidad y compromiso; por sus palabras de aliento y sus consejos; gracias por estar siempre!

A mi co-directora, Marcela Costagliola por permitirme ser parte del Gabinete de Biología Molecular y Microbiología y darme la posibilidad de realizar mi tesis de Maestría, por su confianza, su apoyo y fundamentalmente por transmitirme esa pasión que compartimos, nuestros “vibrios”.

A mi co-directora, Mariana Pichel por sus aportes y lecturas críticas, y por recibirme en su Laboratorio y brindarme toda su ayuda.

A Norma Binsztein y su familia por su valiosa ayuda mientras cursaba la Maestría y por brindarme su apoyo para desarrollar mi tesis.

A Mirta Carlomagno y Natalia Mendonca, por su ayuda y comprensión durante todo este tiempo de cursada de Maestría y realización de mi tesis.

A todas las integrantes del Gabinete de Biología Molecular y Microbiología del INIDEP por su ayuda y colaboración; y en especial, a Analía García por su ayuda con los aislamientos de *V. parahaemolyticus*, a Constanza Hozbor por las largas charlas sobre mis dudas y sus aportes, y a María Inés Trucco por su generosidad, sus palabras de aliento y su apoyo en todo momento. Gracias por los buenos momentos y por la amistad.

A mis colegas Enrique Boschi, Nora Montoya, Hugo Benavides, Laura Schejter, Mónica Fernández, Graciela Molinari, Valeria Segura, Marcela Tobio y Marcela Álvarez que han respondido a mis pedidos y a mis consultas para poder completar esta tesis.

A Daniel Hernández por su paciencia, generosidad y ayuda para analizar mis datos.

A Carlos Guerrero por brindarme su tiempo y conocimientos para la impresión de mi tesis. Gracias por las sugerencias y consejos.

A las integrantes del Laboratorio de Enterobacterias del INEI-ANLIS por recibirme en su Laboratorio y brindarme todo su apoyo.

A Alda Fernández, del Instituto de Salud Pública de Chile, por la realización de la serología en los aislamientos de *V. parahaemolyticus*.

A Irma Rivera, Dora Sorrarain, Ruth Akselman, Marta Odizzio y Gabriela Silvoni quienes siempre me alentaron en este trabajo. Gracias por su amistad, sus palabras y consejos.

A mis amigos de la Maestría, Alicia, Lucrecia, Fernanda, Patricia, Alejandra y Rogelio, gracias por los buenos momentos compartidos, por estar a pesar de la distancia y por el apoyo siempre.

A mis amigas Sonia, Evelina, Victoria y Ana Laura, que siempre están a mi lado ayudándome y acompañándome, gracias por tanto apoyo, por tanta vida compartida y principalmente, por estar en mi camino...

A Violeta y Lola, por la compañía en las largas noches de escritura.

A mi prima Susana, por ayudarme especialmente en mis comienzos.

A mi madrina Isabelita y su esposo Raúl, porque son muy especiales para mí, gracias por tanta ayuda y por estar en todos mis momentos.

A mis tías Isabel y Josefa, ejemplos de vida y de amor, gracias por el amor y alegría con que me alentaron siempre.

A dos personas muy especiales para mí, que están a mi lado...siempre. Abuelita Gerónima y Verónica...se que fueron inspiradoras en mí..., estaban ahí acompañándome, gracias a ambas por la fuerza día a día para continuar.

Y a mis hermanas Marcela y Marisa, sus esposos Darío y José Luis, mis sobrinos y mi sobrino ahijado, por acompañarme, cuidarme y ayudarme; siempre voy a agradecer el tenerlos a mi lado y el pasarlo tan bien juntos.

Además de agradecer, quiero dedicar este trabajo:

A mis padres, que siempre me apoyaron, confiaron en mí y estuvieron siempre a mi lado, quisiera con este trabajo honrar y agradecer todo el esfuerzo que hicieron desde ese día que decidí estudiar en Tandil..., gracias a los dos por el amor, la bondad y el esfuerzo de tantos años, son mis ejemplos de vida...

A Ser, mi amor, gracias por todo el apoyo, la comprensión, la paciencia, el aliento constante, por animarme día a día..., gracias por alentarme a crecer y creer tanto en mí...

Y a mis tres hijos...Pilar, Clara y Matías..., mis amores...sus sonrisas, besos, dibujos, cartas y sus abrazos hicieron que todo sea mucho más fácil, me entendieron y me ayudaron siempre...Gracias Pilar por tus té con limón cuando escribía, Clara tus palabras dulces siempre, mágicamente me tranquilizaban y Mati gracias por ser como me dijiste...mi fan número uno, los amo!

INTRODUCCIÓN	6
El género <i>Vibrio</i>	6
La especie <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
Primer informe de aislamiento y clasificación	8
Características fisiológicas de <i>V. parahaemolyticus</i>	9
Características serológicas de <i>V. parahaemolyticus</i>	11
Mecanismos de patogénesis de <i>V. parahaemolyticus</i>	12
Diversidad genética de <i>V. parahaemolyticus</i>	15
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> en el ambiente acuático	17
Epidemiología de <i>V. parahaemolyticus</i>	18
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> en América Latina	20
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> en Argentina	24
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> como patógeno en humanos	25
Alimentos implicados en las infecciones por <i>V. parahaemolyticus</i>	26
Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de <i>V. parahaemolyticus</i>	27
Caracterización del lugar de muestreo	28
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO 1: Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos de la costa de Buenos Aires	44
CAPÍTULO 2: Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos y su relación con factores ambientales	56
CAPÍTULO 3: Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> patógeno en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos de la costa de Buenos Aires	69
CAPÍTULO 4: Caracterización de los aislamientos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> de muestras de moluscos bivalvos	72
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS (Tablas complementarias)	104

INTRODUCCIÓN

El género *Vibrio*

Los miembros del género *Vibrio* fueron uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descriptos taxonómicamente en la naturaleza (Pacini, 1854). Pertenecen a la familia *Vibrionaceae*, orden *Vibrionales*, clase *Gammaproteobacteria* (Verón, 1965).

El género *Vibrio* incluye bacilos pleomórficos gram-negativos, anaerobios facultativos, mesófilos, curvados de aproximadamente 0,5-1 μm de diámetro y 2-3 μm de longitud, con metabolismo oxidativo y fermentativo (Farmer III y Janda, 2005; Thompson *et al.*, 2004). Son catalasa positivos y con la excepción de *V. metschnikovii* y *V. gazogenes*, son oxidasa positivos. Son móviles poseen al menos un flagelo polar, aunque varias especies también poseen flagelos laterales cuando crecen en medios sólidos. Por lo general, son sensibles al agente vibriostático O/129 y para su crecimiento requieren NaCl (son halófilos); el requerimiento óptimo de NaCl es de 2,0-2,5% (peso/volumen) (Thompson y Swings, 2006). Algunas especies halófilas requieren al menos una concentración del 0,5% de NaCl en el medio para crecer, mientras que especies no halófilas como *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* o *Vibrio hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (Gómez-Gil *et al.*, 2004, citado por Leyton y Riquelme, 2008). Para su crecimiento no requieren vitaminas o aminoácidos (Farmer III *et al.*, 2003); y tienen la capacidad de degradar quitina (Kadokura *et al.*, 2007).

Una particularidad del género es que todas las especies hasta ahora estudiadas poseen dos cromosomas (Okada *et al.*, 2005), uno de mayor tamaño (entre 3 y 4 Mb) que contiene la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento, y un cromosoma pequeño que posee un tamaño más variable (0,8 - 2,4 Mb) con genes que codifican para la adaptación a determinados nichos ambientales (Iida y Kurokawa, 2006).

Los vibrios son habitantes autóctonos de ambientes acuáticos, tanto de ambientes marinos y estuariales, como de agua dulce. Se pueden encontrar libres en el ambiente pero también desarrollando biofilms asociados al sedimento, plancton, mariscos bivalvos, camarones, langostinos, cangrejos y en el tracto intestinal de organismos marinos (Worden *et al.*, 2006; Heidelberg *et al.*, 2002; Watnick *et al.*, 2001). En la **tabla 1**, puede observarse un resumen realizado por Leyton y Riquelme, (2008), que demuestra las altas densidades en la que fueron detectados los vibrios en el ecosistema marino. Se observan las concentraciones de *Vibrio* en muestras de agua de mar y en diferentes organismos marinos, citadas en distintas referencias bibliográficas.

Tabla 1: Concentración de *Vibrio* aislados desde muestras de agua de mar y diferentes organismos marinos citadas en referencias bibliográficas (Reproducido de Leyton y Riquelme, 2008)

Nº	Agua / Organismo	Especie de <i>Vibrio</i>	Concentración y referencia
1	Agua de mar	<i>Vibrio</i> spp.	10 ² CFU mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
		<i>Vibrio</i> spp.	1x10 ² – 7x10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2006)
		<i>Vibrio</i> spp.	9,7x10 ⁵ cél. mL ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2000)
		<i>V. vulnificus</i>	10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2006)
		<i>V. cholerae</i>	10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2006)
		<i>V. splendidus</i>	10 ² CFU mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
		<i>V. harveyi</i>	26 a 58 CFU mL ⁻¹ (Makemson <i>et al.</i> 1992)
		<i>V. harveyi</i>	5 a 7 CFU mL ⁻¹ (Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> 1990)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	4 cél. 100 mL ⁻¹ (DePaola <i>et al.</i> 1990)
	Agua de mar (16°C)	<i>Vibrio</i> spp.	10 ² cél. mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
	Agua de mar (cultivo peces)		
	Agua de mar (cultivo rotíferos)	<i>V. rotiferianus</i>	1,7x10 ⁵ CFU mL ⁻¹ (Suantika 2001)
2	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	3,2 x 10 ² y 1,9 x 10 ³ CFU ml ⁻¹ (Estes <i>et al.</i> 2004)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	8,4x10 ⁵ – 3,4x10 ⁷ CFU g ⁻¹ (Calik <i>et al.</i> 2002)
	Ostras	<i>V. splendidus</i>	10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	10 ³ CFU g ⁻¹ (Kaysner & DePaola 2000)
	Ostión	<i>V. parahaemolyticus</i>	10 ³ CFU g ⁻¹ (DePaola <i>et al.</i> 2000)
		<i>V. vulnificus</i>	10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Cai <i>et al.</i> 2007)
3	<i>Turbo cornutus</i>	<i>V. haliotocoli</i>	1,7x10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2003)
	<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	3,5x10 ⁵ CFU mL ⁻¹ (Cai <i>et al.</i> 2007)
	<i>Haliotis discus</i> (digestivo)	<i>V. haliotocoli</i>	2,6 x10 ⁶ a 9,9 x10 ⁸ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 1995)
	<i>Haliotis midae</i> (digestivo)	<i>V. haliotocoli</i>	3,7 x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2006)
	<i>Haliotis tuberculata</i>	<i>V. gallicus</i>	3,0 x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2006)
	<i>Haliotis laevigata</i> (digestivo)	<i>Vibrio</i> spp	9,4 x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2006)
	4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Vibrio</i> spp
		<i>Vibrio</i> spp	10 ⁹ CFU g ⁻¹ (Moss <i>et al.</i> 2000)
<i>Penaeus merguensis</i>		<i>V. logei</i>	10 ⁴ y 10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Oxley <i>et al.</i> 2002)
<i>Penaeus monodon</i>		<i>A. pelagius</i>	10 ⁴ CFU mL ⁻¹ (Aguirre-Guzman <i>et al.</i> 2003)
<i>Penaeus monodon</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>	1x10 ⁵ CFU peneido ⁻¹ (Sudheesh & Xu 2001)
5	<i>Anguilla japonica</i>	<i>V. vulnificus</i>	9,4x10 ³ a 2,3x10 ⁵ CFU anguila ⁻¹ (Tison <i>et al.</i> 1982)
	<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>V. cholerae</i>	1,26x10 ⁴ y 1,26x10 ² cél. mL ⁻¹ (Yamanoi <i>et al.</i> 1980)
6	<i>Sepiolla</i> sp.	<i>Vibrio</i> spp.	10 ¹¹ cél. órgano ⁻¹ (Nishiguchi 2000)
7	<i>Oculina patagonica</i>	<i>V. shiloi</i>	10 ⁸ a 10 ⁹ cél. (cm ³) ⁻¹ (Rosenberg & Koren 2006)
8	Zooplankton	<i>Vibrio</i> spp.	4,3x10 ⁶ cél. (mm ²) ⁻¹ (Heidelberg <i>et al.</i> 2002)
9	Sedimento	<i>Vibrio</i> spp.	3,0 x10 ³ CFU g ⁻¹ (Maeda <i>et al.</i> 2003)
		<i>V. harveyi</i>	10 ³ CFU g ⁻¹ (Ramesh <i>et al.</i> 1989)

La distribución, concentración y dinámica de estas poblaciones están influenciadas por gradientes medioambientales como temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y factores biológicos como, depredación y abundancia de dinoflagelados y hospedadores (Thompson y Polz, 2006). En general, los vibrios tienden a ser más comunes en aguas cálidas, en particular cuando las temperaturas exceden los 17°C

(Thompson *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la ocurrencia estacional de vibrios mesófilos como *V. parahaemolyticus* y *V. coralliilyticus* se puede deber a una 'hibernación' en sedimentos o en asociación con la fauna marina (Ben-Haim *et al.*, 2003). El tracto digestivo de organismos marinos posee mayor disponibilidad de materia orgánica que el agua de mar, transformándose en un ambiente apropiado para los vibrios, aunque en este microambiente están expuestos a un pH bajo, secreción de ácido bílico y a condiciones micro o anaeróbicas (Urakawa y Rivera, 2006).

En el ecosistema marino, los vibrios juegan importantes funciones, tales como biodegradación de materia orgánica y regeneración de nutrientes (Cavallo y Stabili, 2004), además pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial, o bien afectar al hombre (Thompson *et al.*, 2004).

Existe una gran diversidad de vibrios, reconociéndose actualmente 91 especies descritas dentro de este grupo (ICSP), de las cuales solo 12 son consideradas patógenas para el ser humano: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *Grimontia (Vibrio) hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Photobacterium (Vibrio) damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* y *V. harveyi* (Nishibuchi, 2006); y de las mismas 8 pueden causar, o estar asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos. A su vez, 3 de ellas, *V. cholerae*; *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son de importancia epidemiológica. *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, además, tienen importancia pandémica (Austin, 2010; Fica, 2007).

Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* usualmente están asociadas a la ingestión de moluscos contaminados; los síntomas que manifiesta el paciente van desde gastroenteritis, infección en la piel, septicemia, llegando a la mortalidad en el caso de pacientes inmunocomprometidos.

La especie *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es habitante natural de los ambientes marinos costeros y de las áreas estuariales, se encuentra en sedimentos marinos en épocas frías y en agua y moluscos bivalvos en épocas calurosas, las altas temperaturas favorecen su proliferación (De Paola *et al.*, 2000).

Primer informe de aislamiento y clasificación

La bacteria que ahora se conoce como *V. parahaemolyticus*, fue identificada por primera vez como patógeno transmitido por alimentos, en Japón en 1950, por Fujino y sus colaboradores, de un brote de gastroenteritis asociado al consumo de "shisaru", sardina semiseca. La bacteria aislada de este alimento fue llamada *Pasteurella parahaemolytica*. En 1958 un organismo similar, halotolerante llamado *Pseudomonas*

enteritis fue aislado por Takikawa, quien confirmó su enteropatogenicidad en humanos voluntarios (Sakazaki *et al.*, 1963, citado por González Morera, 1982).

Sakazaki *et al.*, (1963), mencionan que Miyamoto y sus colaboradores propusieron un nuevo género, *Oceanomonas*, dentro del cual consideraron tres especies: *Oceanomonas parahaemolytica*, *Oceanomonas enteritis* y *Oceanomonas alginolytica*. Otros investigadores reconociendo la heterogeneidad del género *Oceanomonas*, consideraron que las bacterias aisladas debían ser clasificadas dentro del género *Vibrio* y propusieron el nombre de *Vibrio parahaemolyticus* (González Morera, 1982).

Esta especie fue dividida en dos biotipos: los miembros del biotipo 1, no crecían en caldo peptona con una concentración de cloruro de sodio de 10%, no producían acetoina y en su mayoría no fermentaban la sacarosa. Los miembros del biotipo 2, crecían en agua peptonada con 10% de cloruro de sodio, daban reacción de Voges Proskauer positiva y fermentaban la sacarosa (González Morera, 1982).

Zen-Yoji *et al.*, (1965) sugirieron que los miembros del biotipo 2 fueran excluidos de la especie *V. parahaemolyticus* por las diferencias bioquímicas y patogénicas entre los dos biotipos, por lo que Sakazaki (1968) re-examinó las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los dos biotipos y propuso el nombre de *V. alginolyticus* para el biotipo dos de *V. parahaemolyticus* (González Morera, 1982).

Otros investigadores habían propuesto que *V. parahaemolyticus* sea llamado *Beneckeia parahaemolytica*, por la formación de flagelos peritricos, los cuales pueden ser inducidos cuando el microorganismo es cultivado en medio sólido (Baumann *et al.*, 1971).

Finalmente, en la octava edición del Manual Bergey's, el microorganismo fue agrupado en el género *Vibrio*, dentro de la familia *Vibrionaceae*, denominado *Vibrio parahaemolyticus*, como es considerado actualmente (Buchanan y Gibbons, 1974). Para finales de los años 60' y principio de los 70', *V. parahaemolyticus* fue reconocido como una causa de enfermedad diarreica a nivel mundial.

Características fisiológicas de *V. parahaemolyticus*

Son bacilos gram-negativos, con un tamaño de 0,5 a 0,8 µm de diámetro por 1,4 a 2,6 µm de longitud, pleomórficos, rectos o ligeramente curvos, con los extremos redondeados. La secuencia del genoma completo de la cepa *V. parahaemolyticus* RIMD2210663 (Makino *et al.*, 2003) y los mapeos genéticos realizados a la cepa *V. parahaemolyticus* AQ4673 (Yamaichi *et al.*, 1999) han establecido que esta bacteria posee dos cromosomas de 3,2 y 1,9 Mb, con un contenido de G + C de 45,4% para cada uno (**Figura 1**).

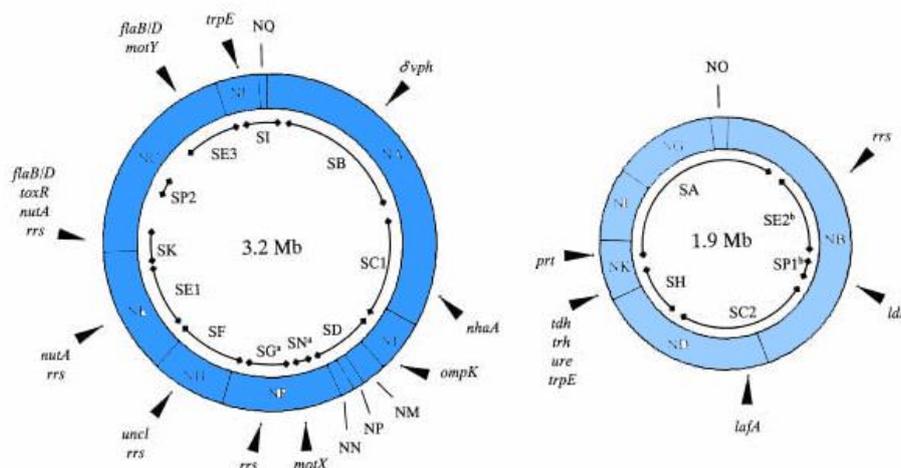


Figura 1. Mapa genético del genoma de *V. parahaemolyticus* AQ4673 y localización de diferentes genes de virulencia (Reproducido de Yamaichi *et al.*, 1999).

Es anaerobio facultativo con metabolismo oxidativo y fermentativo. Fermenta la glucosa sin producción de gas, fermenta manitol, arabinosa y manosa, no fermenta sacarosa, lactosa, inositol y ramnosa y es ureasa variable.

Para su crecimiento requiere iones de sodio, potasio y magnesio. Crece mejor en sustratos que contienen de 2 a 3% de cloruro de sodio y puede crecer en un intervalo de 3,6 y 8% de NaCl. El rango óptimo de temperatura de crecimiento es de 35 a 37°C, siendo la temperatura máxima de 44°C y la mínima de 10°C, la cocción a 65°C lo inactiva. En un estudio realizado por Andrews *et al.*, (2003) sobre la respuesta de *V. parahaemolyticus* a un proceso de pasteurización, se concluyó que la cepa O3:K6 requiere un mínimo de 22 minutos a 50-52°C para reducir su multiplicación de 10^6 a niveles no detectables (< 3 bacterias/g). El pH óptimo de crecimiento es de 7,5 a 8,6 aunque puede crecer a pH tan bajo como 4,8 y tan alto como 11. (Parija, 2009; Pascual Anderson y Calderón y Pascual, 1999)

En el laboratorio, *V. parahaemolyticus* es comúnmente aislado en agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (Kobayashi *et al.*, 1963), las colonias se observan grandes viscosas, de color verde azulado. Recientemente se ha desarrollado para su detección un medio cromogénico, CHROMAgar *Vibrio* (CAV), las colonias se observan púrpuras rodeadas de un halo blanquecino (Hara-Kudo *et al.*, 2001) (**Figura 2**).



Figura 2: Placas de cultivo de TCBS y CAV con colonias de *V. parahaemolyticus*

Actualmente, para su confirmación se utilizan técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado ser una herramienta muy útil para el

diagnóstico de este microorganismo. Numerosos autores han utilizado el gen específico regulatorio de la toxina (*toxR*) para detectar *V. parahaemolyticus* por PCR. Según un estudio realizado por Croci *et al.* (2007), el gen *toxR* resultó ser muy sensible y específico, debido a que, *V. parahaemolyticus* fue detectado en todas las muestras estudiadas, y no fueron hallados resultados falsos positivos (Dileep *et al.*, 2003; Croci *et al.*, 2007).

Características serológicas de *V. parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus posee tres componentes antígenicos: somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). El antígeno H es común a todas las cepas de *V. parahaemolyticus*, por lo tanto, es de poco valor para la clasificación serológica (Sakazaki *et al.*, 1968). Los serotipos de *V. parahaemolyticus* se clasifican sobre la base de sus antígenos O y K. Los antígenos K son destruidos por calentamiento a 100°C, mientras que los O son termoestables. Esta característica permite separarlos para poder preparar los sueros específicos.

El esquema antigénico de tipificación fue diseñado inicialmente por Sakazaki en Japón en 1963, y complementado posteriormente por la Comisión de Serotipificación de *V. parahaemolyticus* (Japón). Fueron excluidos los antígenos K: 2, 14, 16, 29, 35 y 62 (Hugh y Feeley, 1972). Los antígenos K: 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 19 se producen con más de un antígeno O. Actualmente están en revisión las modificaciones realizadas por Ishibashi *et al.*, (2000), en total hay 11 serogrupos O y 71 serogrupos K (**Tabla 2**).

Tabla 2: Correlación de los serotipos de acuerdo a los antígenos O y K (Reproducido de Sakazaki y Shimada, 1986; Honda *et al.*, 2008).

Serotyping for pathogenic isolates of <i>V. parahaemolyticus</i>	
Pathogenic O and K antigen combinations	
O antigen	K antigen
1	1,5,20,25,26,32,38,41,56,58,60,64,69
2	3,28
3	4,5,6,7,25,29,30,31,33,37,43,45,48,54,56,57,58,59,72,75
4	4,8,9,10,11,12,13,34,42,49,53,55,63,67,73
5	15,17,30,47,60,61,68
6	18,46
7	19
8	20,21,22,39,41,70,74
9	23,44
10	24,71
11	19,36,40,46,50,51,61
12 ^a	19,52,61,66
13 ^a	65

^aEn discusión por el Comité de Serotipificación de *Vibrio parahaemolyticus* (Japón)

A diferencia de lo que sucede con *V. cholerae*, no hay asociación de un serotipo en particular con enfermedad, y de los actualmente reconocidos todos pueden causar

gastroenteritis (Nair y Hormazábal, 2005). Los brotes infecciosos que se han presentado a nivel mundial en los últimos años se han atribuido a la aparición principalmente del serotipo O3:K6 y de los serotipos O4:K68 y O1:KUT (no tipificable). Se ha demostrado que las cepas O4:K68 y O1:KUT resultaron genéticamente idénticas al serotipo O3:K6; comparten similares perfiles de ribotipificación, electroforesis en campo pulsado (PFGE) y reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos arbitrarios (AP-PCR). De acuerdo al orden cronológico de aparición, se ha propuesto que O4:K68 y O1:KUT, probablemente, se originaron a partir de un clon de la cepa O3:K6 pandémica (Yeung y Boor, 2004). Estos serotipos presentan mayor adherencia y citotoxicidad en cultivos de tejidos, lo que estaría contribuyendo a incrementar su potencial patogénico. Los diferentes serotipos han sido identificados en varias localidades, por lo que su distribución es mundial y la transición entre un serotipo y otro ha sido observada tanto en pacientes como a nivel ambiental (Mancilla, 2005).

Las pruebas serológicas por si solas no se utilizan para identificar *V. parahaemolyticus*, debido a que, se producen reacciones cruzadas con otros microorganismos. Sin embargo durante las investigaciones de brotes de origen alimentario las pruebas serológicas se convierten en una valiosa herramienta epidemiológica (Kaysner y DePaola, 2004).

Mecanismos de patogénesis de *V. parahaemolyticus*

El mecanismo de patogénesis de *V. parahaemolyticus* ha sido intensamente estudiado, no obstante, aún no está totalmente dilucidado (Broberg *et al.*, 2011). *V. parahaemolyticus* posee diferentes mecanismos que los de *V. cholerae* para establecer infección; mientras que la infección por *V. cholerae* generalmente produce diarrea no inflamatoria, la infección por *V. parahaemolyticus* puede cursar diarrea inflamatoria en la etapa avanzada de la enfermedad (Ramamurthy y Nair, 2005). La respuesta inflamatoria incluye edema en la laminapropia, congestión de los vasos sanguíneos y hemorragias en duodeno y recto (Qadri *et al.*, 2003).

La patogénesis de *V. parahemolyticus* está basada principalmente en la presencia de dos factores de virulencia: una *hemolisina termoestable directa* - TDH y una *hemolisina relacionada a TDH* - TRH (Honda e Iida, 1993; Nishibuchi y Kaper, 1995; Takeda, 1983).

La *hemolisina termoestable directa* (TDH) es una toxina que posee varias propiedades entre las que se destacan: citotoxicidad, cardiotoxicidad, enterotoxicidad, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de líquido en el asa de íleon en el modelo experimental en conejos. (Honda e Iida, 1993) TDH actúa sobre las membranas celulares como una toxina formadora de poros que altera iones en las células intestinales, provocando la secreción de fluidos intestinales y diarrea (Honda *et al.*

1992; Fabbri *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 2000; Yeung y Boor, 2004). El gen *tdh* codifica la producción de TDH (Nishibuchi y Kaper, 1995; McCarthy *et al.*, 2000).

Las bacterias que poseen este factor de virulencia tienen la capacidad de producir β -hemólisis en agar sangre Wagatsuma (fenómeno de Kanagawa), esta relación ha permitido utilizar esta prueba como un marcador de virulencia para el diagnóstico clínico de *V. parahaemolyticus* (*tdh*-positivo/KP+). (Nishibuchi y Kaper, 1995).

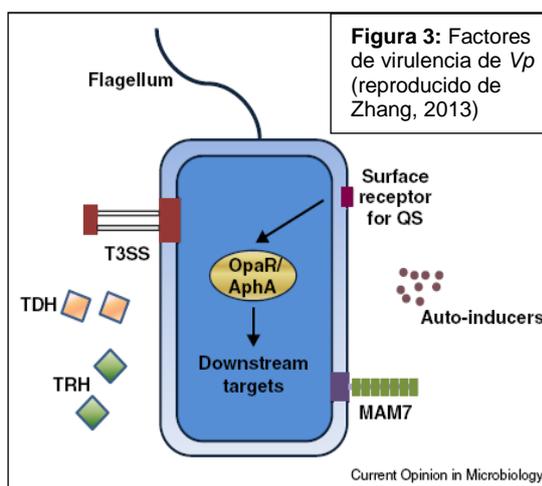
La *hemolisina relacionada a TDH* (TRH) codificada por el gen *trh*, fue inicialmente determinada en cepas provenientes de casos de gastroenteritis que no presentaban el fenómeno hemolítico de Kanagawa (Honda *et al.*, 1987, 1988). Posee un mecanismo de acción similar a TDH, induce alteración en el flujo de iones produce acumulación de líquido en el modelo experimental de asa ileal y presenta actividad citotóxica en una variedad de tejidos. *V. parahaemolyticus* TRH+ casi siempre produce ureasa (Okuda *et al.*, 1997; Osawa *et al.*, 1996; Suthienkul *et al.*, 1995).

La asociación entre la producción de ureasa y la posesión del gen *trh* se debe a un ligamiento genético entre el gen estructural de la ureasa (*ureC*) y el gen *trh* en el cromosoma II de *V. parahaemolyticus* (Iida *et al.*, 1997), ambos genes se encuentran ubicados en la isla de patogenicidad VPaI-7 (Park *et al.*, 2002, Izutsu 2008, Matz 2011). La producción de ureasa provoca un aumento en la tolerancia al ácido gástrico, fenómeno estudiado en patógenos entéricos como *Yersinia enterocolitica*, (DeKoning-Ward y Robins Browne, 1995) y *Helicobacter pylori* (Turbett *et al.*, 1992). Esta relación/asociación ha permitido utilizar la producción de ureasa como un marcador de virulencia para el diagnóstico clínico de *V. parahaemolyticus* (*trh*-positivo) (Park *et al.*, 2000).

TDH y TRH son inmunológica y biológicamente similares (Honda *et al.*, 1988). El secuenciamiento de nucleótidos de los genes correspondientes reveló una similitud del 68,6% aproximadamente (Ramamurthy y Nair, 2005; Nishibuchi *et al.*, 1989; Kishishita *et al.*, 1992).

Además de TDH y TRH, otros factores de virulencia han sido identificados en aislamientos de *V. parahaemolyticus* como: islas de patogenicidad,

hemolisinas, proteína reguladora (*toxR*), variedad de pili, sistemas de secreción tipo III (SSTT), polisacárido capsular (CPS), hemaglutininas (hemaglutinina manosa sensitiva, MSHA), proteasa sérica monómerica, vibrioferrinas, flagelos, adhesinas, *quorum sensing* (QS), factores de colonización y capacidad de invasión celular (**Figura 3**, reproducido de Zhang y Orth, 2013).



El papel en la patogénesis de las proteínas de SSTT y ureasa, así como los genes involucrados en la formación de biofilms y en la supervivencia de *V. parahaemolyticus*, ya está ampliamente aceptado (Park *et al.*, 2000, 2004; Nakaguchi *et al.*, 2003). En la **tabla 3**, reproducida de Nishibuchi y De Paola (2005), y con aportes más recientes, se muestra un resumen de los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*.

Tabla 3: Factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*

Factores de virulencia (genes)		Referencias
Principales factores de virulencia	Hemolisina termoestable directa (<i>tdh</i>)	Nishibuchi <i>et al.</i> (1992)
	Hemolisina relacionada a TDH (<i>trh</i>)	Xu <i>et al.</i> (1994)
Otros factores de virulencia	Quimiotaxis y movilidad	Kim & McCarter (2000), McCarter & Wright (1993)
	Sistemas de adquisición de hierro (<i>pvuA</i> , <i>psuA</i>)	Funahashi <i>et al.</i> (2002)
	Pilus	Nakasone & Iwanaga (1990)
	Hemaglutininas	Nagayama <i>et al.</i> (1995)
	Hemolisina termoestable	Taniguchi <i>et al.</i> (1990)
	Hemolisina termolábil (<i>tth</i>)	Taniguchi <i>et al.</i> (1986), Shinoda <i>et al.</i> (1991)
	Metaloproteasas (<i>pvtVp</i> , <i>vppC</i>)	Lee <i>et al.</i> (1995c)
	Polisacárido capsular-CPS	Hsieh <i>et al.</i> (2003).
	Sistema de secreción tipo III-SSTT	Makino <i>et al.</i> (2003), Okada <i>et al.</i> 2009
	Adhesina MAM7	Krachler <i>et al.</i> 2011
Factores reguladores de virulencia	ToxR (<i>toxR</i>)	Lin <i>et al.</i> (1993)
	Regulador del sistema de adquisición de hierro (<i>fur</i>)	Yamamoto <i>et al.</i> (1997)

El polisacárido capsular (CPS) favorece la adherencia bacteriana (Hsieh *et al.*, 2003). La proteasa sérica monomérica, ejerce un efecto tóxico sobre diferentes líneas de células y hemorragia del tejido inducido y la muerte en ratones experimentales (Lee *et al.*, 2002). El sistema de secreción tipo III (SSTT) se activa cuando una bacteria se presenta en contacto estrecho con las células huésped, es un sistema de secreción de proteínas bacterianas que segrega proteínas en el medio extracelular, pero también puede inyectar proteínas bacterianas directamente en las células diana del huésped

eucariota. Los genes de los sistemas de secreción tipo III (SSTT) fueron identificados por Makino *et al.*, 2003, posteriormente se demostró la existencia de dos tipos diferentes de SSTT, T3SS1 y T3SS2, ubicados en los cromosomas 1 y 2 respectivamente. Ambos han demostrado estar involucrados en la citotoxicidad y enteropatogenicidad de *V. parahaemolyticus* (Okada *et al.*, 2009). La molécula de adhesión multivalente 7 (MAM7), actúa como factor de adherencia, facilita la unión bacteriana mediante la interacción con la superficie de la célula huésped (Krachler *et al.*, 2011).

Las islas de patogenicidad son las llamadas islas genómicas que contienen genes involucrados en la virulencia. Actualmente con la secuenciación del genoma completo de una cepa de *V. parahaemolyticus* O3:K6, se han detectado 7 islas genómicas (Vpal-1 a Vpal-7), de las cuales las cinco primeras se ubican en el cromosoma I y las otras dos en el cromosoma II (Hurley *et al.*, 2006).

Las islas genómicas son regiones cromosomales de tamaño relativamente grande (10 kb a 81 kb) adquiridas por transferencia horizontal, que poseen un contenido distinto de GC (39,8%) con respecto al resto del genoma que contiene una media de contenido de GC (45,4%). Estudios más recientes han revelado que las islas genómicas se encuentran de manera variable en las cepas de *V. parahaemolyticus*, a excepción de Vpal-2, esto confirmaría la transferencia genética que ocurre entre distintos linajes de *V. parahaemolyticus*.

Actualmente en *V. parahaemolyticus* se ha identificado la isla de patogenicidad Vpal-7, localizada en el cromosoma II que contiene dos genes *tdh*, como así también otros genes que se han asociado con la virulencia, incluyendo SSTT, factor necrotizante y exoenzimas.

Por otro lado, existen observaciones que sugieren que algunos aislamientos patogénicos de *V. parahaemolyticus* adquirieron el gen *tdh* y posiblemente el gen *trh*, por transferencia genética horizontal (Yamaichi *et al.*, 1999). Al igual que sucede con *V. cholerae*, a nivel molecular, los principales genes patogénicos de *V. parahaemolyticus* se encuentran en regiones del cromosoma en forma de "clusters" o islas de patogenicidad, teniendo la capacidad de ser propagados horizontalmente (Karaolis *et al.* 1998; Heidelberg *et al.*, 2000).

Diversidad genética de *V. parahaemolyticus*

La creciente prevalencia de *V. parahaemolyticus*; diseminándose en varios países y estableciéndose endémicamente en algunas áreas geográficas, causando serios problemas en aquellos países donde el consumo de alimentos marinos crudos es común, demanda una activa vigilancia de este patógeno, con la aplicación de métodos de tipificación discriminatorios para establecer la relación entre los distintos serotipos circulantes y, por otro lado, el origen y la divergencia de los aislamientos (Dauros Singorenko, 2009; Tanil *et al.*, 2005).

La diversidad genética de *V. parahaemolyticus* ha sido estudiada utilizando diferentes técnicas de tipificación molecular como electroforesis en campo pulsado (PFGE, de *pulsed-field gel electrophoresis*, en inglés), ribotipificación y técnicas basadas en PCR como por ejemplo RS-PCR (secuencias conservadas ribosomales) REP-PCR (secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas), y ERIC-PCR (secuencias repetitivas intergénicas de consenso de las enterobacterias) (Khan *et al.*, 2002; Wong y Lin, 2001).

La tipificación por PFGE ha demostrado ser la herramienta más eficaz para evaluar la relación entre aislamientos bacterianos de la misma especie. Posee alto poder discriminatorio y de tipificación, es altamente reproducible y permite obtener patrones más fáciles de interpretar en comparación con otros métodos. Es considerado un método de aplicación universal y la información que genera puede utilizarse en investigaciones epidemiológicas (Wang *et al.*, 2008). La epidemiología lo utiliza a corto plazo en investigación de brotes.

El Centro de Control y Prevención de las Enfermedades (CDC, Estados Unidos), creó una red internacional de protocolos estandarizados y datos de PFGE, *PulseNet* (CDC, 2002) para poder comparar los brotes de patógenos de alimentos provenientes de distintos países, identificándolos tempranamente, y así contribuir a la implementación de nuevas medidas que ayuden a la prevención (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). En el año 2007, se publicó un estudio oficial de *PulseNet* en el cual se evaluaron las condiciones que varios autores ya venían utilizando en la tipificación de *V. parahaemolyticus*. Se evaluó el perfil de restricción con distintas enzimas como Sfil, NotI, Spel, XbaI, KpnI y ApaI, concluyendo que sólo Sfil y NotI generaban una cantidad razonable de fragmentos y por consiguiente mayor poder discriminatorio, como también la concentración de estas enzimas necesaria para una digestión de ADN completa (Parsons *et al.*, 2007). Los autores recomiendan el uso de Sfil en primera instancia, y sólo NotI para diferenciar cepas indistinguibles (Kam *et al.*, 2008). Sin embargo, otros estudios de relación costo-eficacia, establecieron que NotI es mejor que Sfil en relación al costo por digestión y poder discriminatorio (Wang *et al.*, 2008).

En general, los resultados de diversos estudios de tipificación por PFGE en *V. parahaemolyticus* demuestran que la diversidad de perfiles en las cepas ambientales es mayor, frente a las cepas clínicas, aún cuando el número de cepas ambientales evaluadas fuese menor. Esta variabilidad en las cepas ambientales se considera normal, debido a que, *V. parahaemolyticus* es un microorganismo naturalmente marino. Por lo tanto, la diversidad genética que se puede observar en este ambiente es elevada, mientras que los aislamientos clínicos suelen pertenecer a un bajo número de linajes portadores de genes asociados a virulencia, que se estima representan sólo un porcentaje bajo de las cepas ambientales (Dauros Singorenko, 2009).

Por otra parte, otros estudios han corroborado que al mismo perfil de PFGE pueden pertenecer hasta 4 serotipos pandémicos distintos (Wong *et al.*, 2007; Martínez-Urtaza *et al.*, 2004). Los genes que participan en la génesis del serotipo se ubican en *clusters*, y la conversión entre un serotipo y otro puede ocurrir con mínimas diferencias genéticas en estos *clusters*, lo que puede no ser detectado en la macrorestricción del genoma completo al generar los perfiles de PFGE (Dauros Singorenko, 2009). Bhoopong *et al.*, 2007, describieron la posibilidad de que una conversión de serotipo puede ocurrir *in vivo*, con la comprobación experimental en conejos.

También se ha confirmado por otros estudios, la presencia de diferentes serotipos entre aislamientos con el mismo perfil de PFGE del clon pandémico (Wong *et al.*, 2007), y se observaron cepas clínicas que no poseían el gen *tdh* pero si el gen *trh* y pertenecían a serotipos no pandémicos; en este caso, el esquema de serotipificación no resultó confiable para caracterizar la diseminación epidemiológica de *V. parahaemolyticus* (Han *et al.*, 2008, citado por Dauros Singorenko, 2009).

***Vibrio parahaemolyticus* en el ambiente acuático**

Vibrio parahaemolyticus es habitante autóctono de los ambientes marinos costeros y de las áreas estuariales en todo el mundo. En el ambiente acuático se encuentra libre en suspensión y/o asociado a partículas formando complejos de alta densidad celular como biofilms. Se ha demostrado que puede encontrarse asociado a superficies inanimadas, fitoplancton, zooplancton especialmente copépodos (Huq *et al.*, 1983; Asplund *et al.*, 2011, Rehnstam-Holm *et al.*, 2010), como así también, formando parte de la flora comensal de algunos peces, mariscos y crustáceos (DePaola *et al.*, 2003; FAO 2000, Martínez-Urtaza *et al.*, 2004).

En los animales marinos, se encuentra comúnmente en el tracto digestivo y en sus superficies, incluyendo la piel y exoesqueletos quitinosos (Urakawa y Rivera, 2006), aportando beneficios mutuos para el crecimiento y nutrición (Colwell, 2006). Al igual que otros vibrios, *V. parahaemolyticus* posee actividad quitinolítica, esto le permitiría permanecer adherido a los copépodos y le proporcionaría una plataforma para desplazarse por el océano, otorgándole además protección ante condiciones ambientales adversas y nutrientes, utilizando al polisacárido como fuente de carbono y nitrógeno.

Los principales factores que influyen en la ocurrencia y distribución de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar son la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes, concentración de plancton y asociación con organismos marinos, entre otros (Tantillo *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005).

La temperatura del agua es considerada como el factor más importante que rige la distribución y abundancia de *V. parahaemolyticus*.

Kaneko y Colwell (1973), confirmaron que altas poblaciones de *V. parahaemolyticus* están correlacionadas con el incremento de la temperatura del agua durante los meses de verano. Estos mismos autores, determinaron que *V. parahaemolyticus* durante el invierno se sumerge en el fondo, en el material quitinoso del plancton y reaparece en el agua cuando la temperatura aumenta, produciéndose un ciclo de sedimentación y resuspensión. La temperatura óptima para su desarrollo es entre 20 y 30° C, por debajo de 20° C disminuye su concentración en el medio y a 10° C “desaparece” de la columna de agua, pero se mantiene en el sedimento desde donde reemerge cuando las condiciones son nuevamente favorables (Ej. meses cálidos en regiones templadas) (Tantillo *et al.*, 2004; Hervio-Heath *et al.*, 2002).

La salinidad requerida es entre 5 y 30‰ (bacterias halófilicas), concentración que puede variar dependiendo de la temperatura ambiental y disponibilidad de nutrientes. (Tantillo *et al.*, 2005; Heitmann *et al.*, 2005).

En condiciones ambientales adversas, como falta de nutrientes, cambios en la salinidad y temperaturas altas o bajas, *V. parahaemolyticus* puede entrar en un estado de latencia que se denomina estado viable no cultivable (VBNC), en el cual, disminuye su metabolismo y modifica la estructura de su pared bacteriana para lograr resistir a condiciones de estrés por largos períodos de tiempo. Bajo condiciones favorables las formas VBNC podrían revertir al estado cultivable, manifestando su capacidad de infección, patogenicidad y transmisibilidad (Jiang y Chai, 1996; Oliver, 2005).

En el medioambiente, se ha informado que solamente del 1 al 5 % de los aislamientos de *V. parahaemolyticus* son TDH+ y/o TRH+ y poseen la capacidad de producir infección entérica (De Paola *et al.*, 2003; Heitmann *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2000). Esta baja frecuencia, según Raghunath *et al.* (2009), podría deberse a que las cepas patógenas son más sensibles a las condiciones adversas y rápidamente revertirían a un estado viable no cultivable (VBNC). Por otra parte, la selectividad del caldo de enriquecimiento (Agua de Peptona Alcalina - APA) utilizado en el aislamiento, esta basada en el pH alcalino; sin embargo, las cepas patogénas encuentran en el tracto gastrointestinal un pH ácido y un ambiente que contiene sales biliares (Raghunath 2009). Pace *et al.* (1997), sugirieron que estos factores revertirían el estado viable no cultivable, activando y aumentando la virulencia de las cepas de *V. parahaemolyticus*. Estas podrían ser algunas razones por las cuales se aíslan cepas patógenas del tracto gastrointestinal humano, en contraste con lo hallado en el ambiente acuático (Pace *et al.*, 1997).

Epidemiología de *V. parahaemolyticus*

Desde el punto de vista epidemiológico, la presencia de *V. parahaemolyticus* en los productos del mar ha sido identificada como una importante causa de enfermedad transmitida por alimentos, desde que, en 1950 produjo un brote de gastroenteritis en Japón, donde 272 personas fueron afectadas y 20 fallecieron. (Fujino *et al.*, 1953). La

enfermedad gastrointestinal causada por *Vibrio parahaemolyticus* ha sido reportada en América, África, Asia, Europa y Oceanía.

Los brotes infecciosos que se han presentado a nivel mundial en los últimos años se han atribuido a la aparición de tres serotipos con un importante potencial pandémico: O3:K6, O4:K68 y O1:KUT (Nair *et al.*, 2007).

En el año 1996 en Calcuta, India, *V. parahaemolyticus* O3:K6 fue el causante del 50 a 80% de los casos de gastroenteritis en pacientes hospitalizados (Chowdhury, 2004). La tendencia pandémica de este serotipo se hizo evidente cuando comenzó a reportarse el aislamiento en muestras clínicas en Taiwan, Laos, Japón, Tailandia y Corea (CDC, 2004). En los años siguientes, fueron reportados aislamientos de O3:K6 similares a aquellos obtenidos en Calcuta en brotes asociados a alimentos y casos esporádicos en Bangladesh, Chile, Japón, Corea, Laos, Rusia, Taiwan, Tailandia y Estados Unidos de Norteamérica.

Posteriormente, se han encontrado otros serotipos de *V. parahaemolyticus*, con las mismas características genéticas del clon pandémico, denominándose a todas ellas el “grupo pandémico”. En América del Sur, el serotipo pandémico O3:K6, fue reportado en Perú y Chile como causa de brotes de gastroenteritis desde 1998, ocasionando en el año 2005 más de diez mil casos que requirieron hospitalización y dos muertes (González Escalona *et al.*, 2005, Heitmann *et al.*, 2005).

El clon de *V. parahaemolyticus* O3:K6 se ha diseminado actualmente en cuatro continentes: Asia, América, África y Europa. Tal diseminación de un solo serotipo de *V. parahaemolyticus* no había sido reportada anteriormente, haciéndose evidente que estamos frente a una pandemia de gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus*. (Nair y Hormazábal, 2005).

Otros serotipos, como el O4:K68 y O1:KUT (no tipificable) parecen haberse originado a partir del clon pandémico y se han señalado como derivados clonales. La variación ha continuado y desde 1998 se han descrito un total de 20 serovariantes con la misma consideración. O4:K68, O1:K125 y O1:KUT poseen secuencias *toxRS*, perfiles AP-PCR, ribotipos y perfiles PFGE idénticos a los del O3:K6. El serotipo O6:K18 comparte identidad molecular con el O3:K6. El resto, descritos por una gran variedad de técnicas de caracterización molecular, aislados en el curso de brotes en diversas partes del mundo se consideran, derivados clonales, originados por alteración o modificación de los antígenos O:K. La lista, además de los mencionados, incluye: O4:K12, O1:K41, O1:K56, O3:K75, O4:K8, 5:KUT, O4:KUT, O5:KUT, O5:K17, O5:K25, O1:K33, O2:K3, OUT:KUT, O3:KUT, O3:K5, O4:K4, O4:K10 y O6:K18 (AESAN, 2010).

Vibrio parahaemolyticus se transmite principalmente por la ingestión de mariscos crudos o mal cocidos, especialmente moluscos bivalvos. También se puede transmitir por contaminación cruzada, por la manipulación de mariscos crudos con otros alimentos, o por enjuagar éstos con agua contaminada. El transporte o almacenamiento de productos del mar en condiciones inadecuadas de refrigeración

favorece su proliferación y la posibilidad de infección. *V. parahaemolyticus* ha sido aislado de una gran cantidad y variedad de especies marinas, tales como cangrejos, camarones, langostas, caracoles, sardinas, atunes, almejas, calamares y pulpos (Baffone *et al.*, 2006; Mahmud *et al.*, 2008).

Aunque se pensó originalmente que los alimentos marinos crudos eran el principal vehículo de infección, está claro que alimentos cocidos, contaminados por las manos, materiales crudos o equipo, pueden ser causantes del problema. Fishbein *et al.* (1970) aislaron *V. parahaemolyticus* de carne de cangrejo procesada (carne cocida, empacada y refrigerada). En Maryland, *V. parahaemolyticus* fue aislado de carne de cangrejo cocido con vapor, la cual fue contaminada después de la cocción, porque fue almacenada con cangrejos vivos (Dadisman *et al.*, 1972).

En áreas donde *V. parahaemolyticus* es habitual, los microorganismos han sido aislados de las manos de los hombres que venden productos de mar y de utensilios de cocina usados para la cocción de pescados y crustáceos. En Tokio, Zen-Yoji *et al.* (1965), analizaron 130 utensilios de cocina y aislaron *V. parahaemolyticus* en 107 (82.3%) de ellos.

Los principales reservorios de *V. parahaemolyticus* son los alimentos marinos y agua de mar, usualmente de áreas costeras. Sin embargo, en Calcuta, India, *V. parahaemolyticus* ha sido aislado de aguas de río, de lagos y de pescado de agua dulce (Blake y Hollis, 1980).

La dinámica epidémica de los patógenos asociados con las enfermedades transmitidas por el agua, como es el caso de las infecciones por *Vibrio* tienen una gran dependencia de los factores físicos-químicos y biológicos del medio ambiente que van a modular su presencia y su abundancia mediante un equilibrio entre crecimiento y depredación. Variaciones en las condiciones ambientales y ecológicas del medio van a repercutir sobre la dinámica biológica de estos microorganismos favoreciendo o limitando su abundancia y promoviendo la aparición de infecciones cuando las condiciones ambientales permiten alcanzar altas cargas de organismos en alimentos marinos de consumo (Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011).

La mayor incidencia de infecciones se produce en los meses de verano, a favor de condicionantes climáticos, ecológicos y socioculturales, como son, las altas temperaturas, las actividades acuáticas y el mayor consumo de pescados y mariscos en estos meses (Janda *et al.*, 1988).

***Vibrio parahaemolyticus* en América Latina**

La dinámica epidémica de *V. parahaemolyticus* en América Latina ha estado caracterizada por la existencia de casos de infección durante la época estival cuando se registraban aumentos en la temperatura ambiental. Los casos detectados

resultaban esporádicos, en su mayoría asociados al clon O4:K8, y normalmente debidos al consumo de productos marinos crudos (Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011).

Este patrón estacional cambió drásticamente en 1997 cuando en el invierno austral fue detectado el clon pandémico asiático de *V. parahaemolyticus* a lo largo de la costa de Perú, causando un aumento en el número de infecciones. Se detectó la llegada de este clon al norte del país en julio de 1997 (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008), y de ahí se propagó secuencialmente hacia el sur hasta llegar a Lima; en noviembre las infecciones fueron extendiéndose en dirección sur alcanzando el departamento de Moquegua y cruzando la frontera con Chile alcanzando Antofagasta (**Figura 4**), (González Escalona *et al.*, 2005). Desde este punto, el clon pandémico comenzó una difusión global constante (Nair *et al.*, 2007).

Las rutas y los mecanismos de difusión del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* en América del Sur, ha sido motivo de controversia desde su origen y permaneció desconocido hasta hace poco tiempo (Martínez-Urtaza *et al.*, 2010; Ansedo-Bermejo *et al.*, 2010).

Una de las explicaciones más recurrentes ha sido basada, en la descarga de aguas de lastre de los buques que llegaban desde zonas endémicas de *V. parahaemolyticus*. Las descargas de aguas de lastre han sido reconocidas como uno de los principales vehículos para la difusión mundial de las especies marinas y las invasiones biológicas (Niimi, 2004) y se han identificado como un mecanismo fiable para la propagación de vibrios patógenos (DePaola *et al.*, 1992; McCarthy y Khambaty, 1994; Ruiz *et al.*, 2000).

Sin embargo, la dispersión de bacterias a través del agua de lastre, no proporciona una explicación coherente y global para el surgimiento de algunos episodios epidémicos de *V. parahaemolyticus*, como lo sucedido con la rápida propagación de la epidemia; en solo 4 meses se extendió a lo largo de más de 1500 km de costa, comenzando en el norte del Perú y llegando a la ciudad chilena de Antofagasta (González-Escalona *et al.*, 2005).

Una revisión reciente reveló que la aparición y dispersión de la epidemia de *V. parahaemolyticus* en 1997 siguió el mismo patrón de dispersión que la epidemia de cólera en 1991, y a su vez, ambas epidemias coincidieron con el inicio de los eventos del Fenómeno del Niño de 1991 y 1997 (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008).

El estudio de las condiciones oceanográficas existentes en la costa de Perú durante El Niño en 1997, evidenció que las aguas cálidas asociadas a este episodio llegaron al norte del país alrededor de mayo de 1997, coincidiendo con la llegada de infecciones, que afectaron en esta primera fase la zona norte del país. En noviembre de ese año, se detectó una segunda anomalía oceanográfica todavía más fuerte que alcanzó la frontera sur de Perú y alcanzó Antofagasta al norte de Chile (**Figura 4**).

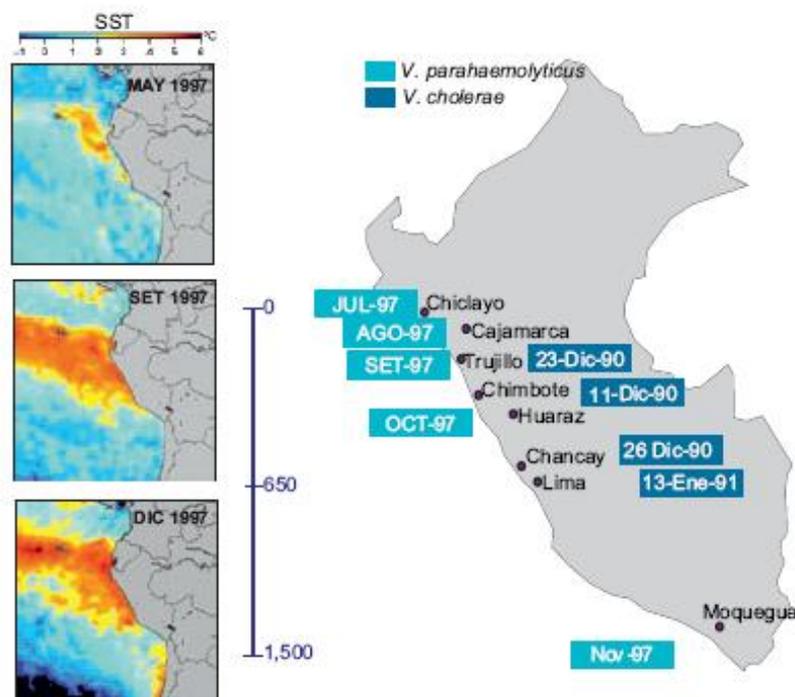


Figura 4. Similitudes entre la aparición y progresión de las epidemias de *V. cholerae* en 1991 y *V. parahaemolyticus* en 1997 en Perú con la llegada y el movimiento de las aguas de El Niño durante 1997. El movimiento de las masas de agua de El Niño en 1997 fueron graficados utilizando los valores de la temperatura superficial del mar (SST) obtenidos por satélite (Mapas de la izquierda). La dispersión de los brotes de *V. parahaemolyticus* fue representada en color celeste y fueron obtenidas a partir de los registros de cepas referidas al INS durante 1997. La detección de los primeros casos del cólera durante la epidemia de 1991 fueron graficados de color azul de acuerdo con los datos aportados por Seas *et al.* (Mapa de la derecha)(Reproducido de Gavilán *et al.*, 2011).

El análisis y caracterización de las cepas del clon pandémico detectadas en Perú durante 1997, evidenció que eran fenotípica y genéticamente indistinguibles a las detectadas en la India e Indonesia en 1996 que originaron la aparición de la pandemia asociada al clon O3:K6 (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008). Paralelamente, un estudio retrospectivo de cepas de *V. parahaemolyticus* obtenidas en varios hospitales de Perú identificó una cepa aislada en 1996 que pertenecía al clon pandémico que era indistinguible genéticamente de las reportadas en Asia (Gil *et al.*, 2007).

Este descubrimiento reforzó la teoría de dispersión transoceánica de las infecciones por *Vibrio*. De acuerdo con nuevas evidencias, las aguas ecuatoriales transportadas por el fenómeno de El Niño habrían sido las responsables del transporte del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* desde Asia a América en 1997, un viaje de más de 14000 km (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008) (**Figura 5**). La diseminación de este patógeno estaría relacionada con el transporte de zooplancton por las aguas cálidas oceánicas de El Niño, ya que se ha detectado la llegada de zooplancton tropical en asociación con estas aguas cálidas (Baker-Austin *et al.*, 2010; Martínez-Urtaza *et al.*, 2010).

La dispersión de las aguas de El Niño de 1997 tuvo su límite al sur en Antofagasta. De forma similar, el brote epidémico de *V. parahaemolyticus* en Perú se extendió hasta Antofagasta, donde los primeros casos fueron detectados en los últimos días de 1997 (Córdova *et al.*, 2002). Las cepas aisladas en Antofagasta fueron indistinguibles de las de Perú, lo que refuerza su conexión epidémica.

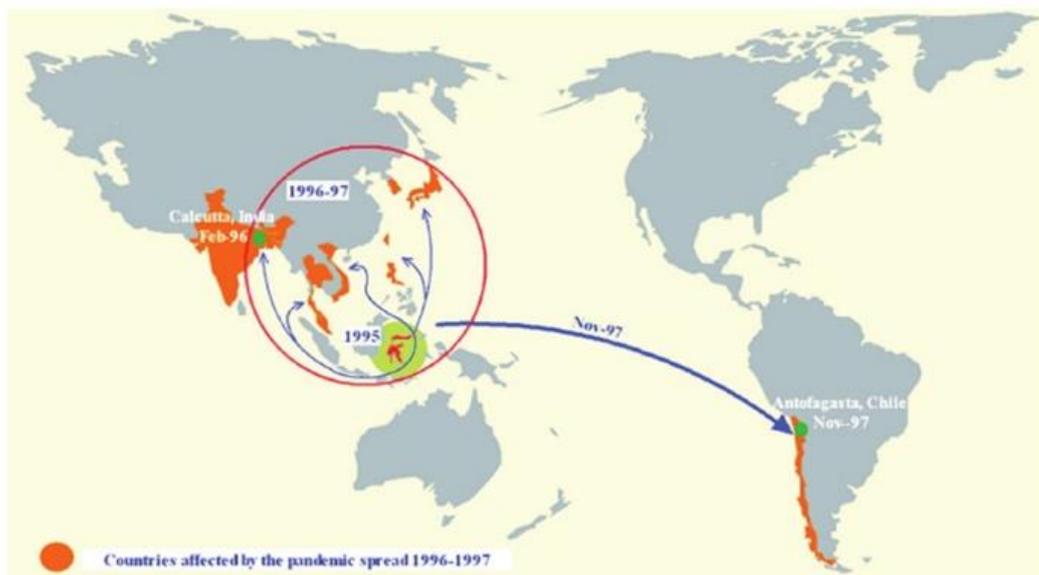


Figura 5. Distribución de la pandemia de *Vibrio parahaemolyticus* 1996-1997. Detección de infecciones en Asia y en el norte de Chile (Reproducido de Martínez-Urtaza *et al.*, 2008).

Desde 1997, los casos de *V. parahaemolyticus* tuvieron un notable retroceso hasta casi desaparecer. Sin embargo, en 2004 en Puerto Montt, Chile, se produjo un nuevo brote de infección de dimensiones desconocidas, se detectaron más de 3600 casos en el 2004 y 10984 en el 2005, todos ellos relacionados con el clon pandémico. Este hecho se repitió con menos personas afectadas, en la misma época pero en el año 2006, marcando un récord a nivel mundial, nunca antes se había reportado un número tan elevado de cuadros clínicos debido a este agente (Fuenzalida *et al.*, 2007). Los casos del 2006 corresponden a un 53% menos que lo notificado durante el 2005 (14 febrero al 24 abril) con un total de 6.836 casos (Harth *et al.*, 2009). Específicamente, entre los años 2004 al 2008 se verificaron 19.286 casos, siendo la Región del Bío-Bío una de las más afectadas, llegando algunas temporadas a ser la región con mayor número de casos a nivel nacional, con un total de 3.659 entre los años 2006 al 2009. Entre el 1 de enero y el 30 de abril de 2011, se notificaron 71 casos de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* en Chile, inferior a lo observado en el mismo período en los años anteriores: 2010 (358 casos), 2009 (704 casos), 2008 (3.643 casos), 2007 (1.008 casos) y 2006 (3.651 casos) (MINSAL, 2011).

Durante el verano de 2009, se detectó un nuevo brote de *V. parahaemolyticus* en el norte del Perú causado por una cepa de *V. parahaemolyticus* con características genéticas distintas al clon pandémico y a las cepas previamente identificadas en Perú. Estas infecciones fueron asociadas al consumo de productos marinos y, al igual que

otros brotes estacionales anteriores, su incidencia se limitó a la época estival (Boletín Epidemiológico 2009; Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011).

Actualmente, la incidencia de infecciones por *V. parahaemolyticus* en Perú y Chile han disminuido considerablemente desde la aparición del clon pandémico, retornando a su dinámica estacional y a cepas principalmente endémicas, como el clon del serotipo O4:K8 (Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011).

En Brasil, entre 1999 y 2008, fueron reportados 10 brotes donde los agentes etiológicos fueron descritos como especies patogénicas de *Vibrio*. Oliveira *et al.* (2002), investigaron un brote de gastroenteritis aguda ocurrido entre participantes de un evento científico en la ciudad de Fortaleza-Ceará, y se aisló *V. parahaemolyticus* O3:K6 (Kanagawa positivo) en 9 muestras de heces de los 20 casos detectados.

En México, los casos de intoxicación alimentaria por *V. parahaemolyticus* derivados del consumo de moluscos bivalvos son esporádicos. A finales de 2007 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) reportó dos presuntos casos de intoxicación alimentaria por *V. parahaemolyticus* asociados al consumo de moluscos bivalvos provenientes de México. En el periodo 2007 a 2010 la FDA había comunicado menos de una decena de casos atribuidos a moluscos bivalvos de origen mexicano, tratándose de eventos esporádicos y aislados (Cofrepis, 2010).

En Uruguay no se dispone de datos sobre la incidencia de *V. parahaemolyticus* en infecciones humanas.

***Vibrio parahaemolyticus* en Argentina**

Los primeros reportes de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en Argentina surgen de los estudios realizados por los Drs. Caria y Casellas, en los años 1971 y 1974, en muestras de cholgas y mejillones del Golfo Nuevo (Provincia del Chubut, Argentina). Las muestras de cholgas (*Aulacomya ater*) y almejas (*Protothaca antiqua*) fueron extraídas de una “cholguera” ubicada frente a Punta Loma (Golfo Nuevo), mientras que los mejillones (*Mytilus edulis*) procedieron de distintas zonas del golfo. Se procesaron en total 180 ejemplares y se caracterizaron 9 aislamientos como *V. parahaemolyticus*, Kanagawa positivos, estimándose que la concentración máxima en las muestras fue de 10^2 Vp/gramo (Casellas *et al.*, 1977).

Entre 1987 y 1989, Monticelli *et al.*, 1991, realizaron estudios en mejillones comercializados en el Puerto de Mar del Plata, provenientes del Banco natural Mar del Plata, del Banco Quequén (Provincia de Buenos Aires) y de un cultivo desarrollado en la localidad de San Antonio Oeste (Río Negro.). Se estudiaron 252 aislamientos, no detectándose *V. parahaemolyticus* en ninguno de ellos.

En 1989, se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua, sedimento y plancton de los golfos norpatagónicos. De 150 aislamientos identificados, ninguno resultó tener capacidad patogénica, resultaron Kanagawa negativos. (Cabezalí *et al.*, 1989).

Por otro lado, en Argentina no se cuentan con datos oficiales acerca de casos o brotes producidos por este microorganismo en humanos y debido a los escasos reportes de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en productos pesqueros, no se han realizado hasta ahora estudios de epidemiología molecular que permitan conocer la distribución de las cepas circulantes en nuestro país.

Sin embargo, en los últimos años, en los meses de verano se han observado episodios de gastroenteritis en turistas, aparentemente relacionados con el consumo de almejas y berberechos extraídos de las playas balnearias. Se ha informado que dichos eventos podrían atribuirse a toxinas diarreicas de moluscos bivalvos, debido a que fueron detectados altos niveles de toxinas diarreicas en moluscos bivalvos y en agua del ambiente. Sin embargo, no fueron realizados otros estudios sobre las muestras, como la búsqueda de bacterias o virus (*V. parahaemolyticus*, Norovirus), que podrían cursar cuadros clínicos similares de gastroenteritis. Por otro lado, no hay reportes que informen la confirmación de los casos basándose en los análisis de los alimentos ingeridos por los enfermos, ni estudios clínicos que los avalen. Hasta el momento se carece de estudios epidemiológicos que lo confirmen.

***Vibrio parahaemolyticus* como patógeno en humanos**

La infección en humanos por *V. parahaemolyticus* desencadena gastroenteritis aguda con diarrea. (Cho *et al.*, 2008). Produce un cuadro intestinal, de aparición brusca, caracterizado por diarrea acuosa y cólicos abdominales (89%), que pueden acompañarse de náuseas (76%), vómitos (55%), fiebre y cefalea (52%). La temperatura rara vez excede los 38,9°C. En ocasiones la diarrea es sanguinolenta, “como carne lavada”, denominación con la que se describe un tipo de heces de color rojizo acuoso, pero diferente del que se puede ver en otros cuadros diarreicos parecidos, como en los producidos por *Shigella* o amebas.

El periodo de incubación oscila entre 4 y 90 horas, con una media de 17 horas, dependiendo en parte de la dosis infectante, de la naturaleza del alimento o plato ingerido y de la acidez gástrica. El cuadro clínico se considera autolimitante, de gravedad moderada, la duración de la enfermedad varía desde 12 horas a 12 días, con una duración media de tres días (Daniels *et al.*, 2000).

En estudios experimentales realizados en voluntarios se ha demostrado que la dosis capaz de infectar a humanos tiene un rango de 10^5 y 10^7 microorganismos dependiendo de las condiciones del estomago y del tipo, cantidad y capacidad amortiguadora del alimento ingerido (Daniels *et al.*, 2000, FDA 2000). Estudios anteriores en voluntarios humanos coincidieron con este rango, diversos autores

observaron un rápido desarrollo de gastroenteritis después de la ingestión de niveles de 2×10^5 a 2×10^7 ufc del patógeno KP positivo; por otra parte, voluntarios que recibieron hasta $1,6 \times 10^{10}$ ufc de un aislado KP negativo, no exhibieron signos de diarrea (Sanyal y Sen, 1974; Oliver y Kaper, 1997). Sin embargo, en los brotes sucedidos en Canadá y Estados Unidos durante 1997 y 1998 por consumo de ostras, el análisis de muestras evidenció valores inferiores a 200 ufc/g de carne de ostra, lo que sugiere que la enfermedad puede aparecer como consecuencia de la exposición del agente a niveles mucho más bajos de los que habitualmente se habían considerado (CDC, 1999).

Además del cuadro gastroentérico, en raras ocasiones *V. parahaemolyticus* puede causar fascitis necrotizante en heridas infectadas, infecciones de oído y septicemias en individuos inmunocomprometidos. (Tena, 2010; Daniels *et al.*, 2000). Aunque normalmente la gastroenteritis producida por este agente es autolimitante, en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas puede causar septicemia de pronóstico grave o muy grave (Khamet *et al.*, 2001; Ruiz y Agraharkar, 2003). En pacientes que han sido sometidos a trasplante de órganos se ha descrito diarrea prolongada con mala absorción (Matsumoto *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Daniels *et al.*, 2000, en una serie de pacientes con infección por este agente, 59% presentó diarrea, 34% infección de heridas, 5% síndrome séptico y 2% tuvieron otras manifestaciones.

Alimentos implicados en las infecciones por *V. parahaemolyticus*

Los alimentos asociados con enfermedades debidas al consumo del *V. parahaemolyticus* incluyen langostinos, langosta, cangrejos de río de patas rojas, camarones, albóndigas de pescado, almejas blancas hervidas, almejas navajas, caballas fritas, mejillones, atún, ensaladas de mariscos, ostras crudas, carne de cangrejo hervida/cocida al vapor, pectínidos, calamares, erizos, misidáceos y sardinas (CCFH, 2002). (**Figura 6**). Estos alimentos incluyen tanto los productos de mariscos crudos como aquellos poco cocinados y substancialmente recontaminados (CCFH, 2010).

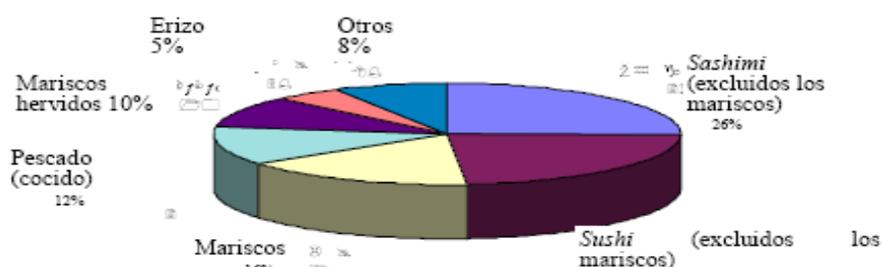


Figura 6: Proporción de ocurrencia de *V. parahaemolyticus* por grupo de alimento implicado (Fuente: Ministerio de Salud, Labor y Bienestar Público, Japón, citado y reproducido de CCFH, 2002)

Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de *V. parahaemolyticus*

Las infecciones alimentarias debidas al consumo de moluscos se clasifican en tres categorías de acuerdo con el origen del agente etiológico): 1) las asociadas con agentes patógenos procedentes de la contaminación fecal humana o animal; 2) las ocasionadas por organismos autóctonos de ambientes marinos y estuarios; y 3) las originadas por la contaminación del alimento durante su procesado o manipulación.

Las primeras descripciones de enfermedad bacteriana transmitida a través del consumo de moluscos bivalvos datan del siglo XIX y principios del XX. Con anterioridad a 1950, la infección más comúnmente asociada con la ingestión de moluscos crudos o insuficientemente cocidos era la fiebre tifoidea (Riipey, 1994).

En la actualidad, las infecciones relacionadas con la ingestión de moluscos bivalvos son de origen bacteriano y/o vírico. Los moluscos bivalvos son un vehículo bien documentado de transmisión de enfermedades causadas por las especies de *Vibrio*. (De Paola *et al.*, 2007).

Vibrio parahaemolyticus es reconocido como un patógeno transmitido por pescados y mariscos y considerado un patógeno zoonótico, debido a que los moluscos y camarones actúan como reservorios de esta patógeno (Cook *et al.*, 2002; DePaola *et al.*, 2000.; Lozano-León *et al.*, 2003; Austin, 2010).

El consumo de moluscos bivalvos ha aumentado de manera significativa en los últimos años y algunas especies se consumen preferentemente crudas o vivas (p. ej. ostras) o poco cocinadas (p. ej. mejillones) (FAO, 2008). El consumo directo de organismos marinos constituye un riesgo potencial para la salud pública debido a que, al ser animales de régimen alimentario exclusivamente filtrador, concentran contaminantes que se hallan en la columna de agua donde crecen (FAO, 2008). Wright *et al.* (1996) demostraron que las ostras pueden alcanzar concentraciones 100 veces superiores de contaminantes a los existentes en el agua circundante. Estos contaminantes pueden provocar enfermedades en las personas que los consumen (Morris, 2003).

Por otra parte, los moluscos bivalvos son únicos en el sentido de que son capturados, manipulados y consumidos de diferente manera que la mayoría de los productos alimentarios de origen marino y, por lo tanto, representan riesgos y opciones de control únicos. Según FAO/OMS, en muchos países, los moluscos bivalvos se conservan vivos fuera del agua durante varios días después de la cosecha a temperatura ambiente, lo que permite y favorece la proliferación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. (AESAN, 2010).

Los moluscos a través de sus branquias cubiertas de mucus y cilios vibrátiles, filtran el agua y se alimentan, consumen materia orgánica en forma de partículas inertes, detritos, fitoplancton y microzooplancton. En menor medida, consumen bacterias y pueden absorber directamente sustancias disueltas en el agua como aminoácidos y azúcares (Bayne y Hawkins, 1992). La velocidad de este proceso depende de varios factores: i) el tamaño del molusco (los de mayor tamaño filtran, en términos absolutos,

volúmenes superiores de agua pero menor cantidad si la filtración se valora en proporción al peso del animal); ii) la temperatura del agua (su incremento favorece la velocidad de filtración); y iii) la concentración de alimento (la velocidad aumenta cuando hay poco alimento disponible y disminuye si éste es muy abundante). El volumen de agua que los moluscos bivalvos pueden filtrar es elevado, se ha descrito que la ostra americana, *Crassostrea virginica*, puede procesar unos 37 litros de agua por hora (Brusca y Brusca, 2002). El tamaño de las partículas retenidas depende de la especie de molusco y oscila entre un mínimo de 1-5 μm y un máximo de 400-500 μm de diámetro (Puerta, 1995). En cuanto a la localización de los microorganismos, la mayoría se acumulan en el tracto digestivo. Otras partes del cuerpo (branquias, manto, pie) tienen niveles de contaminación similares a las del agua circundante (Power y Collins, 1990). Los animales fisiológicamente activos constituyen verdaderos concentradores biológicos, siendo capaces de acumular virus y bacterias muy rápidamente.

El grado de contaminación de *V. parahaemolyticus* en marisco crudo se asocia con la temperatura del agua (AESAN, 2010) normalmente la concentración del microorganismo en ostras en el momento de su cosecha, está por debajo de 10^3 ufc/g (Kaysner y DePaola, 2000), esta concentración puede aumentar si la temperatura del agua aumenta (meses de verano) o si, luego de la cosecha son expuestas a una temperatura ambiente muy elevada. Por otra parte, se ha demostrado también que tratamientos térmicos moderados, o tratamientos de congelación y de altas presiones hidrostáticas aplicados a ostras recién capturadas, producen una disminución de entre 5 a 6 unidades logarítmicas con respecto a ostras no procesadas (DePaola *et al.*, 2009).

En un estudio reciente realizado por Yoon *et al.*, 2008 en el cual desarrollaron modelos de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en preparados de ostras, se observó que hasta 15°C decrece la concentración de *V. parahaemolyticus* y que comienza a crecer muy lentamente a partir de 20°C (a 20°C aumenta una unidad logarítmica después de 75 h de almacenamiento). Un aumento de la temperatura de tan sólo 5°C (25°C) produjo un crecimiento de dos unidades logarítmicas en 28 h, y a 30°C el tiempo necesario para producir tal incremento fue de 9,5 h.

Caracterización del lugar de muestreo

Aspecto geográfico

La costa de la provincia de Buenos Aires tiene aproximadamente 1.900 km de longitud, abarca desde la desembocadura del arroyo del Medio, al norte de San Nicolás de los Arroyos ($33^\circ 21'$



Figura 7: Villa Gesell

S y 60°13' W) hasta Punta Redonda (41°03' S y 63°23' W). Sobre la base de sus características geográficas, se reconocen tres sectores bien diferenciados: el norte corresponde a las costas fluvioestuariales del Río de la Plata, el central está formado por las costas marinas de la llanura pampeana y el sector sur corresponde a las costas marinas de la meseta patagónica (Dadon y Matteucci, 2006).

Las localidades elegidas para este estudio se encuentran en el sector central, las costas marinas bonaerenses son en su mayoría bajas, de sedimento no consolidado y conforman un cordón costero medanoso (**Figuras 7 y 8**).

Respecto a las aguas costeras que cubren el litoral bonaerense, en el norte se encuentra el Río de la Plata y hacia el sur se encuentran las aguas del Mar Argentino, dentro del Océano Atlántico; la confluencia de aguas continentales y marinas da origen a tres tipos de zonas, la zona continental que cubre la parte interna y media del Río de la Plata, con aguas de salinidades menores a 2 ups, la zona estuarina que comprende el área de transición entre las aguas dulceacuícolas y marinas, con salinidades en un rango de 2 a 27 ups, incluyendo la Bahía Samborombón y la zona marina que se extiende a lo largo de la costa entre Punta Rasa y el extremo sur de la Provincia de Buenos Aires, con aguas con salinidades superiores a 27 ups (Lucas *et al.*, 2002).

La escasa pendiente y gran amplitud del litoral bonaerense hace que las características físico-químicas y distribución de las aguas sean influenciadas por el ciclo térmico atmosférico y por los vientos prevalecientes (Guerrero y Piola, 1997). En el estuario las aguas dulces continentales en su encuentro con las aguas marinas no se mezclan espontáneamente, sino que se



desplazan hacia el océano por la superficie. El fondo es ocupado por aguas de mayor salinidad, que se mueven en dirección a la cabecera del río. La distribución horizontal de la salinidad de superficie muestra un patrón estacional gobernado por los vientos. Durante otoño e invierno el río descarga sobre la costa uruguaya, en tanto que durante la primavera verano lo hace sobre la costa argentina, habiéndose detectado su influencia hasta la latitud de Mar del Plata (38°S) (Guerrero *et al.*, 1997b, Guerrero y Piola, 1997; Framiñan *et al.*, 1999). Esta característica diferencia las localidades elegidas para este estudio, debido a que, en verano la influencia del Río de la Plata, en su descarga en el Océano Atlántico provoca una disminución de la salinidad en las playas de Santa Teresita, con respecto a las de Villa Gesell y Mar Azul.

Las temperaturas del agua, por ser aguas costeras y de poca profundidad, se encuentran sometidas predominantemente al ciclo térmico atmosférico y en menor medida a la temperatura del Agua de Plataforma Media, presentan carácter estacional,

con un valor medio máximo de 22°C durante el mes de febrero y un mínimo de 8°C en el mes de julio. Existe una dependencia de la temperatura del agua de mar respecto a la temperatura del aire, según la cual el ciclo de la temperatura de aire antecede en un mes a la del agua, predominantemente en verano y otoño (Martos *et al.*, 2004).

El clima presenta características asociadas al templado oceánico, la temperatura media anual es de 14°C, mientras que, la media en verano es de 22,4°C y la marca promedio invernal alcanza los 8°C. Durante el verano se registran los valores máximos de precipitaciones y en términos generales, de septiembre a enero, es la época con mayor intensidad de vientos.

Actividades antropogénicas

En la segunda mitad del siglo XX comenzó una rápida transformación de las zonas costeras de Sudamérica, la cual todavía se encuentra en marcha. Las costas, en su mayoría con paisajes y ecosistemas todavía naturales, son destinadas a nuevos usos y actividades, debido al aumento de la población costera, la demanda de alimentos y el auge del turismo masivo (Dadon y Matteucci, 2006).

En la provincia de Buenos Aires, aproximadamente el 50% de la población vive a no más de 200 km de la costa. La densidad en las zonas costeras es de alrededor de 80 personas por km cuadrado, las costas del litoral atlántico bonaerense, en la actualidad, son asiento de numerosas ciudades balnearias que reciben gran cantidad de turistas sobre todo en el periodo estival (Lasta y Jaureguizar, 2006). En los meses de verano, la densidad de las poblaciones humanas puede ser sorprendentemente elevada en algunas playas, con casi un individuo por metro cuadrado en el intermareal superior y en el supralitoral (Boschi, 2004).

En la zona costera bonaerense predomina el turismo, las actividades portuarias y pesqueras. Las playas atraen a la más importante corriente turística del país y existe una variada oferta de balnearios con características distintivas que incluye ciudades balnearias de gran tamaño (Mar del Plata, Necochea) y de tamaño intermedio (Santa Teresita, San Bernardo-Mar de Ajó, Pinamar- Ostende-Valeria del Mar, Villa Gesell, Santa Clara del Mar, Miramar, Claromecó, Monte Hermoso, entre otras) hasta localidades pequeñas y loteos recientes (Mar Azul, Las Gaviotas) (Dadon y Matteucci, 2006).

Principales moluscos bivalvos de la costa bonaerense: especies y consumo

En general, en este tipo de playas, se observa un bajo número de especies, las cuales presentan altos valores de biomasa; típicamente dominan los moluscos y/o crustáceos filtradores (Bally, 1981). En el área estudiada, el meso y macrobentos se compone de pocas especies, los moluscos bivalvos presentes en la costa bonaerense

son: *Mesodesma mactroides* (almeja amarilla) y *Donax hanleyanus* (berberechos); otra especie no explotada comercialmente es *Brachidontes rodriguezii* (mejillines). En la década del '60, la almeja amarilla estaba declinando a causa de la explotación comercial desmedida. Fue entonces, cuando comenzó a aumentar la población de berberechos siendo actualmente la más abundante en el litoral bonaerense (Dadon *et al.*, 2001).



Figura 9: Berberechos (*Donax hanleyanus*)

No hay datos oficiales sobre el consumo de moluscos bivalvos. Si bien habitualmente los bivalvos de playas son incluidos entre los recursos pesqueros, el manejo de estos moluscos no es similar al manejo de poblaciones de peces marinos. Un factor importante es la cosecha ilegal en las playas, la extracción se realiza en forma artesanal, para su venta y consumo local, frecuentemente, se encuentran a turistas, que de manera informal recolectan los ejemplares presentes en las playas y los consumen en preparaciones caseras.

Se cosecha principalmente berberechos (*Donax hanleyanus*) y almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*), esta última actualmente protegida (DPP N° 1238/1996). En los últimos años una parte considerable de la población ha adquirido el hábito de consumirlos crudos.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

Durante los últimos años ha habido un aumento de brotes epidémicos notificados y casos de enfermedades de transmisión alimentaria atribuidos a especies patógenas de *Vibrio*. De todas las especies del género *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* es uno de los principales organismos causantes de enfermedades en humanos, ha causado una serie de brotes pandémicos debido al consumo de alimentos de origen marino, y su emergencia ha sido observada en regiones del mundo que anteriormente no habían sido reportadas. Actualmente es considerado un patógeno emergente y presenta una distribución mundial (CCFH, 2010; Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011)

Hasta 1996, las infecciones por *V. parahaemolyticus* se consideraban esporádicas y asociadas a múltiples serotipos. Sin embargo, en 1996 en Calcuta, India, surgió un serotipo O3:K6, con características pandémicas, que logró diseminarse por los cinco continentes y provocar un aumento en el número de casos de gastroenteritis asociadas a este microorganismo (Ramamurthy y Nair, 2005). En América del Sur, fue reportado en Perú y Chile desde 1997, ocasionando en el 2005 más de 10.000 casos y 2 muertes (González Escalona *et al.*, 2005; Heitmann *et al.*, 2005). Este fenómeno ha

sido asociado a factores de origen antropogénico, como el transporte marítimo, como así también, a factores oceanográficos, como el movimiento de masas de agua, que podrían estar influenciadas por el cambio climático (CCFH, 2010).

Produce un cuadro intestinal caracterizado por diarrea acuosa y cólicos abdominales, que pueden acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefalea. Rara vez puede causar fascitis necrotizante en heridas infectadas y septicemias en individuos inmunocomprometidos (Cho *et al.*, 2008; Lim y Stebbings, 1999). La mayor incidencia de infecciones se produce en los meses de verano, a favor de condicionantes climáticos y ecológicos, y socioculturales, como son las vacaciones en la playa y el mayor consumo de pescados, crustáceos y mariscos en esos meses (Janda *et al.*, 1988). Por otra parte, con la globalización de la cocina japonesa y la mayor difusión de la práctica de comer pescado y moluscos crudos, han aumentado las posibilidades de que se produzca una infección por *V. parahaemolyticus* (FAO, 2003).

Teniendo en cuenta que las infecciones causadas por este patógeno tienen una creciente importancia en salud pública y, a su vez, la presencia de especies patógenas de *Vibrio* en alimentos de origen marino han ocasionado trastornos en el comercio internacional; los esfuerzos y las preocupaciones por la inocuidad de los alimentos asociadas con este microorganismo han llevado a reconocer la necesidad de realizar estudios y contar con datos, para el establecimiento de guías específicas sobre las posibles estrategias de gestión de riesgos para su control a nivel mundial (CCFH, 2010).

En Argentina no se cuenta con datos acerca de casos o brotes producidos por este microorganismo, sin embargo han sido reportados casos de gastroenteritis provocados por el consumo de moluscos bivalvos; por otro lado, son muy escasos los reportes de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en productos pesqueros y no se han realizado hasta ahora estudios de epidemiología molecular que permitan conocer la distribución de las cepas circulantes en nuestro país (Costagliola y Jurquiza, 2010).

Debido a la escasa información existente y habiéndose registrado casos de gastroenteritis aparentemente debidos al consumo de moluscos bivalvos crudos recolectados en la costa bonaerense en los últimos años. Considerando que *V. parahaemolyticus* constituye uno de los principales patógenos de transmisión alimentaria asociado al consumo de moluscos bivalvos y que, en verano aumenta su consumo, se consideró necesario y de gran utilidad la realización de estudios de aislamiento, identificación y caracterización molecular de *V. parahaemolyticus*.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Determinar la frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en muestras de bivalvos, agua y sedimento de la costa Atlántica de Buenos Aires.
- Analizar la frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* y su relación con los factores ambientales.

- Detectar el gen específico de especie *toxR* para confirmar la identificación y los genes de virulencia *tdh* y *trh* de *V. parahaemolyticus* utilizando la técnica de PCR – reacción en cadena de la polimerasa.
- Caracterizar la diversidad genética de los aislamientos de *V. parahemolyticus* confirmados por PCR, por electroforesis en campo pulsado (PFGE).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo y procesamiento de las muestras

En el marco de las actividades planificadas en el Gabinete de Biología Molecular y Microbiología, Dirección de Pesquerías Pelágicas y Ambiente Marino del INIDEP, se realizaron campañas de investigación quincenales en el área costera de la Provincia de Buenos Aires. En total, se realizaron 16 muestreos que comenzaron en octubre de 2008 y finalizaron en septiembre de 2009 (**tabla 4**).

Las campañas de investigación consistieron en el muestreo de agua, sedimento y moluscos bivalvos de los Partidos de Villa Gesell y de la Costa. Dentro del Partido de Villa Gesell se colectaron muestras en las localidades de Villa Gesell y Mar Azul y en el Partido de la costa en la localidad de Santa Teresita.

Fueron registrados parámetros físico-químicos en cada sitio de muestreo: se realizaron mediciones de temperatura del agua in situ y se tomaron muestras de agua para la determinación de pH y salinidad por conductividad en el Gabinete de Oceanografía del INIDEP. Debido a la cercanía entre las localidades de Villa Gesell y Mar Azul pertenecientes al Partido de Villa Gesell, 5 a 7 km aproximadamente, los parámetros físico-químicos fueron colectados desde el muelle de Villa Gesell y fueron interpretados como representativos y/o similares para ambas localidades.

Tabla 4: Descripción de los sitios de muestreos y muestras recolectadas: Partido de Villa Gesell (PVG), Partido de la Costa (PC), Mar Azul (MA), Villa Gesell (VG) y Santa Teresita (ST), muestras recolectadas: Agua (W), Sedimento (S) y Bivalvos (B).

Nº Muestreo	Fecha	Sitios de muestreo		Tipo y número de muestras		
				W	S	B
1	29/10/08	PVG	MA	s/m	s/m	s/m
		VG		1	1	Berberechos
		PC	ST	1	1	Mejillines
2	18/11/08	PVG	MA	s/m	s/m	s/m
		VG		1	1	Berberechos
		PC	ST	1	1	Berberechos
		PVG	MA	s/m	s/m	s/m

3	11/12/08	VG		1	1	Berberechos
		PC	ST	1	1	Mejillines
4	07/01/09	PVG	MA	s/m	s/m	s/m
		VG		1	1	Mejillines
5	21/01/09	PC	ST	1	1	Mejillines
		PVG	MA	s/m	s/m	Berberechos
6	18/02/09	VG		1	1	s/m
		PC	ST	1	1	s/m
7	04/03/09	PVG	MA	s/m	s/m	Berberechos
		VG		1	1	s/m
8	18/03/09	PC	ST	1	1	s/m
		PVG	MA	s/m	s/m	Berberechos
9	31/03/09	VG		1	1	s/m
		PC	ST	1	1	s/m
10	22/04/09	PVG	MA	s/m	s/m	Berberechos
		VG		1	1	s/m
11	12/05/09	PC	ST	1	1	s/m
		PVG	MA	1	1	Berberechos
		VG		s/m	s/m	Almejas

		PC	ST	s/m	s/m	s/m
		PVG	MA	1	1	Berberechos
12	12/06/09		VG	s/m	s/m	s/m
		PC	ST	s/m	s/m	s/m
		PVG	MA	1	1	Berberechos
13	16/07/09		VG	s/m	s/m	s/m
		PC	ST	s/m	s/m	s/m
		PVG	MA	1	1	Berberechos
14	05/08/09		VG	s/m	s/m	s/m
		PC	ST	s/m	s/m	s/m
		PVG	MA	1	1	Berberechos
15	28/08/09		VG	s/m	s/m	s/m
		PC	ST	s/m	s/m	s/m
		PVG	MA	1	1	Berberechos
16	16/09/09		VG	s/m	s/m	s/m
		PC	ST	s/m	s/m	Almejas
<i>Nº total de muestras</i>				26	26	22

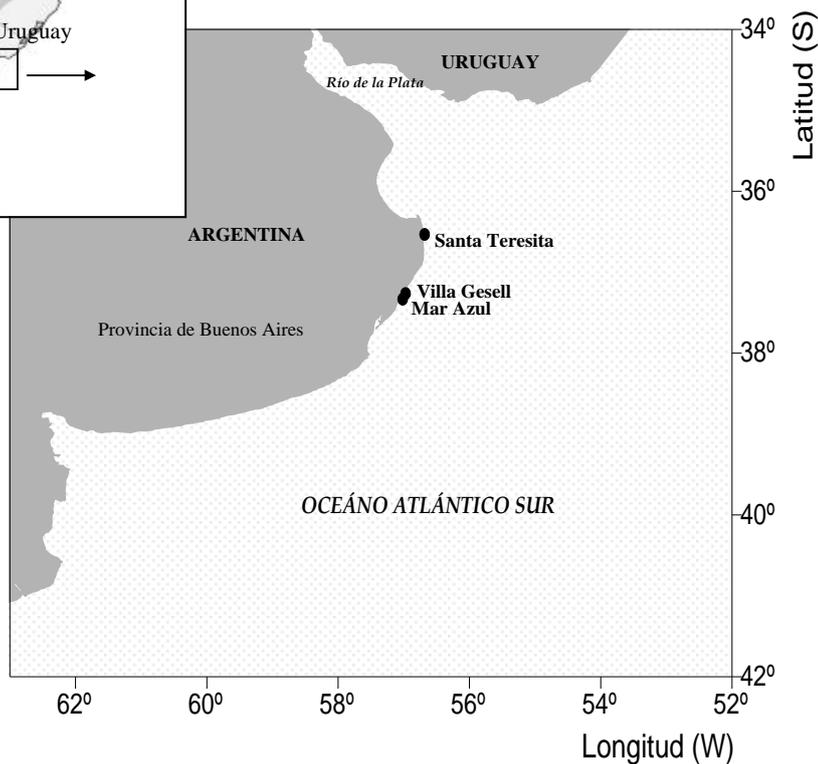
s/m: sin muestra.

Los sitios de muestreo fueron designados de acuerdo a la disponibilidad de muelles (espigones de pesca) y a la presencia de poblaciones de moluscos bivalvos. En las localidades de Villa Gesell y Santa Teresita se contó con muelles, y hasta el 4º muestreo fue posible la recolección de todas las muestras. Sin embargo, luego de este, no fue posible la recolección de moluscos bivalvos en los sitios elegidos porque no se encontraron poblaciones naturales. Por ese motivo, se buscaron moluscos bivalvos en puntos cercanos y se encontraron en la línea de costa de la localidad de Mar Azul (**figuras 10 y 11**).



Figura 10: Área de estudio: América del Sur. Argentina. Provincia de Buenos Aires.

Figura 11: Pcia. de Bs. As. Sitios de muestreo.



Para el aislamiento, identificación y caracterización de *V. parahaemolyticus* se utilizaron los métodos descritos en el Manual de Procedimientos para el Aislamiento, Identificación y Caracterización de *V. parahaemolyticus* de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y en el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la FDA (Silva San Cristóbal *et al.*, 2008; Kaysner y DePaola, 2004).

Para las muestras de agua, se aplicó el método de detección cualitativo de Presencia/Ausencia (P/A). En cambio, para muestras de moluscos bivalvos y sedimentos, se utilizó el método de detección semicuantitativo del Número Más Probable (NMP).

1.1 Muestras de agua

En las localidades de Villa Gesell y Santa Teresita, las muestras fueron recolectadas desde los espigones de pesca (muelles) mediante el empleo de un balde de muestreo.

En la localidad de Mar Azul se recolectó la muestra desde la orilla en la segunda rompiente de las olas. Las muestras fueron acondicionadas en recipientes asépticos y fueron mantenidas refrigeradas a una temperatura entre 7-10°C.

En el Laboratorio de Microbiología del INIDEP se filtró un volumen de 2 litros a través de filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm de porosidad, las membranas obtenidas se incubaron en agua de peptona alcalina (APA) (Oxoid) (peptona 1%, NaCl 1%; pH 8,6), durante 18 h a 35±1°C. Luego del enriquecimiento en APA, una alícuota se transfirió con ansa calibrada a Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y se incubó 24 h a 35±1°C. De las placas de TCBS fueron repicados hasta 5 aislamientos verde azulados (sacarosa negativos), en agar no selectivo (T₁N₁) para su posterior caracterización en agar cromogénico CHROMagar *Vibrio*®. Los aislamientos que resultaron púrpuras en CHROMagar *Vibrio*® fueron confirmados por PCR mediante la detección del gen *toxR*.

1.2 Muestras de Sedimento

En la línea de costa de las playas balnearias de las tres localidades, se colectaron muestras de sedimento, se acondicionaron en bolsas estériles y fueron transportadas refrigeradas.

En el Laboratorio se realizó una dilución 1:10 con PBS estéril; 20 g de muestra fueron diluidos en 180 ml de PBS y se procedió a la siembra de la serie de tubos del método del Número Más Probable (NMP). Se sembraron una serie de cuatro tubos por muestra con las siguientes diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Luego de la incubación en APA a 35±1°C durante 18 a 24 h, de los tubos que presentaron turbidez se sembró un inóculo en agar TCBS y se incubó a 35±1°C durante 24 h. De las placas de TCBS fueron seleccionados hasta 5 aislamientos verde azulados (sacarosa negativos) y fueron repicados en agar no selectivo (T₁N₁) para su posterior caracterización en agar cromogénico CHROMagar *Vibrio*® y su confirmación por PCR.

1.3 Muestras de moluscos bivalvos

En la línea de costa de las playas balnearias se colectaron berberechos (*Donax hanleyanus*), almejas amarillas (*Mesodesma mactroides*) y adheridos en las columnas de los muelles se colectaron mejillines (*Brachidontes rodriguezii*). Las muestras se acondicionaron en bolsas estériles y fueron transportadas refrigeradas hasta su arribo al laboratorio del INIDEP.

Se realizó un pool de 30 a 40 ejemplares, los mismos se lavaron externamente y fueron secados en forma aséptica. Se extrajo músculo, contenido visceral y líquido intervalvar. El contenido de cada ejemplar se depositó en una bolsa estéril, se realizó una dilución 1:2 con PBS estéril y se homogeneizó la muestra en *Stomacher* (Marca

AES Chemunex) durante 60 segundos a máxima intensidad. Luego se realizó una dilución 1:10 y se procedió a la cuantificación por la técnica NMP, se sembraron una serie de cuatro tubos por muestra con las siguientes diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 en APA. Luego de la incubación a $35\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 h, de los tubos que presentaron turbidez se sembró un inóculo en agar TCBS y se incubó a $35\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. De las placas de TCBS se tomaron 5 colonias verde azuladas (sacarosa negativos) y se repicaron en agar no selectivo (T_1N_1) para su posterior caracterización en agar cromogénico CHROMagar *Vibrio*® y confirmación por PCR.

2. Confirmación y caracterización molecular de *V. parahaemolyticus* por PCR

Para confirmar la presencia de *V. parahaemolyticus*, se estudió por PCR la presencia de la secuencia del gen *toxR* (Kim *et al.*, 1999), especie-específico de *V. parahaemolyticus* y solamente aquellas muestras en las que hubo aislamientos positivos para *toxR* se consideraron como positivas para *V. parahaemolyticus*. También se estudiaron genes que codifican los factores de virulencia: hemolisina termoestable directa (*tdh*) y hemolisina termoestable relacionada a TDH (*trh*). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Cebadores utilizados en este estudio, secuencia, tamaño (pb) y referencias.

Nº	Cebadores	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencias
1	<i>toxR</i> ¹	5' GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG 3' 5' ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG 3'	368	Kim <i>et al.</i> 1999
2	<i>trh</i> ²	5' TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT 3' 5' CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G 3'	500	Bej <i>et al.</i> 1999
3	<i>tdh</i> ³	5'GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3' 5' TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC 3'	269	Bej <i>et al.</i> 1999

Ref.: ¹ *toxR*: gen regulador de la toxina. ² *trh*: gen hemolisina termoestable relacionada a *tdh*. ³ *tdh*: gen hemolisina termoestable directa.

2.1 Extracción de ADN a partir de un aislamiento bacteriano

Previo a los análisis moleculares, se realizó la extracción de ADN de los aislamientos bacterianos. A partir de un aislamiento en una placa de T1N1 se tomaron 1-2 colonias medianas y se preparó una suspensión en 300 µl de agua calidad molecular. La suspensión se llevó a ebullición (100°C) durante 10 minutos y luego se centrifugó 20 segundos a 12.000 rpm para precipitar los detritos celulares. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1,5 ml y fue utilizado como templado en la reacción de PCR. Los templados fueron conservados a -20°C.

2.2 Confirmación de *V. parahaemolyticus* por PCR utilizando el gen específico de especie *toxR*

Se empleó la metodología sugerida por Kim *et al.*, 1999. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, utilizando para la mezcla la enzima *GoTaq* polimerasa (Promega) con su *buffer* 1X Green y desoxirribonucleótidos (Promega) en concentración final 0,2 mM y agua calidad molecular (Invitrogen). La concentración final de Cl_2Mg fue 1,5 mM y los cebadores 0,4 µM. Se agregaron 2 ul del templado.

Las condiciones de ciclado fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C seguidos de 20 ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos de apareamiento a 63°C, 1,5 minutos de extensión a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X teñidos con bromuro de etidio o *Syber Safe* (Invitrogen).

Como controles positivos de amplificación fueron utilizados: cepa *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 *toxR+*, *trh+* (*American Type Culture Collection*); como controles negativos fueron utilizados: cepa *V. cholerae* O1 Inaba ATCC 14033 y *V. vulnificus* CAIM 610T (*Collection of Aquatic Important Microorganisms* [<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>]).

Para la determinación del peso molecular de las bandas obtenidas se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb *Sharp DNA Ladder Marker* 50µg/500µl (RBC), que contiene 12 fragmentos de ADN que van desde 100 a 2000 pares de bases.

2.3 Detección de los genes de virulencia *tdh* y *trh* de *Vibrio parahaemolyticus* utilizando la técnica de PCR múltiple

En los aislamientos positivos para *V. parahaemolyticus*, se estudió la presencia de las secuencias específicas para los genes que codifican los factores de virulencia: gen *tdh* y gen *trh* siguiendo la metodología descrita por Bej *et al.*, 1999, con algunas modificaciones. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl.

Se utilizó para la mezcla la enzima *GoTaq* polimerasa (Promega) con su *buffer* 1X Green y desoxirribonucleótidos (Promega) en concentración final 0,2 mM y agua calidad molecular (Invitrogen). La concentración final de Cl_2Mg fue 1,5 mM y los cebadores 0,4 µM. Se agregaron 2 ul del templado. Las condiciones de ciclado fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C seguidos de 30 ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94°C, 1 minuto de apareamiento a 58°C, 1 minuto de extensión a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X teñidos con bromuro de etidio o *Syber Safe* (Invitrogen).

Como controles positivos de amplificación fueron utilizados: cepa *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 *toxR+*, *trh+* (American Type Culture Collection), *V. parahaemolyticus* CAIM 1772 *tdh+/trh+* (Collection of Aquatic Important Microorganisms [<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>]), *V. parahaemolyticus* CAIM 320T *toxR+* y *V. parahaemolyticus* CAIM 1400 O3:K6 *tdh+*; como controles negativos fueron utilizados: cepa *V. vulnificus* CAIM 610T.

Para la determinación del peso molecular de las bandas obtenidas se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb *Sharp DNA Ladder Marker* 50µg/500µl (RBC), que contiene 12 fragmentos de ADN que van desde 100 a 2000 pares de bases.

3. Estudio de diversidad genética utilizando la electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Se utilizó el protocolo estandarizado de la Red *PulseNet* Internacional para *V. parahaemolyticus*, tanto para la preparación del ADN bacteriano como para las condiciones de la corrida electroforética (Parsons *et al.*, 2007 y Kam *et al.*, 2008, Manual Pulsenet, 2004).

El ADN en tacos de agarosa se preparó mezclando en partes iguales una suspensión bacteriana de DO₆₁₀ 0,9 realizada en buffer tris-EDTA 100mM con agarosa Seakem Gold 1% (Lonza, Rockland ME, EEUU) en buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) y lisando las células durante 1 h a 54°C con una solución de lisis (tris 50mM, EDTA 50mM, pH 8,0, Lauril Sarcosina 1%, Proteinasa K 0,1 mg/ml). Los tacos de agarosa se lavaron dos veces con agua calidad molecular y cuatro veces con buffer TE en un baño con agitación a 50°C. El ADN genómico se digirió con 40 unidades (U) de la enzima de restricción *SfiI* incubando durante toda la noche a 50°C. Cuando fue necesario confirmar la clonalidad de los aislamientos al identificar patrones de PFGE indistinguibles con la primera enzima, se utilizó una segunda enzima de restricción *NotI*, de la cual se utilizaron 30U toda la noche a 37°C. La cepa *Salmonella* Braenderup H9812 digerida con *XbaI* se utilizó como cepa estándar de referencia de tamaño de fragmentos para la normalización de geles de PFGE (Hunter *et al.*, 2005).

La electroforesis se realizó con agarosa *Seakem Gold* 1% utilizando un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA, EEUU) en buffer TBE 0,5 X (Tris- borato 45mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) a 200 V/cm y 14°C. El programa de corrida constó de un bloque 10 a 35 s durante 18 h. Las bandas de ADN se visualizaron por tinción en bromuro de etidio y luz UV, y se fotografiaron digitalmente. Los patrones de PFGE se analizaron por inspección visual y utilizando también el *Software BioNumerics* versión 3.5 (*Applied Maths, Sint-Martens-Latem*, Bélgica). Los dendrogramas se construyeron utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA con tolerancia en la posición de bandas y optimización del 1,5%.

4. Análisis estadístico

En primer lugar se realizó una descripción de los datos obtenidos por medio de tablas y gráficos, se utilizaron la media y la mediana para variables cuantitativas y las frecuencias relativas porcentuales (%) para variables cualitativas. Estos análisis se realizaron utilizando los programas Excel (Microsoft Office 2003) y Statistica 8.0 (Stat Soft 2007).

El test de *Chi* cuadrado de Pearson y el test G_H de heterogeneidad (Sokal y Rohlf, 1981) fueron utilizados para evaluar si las diferencias entre las frecuencias de un evento (presencia de *V. parahaemolyticus*) entre tres y dos grupos de muestras eran significativas. Este análisis se realizó manualmente y utilizando el programa Excel (Microsoft Office 2003). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0,05$. La variable dependiente *V. parahaemolyticus* fue dividida en dos categorías presencia (valor 1) y ausencia (valor 0).

Las asociaciones entre los factores ambientales y la presencia de *V. parahaemolyticus* en diferentes lugares y tipos de muestras, teniendo en cuenta las características de la variable respuesta (presencia o ausencia de *V. parahaemolyticus*), se analizaron mediante la aplicación de Modelos Lineales Generalizados (GLMz) de distribución binomial y de función de enlace logit, denominados Modelos Logit (McCullagh y Nelder, 1989).

Dado que el número de datos por lugar (para agua 26, para sedimento 26 y para bivalvos 22) resultaba muy bajo para efectuar un modelado que contemple el lugar como variable categórica, se determinó que el modelado de la relación entre probabilidad de presencia de *V. parahaemolyticus* y las variables ambientales se efectuara en forma global sin discriminar el lugar.

Previo a la aplicación del GLMz se efectuó un análisis exploratorio mediante Modelos Aditivos Generalizados (GAM) a los efectos de determinar la relación entre la probabilidad de presencia de bacterias y cada variable ambiental. Al utilizar los Modelos Logit se evaluó tanto la significación del modelo como la significación de las variables independientes. Se consideró a la variable dicotómica $Y=0$ (ausencia de bacteria) e $Y=1$ (presencia de bacteria) como variable respuesta. Se aplicó el test estadístico de Wald y se calcularon las probabilidades para cada variable. Los análisis se llevaron a cabo con el programa Statistica 8.0 (Stat Soft 2007) y el nivel de significación $\alpha=0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 1

Detección de *Vibrio parahaemolyticus* en agua, sedimento y moluscos bivalvos de la costa Atlántica de Buenos Aires

1.1.- Frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* por métodos cualitativos y cuantitativos (Presencia/Ausencia -NMP) e identificación por PCR

En el **Anexo 1** se encuentran las tablas **A1**, **A2** y **A3**, con el detalle de los resultados totales. La frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* fue del 36,5%. De las 74 muestras analizadas, 27 resultaron positivas. La mayor frecuencia de aislamiento fue detectada en agua, con un porcentaje del 54%, mientras que, en sedimento y moluscos bivalvos la frecuencia fue inferior, 23 y 32% respectivamente. Estas diferencias analizadas en conjunto, a un nivel de significación del 5%, no resultaron ser significativas ($\chi^2 = 5,57$ $p = 0,0617$), si bien el valor de probabilidad calculada es suficientemente bajo como para pensar que las diferencias observadas pueden estar indicando una diferencia real a nivel poblacional. Al aplicar los test estadísticos entre los distintos tipos de muestras; entre agua y sedimento se obtuvieron diferencias altamente significativas ($\chi^2 = 5,18$ $p = 0,0228$) a un nivel del 5%. En cambio, entre agua y bivalvos ($\chi^2 = 2,34$ $p = 0,12$) y sedimento y bivalvos ($\chi^2 = 0,448$ $p = 0,503$), no se observaron diferencias significativas. En la **tabla 6** se muestran los resultados de las frecuencias de aislamiento de *V. parahaemolyticus*.

Tabla 6. Detección de *V. parahaemolyticus* de acuerdo al tipo y número de muestras analizadas.

		Agua	Sedimento	Moluscos Bivalvos	Totales
Muestras	N total	26	26	22	74
	N positivos	14	6	7	27
	%	54	23	32	36,5

Analizando los resultados desde el punto de vista de los muestreos, en la **Figura 12** se muestra la detección de *V. parahaemolyticus* en los distintos tipos de muestras. A los efectos de graficar las muestras positivas y negativas durante el año de muestreo, a los valores positivos se les asignó el 1 y a los negativos el 0. Puede observarse que en los muestreos 3, 5 y 6, *V. parahaemolyticus* se detectó en los tres tipos de muestras

colectadas, agua, sedimento y moluscos bivalvos (señalizadas con un rectángulo en el gráfico). *Vibrio parahaemolyticus* fue detectado en 10 de los 16 muestreos realizados (62,5%) (Tabla 7).

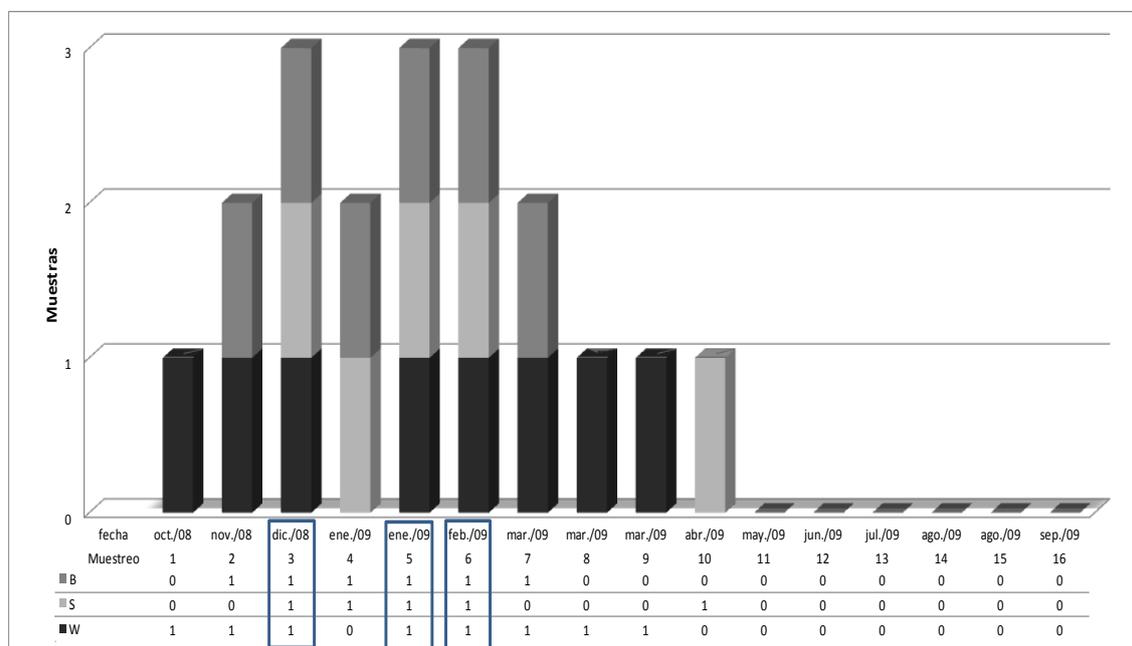


Figura 12. Detección de *V. parahaemolyticus* en los muestreos efectuados.

Tabla 7. Detección de *V. parahaemolyticus* por muestreo.

		Agua	Sedimento	Moluscos bivalvos	Totales
Muestreos	N total	16	16	16	16
	N positivos	8	5	6	10
	% positivos	50	31,25	37,5	62,5

Se detectó *V. parahaemolyticus* desde octubre de 2008 a abril de 2009 (muestreos 1 al 10), mientras que desde mayo a septiembre de 2009 (muestreos 11 al 16) no se detectó en ninguna de las muestras estudiadas.

Se recuperaron 289 aislamientos presuntivos de *V. parahaemolyticus* de agar TCBS, de los cuales 121 aislamientos resultaron caracterizados como *V. parahaemolyticus* en CHROMAgar *Vibrio*. Posteriormente 100 aislamientos fueron confirmados por PCR mediante la detección del gen *toxR* (Tabla 8).

Al analizar los resultados de identificación de los aislamientos presuntivos de *V. parahaemolyticus* se observó que, cuando se analizó el número de aislamientos

confirmados por PCR sobre el número de aislamientos púrpuras en CHROMAgar *Vibrio* (CAV) las diferencias no resultaron significativas ($\chi^2= 1,95$ $P= 0,37$), el valor predictivo del CAV fue alto (83%). Se puede observar que el CAV resultó un medio adecuado para la identificación de *V. parahaemolyticus* en muestras ambientales.

Tabla 8. Resultados de identificación de los aislamientos de *V. parahaemolyticus*

Muestras	Aislamientos presuntivos en TCBS	Aislamientos presuntivos en CAV	Aislamientos Confirmados por gen <i>toxR</i>
Agua	66	38	35
Sedimento	105	38	23
Moluscos Bivalvos	118	45	42
Totales	289	121	100

1.2.- Frecuencia de aislamiento e identificación de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua

De las 26 muestras recolectadas en los 16 muestreos, 14 (54 %) resultaron positivas para *V. parahaemolyticus*. En Villa Gesell/Mar Azul, *V. parahaemolyticus* fue detectado en 6 de las 16 muestras analizadas (37,5%), se aisló a partir del del 3^{er} muestreo (diciembre/08), hasta el 9^{no} (marzo/09), a excepción del 4^{to} muestreo. En Santa Teresita, se detectó en 8 de las 10 muestras analizadas (80%), fue aislado desde el 1^{er} hasta el 9^{no} muestreo (octubre/08 a marzo/09) y tampoco se detectó en el 4^{to} muestreo. A partir del 10^{mo} muestreo (de abril a septiembre/09) *V. parahaemolyticus* no fue detectado en agua (**Figura 13**).

En la **tabla 9** se expresan los resultados de la identificación de los aislamientos procedentes de muestras de agua. Se obtuvieron 66 aislamientos presuntivos de *V. parahaemolyticus* en agar TCBS; de los mismos, 38 resultaron caracterizados en agar CAV, como *V. parahaemolyticus*. Luego de emplear la técnica de PCR para confirmar género y especie, de los 38 aislamientos seleccionados, 35 resultaron confirmados como *V. parahaemolyticus*, (**figura 14**).

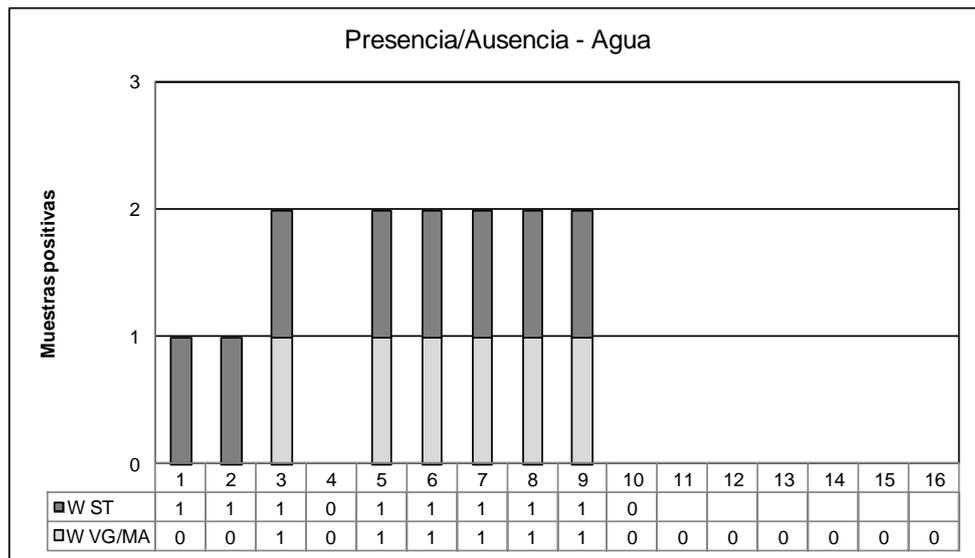


Figura 13. Frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en agua (W), en los diferentes sitios de muestreo: Villa Gesell/Mar Azul (VG/MA) y Santa Teresita (ST). A las muestras positivas se les asigno el valor 1.

Tabla 9. Resultados de identificación de los aislamientos de *V. parahaemolyticus* procedentes de muestras de agua.

	Muestreos 1 al 16	Nº de aislamientos verde-azulados en TCBS	Nº de aislamientos púrpuras en CAV	Nº de aislamientos positivos gen <i>toxR</i>	% Confirmados /presuntivos CAV
Sitios de Muestreo	VG/MA	34	16	13	81,25
	ST	32	22	22	100
	Total	66	38	35	92

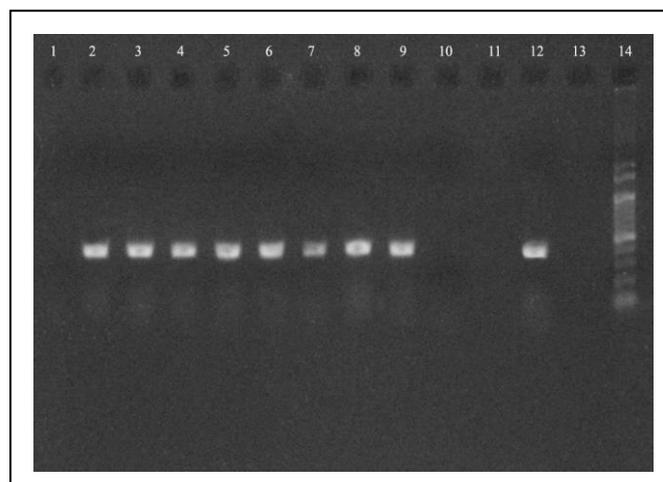


Figura 14. PCR para detectar *V. parahaemolyticus* (gen *toxR* 368 pb) en aislamientos de muestras de agua. 1 y 10: Aislamientos negativos para gen *toxR*; 2-9: Aislamientos positivos

para gen *toxR* (368 pb); 11: Control negativo: *V. cholerae* ATCC 14033; 12: Control positivo *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; 13: sin templado (control de reactivos); 14: Marcador de peso molecular 100 pb.

1.3.- Frecuencia de aislamiento e identificación de *V. parahaemolyticus* en muestras de sedimento

De las 26 muestras estudiadas, 6 (23 %) resultaron con recuentos > 0,3 NMP/g para *V. parahaemolyticus*. En Villa Gesell/Mar Azul, *V. parahaemolyticus* fue detectado en 1 de 16 muestras analizadas (6,25%), correspondiente al 5^{to} muestreo, cuyo valor fue de 0,36 NMP/g; en cambio, en Santa Teresita se detectó en 5 de las 10 muestras analizadas (50%), en valores que oscilaron entre 0,36 a 21 NMP/g, resultando como valor promedio 9,15 NMP/g. El valor mínimo se registró en el 3^{er} muestreo (diciembre/08), mientras que el máximo en el 5^{to} muestro (enero/09). (Figura 15).

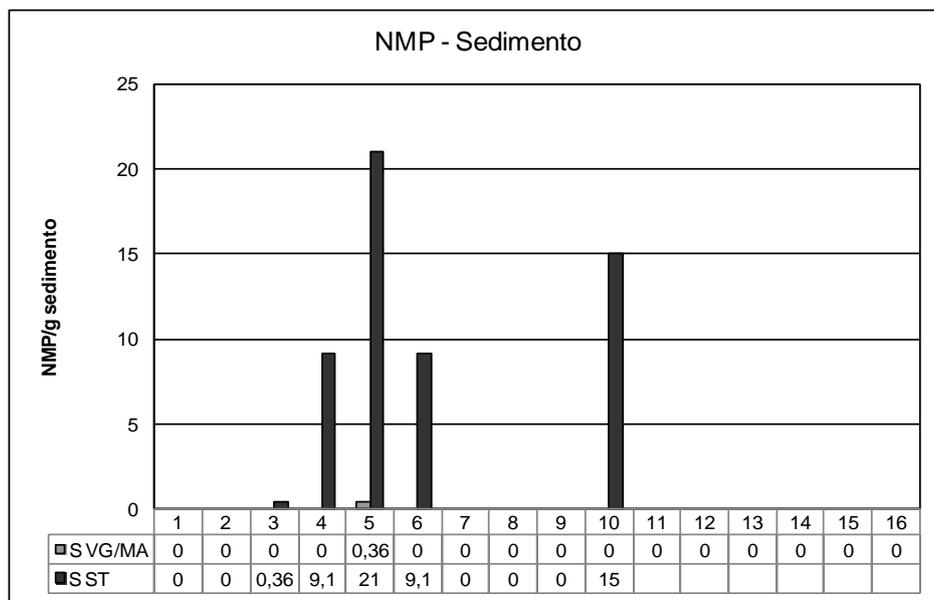


Figura 15. NMP/g en muestras de sedimento para *V. parahaemolyticus* en los diferentes sitios de muestreo: Villa Gesell/Mar Azul y Santa Teresita, en los 16 muestreos realizados.

En la **tabla 10**, están expresados los resultados de la identificación de los aislamientos procedentes de muestras de sedimento. Se recuperaron 105 aislamientos de agar TCBS presuntivos de *V. parahaemolyticus*, de los cuales 38 resultaron característicos en CAV y, 23 aislamientos fueron confirmados como *V. parahaemolyticus* por PCR mediante la detección del gen *toxR*. (Figura 16).

Tabla 10. Resultados de identificación de los aislamientos de *V. parahaemolyticus* procedentes de muestras de sedimento.

	Muestreos 1 al 16	Nº de aislamientos verde-azulados en TCBS	Nº de aislamientos púrpuras en CAV	Nº de aislamientos positivos gen <i>toxR</i>	% Confirmados /presuntivos CAV
Sitios de Muestreo	VG/MA	35	13	3	23
	ST	70	25	20	80
	Total	105	38	23	60,5

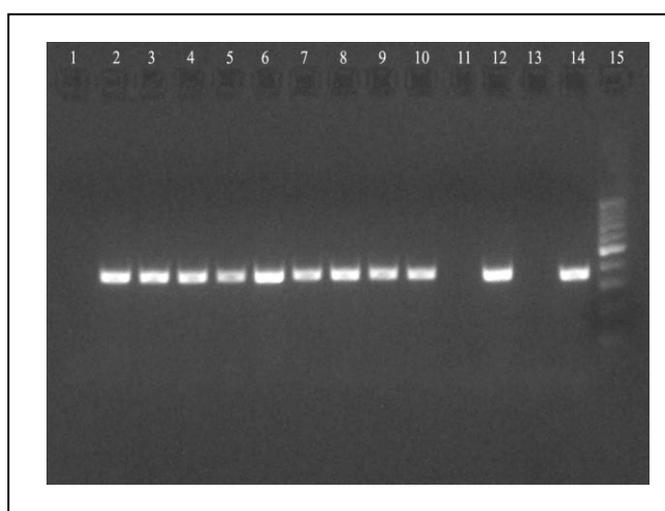


Figura 16. PCR para detectar *V. parahaemolyticus* (gen *toxR* 368 pb) en aislamientos de muestras de sedimento. 1 y 11: Aislamientos negativos para gen *toxR*; 2-10 y 12: Aislamientos positivos para gen *toxR* (368 pb); 13: Control negativo: *V. cholerae* ATCC 14033; 14: Control positivo *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; 15: Marcador de peso molecular 100 pb.

1.4.- Frecuencia de aislamiento e identificación de *V. parahaemolyticus* en muestras de moluscos bivalvos

De las 22 muestras estudiadas, 7 (32 %) resultaron con recuentos > 0,3 NMP/g para *V. parahaemolyticus*. En Villa Gesell/Mar Azul, *V. parahaemolyticus* fue detectado en 4 muestras, correspondientes al 4^{to}, 5^{to}, 6^{to} y 7^{mo} muestreo. En Santa Teresita, se detectó en 3 de las 5 muestras analizadas (60%). Las 7 muestras positivas condujeron a recuentos entre 0,36 y 34 NMP/g de bivalvo. El valor mínimo se registró en el 2^{do} muestreo (noviembre/08), mientras que el máximo en el 4^{to} muestro (marzo/09). El valor promedio fue en Villa Gesell/Mar Azul 11,82 NMP/g y en Santa Teresita 20,78

NMP/g. En el mes de octubre/08 y a partir de abril/09 se registraron recuentos < 0,3 NMP/g.

En general, se detectaron recuentos de *V. parahaemolyticus* a partir del 2^{do} hasta el 7^{mo} muestro, período comprendido desde noviembre de 2008 hasta marzo de 2009, primavera –verano, respectivamente.

En la **Figura 17** están graficados los recuentos de *V. parahaemolyticus*, en el 4^{to} muestreo en Santa Teresita, correspondiente al mes de enero se detectó el valor máximo de recuento (34 NMP/g). En el 1^{to} y partir del 8^{vo} muestreo no se detectó *V. parahaemolyticus*. Además, a partir del 2^{do} muestreo (noviembre), se observa un orden creciente en la densidad de *V. parahaemolyticus*, se detecta un valor de 0,36 NMP/g, se produce un pico en el 4^{to} muestreo (enero) y a partir de ahí comienza a disminuir llegando a un valor de 11 NMP/g en el 7^{mo} muestreo (marzo).

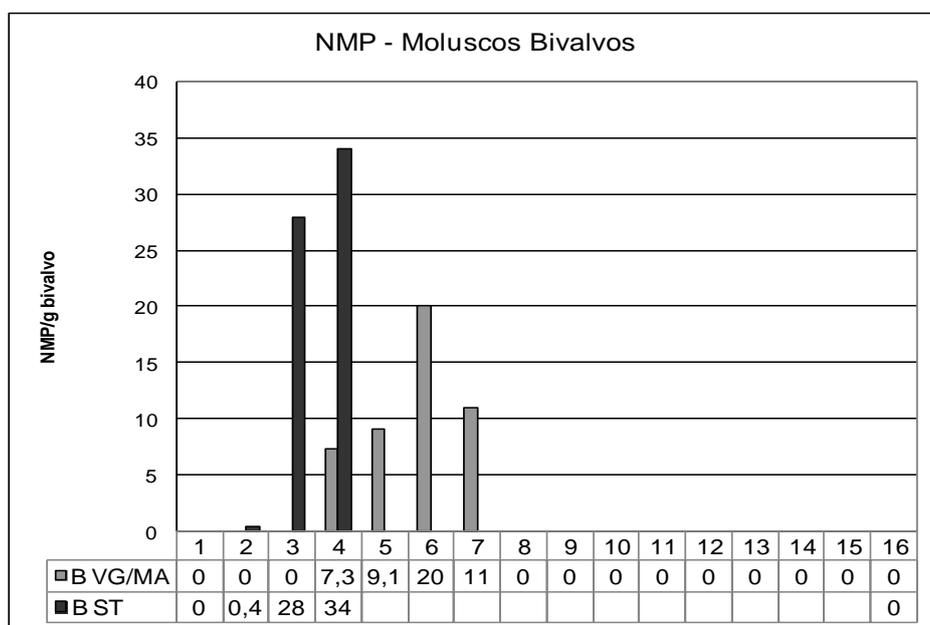


Figura 17. NMP/g de bivalvo para *V. parahaemolyticus* en los diferentes sitios de muestreo: Villa Gesell/Mar Azul y Santa Teresita, en los 16 muestreos realizados.

En la **tabla 11**, están expresados los resultados de la identificación de los aislamientos de *V. parahaemolyticus*, procedentes de muestras de moluscos bivalvos. Se recuperaron 118 aislamientos de agar TCBS, de los cuales 45 resultaron característicos en CAV, y de los mismos, 42 aislamientos fueron confirmados como *V. parahaemolyticus* por PCR mediante la detección del gen *toxR* (**Figura 18**).

Tabla 11. Resultados de identificación de los aislamientos de *V. parahaemolyticus* procedentes de muestras de moluscos bivalvos.

	Muestreros 1 al 16	Nº de aislamientos verde-azulados en TCBS	Nº de aislamientos púrpuras en CAV	Nº de aislamientos positivos gen <i>toxR</i>	% Confirmados /presuntivos CAV
Sitios de Muestreo	VG/MA	80	25	23	92
	ST	38	20	19	95
	Total	118	45	42	93,3

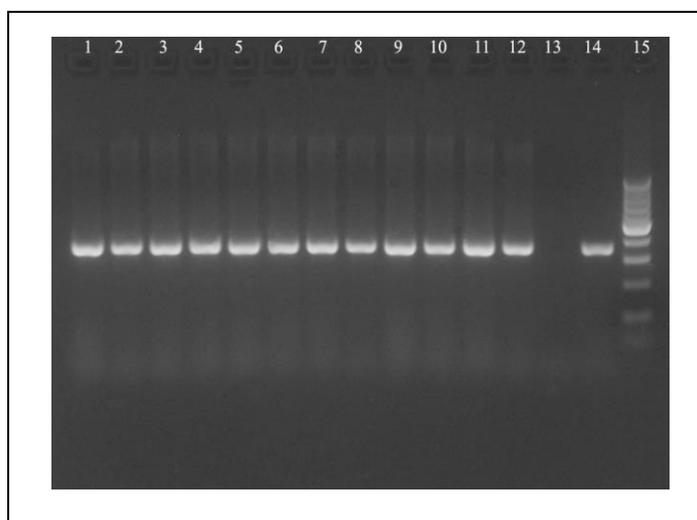


Figura 18: PCR para detectar *V. parahaemolyticus* (gen *toxR* 368 pb) en aislamientos de muestras de bivalvos. 1 y 12: Aislamientos positivos para gen *toxR* (368 pb); 13: Control negativo: *V. cholerae* ATCC 14033; 14: Control positivo *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; 15: Marcador de peso molecular 100 pb.

Discusión

En este estudio se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos de la costa de la provincia de Buenos Aires. Los resultados indican la presencia de potenciales reservorios de *V. parahaemolyticus* en el área estudiada. Este estudio constituye el primer informe de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en la costa bonaerense y está en concordancia con lo reportado en otros lugares de América Latina (Dueñas Peña, 2008; Cabrera García *et al.*, 2004).

En Argentina, en los años 1971 y 1974, el Dr. Casellas junto a su grupo de trabajo, detectó *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos en la zona del Golfo Nuevo, provincia de Chubut. Este hallazgo puso en evidencia la necesidad de continuar con los estudios sobre este microorganismo, y a su vez, ampliar las zonas de investigación a la costa bonaerense.

La costa bonaerense es un área turística muy importante en primavera-verano, hay un aumento de la población costera y de las actividades relacionadas con el mar (baños recreacionales, pesca, consumo de mariscos crudos directamente de las playas, etc.). A nivel físico-químico y biológico, es una zona cálida, con temperaturas del agua templadas (mayores a 20°C), salinidades fluctuantes por la influencia del Río de la Plata (menores a 30 ups), y gran abundancia de copépodos (Guerrero *et al.*, 2004, 2010; Di Mauro, 2011). Estas variables, sumadas a las características de una zona turística, resultarían favorables para la proliferación de este microorganismo (Dadon, 2002; Tantillo *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que los muestreos fueron realizados durante un año de octubre/08 a septiembre/09, se observa que *V. parahaemolyticus* fue detectado desde octubre/08 a abril/09 (periodo primavera- verano), estos resultados coinciden con estudios previos, que determinaron que *V. parahaemolyticus* durante el invierno se sumerge en el fondo y reaparece en el agua cuando la temperatura aumenta, produciéndose un ciclo de sedimentación y resuspensión. (Tantillo *et al.*, 2004; Hervio-Heath *et al.*, 2002). La dinámica estacional observada fue similar en los tres tipos de muestras, de acuerdo a la bibliografía, en condiciones ambientales desfavorables *V. parahaemolyticus* (bajas temperaturas, bajos nutrientes, altas salinidades, etc) adquiere el estado VBNC y esto podría explicar la falta de detección en épocas frías, aún en muestras de sedimento (Jiang y Chai, 1996; Wong *et al.*, 2004).

Vibrio parahaemolyticus fue detectado en el 54% de las muestras de agua, en el 23% de las muestras de sedimento y en el 32% de las muestras de moluscos bivalvos. Estos resultados difieren de los obtenidos por Rodríguez-Castro (2012), en la zona de Galicia, España, que menciona un 64.6% de detección en muestras de moluscos (mejillones) y un 12% en aguas oceánicas. Dichas diferencias, considerando que son dos ambientes de estudios distintos, podrían deberse a la influencia de las variables ambientales de cada lugar en el ciclo de vida del microorganismo. Según lo publicado en distintos trabajos científicos, en cada ambiente de estudio, se han observado la influencia de diferentes parámetros ambientales, no resultando siempre la temperatura y/o salinidad lo que afectaría la abundancia y distribución de *V. parahaemolyticus*. Además, se han observado diferencias en la acumulación de *V. parahaemolyticus* en distintas especies de moluscos bivalvos relacionadas con la salinidad y con el rango óptimo de temperatura de filtración de cada especie (López-Joven, 2012).

Por otro lado, resulta interesante mencionar que en un estudio previo relacionado con la detección de *Vibrio cholerae* en agua y plancton, en aguas estuariales y oceánicas del Mar Argentino, (Binzstein *et al.*, 2004), se observó una mayor detección en

muestras de agua de mar con respecto a las de plancton, dichos investigadores mencionan a la amplia capacidad de supervivencia que poseen los vibrios en el medio acuático, como una explicación posible a estos resultados. Los vibrios en el medio acuático son capaces de adherirse a superficies inanimadas, a plancton, a exubias de copépodos, pueden tener formas de vida libre y pueden formar biofilms (Leyton y Riquelme, 2008). Es importante destacar que en las muestras de agua las bacterias no se encuentran necesariamente libres ya que la metodología utilizada no puede diferenciar bacterias libres de bacterias adheridas a partículas microscópicas (plancton, detritus) (González Fraga, 2010).

En nuestros resultados se ha evidenciado que CHROMagar *Vibrio* resultó adecuado para el aislamiento de *V. parahaemolyticus*. El análisis de los datos reflejó una diferencia no significativa entre CAV/*toxR*. Similares resultados obtuvieron Di Pinto *et al.* (2011) demostrando que el CAV proporcionó una mayor especificidad y exactitud de aproximadamente el 95 % y 88 % respectivamente. En los últimos años, diferentes autores han reportado varias limitaciones asociadas al uso del agar TCBS para el aislamiento de *V. parahaemolyticus* de muestras clínicas y ambientales (Hara-Kudo *et al.*, 2001; Martínez-Urtaza *et al.*, 2008; Miwa *et al.*, 2003). En TCBS, *V. parahaemolyticus* presenta una morfología con características similares a otras especies de *Vibrio* spp. (*V. vulnificus*, *V. mimicus*), *Photobacterium* spp., *Chryseomonas* spp. o *Shewanella* spp. Además de la falta de especificidad, la selectividad limitada del medio permite el sobrecrecimiento de otras bacterias que predominan en el medio ambiente, como en el caso de *V. alginolyticus*, lo que enmascara la presencia de colonias de *V. parahaemolyticus* y complican la identificación de las colonias (Su y Liu, 2007; Martínez-Urtaza *et al.*, 2008).

En muestras de agua, es importante destacar la falta de detección de *V. parahaemolyticus* en el 4^{to} muestreo, correspondiente a enero/09, tanto en Villa Gesell/Mar Azul como en Santa Teresita. La presencia en época estival responde a la dinámica estacional que tiene *V. parahaemolyticus*, sin embargo, a mitad del verano no fue detectado. Una explicación a este fenómeno podría ser la competencia que sucede en los medios de cultivo especialmente en el APA, (que no resulta específico para *V. parahaemolyticus* sino que favorece el desarrollo de todas las especies de vibrios) y por otro lado, la competencia que sucede en el medio de cultivo TCBS con *V. alginolyticus* como se menciona en el párrafo anterior.

Otra explicación posible, observando que fue detectado en los otros tipos de muestras (sedimento y bivalvos), podría ser el efecto de la radiación UVB sobre la columna de agua (Karentz y Lutz, 1990), numerosos estudios demostraron que la radiación UVB penetra en el océano y tiene un fuerte efecto sobre los primeros metros de la columna de agua produciendo daños directos sobre las bacterias marinas, afectando su viabilidad y actividad bacteriana (Helbling *et al.*, 1995; Vincent y Neale, 2000; Hernández y Mac Cormack, 2007).

En sedimento, es importante destacar que la presencia de *V. parahaemolyticus* siguió el mismo patrón estacional que las demás muestras, se detectó en primavera-verano, sin embargo, a diferencia de agua y bivalvos, también se detectó a principios de otoño. La bibliografía señala que *V. parahaemolyticus* posee un ciclo de resuspensión en primavera verano y sedimentación en otoño invierno, además se menciona a la interfase agua sedimento, donde se acumula la mayor cantidad de materia orgánica, como uno de lugares donde se encuentran las mayores concentraciones de microorganismos (Miravet, 2003).

Sin embargo, como se mencionó en un párrafo anterior, la capacidad de adquirir el estado VBNC en condiciones ambientales desfavorables, explicaría la falta de detección en muestras de sedimento, en épocas frías (Alam *et al.*, 2007). Al igual que en muestras de agua, se observa mayor frecuencia de aislamiento en Santa Teresita (50%), con respecto a Villa Gesell/Mar Azul (6%).

En moluscos bivalvos, no se pudieron establecer diferencias con respecto al aislamiento de *V. parahaemolyticus* en los distintos sitios de muestreo, debido que a partir del 5^{to} muestreo (a excepción del muestreo 16 donde pudieron recolectarse almejas), en la línea de costa de Santa Teresita no fueron detectadas poblaciones naturales de moluscos bivalvos, solamente pudieron extraerse moluscos bivalvos de Villa Gesell/Mar Azul. Sin embargo, analizando los primeros cuatro muestreos, se observa un mayor porcentaje de aislamiento en Santa Teresita (75%) con respecto a Villa Gesell/Mar Azul (25%).

De igual manera que en agua y sedimento, en moluscos bivalvos *V. parahaemolyticus* fue detectado en el periodo primavera-verano, esto coincide con lo publicado por otros autores que concluyen que las tendencias estacionales del género *Vibrio* muestran que, es más frecuente aislarlos en verano que en otoño y primavera, y es escaso en invierno (Crocini *et al.*, 2002; Pardío Sedas, 2008; Castañeda *et al.*, 2005).

Vibrio parahemolyticus es considerado un patógeno de interés creciente cuya vigilancia sanitaria previa al consumo se limita a que su número no exceda 100 ufc/g de alimento procedente de zonas de riesgo. De acuerdo a nuestros resultados, donde el valor máximo hallado fue 34 NMP/g bivalvo, podemos considerar, este alimento de bajo riesgo. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en el caso de ostras sin refrigerar pueden aumentar rápidamente entre 50-790 veces dentro de las 24 horas después de la captura, si las ostras se exponen a 26 °C (Gooch *et al.*, 2002). *V. parahaemolyticus* tiene un tiempo de generación corto, en torno a 9 minutos en condiciones óptimas, lo que significa que puede alcanzar concentraciones muy altas dentro de los moluscos una vez que estos han sido cosechados o capturados (DePaola *et al.*, 2000; Miles *et al.*, 1997). Esta concentración dependerá de la concentración inicial así como de la temperatura de almacenamiento y transporte.

Por lo tanto, habría que tener en cuenta que, según las condiciones de manipulación del alimento posteriores a la pesca/cosecha, el riesgo puede ser mayor al esperado.

Los brotes han incluido incidentes de contaminación cruzada por mariscos crudos o equipos de elaboración, prácticas de higiene indebidas, el control inadecuado de temperaturas y la aplicación insuficiente de calor (FAO, 2003).

Los moluscos bivalvos representan un riesgo intrínsecamente mayor que otros alimentos de origen marino debido a su actividad como animales filtrantes que concentra los patógenos presentes en el agua. (CCFH, 2010). En un estudio realizado por Cabello *et al.*, (2005) sobre el comportamiento de *V. parahaemolyticus* en ostras, concluyen que en principio, la mayoría es ingerido directamente del agua de mar, no necesariamente necesita estar adherido a partículas de mayor tamaño, luego la mayoría de ellos son digeridos por las ostras y sólo una pequeña fracción es capaz de persistir y almacenarse en los tejidos de la ostra sin preferencia de uno en particular.

CAPITULO 2

Detección de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos y su relación con los factores ambientales

2.1.- Mediciones de parámetros físico-químicos en cada sitio de muestreo

En este estudio fueron registradas mediciones de temperatura, salinidad y pH del agua, en los sitios donde fueron extraídas las muestras. En la tabla **A4** del Anexo 1, se muestran los resultados obtenidos de cada parámetro físico-químico por muestreo.

La temperatura tuvo una variación entre 8 y 24°C. En Villa Gesell/Mar Azul, el valor mínimo fue de 8°C en julio/09 y el máximo 21.5°C en enero/09. En Santa Teresita el valor mínimo detectado fue de 12°C en septiembre/09 y el máximo 24°C en febrero/09. El rango de temperatura en el cual fue detectado *V. parahaemolyticus* fue de 18 a 21,5°C en Villa Gesell/Mar Azul y de 15,3 a 24°C en Santa Teresita.

La salinidad varió entre 24,86 y 34,31 ups. En Villa Gesell/Mar Azul entre 29,89 y 34,31 ups, mientras que en Santa Teresita entre 24,83 a 32,03. Los valores de salinidad en los cuales fue detectado *V. parahaemolyticus* oscilaron entre 29,89-32,74 (Villa Gesell/Mar Azul) y 24,83-30,05 (Santa Teresita).

El pH en los sitios de muestreo osciló entre valores de 7 a 8,5. En Villa Gesell/Mar Azul llegó a medir 8,5; sin embargo, en Santa Teresita no superó el valor de 8. El pH en las muestras positivas fue de 7 a 8, mientras que en las muestras negativas, el intervalo de valores fue de 7,5 a 8,5.

2.2.- Detección de *V. parahaemolyticus* y su relación con parámetros ambientales en Villa Gesell/Mar Azul

En la **Tabla 12** se describen los resultados de la detección de *V. parahaemolyticus* en Villa Gesell/Mar Azul y los datos ambientales registrados.

En la **Figura 19** están graficados los resultados, en los diferentes tipos de muestras (agua, sedimento y moluscos bivalvos) en relación con la temperatura y salinidad de Villa Gesell/Mar Azul. Se observó una mayor detección de *V. parahaemolyticus* en los muestreos 5, 6 y 7. Esto coincidió con los meses más cálidos, con temperaturas de 20-22°C. Asimismo, se observa una menor salinidad en esos muestreos en relación a los restantes.

Tabla 12. Detección de *V. parahaemolyticus* y datos ambientales en Villa Gesell/Mar Azul.

Muestreo	Fecha	Temp.°C	Sal. Ups	pH	Agua	Sedimento NMP/g	Bivalvos NMP/g
1	29/10/2008	15	32,97	8,2	-	-	-
2	18/11/2008	16	33,75	8	-	-	-
3	11/12/2008	18	30,7	8	+	-	-
4	07/01/2009	19,5	32,43	8	-	-	7,3
5	21/01/2009	21,5	32,74	7,5	+	0,36	9,1
6	18/02/2009	21	29,89	7,5	+	-	20
7	04/03/2009	20,5	31,02	8	+	-	11
8	18/03/2009	20	31,47	8	+	-	-
9	31/03/2009	20	31,22	8	+	-	-
10	22/04/2009	16,5	32,6	7,5	-	-	-
11	12/05/2009	13,5	33,41	8	-	-	-
12	12/06/2009	10	34,31	8,5	-	-	-
13	16/07/2009	8	34,22	8,5	-	-	-
14	05/08/2009	9	34,04	8	-	-	-
15	28/08/2009	11	34,18	8	-	-	-
16	16/09/2009	12	33,92	8	-	-	-

°C: grados centígrados, ups: unidades prácticas de salinidad.

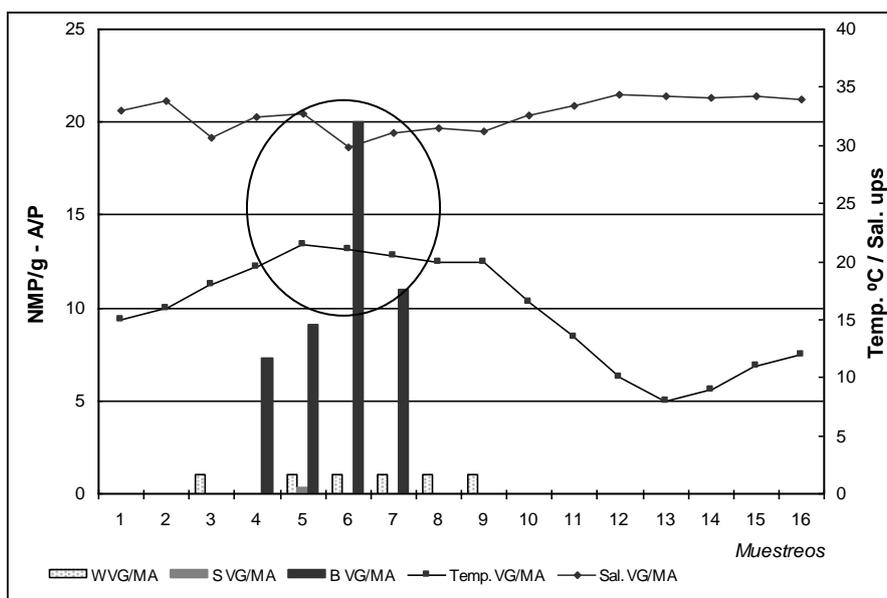


Figura 19. Detección de *V. parahaemolyticus* en relación con la temperatura y salinidad en Villa Gesell/Mar Azul. El círculo señala la relación entre los mayores valores de detección de *V. parahaemolyticus*, la mayor T° y los bajos valores de salinidad.

2.3.- Detección de *V. parahaemolyticus* y su relación con parámetros ambientales en Santa Teresita.

En la **Tabla 13** se describen los resultados de detección de *V. parahaemolyticus* en Santa Teresita y los datos ambientales. En la **Figura 20** están graficados los resultados, se observó una mayor detección de *V. parahaemolyticus*, entre los muestreos 3 al 6; esta observación coincidió también con el registro de altos valores de temperatura y bajos valores de salinidad.

Tabla 13. Detección de *V. parahaemolyticus* y datos ambientales en Santa Teresita.

Muestreo	Fecha	Temp.°C	Sal. ups	pH	Agua	Sedimento NMP/g	Bivalvos NMP/g
1	29/10/2008	15,3	30,23	8	+	-	-
2	18/11/2008	18	24,83	8	+	-	0,36
3	11/12/2008	19	30,05	8	+	0,36	28
4	07/01/2009	22,5	27,56	7	-	9,1	34
5	21/01/2009	23,2	28,42	7,5	+	2,1	-
6	18/02/2009	24	26,84	7	+	9,1	-
7	04/03/2009	22,3	24,86	8	+	-	-
8	18/03/2009	22	27,26	8	+	-	-
9	31/03/2009	22	28,20	8	+	-	-
10	22/04/2009	19	26,22	7,5	-	15	-
11	12/05/2009	-	-	-	-	-	-
12	12/06/2009	-	-	-	-	-	-
13	16/07/2009	-	-	-	-	-	-
14	05/08/2009	-	-	-	-	-	-
15	28/08/2009	-	-	-	-	-	-
16	16/09/2009	12	32,04	8	-	-	-

A diferencia de Villa Gesell/Mar Azul, en Santa Teresita, aunque en diferentes muestras, *V. parahaemolyticus* fue detectado en todos los muestreos realizados (del 1 al 10, con excepción del muestreo 16, en el que fue analizada solo una muestra de almejas resultando negativa para *V. parahaemolyticus*). En general, se observa que en Santa Teresita resultó más alto el promedio de temperatura y más baja la salinidad con respecto a Villa Gesell/Mar Azul.

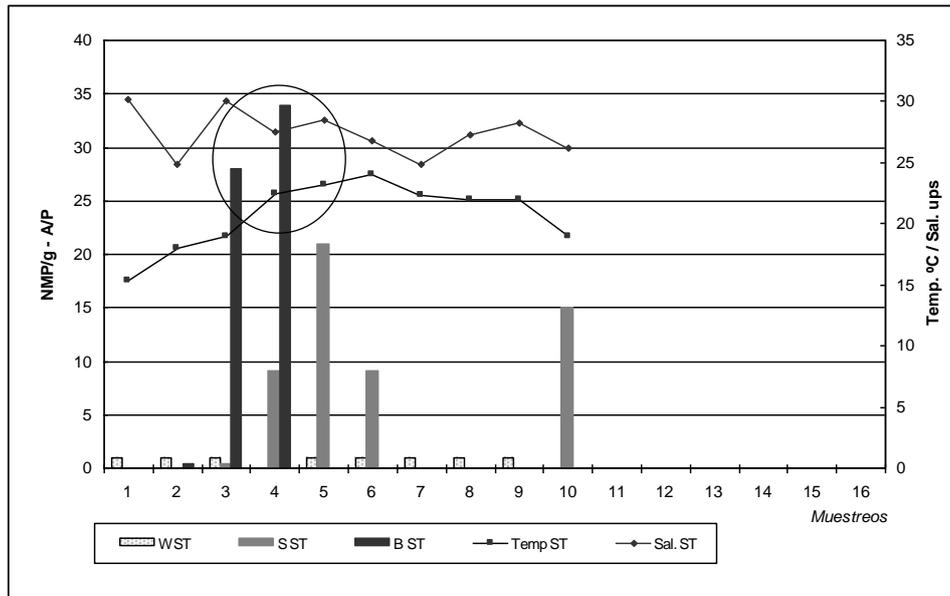
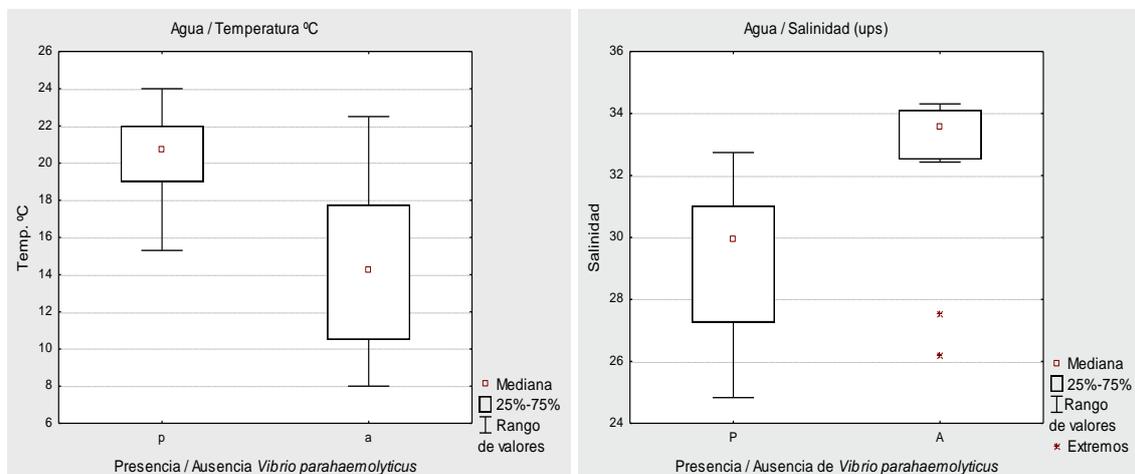


Figura 20. Detección de *V. parahaemolyticus* con relación a la temperatura y salinidad en Santa Teresita. El círculo señala la relación entre los mayores valores de detección de *V. parahaemolyticus*, la alta T° y bajos valores de salinidad.

2.4.- Asociación entre detección de *V. parahaemolyticus* en los tres tipos de muestras agua, sedimento y moluscos bivalvos, y su relación con la temperatura y salinidad.

Los siguientes diagramas de dispersión (Figura 21) muestran una clara tendencia de mayor frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* con temperaturas elevadas y bajas salinidades, en los tres tipos de muestras. Se observó una mediana de entre 20,5-22°C para temperatura y 29-30 ups para salinidad en aquellas muestras donde se recuperó la bacteria.



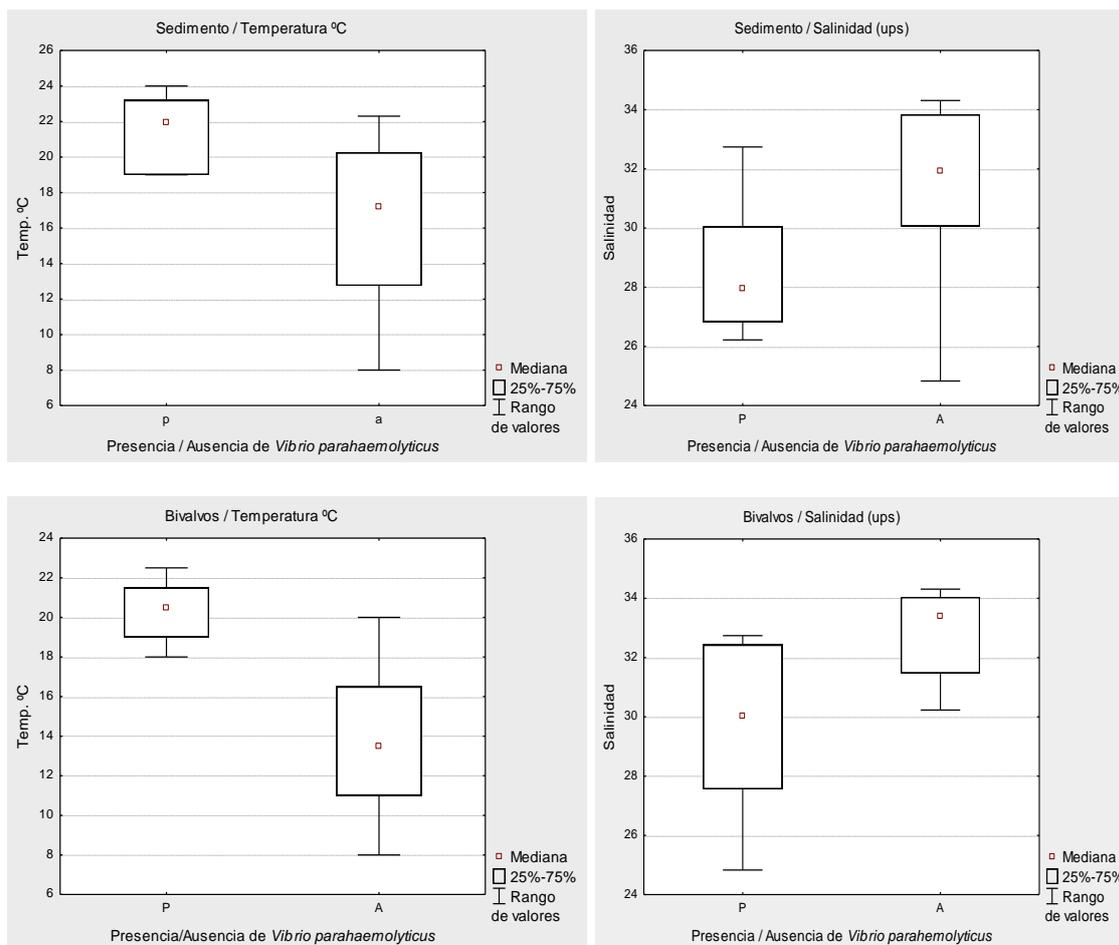


Figura 21: Diagramas de cajas (*Box Plots*) obtenidos para temperatura y salinidad en los tres tipos de muestras: agua, sedimento y moluscos bivalvos, según la recuperación de *V. parahaemolyticus*: p (presencia) a (ausencia). Se indican la mediana, el intervalo de valores y el intervalo de valores que comprenden el 25 y 75% de las muestras positivas y negativas.

A continuación, se muestran los resultados de la aplicación del Modelo Logit para determinar la relación entre la probabilidad de la presencia de *V. parahaemolyticus* en agua, sedimentos y moluscos bivalvos en función de la temperatura y la salinidad, en los lugares de muestreo (Santa Teresita, Villa Gesell/Mar Azul).

Previo a la aplicación del modelo matemático, se analizó la relación entre las variables a analizar para determinar en que forma se involucrarían las mismas.

En la **figura 22** esta representada la relación de ambas variables, los valores de temperatura presentan una relación cuadrática con respecto a los valores de salinidad, con un coeficiente de determinación múltiple (porcentaje de varianza de la temperatura explicada por la salinidad a partir del modelo cuadrático) igual al 71,52%.

La existencia de una relación fuerte entre las dos variables puede generar problemas de colinealidad entre la temperatura y la salinidad y esto afectar a los resultados del análisis, generando problemas de carácter numérico cuando se consideran modelos para establecer la relación entre la probabilidad de presencia de bacterias y las variables ambientales.

Esto determinó que los modelos considerados involucren a las variables ambientales en forma individual.

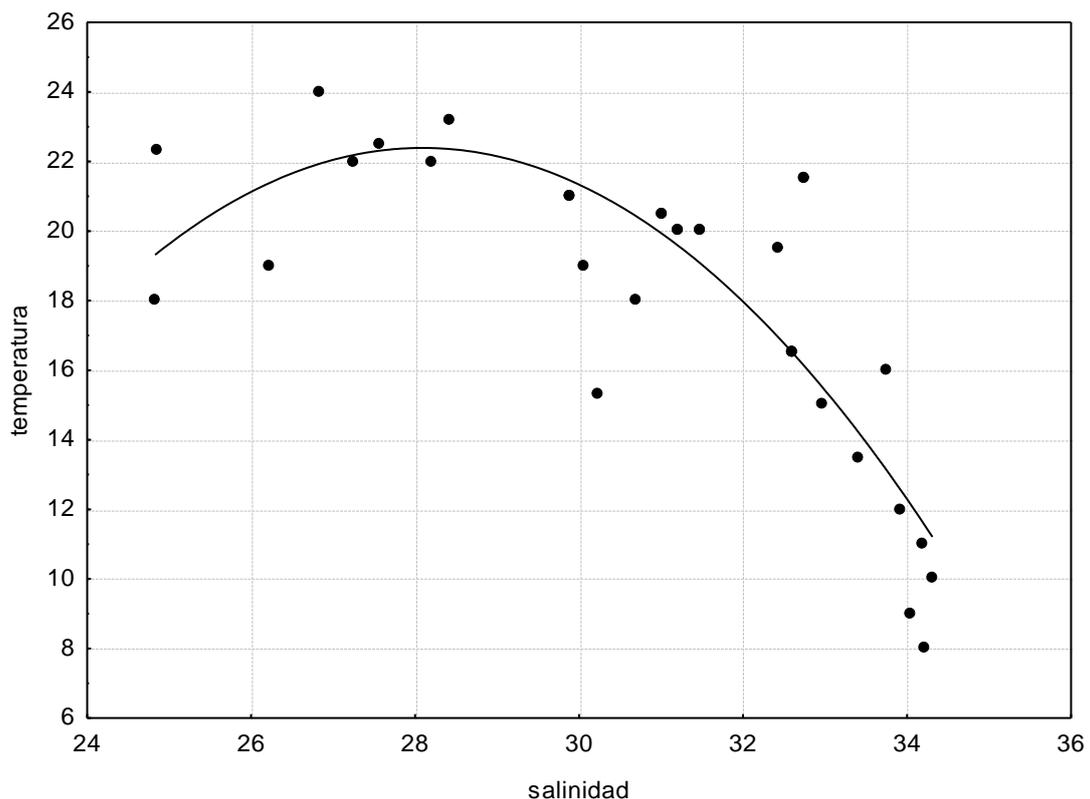


Figura 22: Relación entre la temperatura y la salinidad. Los puntos representan los distintos valores de cada parámetro.

En la **figura 23** están representados los resultados de la aplicación de un análisis exploratorio mediante Modelos Aditivos Generalizados (GAM en inglés), se muestran los diagramas de dispersión suavizados (*scatterplot smoothing*) obtenidos a partir de los Modelos Aditivos Generalizados.

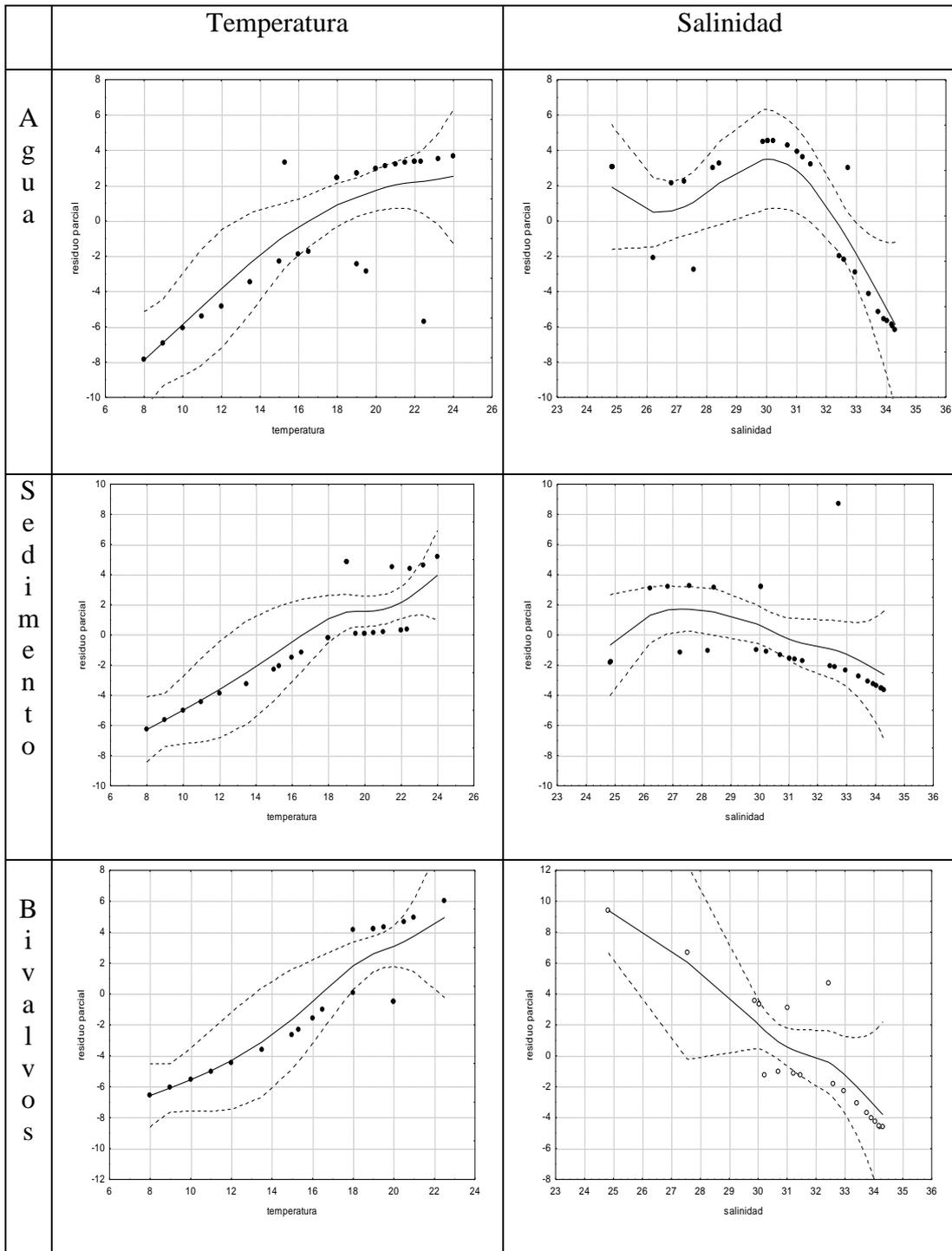


Figura 23: Scatterplot smoothing obtenidos a partir de Modelos Aditivos Generalizados (GAM en inglés) para temperatura y salinidad en forma independiente y para agua, sedimentos y bivalvos. Puntos: valores observados, línea llena: suavizador construido con *splines* cúbicos, línea segmentada: bandas de confianza del 95%.

Los resultados muestran que para agua la relación sugerida por los GAM entre la probabilidad de presencia de bacteria y las variables ambientales es: lineal creciente para la temperatura, es decir, aumenta a medida que aumenta la temperatura; y cuadrática para la salinidad, es mayor en un determinado rango de salinidad. Por su

parte para sedimentos y bivalvos las relaciones sugeridas por los GAM son: lineal creciente para temperatura y lineal decreciente para salinidad.

Una vez determinado el tipo de relación de la probabilidad de presencia de bacteria en cada medio y las variables ambientales a partir de los modelos GAM en término de los suavizadores, los Modelos Logit permiten establecer la relación paramétrica funcional entre la probabilidad de presencia de bacterias y los valores de temperatura o salinidad (los cuales se consideran las variables independientes x del modelo). El Modelo Logit en término de las probabilidades de presencia de bacteria se escribe en la forma:

$$P(x) = 1/(1+ \exp (-L(x)))$$

Siendo: $P(x)$: probabilidad de presencia de la bacteria para el valor x de la variable independiente.

$L(x)$: predictor lineal.

En la **Tabla 14** se presentan los resultados de los Modelos Logit, considerando la variable dicotómica $Y=0$ (ausencia de bacteria) e $Y=1$ (presencia de bacteria). En esta tabla se muestran los valores del estadístico de Wald y los correspondientes valores de probabilidad.

Tabla 14: Resultados de los Modelos Logit. Estadísticos de Wald y probabilidades para cada variable. Modelos considerando cada variable ambiental por separado, sin discriminar por lugar. Modelo con distribución binomial y función de enlace *logit*. Todas las variables con 1 grado de libertad.

	Variable	Estadístico de Wald	Probabilidad
agua	temperatura	6,05	0,01392
	Salinidad	5,19	0,02268
	Salinidad ²	5,50	0,01898
sedimentos	temperatura	3,94	0,04707
	Salinidad	3,18	0,07464
bivalvos	temperatura	3,97	0,04642
	Salinidad	4,51	0,03367

Según se ve en la **Tabla 14** todas las variables resultaron estadísticamente significativas al nivel del 5%, exceptuando la variable salinidad en sedimentos que puede ser considerada como estadísticamente significativa a un nivel de significación del 10% (probabilidad=0,07464), es decir, que tanto la temperatura como la salinidad influirían significativamente en la frecuencia de aislamiento de *V. parahaemolyticus* en el ambiente costero de la provincia de Buenos Aires. Debe observarse que la variable

salinidad², en agua, resultó también significativa, mostrando esto que la relación cuadrática que se visualiza como resultado del GAM (**Figura 23**) es plausible. Existiendo por lo tanto, en teoría, para la salinidad, un valor intermedio que determina mayor probabilidad de presencia de bacterias, disminuyendo ésta probabilidad para valores por debajo y por encima de este valor de máxima probabilidad.

En la **Tabla 15** se muestran las estimaciones de los coeficientes de regresión (del predictor lineal $L(x)$ del Modelo Logit) correspondientes a cada variable ambiental y su correspondiente desvío estándar.

Tabla 15: Resultados de los Modelos Logit. Coeficientes de regresión estimados y desvíos estándar. Modelos considerando cada variable ambiental por separado, sin discriminar por lugar. Modelo con distribución binomial y función de enlace *logit*. Todas las variables con 1 grado de libertad.

	Variable	Coeficiente de regresión	Desvío estandar
agua	intercepto	-8,7100	3,5415
	temperatura	0,4980	0,1906
	intercepto	-145,8698	66,4748
	salinidad	10,4838	4,6005
	salinidad ²	-0,1849	0,0788
sedimentos	intercepto	-9,7212	4,6320
	temperatura	0,4464	0,2248
	intercepto	7,7738	4,8957
	salinidad	-0,2932	0,1644
bivalvos	intercepto	-16,2554	8,2447
	temperatura	0,8691	0,4364
	intercepto	36,6300	17,3995
	salinidad	-1,1882	0,5594

Como se puede ver en **Tabla 15** la relación con la temperatura es lineal creciente (valores de los parámetros de regresión positivos), tanto para agua, sedimentos, como bivalvos. En el caso de la salinidad, en cambio, la relación es cuadrática para el agua y lineal decreciente (valores de los parámetros de regresión negativos) para sedimentos y bivalvos. En el caso del agua la relación es cuadrática, siendo el predictor lineal, de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 15:

$$L(x) = -145,8698 + 10,4838 \text{ salinidad} - 0,1849 \text{ salinidad}^2$$

De esta forma, el valor de salinidad que determina que la probabilidad de presencia de bacterias sea máxima es igual a:

$$\text{salinidad}_{opt} = \frac{-10,4838}{2 \times -0,1849} = 28,3499$$

En las figuras siguientes se muestran (**Figura 24**) las curvas de la probabilidad de presencia de bacteria en agua, sedimento y bivalvos, en función de la temperatura y salinidad.

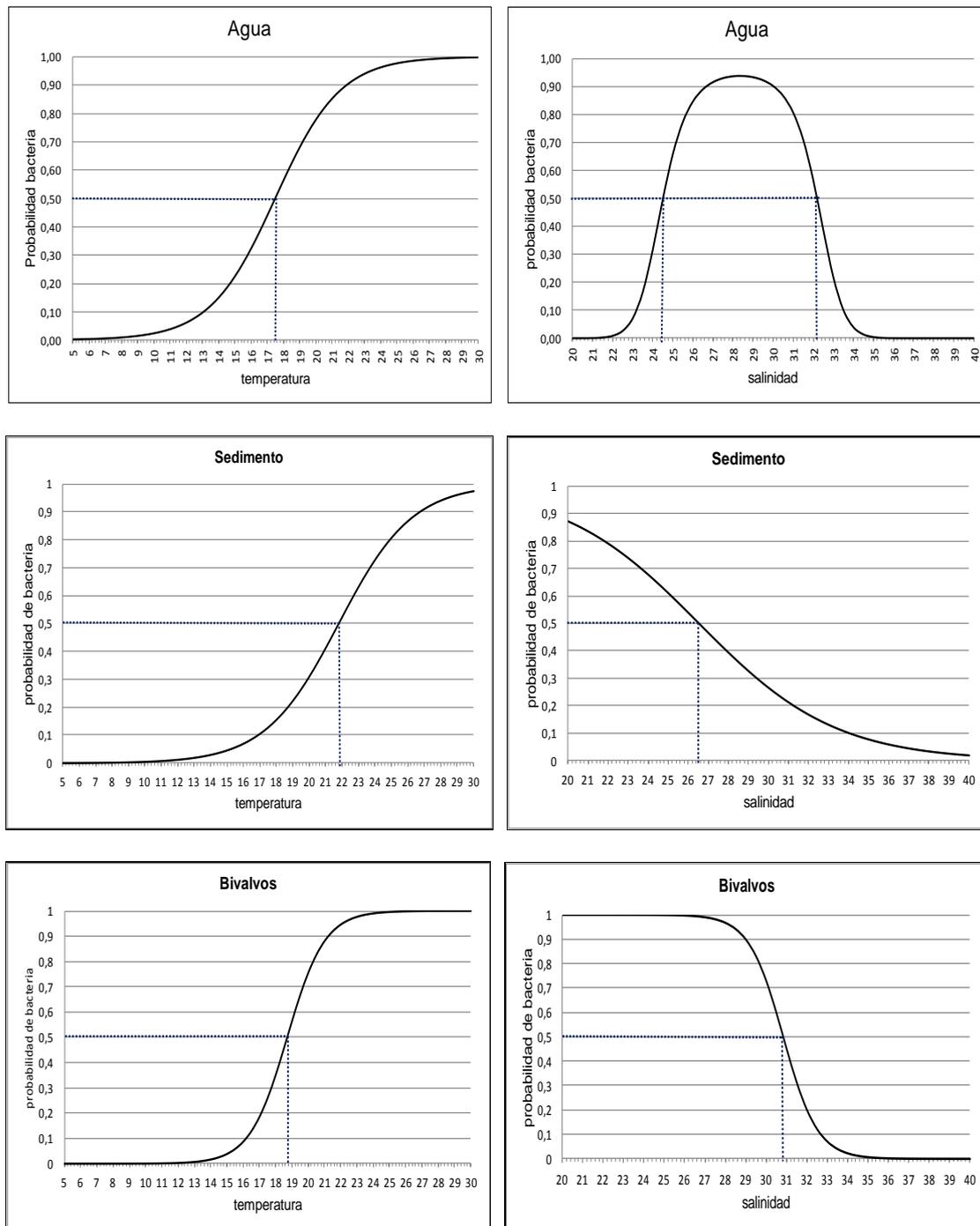


Figura 24: Curvas de probabilidad de presencia de bacteria en el agua, sedimento y bivalvos en función de la temperatura y salinidad.

Como se puede observar en las figuras, las temperaturas medias, es decir, la temperatura que produciría una probabilidad del 50 % de presencia de bacteria, en este caso *V. parahaemolyticus*, correspondió a los siguientes valores: para agua 17,5°C, para sedimento 21,8°C y para moluscos bivalvos 18,8°C, resultando como valor promedio 19,3°C.

En el caso de la salinidad, las medias fueron para sedimento 26,5 ups y para moluscos bivalvos 30,8 ups. En cambio para agua se hallaron 2 valores, 24,4 y 32,2 ups, resultando 28,4 ups el valor promedio.

Discusión

Como se mencionó en el Capítulo 1, los resultados obtenidos en este estudio revelan un patrón estacional de presencia de *V. parahaemolyticus* en el medio ambiente marino de la costa de Buenos Aires.

La mayor presencia (63%) y abundancia de *V. parahaemolyticus* (valor máximo 34 NMP/g de bivalvo) fue detectada en los meses de verano, coincidiendo también con el período de máximas temperaturas del agua de mar (20-24°C) y con salinidades que oscilaron entre los 24,83 y 32,74 ups. En primavera y otoño fue detectado en menores porcentajes, 26% y 1%, respectivamente; en primavera las temperaturas oscilaron entre 15-19°C y el rango de salinidad fue 24,83 a 33,75, en cambio en otoño fue 8-12°C y el rango de salinidad 28.20-34,31 ups. En invierno no fue detectado, las temperaturas oscilaron entre 8-12°C y la salinidad entre 33,92-34,22 ups.

Los resultados demuestran que *V. parahaemolyticus* fue detectado por encima de los 15°C y el rango de temperatura en el cual se detectó osciló entre 15,3 a 24°C. Esto coincide con lo publicado por distintos autores, Kaneko y Colwell estudiaron durante varios años el ciclo anual de *V. parahaemolyticus* en EE.UU., y observaron que *V. parahaemolyticus* tenía un ciclo estacional, esta bacteria sobrevivía durante el invierno en el sedimento, para asociarse posteriormente con poblaciones de copépodos cuando la temperatura del agua alcanzaba los 14-15°C, (primavera) y era liberada a la columna de agua cuando la temperatura se incrementaba a 19-20°C (verano) (Kaneko y Colwell, 1973, 1975, 1978).

Con respecto al aislamiento de *V. parahaemolyticus* a partir de muestras de agua, se observaron diferencias entre los sitios de muestreo, en Villa Gesell se encontró a temperaturas mayores de 18°C, con salinidades que variaron entre 29,89 a 32,74 ups, en cambio, en Santa Teresita se detecta a partir de los 15,3°C y a salinidades que varían entre 24,83 a 30,23 ups. En general, según fuentes bibliográficas, las temperaturas superiores a 19°C, siendo la mínima de 15°C, cuando la salinidad está entre 5 y 30 ups, siendo 23 la óptima, favorecen el crecimiento de *V. parahemolyticus*

en el medio acuático; incluso se ha observado que fuera de este rango de salinidades, las temperaturas elevadas permiten la proliferación de especies patógenas de vibrios (Tantillo *et al.*, 2004, Mc Laughin *et al.*, 2005; Martínez-Urtaza *et al.*, 2010).

En sedimento, al igual que en muestras de agua, se observaron diferencias en los distintos sitios de muestreo, en Villa Gesell/Mar Azul se encontró a temperaturas mayores de 21,5°C y con una salinidad de 32,74 ups, en cambio en Santa Teresita se detectó a partir de los 19°C y a salinidades que variaron entre 26,22 a 30,05 ups. No se detectó por debajo de los 19°C; la capacidad de adquirir el estado VBNC explicaría la ausencia de detección en épocas frías, con las técnicas empleadas en este estudio (Jiang y Chai, 1996; Wong *et al.* 2004).

En moluscos bivalvos, no fue posible establecer diferencias con respecto al aislamiento de *V. parahaemolyticus* en los distintos sitios de muestreo, debido a que, a partir del 4^{to} muestreo, en la línea de costa de Santa Teresita no fueron detectadas poblaciones naturales de moluscos bivalvos (a excepción del muestreo 16); a partir del 5^{to} muestreo solamente se pudieron extraer moluscos bivalvos de Villa Gesell/Mar Azul. Sin embargo, los primeros cuatro muestreos, poseen un mayor porcentaje de aislamiento en Santa Teresita (75%) con respecto a Villa Gesell/Mar Azul (25%). En Santa Teresita, *V. parahaemolyticus* fue detectado a partir de los 18°C y con una salinidad de 24,83 ups, en cambio, en Villa Gesell/Mar Azul fue detectado a partir de los 19,5°C y con una salinidad de 32,43 ups. En general, en el periodo primavera-verano, en Santa Teresita se detectaron mediciones mayores de temperatura y bajas salinidades, con respecto a las detectadas Villa Gesell/Mar Azul. Asimismo, la frecuencia de aislamiento fue mayor en Santa Teresita con respecto a Villa Gesell/Mar Azul, este hecho podría deberse a la influencia de las aguas provenientes de la descarga del Río de la Plata sobre la costa bonaerense en ese periodo que provocan una disminución de la salinidad en las aguas costeras de la provincia de Buenos Aires. Esto coincide con lo publicado por Martínez-Urtaza *et al.* (2008), que menciona a la salinidad como un factor principal que influye en la presencia de *V. parahaemolyticus* en el ambiente. Sin embargo, la mayoría de los trabajos definen a la temperatura como el factor más importante que influiría en la presencia de *V. parahaemolyticus* en el ambiente (Su y Liu, 2007; Igbinsosa y Okoh, 2008).

Al observar los resultados de la aplicación del modelo estadístico para representar la probabilidad de presencia de la bacteria *V. parahaemolyticus* en los diferentes tipos de muestras en función de la temperatura y salinidad. Se observaron diferencias significativas entre la presencia de *V. parahaemolyticus* y los valores de temperatura y salinidad, ambos factores influirían de manera significativa en la aparición de *V. parahaemolyticus* en el ambiente costero de Buenos Aires. Una relación lineal creciente fue observada entre la temperatura y la detección de *V. parahaemolyticus* en los tres tipos de muestras. En cambio, para la salinidad se observó una relación cuadrática para el agua y lineal decreciente para sedimento y moluscos bivalvos. En el caso de la salinidad en muestras de agua, la aplicación del modelo sugeriría en teoría la existencia de un valor intermedio que determinaría mayor probabilidad de bacterias,

disminuyendo la misma para valores por debajo y por encima de este valor de máxima probabilidad. Una combinación de valores altos de temperaturas y bajos de salinidades podría explicar la mayor frecuencia de aislamiento en los meses de verano.

En este estudio, se observa que en los muestreos donde se registraron las mayores densidades de *V. parahaemolyticus*, coincidieron altos valores de temperatura con bajos valores de salinidad. Algunos autores mencionan que la temperatura podría modular la densidad de *V. parahaemolyticus* solo cuando las aguas cálidas coinciden con periodos de salinidad reducida. Este patrón de los efectos combinados de altas temperaturas y bajas salinidades se ha observado que influye en la abundancia de *V. parahaemolyticus* en investigaciones llevadas a cabo en diferentes regiones de América del Norte (Kelly y Stroh, 1988; De Paola *et al.*, 2000). Estudios llevados a cabo por Martínez-Urtaza *et al.*, (2008), sugirieron que la influencia de la temperatura oceanográfica en el patrón estacional de *V. parahaemolyticus* muchas veces parece estar controlada por el efecto de la salinidad.

Los valores de pH no mostraron diferencias entre muestras positivas y negativas, encontrándose dentro del rango óptimo para su desarrollo. Para muestras positivas oscilaron entre 7 a 8, mientras que para muestras negativas entre 7 a 8.5. Valores de pH de 8.5 en muestras negativas también coincidieron con valores bajos de temperaturas y altas salinidades. La influencia de los parámetros ambientales, como la temperatura, salinidad, pH, lluvias, clorofila y plancton ha sido muy estudiada en la ecología de *V. parahaemolyticus*, siendo en términos generales la temperatura y la salinidad los parámetros más importantes que influirían en la dinámica de *V. parahaemolyticus*.

CAPITULO 3

Detección de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos de la costa Atlántica de Buenos Aires

3.1.- Detección de genes de virulencia *tdh/trh*, en los aislamientos de *V. parahaemolyticus* por PCR múltiple

De los 35 aislamientos procedentes de muestras de agua, 23 de muestras de sedimento y 42 de muestras de moluscos bivalvos, 100 en total; se detectó por PCR multiplex, un aislamiento con ambos marcadores de virulencia (1%) (**Figura 25**). El aislamiento C217/09 procedente de una muestra de moluscos bivalvos, (berberechos) resultó positivo para los genes *tdh* y *trh*. La muestra fue recolectada en el 5^{to} muestreo en la localidad de Mar Azul en el mes de enero/09, con una temperatura de 21°C y una salinidad de 32.74 ups; el recuento total de *V. parahaemolyticus* en la muestra resultó 9,1 NMP/g de bivalvo.

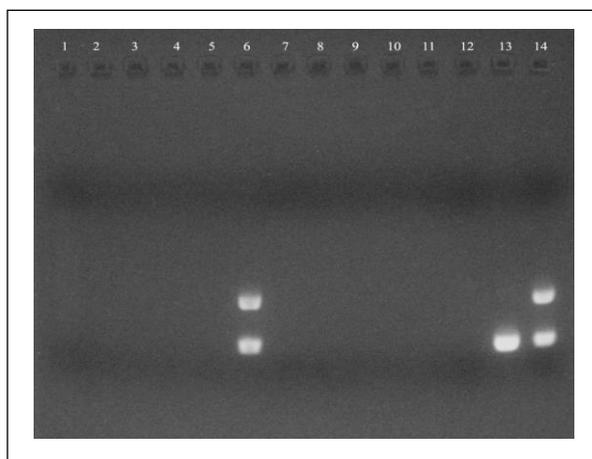


Figura 25: PCR múltiple para detectar las toxinas de *V. parahaemolyticus* (genes *tdh* (269 pb) y *trh* (500 pb) en aislamientos de muestras de bivalvos. 1 a 5 y 7 a 11: Aislamientos negativos para ambos genes. 6: Aislamiento positivo (C217/09) para genes *tdh* y *trh*. 12 Control negativo: *V. cholerae* ATCC 14033; 14: Control positivo para gen *tdh* cepa *V. parahaemolyticus* O3:K6 toxigénico (*Collection of Aquatic Important Microorganisms* [<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>]). 14. Control positivo *V. parahaemolyticus* toxigénico CAIM 1772 *tdh+/trh+* (*Collection of Aquatic Important Microorganisms* [<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>])).

Discusión

Estos resultados evidencian por primera vez, la presencia de *V. parahaemolyticus* potencialmente patógeno para humanos aislado de una muestra de moluscos bivalvos de la costa de la provincia de Buenos Aires. Asimismo, es la primera vez que se detecta en un aislamiento de *V. parahaemolyticus* la coexistencia de ambos genes marcadores de virulencia: genes *tdh* y *trh*. Esto coincide con lo publicado por Rodríguez-Castro y López-Joven (2012), ambos en diferentes zonas de España (zona de Ferrol y Delta del Ebro), detectaron por primera vez aislamientos de *V. parahaemolyticus tdh+/trh+*; y por lo publicado por Robert-Pillot *et al.*, (2004) que en muestras de mariscos, detectó un aislamiento con ambos marcadores de virulencia, resultando los mismos los primeros reportes de aislamientos ambientales con esas características particulares en Europa, y en nuestro caso, la primera evidencia en Argentina. La presencia de ambos genes de virulencia en un aislamiento pone en evidencia la necesidad de profundizar estudios moleculares en el mismo.

Este aislamiento fue detectado en el mes de enero, coincidiendo con el periodo de mayor temperatura, esto también coincide con Rodríguez Castro (2012) que detectó los aislamientos patogénicos en agosto (periodo más cálido). La estacionalidad de este aislamiento y en general la estacionalidad con que fue detectado *V. parahaemolyticus*, coinciden con los reportes de infecciones gastrointestinales que se producen en verano en la costa Atlántica, relacionadas con el consumo de bivalvos. Por lo tanto, a pesar de no contar con datos clínicos epidemiológicos sobre infecciones gastrointestinales causadas por *V. parahaemolyticus* en humanos asociadas al consumo de bivalvos, según los resultados de este estudio, podemos alertar, que el mayor riesgo de infección podría estar asociado a los meses de verano donde la incidencia de *V. parahaemolyticus* total fue mayor y ha sido detectado *V. parahaemolyticus* potencialmente patógeno.

Por otro lado, la detección de este aislamiento potencialmente patógeno en una muestra de berberechos, coincide con lo enunciado por diferentes autores, que han documentado el rol de los moluscos bivalvos como vehículos de transmisión de virus y bacterias patógenas para los humanos.

Al analizar el porcentaje de aislamientos patogénicos detectados en el medio ambiente, solamente el 1%; observamos que estos resultados coinciden con lo publicado por diferentes autores, que mencionan que en el medioambiente *V. parahaemolyticus* es mayoritariamente no patógeno y han reportado que solamente del 1 al 5% de las cepas ambientales estudiadas fueron TDH+ y/o TRH+ (DePaola y Hwang, 1995; Nishibuchi y Kaper, 1995).

Actualmente, en alimentos, se utiliza el recuento total indiferenciado como control de contaminación; sin embargo, el número de bacterias potencialmente patógenas (TDH+ y/o TRH+) capaces de provocar gastroenteritis en humanos resulta muy bajo, y

además existen evidencias de brotes epidémicos que tuvieron lugar en los Estados Unidos pese a que los recuentos del NMP fueron inferiores a 10^4 ufc/g (Nair y Hormazábal, 2005). Por lo tanto, tendría que considerarse un control inadecuado.

Debería considerarse el recuento y la detección de aislamientos patogénicos en muestras ambientales y de alimentos como control de contaminación; no obstante, como aún no están dilucidados todos los mecanismos de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* entre las poblaciones ambientales: vinculación clara entre los genes *tdh* y *trh* positivos y el T3SS, genes involucrados, relaciones entre ellos, etc., y además, recientemente fue publicado un reporte de gastroenteritis asociado a *V. parahaemolyticus* no toxigénico; resulta difícil establecer un parámetro seguro en el control de alimentos (Ottaviani *et al.*, 2012).

CAPITULO 4

Caracterización de los aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus* de muestras de moluscos bivalvos

4.1 Estudio de la diversidad genética por electroforesis en campo pulsado -PFGE

Este estudio se realizó sobre una selección de 28 aislamientos de *V. parahaemolyticus* de los 42 recuperados de muestras de moluscos bivalvos (**tabla A3** Anexo 1), incluyendo además la cepa de referencia ATCC 17802. Para realizar la selección se priorizaron colonias altamente viables en CHROMAgar *Vibrio*, y se tuvo en cuenta la procedencia: lugar, fecha de muestreo y recuperación de una misma placa o de diferentes placas de cultivo. En la **tabla 16** están descriptos los aislamientos seleccionados.

Tabla 16: Aislamientos de *V. parahaemolyticus* seleccionados para PFGE.

<i>Aislamiento</i>	<i>Muestra</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Nº de Muestreo - fecha (D/M/A)</i>	<i>Placa de cultivo NMP-TCBS</i>
C-112/08	Mejillines	Santa Teresita	3º - 11/12/08	A-4
C-113/08	Mejillines	Santa Teresita	3º - 11/12/08	A-4
C-123/09	Mejillines	Villa Gesell	4º - 07/01/09	C-1
C-125/09	Mejillines	Villa Gesell	4º - 07/01/09	C-2
C-128/09	Mejillines	Villa Gesell	4º - 07/01/09	A-3
C-144/09	Mejillines	Santa Teresita	4º - 07/01/09	B-1
C-145/09	Mejillines	Santa Teresita	4º - 07/01/09	B-1

C-147/09	Mejillines	Santa Teresita	4° - 07/01/09	A-2
C-151/09	Mejillines	Santa Teresita	4° - 07/01/09	A-3
C-152/09	Mejillines	Santa Teresita	4° - 07/01/09	A-3
C-155/09	Mejillines	Santa Teresita	4° - 07/01/09	A-4
C-157/09	Mejillines	Santa Teresita	4° - 07/01/09	B-4
C-160/09	Mejillines	Santa Teresita	4° - 07/01/09	C-4
C-212/09	Berberechos	Mar Azul	5° - 21/01/09	A-1
C-214/09	Berberechos	Mar Azul	5° - 21/01/09	B-1
C-217/09	Berberechos	Mar Azul	5° - 21/01/09	A-2
C-229/09	Berberechos	Mar Azul	6° - 18/02/09	A-1
C-233/09	Berberechos	Mar Azul	6° - 18/02/09	B-2
C-239/09	Berberechos	Mar Azul	6° - 18/02/09	C-4
C-292/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	A-1
C-293/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	B-2
C-294/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	B-2
C-295/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	C-1
C-296/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	C-1
C-299/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	C-2
C-300/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	A-3

C-301/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	A-3
C-306/09	Berberechos	Mar Azul	7° - 04/03/09	A-4

De los 29 aislamientos estudiados, 4 fueron no tipificables por Sfil-PFGE, incluso luego de agregar tiourea en el buffer de corrida: C125/09, C145/09, C212/09 y C233/09.

La electroforesis en campo pulsado, luego de una restricción con la enzima Sfil, resultó muy discriminadora, debido a que se encontraron 16 patrones electroforéticos entre los 25 aislamientos comparados (**figura 26**). Se identificaron cinco “clusters” o grupos de aislamientos indistinguibles entre sí; los primeros tres grupos compuestos por dos aislamientos cada uno, y el cuarto y quinto compuestos por cuatro aislamientos cada uno. En la **figura 26** se destacan con círculos los grupos anteriormente mencionados.

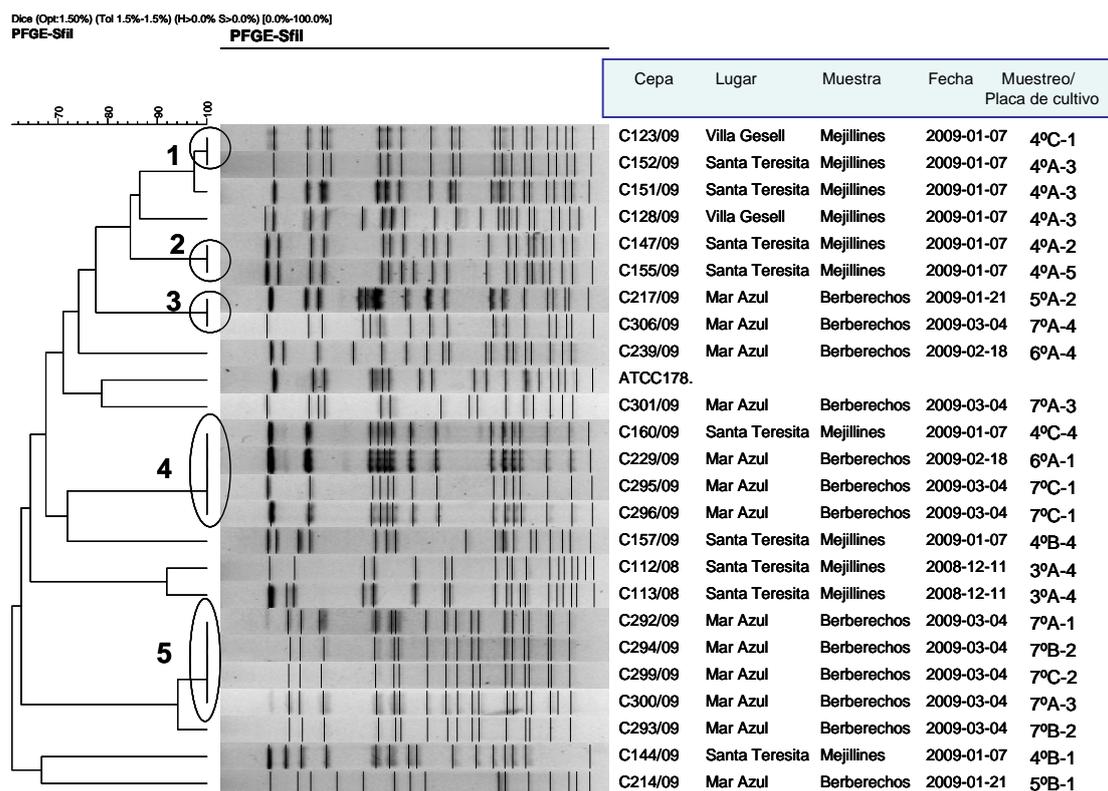
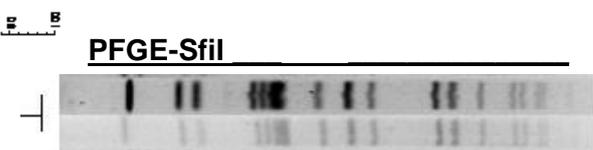


Figura 26: Dendrograma de Sfil-PFGE para los aislamientos de *V. parahaemolyticus* procedentes de muestras de moluscos bivalvos. Se señalan con círculos los grupos que resultaron indistinguibles entre sí. En las columnas a la derecha de los perfiles de PFGE se presenta el número de aislamiento, el lugar de muestreo, el tipo de muestra y la fecha de extracción de cada la muestra.

El primer grupo [1] comprendió los aislamientos C123/09 y C152/09 recuperados en mejillines, en las localidades de Villa Gesell/Mar Azul y Santa Teresita en el mes de enero de 2009. El segundo grupo [2] comprendió los aislamientos C147/09 y C155/09 recuperados en mejillines, en la localidad de Santa Teresita en el mes de enero de 2009. El tercer grupo [3] comprendió los aislamientos C217/09 y C306/09 recuperados en berberechos, en Villa Gesell/Mar Azul, el primero en enero de 2009 y el segundo en marzo de 2009.

El cuarto grupo [4] comprendió los aislamientos C160/09, C229/09, C295/09 y C296/09, el primero recuperado en mejillines, en Santa Teresita, en enero de 2009; en cambio los restantes fueron recuperados en berberechos, en Villa Gesell/Mar Azul, en diferentes fechas de muestreo, febrero de 2009 y marzo de 2009, respectivamente. El quinto [5] grupo comprendió los aislamientos C292/09, C294/09, C299/09 y C300/09 recuperados en berberechos, en la localidad de Villa Gesell/Mar Azul, en el mes de marzo de 2009.

Cabe destacar que tanto en el primer como en el cuarto grupo, se recuperaron aislamientos con el mismo patrón de PFGE procedentes de los dos sitios de muestreo, Santa Teresita y Villa Gesell/Mar Azul, las localidades se encuentran separadas por una distancia de entre aproximadamente 90 y 100 km. Por otra parte, también es muy interesante resaltar que el tercer grupo integrado por los aislamientos C217/09 y C306/09 provenientes de muestras de berberechos de Mar Azul, recuperados en distintos muestreos, comparten el mismo patrón por Sfil-PFGE, pero presentan distinto perfil de virulencia: C217/09 fue positivo para los genes *tdh* y *trh*, en cambio C306/09 resultó negativo para ambos genes. Ante estos resultados, dichos aislamientos se enviaron al Instituto de Salud Pública de Chile, para realizar la serología. Se obtuvieron los siguientes serotipos:

Dice(Opt1.50%)(Tol1.50%-1.5%)(H>0.%S>0.0%)[0.0%100%]		Cepa	Genotipo <i>tdh/trh</i>	Serotipo
		C217/09	<i>tdh+ / trh+</i>	O4:K18
		C306/09	<i>tdh- / trh-</i>	O6:K18

En el dendrograma elaborado utilizando la enzima de restricción Sfil (**figura 26**) también se observaron perfiles genéticos relacionados que diferían entre una y tres bandas con porcentajes de similitud mayores al 90%. Se identificaron tres nuevos grupos. El primer grupo comprendió los aislamientos C123/09, C152/09 y C151/09 que diferían en una sola banda, presentando un porcentaje de similitud de 97.4%, el segundo grupo conformado por los aislamientos C292/09, C294/09, C299/09, C300/09 y C293/09 difirió en dos bandas presentando un porcentaje de similitud de 94,1%, y el tercer grupo conformado por C112/09 y C113/09 difirió en tres bandas y presentó un porcentaje de similitud de 91,9%.

Por otra parte, se observó que aislamientos procedentes de un mismo muestreo y muestra, que fueron recuperados de una misma placa de cultivo, presentaron diferentes perfiles genéticos (C-152/09 y C-151/09; C-112/09 y C-113/09; C-293/09 y C-294/09; C-300/09 y C-301/09), mientras que solamente los aislamientos C-295/09 y C-296/09 recuperados de una misma placa de cultivo compartieron perfiles genéticos similares.

La cepa de referencia ATCC 17802 no mostró estar relacionada significativamente con ningún aislamiento estudiado, siendo el más cercano el aislamiento C301/09, con el que tuvo un porcentaje de similitud menor al 80%.

Al utilizar la segunda enzima de restricción NotI, se analizaron los cinco grupos que, de acuerdo al patrón de Sfil-PFGE fueron indistinguibles entre sí. De los 14 aislamientos resultantes se seleccionaron 11, se excluyeron el aislamiento C296 del grupo 4, que fue recuperado de una misma placa de cultivo que C295/09, y los aislamientos C294 y C299 del grupo 5, que fueron recuperados de la misma muestra que C292/09 e C300/09 respectivamente, incluidos en el ensayo.

La electroforesis en campo pulsado con la enzima NotI confirmó los resultados obtenidos con Sfil (**figura 27**), estableciendo que los grupos identificados por la primera enzima están altamente relacionados. Entre los 11 aislamientos analizados, se identificaron 8 patrones electroforéticos. En 2 grupos de los 5 comparados, el perfil resultó indistinguible (representados por círculos). A su vez, en otros dos grupos los perfiles tuvieron un porcentaje de similitud del 91,4% y los aislamientos C147/09 y C155/09 tuvieron un porcentaje de similitud del 96,6% (representados por rectángulos) (**figura 27**).

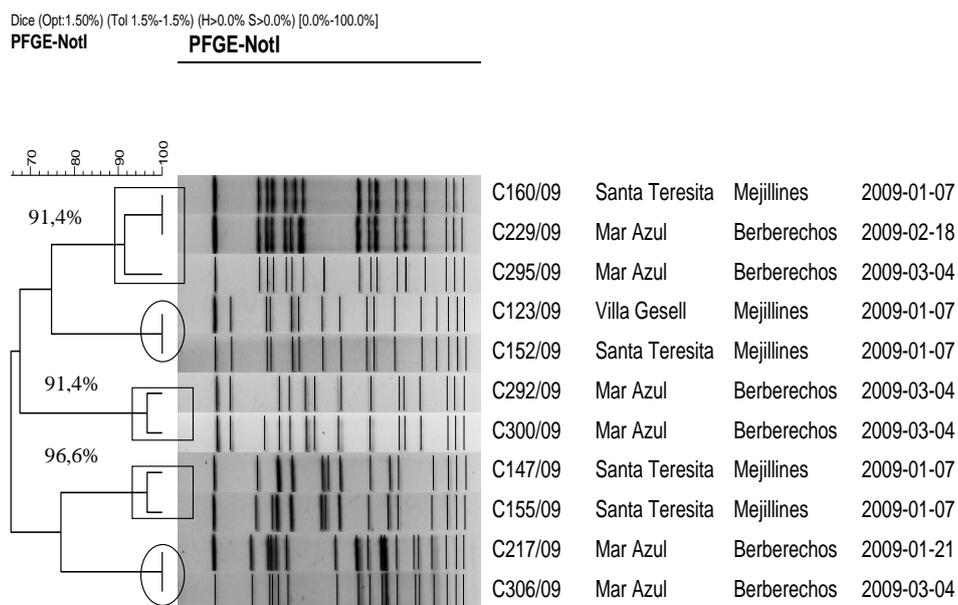


Figura 27: Dendrograma de NotI-PFGE para los aislamientos de *V. parahaemolyticus* seleccionados que presentaron patrones compartidos con la enzima Sfil. Se señalan con

círculos los grupos que resultaron indistinguibles entre sí y con rectángulos los que difirieron en una banda. En las columnas a la derecha de los perfiles de PFGE se presenta el número de aislamiento, el lugar de muestreo, el tipo de muestra y la fecha de extracción de cada muestra.

Discusión

Este estudio de diversidad genética en aislamientos ambientales de *V. parahaemolyticus* resulta ser el primero en Argentina, con el cual se logró constituir una primera base de datos de subtipos de *V. parahaemolyticus* circulantes en la costa Atlántica de la provincia de Buenos Aires.

Al igual que otros estudios realizados mundialmente, se encontró alta diversidad genética en los aislamientos de *V. parahaemolyticus* analizados por PFGE (Tanil *et al.*, 2005; Suffredini *et al.*, 2011; Ellingsen *et al.*, 2008). Se identificaron 16 patrones electroforéticos entre los 25 aislamientos comparados. Solamente se identificaron 5 grupos genéticamente similares, de dos y hasta cuatro aislamientos cada uno.

En uno de los grupos, grupo 1 (figura 4.1) los aislamientos provinieron de diferentes sitios de muestreo (Villa Gesell/Santa Teresita); en el grupo 4 (figura 4.1) los aislamientos procedieron de distintos sitios de muestreo y de diferentes muestras (Mar Azul/Santa Teresita y berberechos/mejillines), esto sugiere que estos agrupamientos incluyeron aislamientos con amplia distribución geográfica y de diversas fuentes.

Asimismo, dentro de un mismo cluster (grupos 3 y 4) se observó la persistencia de aislamientos similares a lo largo del tiempo (debido a que se aislaron en diferentes muestreos), esto podría explicarse por el origen común de esos aislamientos.

Estos resultados coinciden con lo publicado por Ellingsen *et al.*, (2008) y Tanil *et al.*, (2005) que observaron que aislamientos ambientales procedentes de diferentes sitios de muestreo tenían el mismo perfil genético y algunos fueron estables en el tiempo. La descarga del Río de la Plata sobre la costa bonaerense en el periodo primavera verano, y las corrientes costeras pueden transportar microorganismos de un sitio a otro; esto podría explicar porque se observaron variantes similares de *V. parahaemolyticus* en diferentes áreas.

Resulta importante destacar que el aislamiento C217/09 toxigénico (*tdh+/trh+*), serotipo O4:K18, presenta el mismo perfil genético que el aislamiento C306/09 no toxigénico (*tdh-/trh-*), serotipo O6:K18, ambos provienen de una muestra de berberechos pero de diferentes muestreos.

Distintos estudios han corroborado que al mismo perfil de PFGE pueden pertenecer hasta 4 serotipos pandémicos distintos (Wong *et al.*, 2007; Martínez-Urtaza *et al.*, 2004). Los genes que participan en la génesis del serotipo se ubican en *clusters*, y la conversión entre un serotipo y otro puede ocurrir con mínimas diferencias genéticas, lo

que puede no ser detectado en la macrorestricción del genoma completo al generar los perfiles de PFGE (Wong *et al.*, 2007).

Además, se ha sugerido que la serotipificación de *V. parahaemolyticus* puede ser engañosa y de poco valor epidemiológica (González-Escalona *et al.* 2008). Por otro lado, Ellingsen *et al.* (2008) también observó que un aislamiento clínico (*tdh+*/*tdh+*) tenía un patrón de bandas similar a un aislamiento ambiental (*trh-*/*tdh-*). Además, Terai *et al.* (1991) determinaron que algunas cepas poseían el gen *tdh* asociado a una estructura tipo secuencia de inserción (SI), estos elementos tienen la capacidad de movilizarse y generar rearrreglos genéticos, inactivando genes y realizando deleciones en el ADN (Bennet 2004, citado por Dauros Singorenko, 2009).

Recientemente se detectó desde 1 a 4 copias de SI en el genoma de una cepa de *V. parahaemolyticus*, observándose en un subcultivo fenómenos de transposición (inserción y replicación). Esto indica que estos fenómenos son usuales y que la detección de factores de virulencia mediante PCR puede verse influenciada por la inserción de SI (Kamruzzaman *et al.*, 2008). Esto podría explicar la falta de detección de factores de virulencia en el aislamiento C306/09 y evidencia la necesidad de realizar otros estudios moleculares para dilucidar la relación entre ambos aislamientos.

A pesar de lo referido con respecto a la serología para caracterizar la diseminación epidemiológica de *V. parahaemolyticus*, resulta interesante mencionar que el serotipo O6:K18 observado en nuestro estudio, detectado inicialmente en Taiwán, comparte identidad molecular con el clon pandémico O3:K6 (Wong *et al.*, 2005). Lo importante a resaltar es que, este aislamiento está relacionado, serológicamente con el clon pandémico y por PFGE con un aislamiento toxigénico. Esto demuestra nuevamente la necesidad de implementar mecanismos de vigilancia para este microorganismo y profundizar en estudios moleculares.

CONCLUSIONES

- Este trabajo pone en evidencia la presencia de *V. parahaemolyticus* en la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires. Se confirmó su aislamiento en muestras de agua, sedimento y moluscos bivalvos.
- Se determinó la presencia de *V. parahaemolyticus* en el período primavera-verano, detectándose que tanto la temperatura como la salinidad del medio marino influyeron en la dinámica estacional observada.
- Se ha demostrado la presencia de ambos marcadores de virulencia *tdh* y *trh* en un aislamiento de *V. parahaemolyticus* en berberechos recolectados en la costa bonaerense por técnicas de PCR multiplex. Este hallazgo representa la primera evidencia en Argentina de aislamientos ambientales potencialmente patógenos para el hombre y sugiere principalmente, la necesidad de que se investigue la presencia de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos, en las condiciones en que se ofrecen al consumo.
- Se determinó la diversidad genética de los aislamientos de *V. parahaemolyticus* identificados en moluscos bivalvos, observándose algunos subtipos relacionados, presentes en diferentes sitios y otros persistentes a través del tiempo en los sitios de muestreo.
- Finalmente, se evidencia la necesidad de profundizar estos estudios, como también fortalecer el diagnóstico clínico de este patógeno en las zonas de mayor riesgo, para aportar herramientas de vigilancia y monitoreo en el área de Salud y en los reservorios del ambiente acuático, promoviendo la aplicación de técnicas estandarizadas de identificación y subtipificación a fin de facilitar la comparación de aislamientos circulantes a nivel nacional, regional e internacional.

BIBLIOGRAFIA

1. AESAN, 2010. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección fronterizos, a productos pesqueros importados. 2010. Revista del Comité Científico de la AESAN N°12 Madrid, España. Disponible en línea: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/revistas/comite_cientifico_12.pdf
2. Aguirre-Guzmán G., Labreuche Y., Ansquer D., Espiau B., Levy P., Ascencio F. y Saulnier D. 2003. Proteinaceous exotoxins of shrimp-pathogenic isolates of *Vibrio penaeicida* and *Vibrio nigripulchritudo*. *Cienc. Mar.* 29, 77–88.
3. Alam M., Sultana M., Nair G.B., Siddique A.K., Hasan N.A., Sack R.B., Sack D.A., Ahmed K.U., Sadique A., Watanabe H., Grim C.J., Huq, A. & Colwell R.R. 2007 Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104 (45) 17801-17806.
4. Andrews L.S., DeBlanc S., Veal C.D. & Park D.L. 2003. Response of *Vibrio parahaemolyticus* 03:K6 to a hot water/cold shock pasteurization process. *Food Addit Contam.* 20(4): 331-4.
5. Ansedo-Bermejo J., Gavilán R.G., Triñanes J., Espejo R.T. & Martínez-Urtaza J. 2010. Origins and colonization history of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in South America. *Mol. Ecol.* 19: 3924–37.
6. Asplund M. E., Rehnstam-Holm A. S., Atnur V., Raghunath P., Saravanan V., Härnström K., Collin B., Karunasagar I. & Godhe A. 2011. Water column dynamics of *Vibrio* in relation to phytoplankton community composition and environmental conditions in a tropical coastal area. *Environ. Microbiol.* 13: 2738- 2751.
7. Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* 27: 140 (3-4): 310-7.
8. BAM-FDA. Bacteriological Analytical Manual-Food and Drug Administration. 2004. Chapter 9, *Vibrio*. (en línea), disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/laboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070830>.
9. Baffone W., Tarsi R., Pane L., Campana R., Repetto B., Mariottini G.L. & Pruzzo C. 2006. Detection of freeliving and plankton-bound vibrios in coastal

- waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity associated properties. *Environ. Microbiol.* 8 (7), pp: 1299-1305.
10. Baker-Austin C., Stockley L., Rangdale R. & Martinez-Urtaza J. 2010. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environ. Microbiol. Reports* 2 (1): 7-18.
 11. Baumann P., Baumann L., & Mandel M. 1971. Taxonomy of Marine Bacteria: The genus *Beneckeia*. *J. Bacteriol.* 107:268-270.
 12. Bayne B.L. & Hawkins A.J.S. 1992. Ecological and physiological aspects of herbivory in benthic suspension-feeding molluscs. *En: Plant-animal interactions in the marine benthos*. D.M. John, S.J. Hawkins y J.H. Price (Eds.). Clarendon Press, Oxford, pp. 265-288.
 13. Bej A.K., Patterson D.P., Brasher C.W., Vickery M.C.L., Jones D.D. & Kaysner C.A. 1999. Detection of total and hemolysinproducing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tlh, tdh and trh. *J. Microbiol. Methods* 36, 215–225.
 14. Ben-Haim Y., Thompson F.L., Thompson C.C., Cnockaert M.C., Hoste B., Swings J. & Rosenberg E. 2003a. *Vibrio coralliityticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 309-315.
 15. Bennet P. 2004. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods in Molecular Biology* 266:71-113.
 16. Bhoopong P., Palittapongarnpim P., Pomwised P., Kiatkittipong A., Kamruzzaman M., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Ishibashi M. & Vuddhakul V. 2007. Variability in properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from single patients. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1544–1550.
 17. Binsztein N., Costagliola M.C., Pichel M., Jurquiza V., Ramírez F.C., Akselman R. Vacchino M, Huq A. & Colwell R.R. 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol* 70: 7481-7486.
 18. Blake Y Hollis, 1980. Diseases of humans (Other than cholera) Caused by Vibrios. *Annual Review of Microbiology*. 34: 341-367.
 19. Boletín Epidemiológico. 2009. Ministerio de Salud de Perú. Brotes y otras emergencias sanitarias SE 10. Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico 18(9): 171-2.
 20. Boschi E. 2004. Un asiduo visitantes de las playas denominado *Homo sapiens* Linné. En: Boschi E. & Cousseau B. (Eds.) La vida entre mareas: vegetales y animales de las costas de Mar del Plata, Argentina. Cap. 37: 323-326. INIDEP, Argentina.

21. Brusca C.R. & Brusca J.G. 2002. Phylum Mollusca. *En: Invertebrates*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachussets, pp. 701-769.
22. Buchanan R. & Gibbons N. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
23. Cabello A.E., Espejo R.T. & Romero J. 2005. Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327: 157–166.
24. Cabezalí C.B, Burgos M.A. & Chiarello M.N. 1989. Distribución de *Vibrio parahaemolyticus* en los golfos norpatagónicos. V Congreso Argentino de Microbiología. AAM. Mar del Plata.
25. Cabrera-García M.E., Vázquez-Salinas C. & Quiñones Ramírez E.I. 2004. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol* 70: 6401–6406.
26. Cai S.H., Wu Z.H., Jian J.C. & Lu Y.S. 2007. Cloning and expression of gene encoding the thermostable direct hemolysin from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*). *J. Appl. Microbiol.* 103, 289–298.
27. Calik H., Morrissey M.T., Reno P.W. & An H. 2002. Effect of high pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in oysters. *J. Food Science*, 67: 1506-1510.
28. Casellas J.M., Caria M.A. & Gerghi M.E. 1977. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de cholgas y mejillones en Argentina. *Rev. Arg. de Microbiología* 9: 41-53
29. Castañeda Chávez MR., Padio Sedas V. Orrantia Borunda E. & Lango Reynoso, F., 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholera* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. *Marine Pollution Bulletin* 50: 1641-1648.
30. Cavallo R.A. & Stabili, L. 2004. Culturable vibrios biodiversity in the northern Ionian Sea (Italian coasts). *Sci. Mar. (Barc.)* 68 (Suppl. 1): 23-29.
31. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 1999. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey and New York, 1998. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 48 (3), pp: 48-51.
32. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis. *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.*
33. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Cholera and other *Vibrio* illness surveillance summaries: summary of human *Vibrio* isolates reported to CDC, Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services,

- Disponible en línea:
http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/vibrio_sum/cstevibrio2004.pdf.
34. CCFH, 2002. Codex Committee on Food Hygiene. Documento de debate sobre estrategias de gestión de riesgo del *Vibrio* spp. en mariscos. CX/FH 03/5 - Ad.3. 2003. 25 p. Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH). Disponible en: <http://www.cofexalimentarius.net/ccfh35/fh0301e.htm> [acceso: 8-2-10].
 35. CCFH, 2010. Codex Committee on Food Hygiene. Directrices sobre la aplicación de los principios de higiene de los alimentos para el control de las especies patógenas de *Vibrio* en los alimentos de origen marino. CAC/GL 73-2010. 2010. 17 p. Codex Alimentarius - International Food Standard-WHO-FAO.
 36. Cho S.H., Shin H.H., Choi Y.H., Park M.S. & Lee B.K. 2008. Enteric bacteria isolated from acute diarrheal patients in the Republic of Korea between the year 2004 and 2006. *J. Microbiol.* 46 (1): 325-330.
 37. Cofrepis 2010. Evaluación de Riesgo y Plan de Control de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos. 2010. Comisión de Operación Sanitaria, Dirección Ejecutiva de Programas Especiales, Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. Cofepri. México. Disponible en línea: www.cofepri.gob.mx/AZ/Documents/VpPlan.pdf
 38. Colwell RR. 1996. Global climate and infectious diseases: The cholerae paradigm. *Science* 274 (5295): 2025-2031.
 39. Colwell, R.R. 2006. A Global and Historical Perspective of the Genus *Vibrio*. Chapter 1. En: *The Biology of Vibrios*. Fabiano L. Thompson, Brian Austin & Jean Swings (eds.). pp. 3-11. ASM Press, Washington, DC.
 40. Cook D.W., Leary P.O., Hunsucker J.C., Sloan E.M., Bowers J.C., Blodgett R.J. & DePaola A. 2002. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. *J. Food. Prot.* 65, 79-87.
 41. Córdova J.L., Astorga J., Silva W. & Riquelme C.. 2002. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997–1998 Chilean outbreak. *Biol Res.* 35 (3-4): 433-40.
 42. Costagliola M. & Jurquiza V. 2010. Joint FAO/WHO Expert Meeting on Risk Assessment Tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Associated with Seafoods. Informe de asesoramiento y transferencia INIDEP, a solicitud de FAO/WHO. 30/4/010.
 43. Croci L., Suffredini E., Cozzi L. & Toti L. 2002. Effects of depuration of mollusks experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl. Microbiol.* 92(3): 460-465.

44. Croci L., Suffredin, E., Cozz, L., Tot, L., Ottavian, D., Pruzz, C., Serrator, P., Fischett, R., Goffred, E., Loffred, G., Mioni R., 2007. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* 102, 229–237
45. Dadisman T., Nelson R., Molenda J. & Garber H. 1972. *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis in Maryland. *American Journal of Epidemiology.* 96: 414-418.
46. Dadon J.R., Castaños C., Pérez GarcíaR., Chiappini M.T.G. & Cruses J.M. 2001. Efectos a largo plazo de las pesquerías de almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) y berberecho (*Donax hanleyanus*), y de la urbanización sobre las comunidades intermareales. En: Sustentabilidad de la Biodiversidad (K. Alveal y T. Antesana, eds.), pp. 703-715. Universidad de Concepción, Concepción. ISBN 956-227-257-5.
47. Dadon J.R. 2002. El impacto del turismo sobre los recursos naturales costeros en la costa pampeana. En: Zona Costera de la Pampa Argentina (J. R. Dadon y S. D. Matteucci, eds.). Lugar Editorial, Buenos Aires, pp. 101-121. ISBN 950-892-140-4
48. Dadon J.R. & Matteucci S.D. 2006. Patrones de desarrollo costero en la provincia de Buenos Aires. Capítulo 10. En: Matteucci S.D., Morillo J., Buzai G.D., Baxendale C.A., Silva M., Mendoza N., Pengue W. & Rodríguez A. Crecimiento urbano y sus consecuencias sobre el entorno rural. El caso de la ecorregión pampeana. Orientación Gráfica Editora, SRL, Buenos Aires.
49. Dadon J.R. & Matteucci S.D. 2006. Caracterización de las grandes regiones costeras de la Argentina. En: F.I. Isla y C.A. Lasta: Manual de manejo costero para la Provincia de Buenos Aires, . Eds: EUDEM, Mar del Plata. Pp. 11-39.
50. Daniels N.A., MacKinnon L., Bishop R., Altekruze S., Ray B., Hammond R.M., Thompson S., Wilson S., Bean N.H., Griffin P.M. & Slutsker L. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J. Infect. Dis.* 181(5):1661-1666.
51. Dauros Singorenko P.P. 2009 Elementos que capturan genes de resistencia a antibióticos en cepas del clon pandémico de *Vibrio parahaemolyticus*. Tesis de Maestría-Magister en Ciencias-Mención Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile. 107 pp.
52. De Koning-Ward T.F. & Robins-Browne R.M. 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 63: 3790-3795.
53. DePaola A., Hopkin L.H., Peeler J.T., Wentz B. & McPhearson R.M.. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2299-2302.
54. DePaola A., Capers G.M., Motes M.L., Olsvik O., Fields P.I., Wells J., Wachsmuth I.K., Cebula T.A., Koch W.H. & Khambaty F. 1992. Isolation of Latin American epidemic strain of *Vibrio cholerae* O1 from US Gulf Coast. *Lancet*, 339 (8793), 624.

55. DePaola A. & Hwang G-C. 1995. Effect of dilution, incubation time, and temperature of enrichment on cultural and PCR detection of *Vibrio cholerae* obtained from the oyster *Crassostrea virginica*. *Molec. Cell. Probes*. 9: 75-81.
56. DePaola A., Kaysner C.A., Bowers J. & Cook D.W. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4649–4654.
57. DePaola A., Ulaszek J., Kaysner C.A., Tenge B.J., Nordstrom J.L., Wells J. Puhr N. & Gendel S.M. 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3999-4005.
58. DePaola A., Nordstrom J.L., Bowers J.C., Wells J.G. & Cook D.W. 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1521-6.
59. DePaola A., Jones J., Woods J., Burkhardt W., Calci K., Krantz J. & Bowers J., 2007. Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: US Market Survey. *Appl. Environ. Microbiol.* 10:1128/AE
60. DePaola, A., Cachicas, V., Cornelius, A., Croci, L., Espejo, R., Hervio-Heath, D., Karunasager, I., Hara-Kudo, Y., Liu, J., Madigan, T., Martinez-Urtaza, J., Rangdale, R., Suffredini, E. y Jones, J. 2009. Evaluation of international PCR method performance for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. En libro: 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Conference handbook, 14-19 Junio, 2009; Nantes.
61. Dileep V., Kumar H.S., Kumar Y., Nishibuchi M. & Karunasagar, I. 2003 Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 423–427.
62. Di Pinto A., Terio V., Novello L. & Tantillo G. 2011. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control* 22: 124-127.
63. Di Mauro R. 2011. Variación interanual del mesozooplankton de la plataforma bonaerense en primavera: Introducción de las nuevas metodologías para su análisis. Tesis de Doctorado Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4944_DiMauro.pdf
64. DPP N° 1238. 1996. Disposición Dirección Provincial de Pesca, Protección de la Almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) en la Provincia de Buenos Aires, Ministerio de Asuntos Agrarios.

65. Dueñas-Peña T. 2008. Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en especies marinas de consumo en Lima Metropolitana y Callao. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. Tesis de Grado. 82 pp.
66. Eiler A., Johansson M. & Bertilsson S. 2006. Environmental influences on *Vibrio* populations in Northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 6004-6011.
67. Eilers H., Pernthaler J. & Amann R. 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4634-4640.
68. Ellingsen A., Jørgensen H., Wagley S., Monshaugen M & Rørvik L. 2008. Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* 105: 2195- 2202.
69. Estes R.M., Friedman C.S., Elston R.A. & Herwig R.P.. 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 58(2-3): 223-230.
70. Fabbri A., Falzano L., Frank C., Donelli G., Matarrese P., Raimondi F., Fasano A. & Fiorentini C. 1999. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infect. Immun.* 67: 1139-1148.
71. FAO, 2000. Draft risk assessment on the Public Health impact of *Vibrio parahaemolyticus* in raw molluscan shellfish. Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration U.S. Department of health and Human Services.
72. FAO, 2003. Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp. en mariscos. 2003 Informe de una Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos. Bangkok, Tailandia, 2002. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 75: 67 p. (en línea) Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y8145s/y8145s00.htm>
73. FAO, 2008. Food and Agriculture Organization. 2008. Fisheries Technical Paper. No. 511. Bivalve depuration: Fundamental and Practical Aspects. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/011/i0201e/i0201e00.htm>.
74. Farmer III J.J., Janda J.M. & Birkhead K. 2003. En: Murray P., Baron E.J., Jørgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C., (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Ed. ASM Press, Washington D.C., USA. p: 706-18.
75. Farmer III J.J., & Janda J.M. 2005. *Vibrionaceae*. En: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R. & Garrity G.M. (eds). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Vol. 2.* part. B. 2nd Ed. Springer-Verlag. New York. p. 491-494.

76. Fica A. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Medwave*: 7(9): e2544 doi: 10.5867/medwave.2007.09.2544 Número de artículo: 2544 Fecha de publicación: 1/10/2007.
77. Fishbein M., Mehlman L. & Pitcher J. 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Processed Meat of Chesapeake Bay. *Buy. Cros. Appl. Microbiol.* 20:176-178.
78. Framiñan M.B., Etala M.P., Acha E.M., Guerrero R.A., Lasta, C. & Brown, O. 1999. Physical characteristics and processes of the Río de la Plata estuary. *Estuaries of South America, Their Geomorphology and Dynamics*, G.M.E. Perillo; M.C. Piccolo & M. Pino Quiviara (Eds), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp 161-191.
79. Fuenzalida L., Armijo L., Zabala B., Hernández C., Rioseco M.L., Riquelme C. & Espejo R.T. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117(3):270-275.
80. Fujino, T.; Okuno, Y.; Nakada, D.; Aoyama, A.; Fukai, K. & Mukai, T. 1953. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4: 299-304.
81. Funahashi T., Moriya K., Uemura S., Miyoshi S., Shinoda S., Narimatsu S. & Yamamoto S. 2002. Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 184, 936–946.
82. Gavilán R.G. & Martínez-Urtaza J. 2011. Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública* 28(1): 109-15.
83. Gil A.I., Miranda H., Lanata C.F., Prada A., Hall E.R., Barreno C.M., Nusrin S., Bhuiyan N.A., Sack D.A. & Nair G.B. 2007 O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Perú. *Int. J. Infect. Dis.* 11(4): 324-8.
84. Gomez-Gil B, Roque A., Turnbull J.F. & Tron-Mayen L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163: 1-9.
85. Gomez-Gil B., Thompson F.L., Thompson C.C., García-Gasca A., Roque A. & Swings J. 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 261-265
86. González-Escalona N., Cachicas V., Acevedo C., Rioseco M.L., Vergara J.A, Cabello F., Romero F. & Espejo R.T. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11(1): 129-31.
87. González-Escalona N., Martínez-Urtaza J., Romero J., Espejo R.T., Jaykus L.A & DePaola A. 2008. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio*

- parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J. Bacteriol.*: 190 (8): 2831-2840.
88. González Fraga S. 2010. Búsqueda de reservorios ambientales de *Vibrio cholerae* O1 en diferentes regiones del país y caracterización de *V. cholerae* O1 Variante Tucumán. Tesis de Doctorado. 207 pp. Universidad de Buenos Aires.
 89. González Morera A.L. 1982. Identificación de *Vibrio parahaemolyticus* en *Cynoscion squamipinnis* (Corvina Aguada). Tesis de Lic. Universidad de Costa Rica.
 90. Gooch J.A., DePaola A., Bowers J. & Marshall D.L. 2002. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *J. Food Protection*, 65, pp: 970-974.
 91. Guerrero R.A., Acha E.M., Framiñan M.B. & Lasta, C.A. 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Continental Shelf Research* 17(7): 727-742.
 92. Guerrero, R. A. y Piola, A. R., 1997. Masas de agua en la plataforma continental. En: Boschi E. (ed.) *El Mar Argentino y sus Recursos Pesquero*, Tomo I: Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales. INIDEP, Mar del Plata, Argentina, p: 107-119.
 93. Guerrero R., Piola A., Osiroff A. P., Molinari, G. & Jáuregui, S. 2004. Análisis de datos oceanográficos históricos. Informe final. http://adt.freplata.org/documentos/archivos/Documentos_Freplata/Datos_historicos/TS_Historicos.pdf
 94. Guerrero R.A, Piola A.R., Molinari G.N., Osiroff A.P. & Jauregui S.I. 2010. Climatología de temperatura y salinidad en el Río de la Plata y su Frente Marítimo. Argentina-Uruguay. Publicaciones especiales INIDEP, Mar del Plata, 95p.
 95. Han H., Wong H.C., Kan B., Guo Z., Zeng X., Yin S., Liu X., Zhou D., & Yang R. 2008. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics* 9:570. SCI
 96. Hara-Kudo Y., Nishina T., Nakagawa H., Konuma, H. Hasegawa J. & Kumagai S. 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5819–5823.
 97. Harth E., Matsuda L., Hernández C., Rioseco M.L., Romero J., González-Escalona N., Martínez-Urtaza J. & Espejo R.T. 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks, Southern Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (2): 163-168.
 98. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass

- S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C. & Fraser C.M. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406(6795): 477–483.
99. Heidelberg J.F., Heidelberg K.B. & Colwell R.R. 2002. Bacteria of the gamma-subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5498-5507.
100. Heitmann I.G., Jofré L., Hormázabal J.C., Olea A., Vallebuona C. & Valdés C. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev. Chil. Infectol.* 22 (2): 131-40.
101. Helbling E.W., E.R. Marguet, V.E. Villafane and O. Holhansen: Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 126, 293-298.
102. Hernández C., Ulloa J., Vergara J.A., Espejo R., Cabello F. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile. *Rev. Méd. Chile* 133: 1081-8.
103. Hernández E. A. & Mac Cormack W. P. 2007. Cambios en la viabilidad de dos bacterias marinas antárticas expuestas a la radiación solar en la columna de agua: influencia de la mezcla vertical. *Rev. argent. microbiol.* [online] vol.39 (3): 177-183
104. Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M. & Pommeypuy M. 2002. Ocurrance of pathogenic vibrios in the coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1123-35.
105. Honda S., Goto I., Minematsu I., Ikeda N., Asano N., Ishibashi M., Kinoshita Y., Nishibuchi M. Honda T. & Miwatani T. 1987. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet* I: 331-332.
106. Honda T., Ni Y.X. & Miwatani T. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56(4), 961-965.
107. Honda T., Ni Y. & Miwatani T. 1992. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can. J. Microbiol.* 38: 1175-1180.
108. Honda T. & Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and the related haemolysins. *Rev. Med. Microbiol.* 4:106-113.
109. Honda T., Iida T., Akeda Y. & Kodama T. 2008. Sixty Year of *Vibrio parahaemolyticus* Research. *Microbe* 3 (10): 462-466.

110. Hsieh, Y. C., S. M. Liang, W. L. Tsai, Y. H. Chen, T. Y. Liu, and C. M. Liang. 2003. Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 7:3329-3336.
111. Hsieh J.L., Fries J.S. & Noble R.T. 2008. Dynamics and predictive modelling of *Vibrio* spp. in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Environ. Microbiol.* 10: 57-64.
112. Hugh R. & Feeley J.C. 1972. Report (1966-1970) of the subcommittee on taxonomy of vibrios to the International Committee on Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2: 123-126.
113. Hunter, S. B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M. A., Van Duyne, M. S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T. & Ribot, E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1045–1050.
114. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R. & Colwell R.R.. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.*45: 275-283.
115. Hurley C.C., Quirke A.M., Reen F. J. & Boyd E. F. 2006. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics* 7: 104-122.
116. ICSP-International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* and related organisms <http://www.the-icsp.org/subcoms/vibrionaceae.htm>
117. Iida T., Suthienkul O., Park K.-S., Tang G.-Q., Yamamoto R.K., Ishibashi M., Yamamoto K. & Honda T. 1997. Evidence for genetic linkage the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Med. Microbiol.* 46: 639–645.
118. Iida T. & Kurokawa K. 2006. Comparative genomics: genome configuration and the driving forces in the evolution of vibrios. En: F.L. Thompson, B. Austin & J. Swings (eds). *The Biology of the Vibrios* ASM Press. Washington, D.C. p. 67-75.
119. Ishibashi M., Ohta K., Shimada T., Honda T., Sugiyama J., Miwatani T. & Yokoo H. 2000. Current situation of the combination of the O and K serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* (in Japanese). *Nippon Saikingaku Zasshi* 55: 539-541.
120. Izutsu K, Kurokawa K, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Honda T, Iida T: Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infect. Immun.* 2008, 76(3):1016-1023.

121. Janda J., Powers, C., Bryant R.G. & Abbott S.L. 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin. Rev.* 1: 245-267.
122. Jiang X. & Chai T.J. 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4): 1300-5.
123. Kadokura K, Rokutani A, Yamamoto M, Ikegami T, Sugita H, Itoi S, Hakamata W, Oku T, Nishio T. 2007. Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 357-65.
124. Kam K.M., Luey C.K., Parsons M.B., Cooper K.L., Nair G.B., Alam M., Islam M.A., Cheung D.T., Chu Y.W., Ramamurthy T., Pazhani G.P., Bhattacharya S.K., Watanabe H., Terajima J., Arakawa E., Ratchtrachenchai O.A., Huttayananont S., Ribot E.M., Gerner-Smidt P. & Swaminathan B. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* PulseNet PFGE Protocol Working Group. 2008 Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 46(8): 2766-73.
125. Kamruzzaman M., Bhoopong, P., Vuddhakul V. & Nishibuchi M. 2008. Detection of a functional insertion sequence responsible for deletion of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene.* 421(1-2):67-73.
126. Kaneko T, Colwell R.R. 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Appl. Microbiol.* 29: 269-274.
127. Kaneko T. & Colwell R.R. 1973. Kaneko T. & Colwell, R.R. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113: 24–32.
128. Kaneko T. & Colwell R.R. 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microb. Ecol.* 4: 135-155.
129. Karaolis D.K., Johnson J.A., Baily C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B. & Reeves P.R. 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 17; 95(6): 3134–9.
130. Karentz D. & Lutz L.H. 1990. Evaluation of biologically harmful radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* 35: 549-561.
131. Kaysner C.A. & DePaola A. 2000. Outbreaks of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains. *Journal of Shellfish Research* 19(1): 657.

132. Kaysner C.A. & DePaola A. 2004. Chapter 9: *Vibrio*. En: Bacteriological Analytical Manual - BAM. Center of Food Safety & Applied Nutrition, U.S. Food & Drug Administration - FDA. <http://www.cfsan.fda.gov/mow/chap9>.
133. Kelly M.T. & Stroh E.M. 1988. Occurrence of *Vibrionaceae* in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 9:1-5.
134. Kelly M.T., & Stroh E.M.D. 1988. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *J. Clin. Microbiol.* 26:1754-1756.
135. Khamet A.L., Tabrez S., Link R. & Roberts I. 2001. *Vibrio parahaemolyticus* as a cause for necrotizing fasciitis in a patient with cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* S125.
136. Khan A.A., McCarthy S., Wang R.F. & Cerniglia C.E. 2002. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* Volume 206, Issue 2, pages 209–214.
137. Kishishita M., Matsuoka N., Kumagai K., Yamasaki S., Takeda Y. & Nishibuchi M. 1992. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2449-2457.
138. Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. & Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1173–1177.
139. Kim Y.K. & McCarter L.L. 2000. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182: 3693-3704.
140. Kobayashi T., Enomoto S. & Sakazaki R. 1963. A new selective isolation medium for the vibrio group on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Jpn. J. Bacteriol.* 18: 387-382.
141. Krachler A.M., Ham H. & Orth K. 2011. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 108, 11614-11619.
142. Lasta C.A. & Jaureguizar A. 2006. Ordenamiento ecosistémico del litoral bonaerense. En: Isla F.I & Lasta C.A. 2006. Manual de manejo costero para la provincia de Buenos Aires. Eds: EUDEM, Mar del Plata. Pp. 71-83.
143. Lavilla-Pitogo C., Baticados M., Cruz-Lacierda E. & Dela Peña L. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91: 1-13.

144. Lee C.Y., Pan S.F. & Chen C.H. 1995. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1311–1317
145. Lee C.Y., Cheng C.H., Yu M.J. & Pan S.F. 2002. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 31–37
146. Lee R., Lovatelli A. & Ababouch L. 2010. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. En: FAO, Documento Técnico de Pesca FAO, N° 511. FAO, Roma, Italia.. Div. de Gestión de la Pesca y la Acuicultura, p. 153.
147. Leyton, Y. & Riquelme C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43(3): 441-456.
148. Lim T.K. & Stebbings, A.E. 1999. Fulminant necrotising fasciitis caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Singapore Med. J.* 40, 596-597.
149. Lin Z., Kumagai K., Baba K., Mekalanos J.J. & Nishibuchi M. 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct haemolysin gene. *J. Bacteriol.* 175: 3844–3855.
150. López-Joven M.C. 2012. Epidemiología y cinética de crecimiento y supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España. 261 p.
151. Lozano-León. A., Torres, J., Osorio, C. R. & Martínez-Urtaza., J. 2003. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 281-284.
152. Lucas A.J., Guerrero R.A., Mianzan H., Acha E.M. & Lasta C.A. 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine Continental Shelf (34 - 43°S). *Estuaries, Coastal and Shelf Science* 65: 405-420.
153. Mancilla E. 2005. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuad. Med. Soc. Chile*, 45: 43-47.
154. Makemson J.C., Fulayfil N. & Basson P. 1992. Association of luminous bacteria with artificial and natural surfaces in Arabian Gulf seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2341-2343.
155. Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M. & Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361: 743–9.
156. Martos P, Reta R. & Guerrero R. 2004. El ambiente físico de las costas marplatenses: su clima y sus aguas. En: Boschi E. & Cousseau B. (Eds.) La

- vida entre mareas: vegetales y animales de las costas de Mar del Plata, Argentina. Cap. 2: 29-42. INIDEP, Argentina.
157. McCarter L.L. & Wright M.E. 1993. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 175: 3361-3371.
 158. McCarthy S.A. & Khambaty F.M. 1994. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2597–2601.
 159. McCarthy S.A., DePaola A., Kaysner C.A., Hill W.E. & Cook D.W. 2000. Evaluation of nonisotopic DNA hybridization methods for detection of the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Protect.* 63: 1660-1664.
 160. McCullagh P. & Nelder J. 1989. Generalized linear models, Second Edition. Taylor & Francis (Eds). 532 pp.
 161. Maeda T., Matsuo Y., Furushita M. & Shiba T. 2003. Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA. *Fish. Sci.* 69: 385-394.
 162. McLaughlin J.B., DePaola A., Bopp C.A., Martinek K.A. & Napol N.P. 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New Engl. J. Med.* 353: 1463-1470.
 163. Mahmud, Z.H., Beogi, S.B., Kassu, A., Mai Huong, B.T., Jahid, I.K., Islam, M.S. y Ota, F. 2008. Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Chanel, Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, pp: 209-218.
 164. Martínez-Urtaza J., Lozano-León A., DePaola A., Ishibashi M., Shimada K., Nishibuchi M. & Liebana E. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4672–4678.
 165. Martínez-Urtaza J., Huapaya B., Gavilán R.G., Blanco- Abad V., Ansedo-Bermejo J., Cadarso-Suarez C., Adolfo Figueiras A. & Trinanes J. 2008. Emergence of asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. *Epidemiology* 19(6): 829-37.
 166. Martínez-Urtaza J., Bowers J., Trinanes J. & DePaola A. 2010. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International* 43 (7): 1780-90.
 167. Matsumoto C.S., Fishbein T.M. & Kaufman S. 2004. Gastrointestinal infections in solid organ transplant recipients. *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 9: 406-10.
 168. Matz C., Nouri B., McCarter L., Martinez-Urtaza J. 2011. Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* in the interaction with bacterivorous protists. *PLoS One* 6: e20275. doi:10.1371/journal.pone.0020275.

169. Miles D.W., Ross T., Olley J. & McMeekin T.A. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and aw on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Inter. J. Food Microbiol.* 3 (2-3): 133-142.
170. MINSAL-Ministerio de Salud de Chile. 2011. Informe Final Brote de Gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus*. 2011. Unidad De Vigilancia Epidemiológica, Departamento De Epidemiología, Diplas.
171. Miravet M.E. 2003. Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadores ambientales. Tesis de Doctorado. UH. Cuba.
172. Miwa N., Nishio T., Arita Y., Kawamori F., Masuda T. & Akiyama M. 2003. Evaluation of MPN method combined with PCR procedure for detection and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, 44(6): 289-293.
173. Monticelli L., Costagliola M. & Carella E. 1991 Estudio microbiológico del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) comercializado en el Puerto de Mar del Plata. *Frente Marítimo* 9: 137-143.
174. Morris J.G., 2003. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clin. Infect. Dis.* 37: 272-280.
175. Moss S.M., LeaMaster B.R. & Sweeney J.N. 2000. Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *J. World Aquacul. Soc.* 31: 255-263.
176. Nair B.G. & Hormazábal Opazo JC. 2005. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. *Rev. Chil. Infectol.* [revista en Internet] 22(2): 125-130. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182005000200002 & lng=es. doi: 10.4067/S0716-10182005000200002
177. Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Dutta B., Takeda Y. & Sack D.A. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (1): 39-48.
178. Nagayama K., Yamamoto K, Mitawani T, Honda T. 1995. Purification and Characterization of a Cell-associated Hemagglutinin of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 5: 1987-1992.
179. Nakaguchi Y., Okuda J., Lida T. & Nishibuchi M. 2003. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene. *Microbiol. Immunol.* 47: 233-239
180. Nakasone N. & Iwanaga M. 1990. Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor. *Infect Immun.* 58(1): 61-9.

181. Niimi A.J. 2004. Role of container vessels in the introduction of exotic species. *Marine Pollution Bulletin* 49: 778–782.
182. Nishiguchi MK. 2000. Temperature affects species distribution in symbiotic populations of *Vibrio* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3550-3555.
183. Nishibuchi M. & De Paola A. 2005. *Vibrio* species. Cap. 12, p 253-254. En: Foodborne Pathogens, Microbiology and Molecular Biology. Ed: Fratamico P., Bhunia A.K & Smith J.L. Caister Academics Press. Grain Britain.
184. Nishibuchi M., Fasano A., Russell R.G., Kaper J.B. 1992. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* 60: 3539-3545.
185. Nishibuchi M., Taniguchi T., Misawa T., Khaeomanee-lam V., Honda T. & Miwatani T. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 57, 2691–2697.
186. Nishibuchi, M. & Kaper, J.B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity* 63: 2093-2099.
187. Okada K., Iida T., Kita-Tsukamoto K. & Honda T. 2005. Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.* 187:752–757.
188. Okada N., Iida T., Park K.S., Goto N., Yasunaga T., Hiyoshi H., Matsuda S., Kodama T. & Honda T. 2009. Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infect Immun* 77: 904–913.
189. Okuda J., Ishibashi M., Hayakawa E., Nishino T., Takeda Y., Mukhopadhyay A.K., Garg S., Bhattacharya S.K., Nair G.B. & Nishibuchi M. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3150-3155.
190. Oliveira W.K. et al. 2002. Investigación de surto de gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará, Setembro, 2002. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*: 4 (2); p.5-7.
191. Oliver J.D. & Kaper J.B. 1997. *Vibrio* species. En: Food microbiology-Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., y Montville, T.J. Washington D.C. ASM Press. pp: 228-264.
192. Oliver J.D. 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.*, Vol. 43, special issue (No. S): 93-100.
193. Osawa R., Okitsu T., Morozumi H. & Yamai S. 1996. Occurrence of urease positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa Japan with specific reference to

- presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH- related hemolysingenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:725-727.
194. Ottaviani D., Leoni F., Serra R., Serracca L., Decastelli L., Rocchegiani E., Masini L., Canonico C., Talevi G. & Carraturo A. 2012. Nontoxicogenic *Vibrio parahaemolyticus* Strains Causing Acute Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 50(12): 4141– 4143.
 195. Oxley A.P., Shipton W., Owens L. & McKay D. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J. Appl. Microbiol.* 93: 214-223.
 196. Pace J.L., Chai T.J., Rossi H.A. & Jiang X. 1997. Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2372-2377.
 197. Pacini F. 1854. Osservazioni microscopiche e deduzione patologiche sul colera asiatico. *Gazette Medicale de Italiana Toscano Firenze* 6: 405-412.
 198. Pardío Sedas, V.T. 2008. Impact of climate and environmental factors on the epidemiology of *Vibrio cholerae* in Aquatic Ecosystems. En: Marine Pollution: New Research. T.N. Hofer, ed. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge NY, USA. Pp.221-254.
 199. Parija S.C. 2009. *Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas* 35: (316) En: Textbook of Microbiology & Immunology. Ed. Elsevier, India. 700 p.
 200. Park K.S., Iida T., Yamaichi Y., Oyagi T., Yamamoto K. & Honda T. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 68: 5742–5748.
 201. Park K.S., Iida T., Yamaichi Y., Oyagi T., Yamamoto K., & Honda T. 2002. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 68: 5742–5748.
 202. Park K.S., Ono T., Rokuda M., Jang M.H., Okada K., Iida T. & Honda, T. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 72: 6659–65. doi: 10.1128/IAI.72.11.6659-6665.2004.
 203. Parsons M.B., Cooper K.L., Kubota K.A., Pühr N., Simington S., Calimlim P.S., Schoonmaker-Bopp D., Bopp C., Swaminathan B., Gerner-Smidt P. & Ribot E. M.. 2007. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4:285-292.
 204. Pascual Anderson M.R. & Calderón y Pascual V. 1999. Investigación y recuento de *Vibrio parahaemolyticus*. En: Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, Cap. 15: 127-140. Ed. Díaz de Santos, España. 464 p.

205. Power U.F., & Collins J.K. 1990. Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl. Environ. Microbiol*, 56: 803-807.
206. Puerta Henche B. 1995. Biología de los moluscos bivalvos. *En: La depuración de los moluscos bivalvos*. Fundación Caixa Galicia, Santiago de Compostela, pp. 33-45.
207. Pujalte M.J., Ortigosa M., Macián M.C. & Garay E. 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Inter. Microbiol.* 2: 259-266.
208. Qadri F., Alam M. S., Nishibuchi M., Rahman T., Alam N. H., Chisti J., Kondo S., Sugiyama J., Bhuiyan N.A., Mathan M.M, Sack D.A., Nair GB. 2003. Adaptive and inflammatory immune responses in patients infected with strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Infect. Dis.* 187: 1085–1096.
209. Raghunath P., Karunasagar M. & Karunasagar I. 2009. Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth. *Inter. J. Food Microbiol.* 129: 200–203.
210. Raimondi F., Kao J.P., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A. & Fasano A. 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infect Immun.* 68: 3180–3185.
211. Ramamurthy T. & Nair B.G. 2005. *Vibrio Parahaemolyticus*: The Threat of Another *Vibrio* Acquiring Pandemic Potential. *En: Ramaiah, N. (Ed.) Marine Microbiology: Facets & Opportunities*. Chapter 11: 103-113. Disponible en: <http://drs.nio.org/drs/handle/2264/76>.
212. Ramesh A. & Venugopalan V.K. 1989. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 529-533.
213. Rehnstam-Holm A.-S., Godhe, K. Härnström A., Raghunath P.R., Saravanan V., Kronkvist B., Karunasagar I., Karunasagar I. 2010. Association between phytoplankton and *Vibrio* spp along the southwest coast of India—a mesocosm experiment. *Aquatic Microbial Ecology* 58: 127-139.
214. Rippey S.R. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 419-425.
215. Robert-Pillot A., Guénole A., Lesne J., Delesmont R., Fournier J.M. & Quilici M.L. 2004. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int. J. Food Microbiol.* 91:319–325.
216. Rodríguez-Castro A.M. 2012. Origen, distribución y caracterización de vibrios patógenos en humanos en el medio ambiente de Galicia. Tesis doctoral

- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela. 211 pp.
217. Rosenberg E. & Koren O. 2006. Vibrios in coral health and disease. The biology of vibrios, 16: 231-238. ASM Press, Washington DC.
 218. Rowe-Magnus D.A., Zouine M. & Mazel D. 2006. The adaptive genetic arsenal of pathogenic *Vibrio* species: the role of integrons. The biology of vibrios 8: 95-111. ASM Press, Washington DC.
 219. Ruiz G.M., Rawlings T.K., Dobbs F.C., Drake L.A., Mullady T., Huq A. & Colwell R.R. 2000. Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408, 49–50.
 220. Ruiz C. & Agraharkar M. 2003. Unusual marine pathogens causing cellulitis and bacteremia in hemodialysis patients: report of the three cases and review of the literature. *Hemodial. Int.* 7: 356-9.
 221. Sanyal S.C. & Sen P.C. 1974. Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. En: Internacional Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Fujimo T., Sakaguchi G., Sakazaki R., y Takeda Y. Tokyo. p: 227-230.
 222. Sakazaki R., Iwanami S., & Fukumi H. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomic position. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 16: 161-188.
 223. Sakazaki R. 1968a. Proposa1 of *Vibrio a1gino1yticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 21: 359-362.
 224. Sakazaki R, Iwanami S. & Tamura K. 1968 Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. II. Serological characteristics. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 21(5): 313–324.
 225. Sawabe T., Oda Y., Shiomi Y. & Ezura Y. 1995. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microbial Ecology* 30: 192-202.
 226. Sawabe T., Setogushi N., Inoue S., Tanaka R., Ootsubo M., Yoshimizu M. & Ezura Y. 2003. Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone - *V. halioticoli* association. *Aquaculture* 219: 671-679.
 227. Sawabe T. 2006. The mutual partnership between *Vibrio halioticoli* and abalones. The biology of vibrios, 15: 219- 230. ASM Press, Washington DC.
 228. Shankar V.K., Zilvetti M., Handa A., Bowler I.C. & Gray D.W. 2004. Chronic diarrhea and weight loss due to *Vibrio parahaemolyticus* infection in a renal transplant recipient. *Transplantation* 78: 487.
 229. Shinoda S., Matsuoaka H., Tsuchie T., Miyoshi S.I., Yamamoto S., Taniguchi H., Mizuguchi Y. 1991. Purification and characterization of a lecithin-dependent

- haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2705-2711.
230. Silva San Cristóbal W., Olea A, Cachicas Cubillos V., Fernández Órdenes J., Ibáñez Cabrera D., Hormazábal J.C., García Moreno J. & Maldonado Ballesteros A. 2008. Aislamiento, Identificación y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Manual de Procedimientos. OPS. Ministerio de Salud - Instituto de Salud Pública. Chile.
231. Sokal R.R. & Rohlf F.J. 1981 *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman, San Francisco, CA.
232. Su Y.C. & Liu C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 24: 549–558.
233. Suantika G., Dhert P., Rombaut G., Vanderberghe J., De Wolf T. & Sorgeloos P. 2001. The use of ozone in a high density recirculation system for rotifers. *Aquaculture* 201: 35-49.
234. Suffredini E., Lopez-Joven C., Maddalena L., Croci L. & Roque A. 2011. Pulsed-field gel electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.*; 77 (17):6301-4.
235. Sudheesh P.S. & Xu H.S. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196(1-2):37-46.
236. 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: 1405-1408.
237. Takeda Y. 1983. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharm. Ther.* 19, 123–146.
238. Taniguchi H., Hirano H., Kubomura S., Higashi K. & Mizuguchi Y. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathog.* 1: 425-432.
239. Taniguchi H., Kubomura S., Hirano H., Mizue K., Ogawa M. & Mizuguchi Y. 1990 Cloning and characterization of a gene encoding a new thermostable haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 339–346.
240. Tanil G. B., Son R., Nishibuchi M., Raha A. R., Napis S., Maurice L. & Gunsalam J. W. 2005. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36: 940-5.

241. Tantillo G.M., Fontanarosa M., Di Pinto A. & Musti M. 2004. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 117-26.
242. Tena D., Arias M., Alvarez B.T., Mauleón C., Jiménez M.P. & Bisquert J. 2010. Fulminant necrotizing fasciitis due to *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Med. Microbiol.* 59: 235–8.
243. Terai A., Baba K., Shirai H., Yoshida O., Takeda O. & Nishibuchi M. 1991. Evidence for Insertion Sequence-Mediated Spread of the Thermostable Direct Hemolysin Gene among *Vibrio* Species. *Journal of Bacteriology* 173:5036-5046.
244. Thompson F.L., Iida T., Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (3): 403-31.
245. Thompson J.R., Randa M.A., Marcelino L.A., Tomita- Mitchell A., Lim E. & Polz M.F. 2004. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4103-4110.
246. Thompson J.R. & Polz M.F. 2006. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*, 13: 190-203. ASM Press, Washington DC.
247. Thompson F.L. & Swings J. 2006. Taxonomy of the Vibrios. In: Thompson F.L., Austin B. & Swings J., editors. *The biology of Vibrios*. Washington DC: ASM Press.
248. Tison D.L., Nishibuchi M., Greenwood J.D. & Seidler R.J. 1982. *Vibrio vulnificus* biogroup 2: a new biogroup pathogenic for eels. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 640- 646.
249. Turbett G.R., Høj P.B., Horne R., & Mee B.J. 1992. Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals. *Infect. Immun.* 60, 5259–5266.
250. Urakawa H. & Rivera I.N. 2006. Aquatic environment. *The biology of vibrios*, 12: 175-189. ASM Press, Washington DC.
251. Verón, M. 1965. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *Comptes Rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences.* 261(23): 5243-5246.
252. Vincent, W. F. y Neale, P. J. 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In S. J. de Mora et al. (eds.): *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. Pp 149-156. Cambridge: Cambridge University Press, UK.
253. Wang Y.W., Chern L.L., Cam P.D. & Chiou C.S. 2008. Evaluation of restriction enzymes for standardizing pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61: 251–255.

254. Watnick P.L., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L. & Kolter R.. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology* 39: 223-235.
255. Wong H.C., Liu S.H., Ku L.W., Lee I.Y., Wang T.K., Lee Y.S., Lee C.L., Kuo L.P., & Shih D.Y.C. 2000. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J. Food. Protec.* 63: 900–906.
256. Wong H.C. & Lin C. 2001. Evaluation of Typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Three PCR Methods Using Specific Primers. *J. Clin. Microbiol.* 39(12): 4233–4240.
257. Wong H.C. & Wang P. 2004 Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 96: 359-366.
258. Wong H.C., Wang P., Chen S.Y. & Chiu S.W. 2004. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 269-275.
259. Wong H.C., Chen C.H., Chung Y.J., Liu S.H., Wang T.K., Lee C.L., Chiou C.S., Nishibuchi M. & Lee B.K. 2005. Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. *J. Appl. Microbiol.* 98: 572-580.
260. Wong H.C., Liu S.H., Chiou C.S., Nishibuchi M., Lee B.K., Suthienkul O., Nair G.B., Kaysner C.A., Taniguchi H. 2007. A pulsed-field gel electrophoresis typing scheme for *Vibrio parahaemolyticus* isolates from fifteen countries. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 280–287.
261. Worden A.Z., Seidel M., Smriga S., Wick A., Malfatti F., Bartlett D. & Azam F. 2006. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environ. Microbiol.* 8: 21-29.
262. Wright A.C., Hill R.T., Johnson J.A., Roghman M.C., Colwell R.R. & Morris J.G. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 717-724.
263. Xu M., Yamamoto K., Honda T. 1994. Construction and characterization of an isogenic mutant of *Vibrio parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) *J. Bacteriol.* 176: 4757–4760.
264. Yamaichi Y., Iida T., Park K.S., Yamamoto K., Honda T. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.* 31: 1513–1521.
265. Yamamoto S., Funahashi T., Ikai H. & Shinoda S. 1997. Cloning and sequencing of the *Vibrio parahaemolyticus* fur gene. *Microbiol. Immunol.* 41: 737-740.

-
266. Yamanoi H., Muroga K. & Takahashi S. 1980. Physiological characteristics and pathogenicity of NAG *vibrio* isolated from diseased ayu. *Fish Pathology* 15: 69-73.
267. Yeung P.S. & Boor K.J. 2004. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog. Dis.* 1:74-88.
268. Yoon K.S., Min K.J., Jung Y.J., Kwon K.Y., Lee J.K. & Oh S.W. 2008. A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiology* 25: 635-641.
269. Zhang L. & Orth K. 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 16:70–77.
270. Zen-Yoji H., Sakai S., Terayama T., Kudo Y., Ito T., Benoki M. & Nagasaki M. 1965. Epidemiology, Enteropathogenicity and Clasifications Disease. *J. Inf. Dis.* 115: 436-444.

A1. Detalle de las muestras de agua, datos físico-químicos obtenidos por muestreo y resultados de la detección de *V. parahaemolyticus*.

Muestreo	Fecha	Sitio	Muestra	T°C	Sal.(ups)	pH	+/-	TCBS Col. Verde- azuladas	CAV Col. púrpuras	+toxR	+tdh/trh
1º	29/10/08	VG	Agua	15	32,97	8,2	-	1	0	0	0
		ST	Agua	15,3	30,23	8	+	4	4	4	0
2º	18/11/08	VG	Agua	16	33,75	8	-	0	0	0	0
		ST	Agua	18	24,83	8	+	2	2	2	0
3º	11/12/08	VG	Agua	18	30,7	8	+	4	2	2	0
		ST	Agua	19	30,05	8	+	2	1	1	0
4º	7/01/09	VG	Agua	19,5	32,43	8	-	0	0	0	0
		ST	Agua	22,5	27,56	7	-	3	0	0	0
5º	21/01/09	VG	Agua	21,5	32,74	7,5	+	2	2	2	0
		ST	Agua	23,2	28,42	7,2	+	3	3	3	0
6º	18/02/09	VG	Agua	21	29,89	7,5	+	5	2	2	0
		ST	Agua	24	26,83	7	+	3	2	2	0
7º	04/03/09	VG	Agua	20,5	31,02	7,8	+	3	2	2	0
		ST	Agua	22,3	24,86	7,8	+	3	2	2	0
8º	18/03/09	VG	Agua	20	31,47	8	+	5	4	4	0
		ST	Agua	22	27,26	8	+	5	5	5	0
9º	31/03/09	VG	Agua	20	31,22	8	+	1	1	1	0
		ST	Agua	22	28,20	8	+	3	3	3	0
10º	22/04/09	VG	Agua	16,5	32,60	7,5	-	1	0	0	0
		ST	Agua	19	26,22	7,5	-	4	0	0	0
11º	12/5/09	MA	Agua	13,5	33,41	8	-	3	3	0	0
12º	12/6/09	MA	Agua	10	34,31	8,5	-	4	0	0	0
13º	16/7/09	MA	Agua	8	34,22	8,5	-	0	0	0	0
14º	5/08/09	MA	Agua	9	34,04	8	-	3	0	0	0
15º	28/8/09	MA	Agua	11	34,18	8	-	0	0	0	0
16º	16/9/09	MA	Agua	12	33,92	8	-	2	0	0	0
n = 26								66	38	35	0

VG: Villa Gesell, ST: Santa Teresita, MA: Mar Azul; T°C: temperatura (grados centígrados); Sal. (ups): salinidad (unidades prácticas de salinidad); +/-: presencia/ausencia de *V. parahaemolyticus*; TCBS col. verde-azuladas: agar TCBS n° de colonias verde-azuladas seleccionadas; CAV col. púrpuras: agar CHROMAgar *Vibrio*, n° de colonias púrpuras seleccionadas; +toxR: n° de aislamientos positivos para el gen *toxR*, +tdh/trh: n° de aislamientos positivos para genes *tdh* y/o *trh*.

A2. Detalle de las muestras de sedimento, datos físico-químicos obtenidos por muestreo y resultados de la detección de *V. parahaemolyticus*.

Muestreo	Fecha	Sitio	Muestra	T°C	Sal.(ups)	pH	NMP/g	TCBS Col.verde- azuladas	CAV Col. púrpuras	+toxR	+tdh/trh
1°	29/10/08	VG	Sedimento	15	32,97	8,2	<0,3	2	2	0	0
		ST	Sedimento	15,3	30,23	8	<0,3	2	0	0	0
2°	18/11/08	VG	Sedimento	16	33,75	8	<0,3	0	0	0	0
		ST	Sedimento	18	24,83	8	<0,3	0	0	0	0
3°	11/12/08	VG	Sedimento	18	30,7	8	<0,3	3	0	0	0
		ST	Sedimento	19	30,05	8	0,36	4	2	2	0
4°	7/01/09	VG	Sedimento	19,5	32,43	8	<0,3	3	2	0	0
		ST	Sedimento	22,5	27,56	7	9,1	7	4	4	0
5°	21/01/09	VG	Sedimento	21,5	32,74	7,5	0,36	5	3	3	0
		ST	Sedimento	23,2	28,42	7,2	21	13	10	7	0
6°	18/02/09	VG	Sedimento	21	29,89	7,5	<0,3	5	0	0	0
		ST	Sedimento	24	26,83	7	9,1	3	2	2	0
7°	04/03/09	VG	Sedimento	20,5	31,02	7,8	<0,3	10	5	0	0
		ST	Sedimento	22,3	24,86	7,8	<0,3	6	0	0	0
8°	18/03/09	VG	Sedimento	20	31,47	8	<0,3	1	0	0	0
		ST	Sedimento	22	27,26	8	<0,3	10	0	0	0
9°	31/03/09	VG	Sedimento	20	31,22	8	<0,3	2	0	0	0
		ST	Sedimento	22	28,20	8	<0,3	3	0	0	0
10°	22/04/09	VG	Sedimento	16,5	32,60	7,5	<0,3	1	1	0	0
		ST	Sedimento	19	26,22	7,5	15	22	7	5	0
11°	12/5/09	MA	Sedimento	13,5	33,41	8	<0,3	3	0	0	0
12°	12/6/09	MA	Sedimento	10	34,31	8,5	<0,3	0	0	0	0
13°	16/7/09	MA	Sedimento	8	34,22	8,5	<0,3	0	0	0	0
14°	5/08/09	MA	Sedimento	9	34,04	8	<0,3	0	0	0	0
15°	28/8/09	MA	Sedimento	11	34,18	8	<0,3	0	0	0	0
16°	16/9/09	MA	Sedimento	12	33,92	8	<0,3	0	0	0	0
n = 26								105	38	23	0

VG: Villa Gesell, ST: Santa Teresita, MA: Mar Azul; T°C: temperatura (grados centígrados); Sal. (ups): salinidad (unidades prácticas de salinidad); NMP/g: Número Más Probable de *V. parahaemolyticus* por gramo; TCBS col. verde-azuladas: agar TCBS n° de colonias verde-azuladas seleccionadas; CAV col. púrpuras: agar CHROMAgar *Vibrio*, n° de colonias púrpuras seleccionadas; +toxR: n° de aislamientos positivos para el gen *toxR*, +tdh/trh: n° de aislamientos positivos para genes *tdh* y/o *trh*.

A3. Detalle de las muestras de moluscos bivalvos, datos físico-químicos obtenidos por muestreo y resultados de la detección de *V. parahaemolyticus*.

Muestreo	Fecha	Sitio	Muestra	T°C	Sal.(ups)	pH	NMP/g	TCBS colonias verde- azuladas	CAV Colonias púrpuras	+ <i>toxR</i>	+ <i>tdh</i> / <i>trh</i>
1°	29/10/08	VG	Berberechos	15	32,97	8,2	<0,3	3	0	0	0
		ST	Mejillines	15,3	30,23	8	<0,3	9	1	0	0
2°	18/11/08	VG	Berberechos	16	33,75	8	<0,3	0	0	0	0
		ST	Berberechos	18	24,83	8	0,36	1	1	1	0
3°	11/12/08	VG	Berberechos	18	30,7	8	<0,3	5	0	0	0
		ST	Mejillines	19	30,05	8	28	12	6	6	0
4°	7/01/09	VG	Mejillines	19,5	32,43	8	7,3	4	3	3	0
		ST	Mejillines	22,5	27,56	7	34	16	12	12	0
5°	21/01/09	MA	Berberechos	21,5	32,74	7,5	9,1	13	4	4	1
6°	18/02/09	MA	Berberechos	21	29,89	7,5	20	8	5	5	0
7°	04/03/09	MA	Berberechos	20,5	31,02	7,8	11	16	12	11	0
8°	18/03/09	MA	Berberechos	20	31,47	8	<0,3	9	1	0	0
9°	31/03/09	MA	Berberechos	20	31,22	8	<0,3	1	0	0	0
10°	22/04/09	MA	Berberechos	16,5	32,60	7,5	<0,3	5	0	0	0
11°	12/5/09	MA	Berberechos	13,5	33,41	8	<0,3	0	0	0	0
			Almejas	13,5	33,41	8	<0,3	7	0	0	0
12°	12/6/09	MA	Berberechos	10	34,31	8,5	<0,3	4	0	0	0
13°	16/7/09	MA	Berberechos	8	34,22	8,5	<0,3	3	0	0	0
14°	5/08/09	MA	Berberechos	9	34,04	8	<0,3	2	0	0	0
15°	28/8/09	MA	Berberechos	11	34,18	8	<0,3	0	0	0	0
16°	16/9/09	MA	Berberechos	12	33,92	8	<0,3	0	0	0	0
		ST	Almejas	12	32,04	8	<0,3	0	0	0	0
n = 22								118	45	42	1

VG: Villa Gesell, ST: Santa Teresita, MA: Mar Azul; T°C: temperatura (grados centígrados); Sal. (ups): salinidad (unidades prácticas de salinidad); NMP/g: Número Más Probable de *V. parahaemolyticus* por gramo; TCBS col. verde-azuladas: agar TCBS n° de colonias verde-azuladas seleccionadas; CAV col. púrpuras: agar CHROMAgar *Vibrio*, n° de colonias púrpuras seleccionadas; +*toxR*: n° de aislamientos positivos para el gen *toxR*, +*tdh/trh*: n° de aislamientos positivos para genes *tdh* y/o *trh*.

A4. Detalle de los resultados de los parámetros físico-químicos obtenidos en cada muestreo. Se muestran datos de temperatura del agua de mar (°C), salinidad (ups) y pH.

Muestreo	Fecha	Temperatura		Salinidad		pH	
		°C		ups			
		VG/MA	ST	VG/MA	ST	VG/MA	ST
1°	29/10/08	15	15,3	32,97	30,23	8,2	8
2°	18/11/08	16	18	33,75	24,83	8	8
3°	11/12/08	18	19	30,7	30,05	8	8
4°	07/01/09	19,5	22,5	32,43	27,56	8	7
5°	21/01/09	21,5	23,2	32,74	28,42	7,5	7,5
6°	18/02/09	21	24	29,89	26,84	7,5	7
7°	04/03/09	20,5	22,3	31,02	24,86	8	8
8°	18/03/09	20	22	31,47	27,26	8	8
9°	31/03/09	20	22	31,22	28,20	8	8
10°	22/04/09	16,5	19	32,60	26,22	7,5	7,5
11°	12/05/09	13,5	-	33,41	-	8	-
12°	12/06/09	10	-	34,31	-	8,5	-
13°	16/07/09	8	-	34,22	-	8,5	-
14°	05/08/09	9	-	34,04	-	8	-
15°	28/08/09	11	-	34,18	-	8	-
16°	16/09/09	12	-	33,92	-	8	-

VG: Villa Gesell, ST: Santa Teresita, MA: Mar Azul;