

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

Tipificación molecular de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* aislados en México

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta

Carlos Abraham Guerrero Ruíz

Ensenada Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Carlos Abraham Guerrero Ruíz

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida
Director del Comité

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Miembro del Comité

Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinadora del Posgrado en
Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Marzo, 2015

Resumen de tesis que presenta el MC. **Carlos Abraham Guerrero Ruíz** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en el posgrado en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Tipificación molecular de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* aislados en México

Resumen elaborado por:

MC. Carlos Abraham Guerrero Ruíz

Las bacterias del género *Vibrio* son organismos con amplia distribución en el medio marino. Los hábitos alimenticios de los moluscos bivalvos tienden a concentrar bacterias, algunas de ellas patógenas para el humano, tales como *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, por lo que su caracterización molecular es relevante en estudios epidemiológicos. En el presente trabajo se aislaron cepas de ambas especies en muestras de ostiones y cepas asociadas a casos de infección en humanos. Las cepas fueron analizadas por diferentes métodos moleculares entre los que se incluye electroforesis de gel en campos pulsados (PFGE), análisis de secuencias multilocus (MLST) y secuenciación de genes implicados en su patogenicidad. Los resultados indican que las cepas obtenidas de muestras ambientales presentan características moleculares similares a las obtenidas de casos clínicos para ambas especies. La mayoría de las cepas patógenas (*tdh*⁺) de *V. parahaemolyticus* fueron tipificadas como pandémicas (ORF8/O3:K6), mostrando que la incidencia de esta cepa se registra en México desde 1998 y presenta las características moleculares del clon aislado desde 1996 en el sureste asiático (ST-3/CC3), el cual ha sido posteriormente detectado en diferentes países. Las cepas de *V. vulnificus* aisladas de ostiones, presentaron las características moleculares del genotipo ambiental (E) y del genotipo clínico (C), lo cual concuerda con lo previamente reportado para esta especie; sin embargo, la alta incidencia del genotipo-C obtenida en el presente trabajo discrepa con las bajas concentraciones comúnmente reportadas en muestras ambientales. Los oligonucleótidos desarrollados en el presente estudio para la caracterización molecular del gen *rtxA1*, fueron utilizados para discriminar los genotipos y las variantes *rtxA1*-M y *rtxA1*-C en *V. vulnificus*, demostrando que estos pueden ser empleados con resultados similares previamente descritos por otros autores. Los análisis tanto por MLST como por secuenciación del gen *rtxA1* indican que las cepas de *V. vulnificus* del genotipo-C aisladas en muestras de ostiones presentan alta similitud genética con las cepas del mismo genotipo, señaladas como altamente patógenas y aisladas de casos clínicos. La similitud genética de las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aisladas en México, con las previamente aisladas en otros países de casos clínicos, indica el potencial patogénico de las cepas aisladas de muestras ambientales y el riesgo sanitario que representan para el humano.

Palabras clave: Epidemiología de vibrios patógenos, PFGE, MLST, O3:K6, *rtxA1*, enfermedades infecciosas, inocuidad en ostiones, bacteriología marina, Biotecnología marina.

Abstract of the thesis presented by MS. **Carlos Abraham Guerrero Ruíz** as a partial requirement to obtain the PhD degree in Science with orientation in Marine Biotechnology.

Molecular typification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolated in Mexico.

Abstract by:

MS. Carlos Abraham Guerrero Ruíz

Vibrio bacteria are wide distributed in the marine environment. Bivalves with filter feeding habits, tend to concentrate bacteria, some of them pathogenic for humans, as *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*, therefore study their molecular characteristics is relevant in epidemiology. For that purpose, strains of both species were isolated from oysters samples and clinical cases. The strains were analyzed with different molecular approaches, which include pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and genes associated to pathogenesis. The results show that the strains isolated from the environment present molecular characteristics similar to those isolated from clinical cases for both species. Most of the pathogenic (*tdh*⁺) *V. parahaemolyticus* strains were typified as pandemic strains (ORF8/O3:K6), indicating that this serotype has been recorded in Mexico from 1998 to 2012 and presented the molecular characteristics of the pandemic clone (ST-3/CC3), isolated since 1996 in the southeast Asia and afterward reported worldwide. *V. vulnificus* strains isolated from oysters were typified as belonging to the environmental (E) and the clinical (C) genotype, in agreement with previous reports; nevertheless the high incidence of the C-genotype obtained in the present study, differs from the low concentration commonly reported in environmental samples. The primers designed for the detection and characterization of the *rtxA1* gene in *V. vulnificus*, were used to discriminate among the genotypes and the variants of *rtxA1*-M and *rtxA1*-C, with similar results as those previously reported by other authors. The analysis with MLST and the sequences of *rtxA1* gene, indicate that *V. vulnificus* strains isolated from oysters samples with C-genotype, presents high genetic similarity with high pathogenic C-genotype strains isolated from clinical cases. The genetic similarity of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* strains isolated in Mexico from environmental samples, with pathogenic strains isolated from clinical cases, indicate their high potential pathogenicity and sanitary risk for humans.

Keywords: Epidemiology of pathogenic vibrios spp., PFGE, MLST, O3:K6, *rtxA1*, infectious diseases, oysters, marine bacteriology, marine biotechnology.

Dedicatoria

En Memoria de

María Guadalupe Ruíz Rodríguez

y

Cecilia Rodríguez Bustamante

Agradecimientos

Al CICESE y su personal académico por permitirme realizar mi formación académica; al programa de Ciencias de la Vida, a sus investigadores y compañeros de Biotecnología Marina, muy en especial a Valeria Revilla, Jairo Fuentes, Alexander Lichius, Félix Olivares, Pavel Lugo, Tanya Camacho, Edna Sánchez, Ricardo Gonzáles, Alejandro Sánchez y Guadalupe Vargas.

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida, que me permitió realizar el presente estudio y que en gran medida es parte importante de mi formación académica y del conocimiento generado en el presente trabajo.

Al Dr. Bruno Gómez-Gil, que mucho del conocimiento generado en el presente estudio fue debido a su dirección y recomendaciones.

A la MC. Irma Wong Chang, al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y a las granjas ostrícolas que participaron en el presente estudio, que con su colaboración fueron de gran importancia para la obtención de material biológico.

A mis sinodales el Dr. Alexei Licea y Helmut Maske que con sus comentarios y críticas permitieron que el presente trabajo integrará diferentes áreas del conocimiento.

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD) unidad Mazatlán que me permitió realizar algunos de los análisis de la tesis; muy en especial al equipo de trabajo del Dr. Bruno Gómez-Gil conformado por Julissa Enciso, Carmen Bolán, Iliana Guardiola, Iliana Espinoza, Itzelsi Fuentes, Mily Laurel y Erick Navarro.

A mi familia muy en especial a mi Madre María Guadalupe Ruíz Rodríguez, Cecilia Rodríguez Bustamante, a mi sobrina Brytani, a mis hermanos Brenda, Víctor y al resto de mi familia que siempre me han alentado a seguir adelante.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que a través de su Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) me otorgó la beca y que mediante el Fondo Sectorial Salud-CONACyT financió el proyecto S008-2009-1114024 a cargo del Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida el cual permitió realizar los estudios aquí descritos.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español.....	i
Resumen Inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Objetivo general.....	2
1.3 Objetivos específicos.....	2
1.4 Hipótesis.....	3
Capítulo 2. Antecedentes.....	4
2.1 El género <i>Vibrio</i>	4
2.1.1 Aspectos ecológicos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	4
2.1.1.1 Temperatura	5
2.1.1.2 Salinidad	5
2.1.2 Presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> en México.....	5
2.1.3 Moluscos como vector de vibrios patógenos.....	7
2.1.4 Producción de ostión en Baja California	7
2.2 Epidemiología de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	8
2.2.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
2.2.2 <i>Vibrio vulnificus</i>	9
2.2.2.1 Genotipos de <i>Vibrio vulnificus</i>	9
2.3 Infección por <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	10
2.3.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11
2.3.2 <i>Vibrio vulnificus</i>	11
2.4 Patogenicidad.....	11
2.4.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12
2.4.2 Gen <i>rtxA1</i> , como factor de patogenicidad en <i>Vibrio vulnificus</i>	12
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	15
3.1 Aislamiento de bacterias patógenas en bivalvos	15
3.1.1 Península de Baja California	15
3.1.2 Mercado de mariscos La Nueva Viga	15
3.1.3 Cepas de colección	15
3.2 Procesamiento de las muestras	16
3.2.1 Aislamiento de las cepas.....	16

Tabla de contenido (continuación)

	Página	
3.3	Identificación molecular de las especies y sus factores de patogenicidad por PCR.....	19
3.3.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
3.3.2	<i>Vibrio vulnificus</i>	20
3.4	Amplificación por PCR.....	20
3.5	Electroforesis de gel en campos pulsados (PFGE).....	22
3.5.1	Preparación de los insertos.....	22
3.5.2	Condiciones de la electroforesis para PFGE.....	22
3.5.3	Análisis de fragmentos de restricción.....	23
3.6	Tipificación por análisis de secuencias multilocus (MLST).....	23
3.6.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24
3.6.2	<i>Vibrio vulnificus</i>	24
3.7	Detección y caracterización del gen <i>rtxA1</i> de <i>Vibrio vulnificus</i>	26
3.7.1	Diseño de oligonucleótidos para los dominios del gen <i>rtxA1</i>	26
3.7.2	Amplificación de los dominios del gen <i>rtxA1</i>	27
3.8	Análisis de secuencias.....	27
3.8.1	Análisis estadístico y filogenético.....	27
3.8.2	Análisis comparativo.....	28
Capítulo 4.	Resultados.....	29
4.1	Detección y caracterización molecular de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
4.1.1	Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en la Península de Baja California.....	29
4.1.2	Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en el Mercado La Nueva Viga, Ciudad de México.....	30
4.1.3	Caracterización molecular de las cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> obtenidas de colecciones.....	31
4.1.4	Serotipificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por anticuerpos para el serotipo O3:K6.....	31
4.2	PFGE de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
4.3	MLST de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	34
4.3.1	Análisis descriptivo de MLST.....	34
4.3.2	Análisis estadístico.....	34
4.3.3	Determinación de la secuencia tipo (ST) y perfil alélico (PA) de las cepas pandémicas O3:K6 de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	35
4.3.4	Análisis comparativo.....	36
4.4	Identificación y caracterización de <i>Vibrio vulnificus</i>	41
4.4.1	Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> en la península de Baja California..	41
4.4.2	Detección de <i>Vibrio vulnificus</i> en muestras obtenidas del Mercado La Nueva Viga (Ciudad de México).....	41
4.5	PFGE de <i>Vibrio vulnificus</i>	42
4.6	MLST de <i>Vibrio vulnificus</i>	44
4.6.1	Análisis descriptivo de MLST de <i>Vibrio vulnificus</i>	44

Tabla de contenido (continuación)

	Página	
4.6.2	Análisis estadístico de MLST de <i>Vibrio vulnificus</i>	44
4.7	Análisis del gen <i>rtxA1</i> de <i>Vibrio vulnificus</i>	48
4.7.1	Análisis estadístico de las secuencias de <i>rtxA1-C</i>	49
4.7.2	Análisis comparativo de <i>rtxA1</i>	50
4.8	Relación genética de <i>Vibrio vulnificus</i> obtenidas de muestras ambientales con cepas de referencia.....	53
4.9	Secuencias.....	53
Capítulo 5.	Discusión.....	55
5.1	Incidencia de cepas patógenas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i>	55
5.2	Caracterización Molecular.....	56
5.2.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	56
5.2.2	<i>Vibrio vulnificus</i>	57
Capítulo 6.	Conclusiones.....	60
Lista de Referencias	61

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Estructura y organización de la toxina MARTX _{Vv} de <i>V. vulnificus</i> codificada por el gen <i>rtxA1</i> . La organización de los dominios (zona coloreada) define la variante del gen <i>rtxA1</i> . La nomenclatura de las variantes deriva de la cepa en la que fue descrita inicialmente. La figura fue obtenida de Kwak <i>et al.</i> (2011).....	14
Figura 2. Ubicación geográfica de las diferentes zonas de muestreo, Bahía de Todos Santos (TS), Bahía Falsa en San Quintín (SQ), Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro (GN), en BC, Laguna San Ignacio (IG) y Bahía Magdalena (BM) en BCS.....	17
Figura 3. Concentraciones (NMP/g) de <i>V. parahaemolyticus</i> detectado por <i>pR72H</i> , <i>tlh</i> y sus factores de patogenicidad <i>tdh</i> y <i>trh</i> en muestras de ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> , en 5 localidades en la península de Baja California. Durante el período de muestreo no se detectó <i>V. vulnificus</i> con <i>vvhA</i>	29
Figura 4. Concentraciones (NMP/g) de <i>V. parahaemolyticus</i> detectado por <i>pR72H</i> y <i>tlh</i> y sus factores de patogenicidad <i>tdh</i> y <i>trh</i> en muestras de ostión (<i>Crassostrea spp</i>) en el mercado La Nueva Viga, en la ciudad de México.....	30
Figura 5. Caracterización de <i>V. parahaemolyticus</i> con la enzima de restricción NotI por PFGE, utilizando el algoritmo UPGMA. Las cepas CICESE-121 y CICESE-122 de <i>V. cholerae</i> se agrupan como el grupo externo. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para el análisis con la técnica de MLST.....	33
Figura 6. Análisis por MLST de <i>V. parahaemolyticus</i> con 7 genes concatenados (<i>dnaE</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>dtdS</i> , <i>pntA</i> , <i>pyrC</i> y <i>tnaA</i>). Las cepas tipificadas como ORF8/O3:K6 se asociaron en el mismo clúster y separadas del resto de las cepas, usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.....	37

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 7. Análisis de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante la comparación de los PA de 32 cepas estudiadas en el presente trabajo y 68 PA obtenidos de pubMLST e implementado en goeBURST 1.2.1. Las ST-3 y ST-1139 de las cepas CICESE tipificadas como ORF8 ⁺ /O3:K6 se asociaron en el CC3 con 40 ST descritos en pubMLST. La ST-326 (CAIM 728), se asoció como doble a ST-89. Las ST-1137 (CAIM 1435), ST-1138 (CICESE-172), ST-1140 (CICESE-250 y CICESE-251) y ST-1141 (CICESE-374 y CICESE-375) se presentaron como ST únicas.....	39
Figura 8. Análisis de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante la comparación de las secuencias de 32 cepas generadas en el presente trabajo y las secuencias de 68 cepas reportadas por González-Escalona <i>et al.</i> , 2008 y Turner <i>et al.</i> , 2013. El análisis se implementó usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter. El CC3 agrupa a las cepas del clon pandémico.....	40
Figura 9. Concentraciones (NMP/g) de <i>V. vulnificus</i> por detección del gen <i>vvhA</i> obtenidas de muestras de ostión (<i>Crassostrea spp</i>) en el mercado La Nueva Viga, en la ciudad de México.....	41
Figura 10. Caracterización de <i>V. vulnificus</i> mediante tipificación por PFGE con la enzima de restricción NotI, utilizando el algoritmo UPGMA. La cepa CICESE-121 y CICESE-122 de <i>V. cholerae</i> se agruparon como grupo externo. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para el estudio de MLST.....	43
Figura 11. Análisis por MLST de 18 cepas de <i>V. vulnificus</i> por la secuenciación y concatenación de 6 genes (<i>glp</i> , <i>metG</i> , <i>purM</i> , <i>dtdS</i> , <i>lysA</i> y <i>pyrC</i>) usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.....	47

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 12. Amplificación con los oligonucleótidos desarrollados en el presente trabajo para la detección y secuenciación del gen <i>rtxA1</i> de <i>V. vulnificus</i> . a) línea 1 y 8 corresponden al marcador molecular (Axygen®); 2, DUF; 3, RID; 4, α/β ; 5, Mcf; 6, PMT C1/C2 y 7 CPD. b) amplificación mediante la combinación de los oligonucleótidos mcf-F y cpd-R, la línea 9 y 10, representan a CICESE-342 y CICESE-357 respectivamente, ambas amplificaron a 2640 pb; línea 11, CAIM 610 ^T la cual amplificó a 1100 pb y línea 12 el marcador molecular.....	48
Figura 13. Análisis de las 18 cepas de <i>V. vulnificus</i> por secuenciación y concatenación de los 6 dominios (DUF, RID, α/β , Mcf, PMT C1/C2 y CPD) del gen <i>rtxA1</i> , usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.....	51
Figura 14. Análisis comparativo mediante la concatenación de las secuencias generadas para el gen <i>rtxA1</i> en las 18 cepas de <i>V. vulnificus</i> aisladas en el presente estudio (CICESE) y la comparación con secuencias obtenidas de GenBank y descritas por Kwak <i>et al.</i> (2011), Morrison <i>et al.</i> (2012) y Roig <i>et al.</i> (2011), usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.....	52
Figura 15. Análisis comparativo de <i>V. vulnificus</i> implementado en SplitsTree v4 con el análisis NeighborNet, mediante la concatenación de las secuencias de los 6 loci utilizados en MLST y los 6 dominios del gen <i>rtxA1</i> para las cepas aisladas en el presente trabajo (CICESE) y secuencias de referencia reportadas por Bisharat <i>et al.</i> (2005), Kwak <i>et al.</i> (2011) y Roig <i>et al.</i> (2011).....	54

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Características genotípicas y fenotípicas de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> analizadas por PFGE. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para el análisis de MLST. Jap., Japón; Tex., Texas; SN, Sinaloa; HG, Hidalgo; MN, Michoacán; DF, Ciudad de México; TM, Tamaulipas; BC, Baja California; NL, Nuevo León; NA, no analizado; Bioincrus., Bioincrustaciones...	18
Tabla 2. Caracterización genotípica por <i>vcg</i> del tipo clínico (C) y ambiental (E) de las cepas de <i>V. vulnificus</i> utilizadas para el análisis por PFGE. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para los análisis por MLST y <i>rtxA1</i>	19
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la detección de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> , así como los factores de patogenicidad. Hemolisina termolábil, <i>tlh</i> ; hemolisina directa termoestable, <i>tdh</i> ; hemolisina directa termoestable relacionada, <i>trh</i> ; fragmento <i>pR72H</i> ; marco abierto de lectura, ORF8, citolisina-hemolisina, <i>vvhA</i> ; gen de correlación a la virulencia, <i>vcg</i> . La °C/seg corresponde a la temperatura y tiempo de alineamiento de cada oligonucleótido y pb corresponde al amplicón en pares de bases.....	21
Tabla 4. Lista de los de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante tipificación por MLST. Los oligonucleótidos señalados (*) fueron desarrollados para el presente estudio.....	25
Tabla 5. Lista de los de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de <i>V. vulnificus</i> para la tipificación por MLST.....	25
Tabla 6. Lista de los oligonucleótidos diseñados en el presente trabajo, para la amplificación y secuenciación de 6 dominios del gen <i>rtxA1</i> de <i>V. vulnificus</i> . La secuencia obtenida para cada dominio corresponde a la posición del cromosoma-II (del gen <i>rtxA1</i>) de la cepa CMCP6 (GenBank: AE016796).....	26

Lista de Tablas (continuación)

	Página
Tabla 7. Descripción estadística de los 7 loci utilizados en el análisis de MLST de <i>V. parahaemolyticus</i>	35
Tabla 8. Perfil alélico de los análisis de MLST para <i>V. parahaemolyticus</i> . Los alelos, ST, CC, o ST única (S) correspondientes a cada cepa, fueron obtenidos por comparación con pubMLST. Las cepas señaladas (*) presentaron un alelo nuevo o nuevo PA.....	38
Tabla 9. Análisis estadístico de los 6 loci estudiados para MLST en <i>V. vulnificus</i> . La tabla muestra diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), sitios polimórficos (SP) y variabilidad genética (Θ).....	45
Tabla 10. Perfil alélico de los análisis de MLST para <i>V. vulnificus</i> . Las cepas con * presentaron uno o más nuevos alelos.....	46
Tabla 11. Análisis estadístico de los dominios utilizados para el análisis del gen <i>rtxA1</i> en <i>V. vulnificus</i>	49
Tabla 12. Valores del índice F_{st} del análisis comparativo de las secuencias obtenidas en el presente estudio (CICESE) y las secuencias del Linaje-I y -II descritas por Kwak <i>et al.</i> (2011) para el gen <i>rtxA1</i> de <i>V. vulnificus</i>	50

Capítulo 1. Introducción

Las enfermedades infecciosas han sido señaladas como uno de los principales problemas de salud en México, siendo el agua y los alimentos contaminados con microorganismos las principales vías de transmisión de enfermedades gastrointestinales. Los productos marinos destinados para la alimentación, en especial los moluscos bivalvos han sido considerados como unos de las principales vectores de transmisión de bacterias patógenas de origen marino, entre ellas las del género *Vibrio* (CDC, 1999; Chiou *et al.*, 2000; Hara-Kudo *et al.*, 2003; Deepanjali *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2005). La presencia o incremento de estos patógenos no necesariamente están asociados a altos niveles de contaminación por drenajes urbanos, ya que son especies que comúnmente son aisladas en diferentes hábitats del medio marino.

Las tres principales especies de vibrios patógenos, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son bacterias frecuentemente asociadas con enfermedades gastrointestinales o septicemias en humanos. *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* han sido ampliamente reportados en países en donde se consumen organismos marinos crudos o poco cocidos, y constituyen actualmente un problema sanitario mundial.

1.1 Justificación

La determinación de los factores de patogenicidad y características genéticas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aislados en México, es imperativa para poder evaluar la presencia de cepas patógenas con potencial pandémico aisladas de moluscos bivalvos y poder compararlas con cepas señaladas como patógenas.

1.2 Objetivo general

Detectar, cuantificar y caracterizar por técnicas moleculares la incidencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aislados en México, para determinar su similitud genética con cepas patógenas aisladas en otros países y determinar la especificidad de las mismas.

1.3 Objetivos específicos

1.3.1 Constatar la incidencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* toxigénicos en ostiones colectados en granjas ostrícolas de la península de Baja California y en el mercado La Nueva Viga en la Ciudad de México.

1.3.2 Caracterizar por PFGE y MLST las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas en México en el periodo correspondiente a 1998-2012.

1.3.3 Constatar la presencia de cepas pandémicas O3:K6 de *V. parahaemolyticus*, en México a partir de 1998 y su asociación con cepas del clon pandémico aisladas en otros países.

1.3.4 Caracterizar por PFGE y MLST las cepas de *V. vulnificus* aisladas en México.

1.3.5 Analizar y secuenciar el gen *rtxA1* de las cepas de *V. vulnificus* aisladas en México, para constatar su similitud genética con respecto a las aisladas en otros países con alto potencial patógeno.

1.4 Hipótesis

Las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aisladas en México presentan características genéticas similares a las cepas patógenas aisladas en otros países.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 El género *Vibrio*

El género *Vibrio* pertenece a la familia Vibrionaceae, incluye a diversos grupos de bacterias marinas heterótrofas, Gram negativas, pertenecientes a la clase gammaproteobacteria (Thompson *et al.*, 2004). Los vibrios son bacterias comúnmente aisladas de ambientes marinos, las cuales se pueden encontrar en asociación con partículas de sedimento, o con organismos tales como corales, peces, moluscos, crustáceos, esponjas, macroalgas, fitoplancton y zooplancton (Arias *et al.*, 1995; Grisez *et al.*, 1997; Vandenberghe *et al.*, 1998; Heidelberg *et al.*, 2002; Rosenberg y Ben-Haim, 2002; Sawabe *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004). La distribución y dinámica de las poblaciones del género *Vibrio*, está influenciada por gradientes medioambientales como temperatura, salinidad, pH, disponibilidad y concentración de nutrientes, así como abundancia de hospederos (Cavallo y Stabili, 2002; Yoon *et al.*, 2008). A la fecha se han descrito más de 72 especies en el género *Vibrio* (Tarr *et al.*, 2007); de las cuales *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, han sido designadas como los principales vibrios patógenos para el humano.

2.1.1 Aspectos ecológicos de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*

Tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* son especies asociadas a ambientes marinos, principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Kaneko y Colwell, 1973 y 1975; Julie *et al.*, 2010). Ambas especies se distribuyen en nichos ecológicos muy similares, pero *V. parahaemolyticus* es capaz de tolerar temperaturas más bajas y salinidades más altas que *V. vulnificus* (Martinez-Urtaza *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Temperatura

Tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* se distribuyen principalmente en zonas cálidas, sin embargo se ha observado que puede sobrevivir en el sedimento durante los meses de bajas temperaturas (<14 °C) y posteriormente, cuando incrementa la temperatura (>19 °C), aumentar su concentración en la columna del agua (Kaneko y Colwell, 1975; Fukushima y Seki, 2004; Mahmud *et al.*, 2006; Mahmud *et al.*, 2008; Julie *et al.*, 2010; Nigro *et al.*, 2011).

Motes *et al.* (1998) indican que la concentración de *V. vulnificus* en cultivos de *Crassostrea virginica* en las costas del Golfo de México (E.U.A) presentó un incremento cuando la temperatura del agua fue mayor a 26 °C, y no fue detectada cuando la temperatura fue inferior a 15 °C. En la Bahía de Barnegat (Nueva Jersey), la abundancia de esta bacteria está fuertemente correlacionada con la temperatura cuando los rangos se presentan de 10 a 30 °C; sin embargo, Randa *et al.* (2004) señalan que a bajas salinidades (5–10 PSU), no se presenta una clara correlación con la temperatura.

2.1.1.2 Salinidad

La salinidad también tiene una influencia en la concentración de *V. vulnificus*, ya que se registra un mayor concentración en rangos de salinidad entre 5-25 PSU, pero cuando la salinidad es mayor o inferior de este rango, la concentración disminuye drásticamente (Motes *et al.*, 1998; Randa *et al.*, 2004; Mahmud *et al.*, 2008).

2.1.2 Presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en México

La información sobre la incidencia de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en México es muy escasa. Galván-Ángeles (2004), analizó la presencia de *V. parahaemolyticus* en ostiones cultivados en granjas ostrícolas de la península de Baja California, pero ninguna de las cepas aisladas presentó los genes de la hemolisina directa termoestable (TDH) o la hemolisina directa termoestable relacionada (TRH), características de las cepas patógenas. Durante el 2003-2004 se registraron más de

1230 casos de gastroenteritis en el estado de Sinaloa, la gran mayoría de estos fueron asociados a la ingesta de camarones contaminados con *V. parahaemolyticus* (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006). Los autores aislaron un total de 103 cepas identificadas como *V. parahaemolyticus*, de las cuales 78% presentaban el gen *tdh* y la mayoría de estas pertenecían al serotipo pandémico O3:K6. Velazquez-Roman *et al.* (2012), indicaron la presencia del 2004 al 2010 en el Estado de Sinaloa del serogrupo O3:K6, así como de otros serogrupos con potencial patógeno. Revilla-Castellanos (2012), analizó las bioincrustaciones asociadas a barcos provenientes de Asia, detectando cepas *tdh*⁺ y *trh*⁻, así como una cepa positiva para el marcador molecular ORF8, la cuál posteriormente se determinó que pertenecía al serogrupo pandémico O3:K6.

En el caso de *V. vulnificus* hay muy pocos estudios que determinen la presencia de esta bacteria en México. En 1994 se reporta el primer caso fatal asociado a *V. vulnificus*, la paciente había consumido mariscos, 12 horas posteriores a la ingesta, presentó fiebre, mareo, náuseas, lesiones cutáneas y deficiencia respiratoria, y falleció en un periodo 24 horas (Porrás-Cortés *et al.*, 1994). Castañón-González *et al.* (1999), describe la sintomatología de *V. vulnificus* en un paciente que falleció 72 horas después de haber ingerido ostiones, presentando ámpulas necróticas características de la infección. Dávalos-Mecalco (2006), aisló 61 cepas de *V. vulnificus* en moluscos y agua en el estado de Veracruz, sus ensayos mostraron que el 100% de las cepas presentaban actividad citotóxica para la línea celular de ovario de hámster chino. Reyes-Mendoza (2004), realizó un estudio para la obtención de toxinas de *V. vulnificus* obtenidas de ostiones y peces, en sus estudios obtuvo un total de 27 cepas que presentaron actividad citotóxica. Cornejo-Juárez *et al.* (2000) describe una serie de casos de infección con *V. vulnificus*; los pacientes presentaron septicemia y siete de ellos fallecieron en un periodo de cuatro días, la mayoría había ingerido mariscos crudos. Baizabal-Ramírez *et al.* (2011) reporta el caso clínico de una paciente que falleció 87 horas después de haber ingerido camarones contaminados con *V. vulnificus*. Con excepción de un estudio realizado por Quiñones-Ramírez *et al.* (2010), que identifica a *V. vulnificus* por PCR, los anteriores trabajos tienen el enfoque de reportes médicos y carecen de análisis moleculares que permita la identificación de la especie.

2.1.3 Moluscos como vector de vibrios patógenos

Actualmente el consumo de alimentos crudos o sin procesar, principalmente moluscos, son una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales (Rippey, 1994). Los moluscos bivalvos son organismos que se alimentan por filtración, debido a lo cuál concentran una gran cantidad de microorganismos, algunos de ellos patógenos para el humano. En los Estados Unidos, el 20% de las enfermedades infecciosas son asociadas al consumo de moluscos contaminados con microorganismos (Lipp y Rose, 1997). En áreas de un alto consumo de productos marinos se ha identificado a las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, entre otras, como causantes de gastroenteritis y septicemias (Linkous y Oliver, 1999; Nair *et al.*, 2007). Entre los moluscos bivalvos, el ostión ha sido señalado como vector de bacterias patógenas del género *Vibrio*, entre las cuales podemos destacar a *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (DePaola *et al.*, 1987; Sugumar *et al.*, 1998; Labreuche *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2008; Parveen *et al.*, 2008; Mahmoud y Burrage, 2009; Kirs *et al.*, 2011).

2.1.4 Producción de ostión en Baja California

A nivel mundial, La producción de moluscos se ha incrementado en las últimas dos décadas. En 1983 se produjeron 1.8 millones de toneladas, en tanto que para 2006 la producción fue de 14.1 millones de toneladas, lo que representa un incremento del 783 %. De esta producción el 97% corresponde a bivalvos, con un total de 13.67 millones de toneladas, siendo el ostión japonés *C. gigas*, el que mayormente se cultiva en el mundo, con una producción de 4.64 millones de toneladas (FAO, 2008).

El cultivo de *C. gigas* inició en Japón y posteriormente se extendió a diversas regiones del mundo, entre ellas México (Coleman *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1986). En México, *C. gigas* es la principal especie ostrícola de cultivo, la cual se realiza en lagunas y estuarios, en los estados de Baja California, Baja California Sur, Nayarit, Sinaloa y Sonora (García-Esquivel *et al.*, 2004; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; CONAPESCA, 2010). En Baja California, esta especie se ha cultivado a partir de la década de los setentas y actualmente existen aproximadamente 32 granjas dedicadas al cultivos de

C. gigas ubicadas a lo largo de la península, con una producción anual cercana a las 744 toneladas métricas (CONAPESCA, 2008 y 2010).

2.2 Epidemiología de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*

Actualmente *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* han sido señaladas como causantes de infecciones asociadas al consumo de organismos marinos, especialmente en moluscos bivalvos, acentuándose en países como Bangladesh, Chile, Estados Unidos, Francia, Hong Kong, India, Indonesia, Israel, Japón, Tailandia, Taiwán, Perú, Vietnam, entre otros (Johnston *et al.*, 1986; Abbott *et al.*, 1989; Chuang *et al.*, 1992; Pan *et al.*, 1997; Mead *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2002; DePaola *et al.*, 2003; Hsueh *et al.*, 2004; Bisharat *et al.*, 2005; Quilici *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005; Cabello *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2007; Jones y Oliver, 2009; Martínez-Urtaza *et al.*, 2010).

2.2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

En el sureste de Asia, los problemas de gastroenteritis causados por el consumo de productos marinos están principalmente asociados a *V. parahaemolyticus* (Chiou *et al.*, 2000; Tuyet *et al.*, 2002; Qadri *et al.*, 2003). Los genes de la hemolisina directa termoestable (*tdh*) y la hemolisina directa termoestable relacionada (*trh*) han sido detectados sistemáticamente en cepas aisladas de casos clínicos, por lo que se les considera factores de virulencia. Serológicamente se ha desarrollado un sistema de clasificación en función de los antígenos O y K describiéndose más de 70 serotipos (Nair *et al.*, 1985; Drake *et al.*, 2007). A partir de 1996 se presenta en la India el primer brote epidemiológico asociado al serotipo O3:K6/*tdh*⁺ y posteriormente este serotipo se diseminó en diferentes países del sureste asiático (Okuda *et al.*, 1997 b; Chowdhury *et al.*, 2004). En el continente americano, se detecta su presencia por primera vez en 1996 (Gil *et al.*, 2007), y en 1998 se presenta el primer brote epidemiológico en los Estados Unidos. Los pacientes que habían ingerido organismos marinos, principalmente moluscos extraídos del Golfo de México (Texas), contaminados con el serotipo O3:K6 (Daniels *et al.*, 2000 a y b). En años subsecuentes se informó de brotes epidemiológicos en diferentes países del continente, entre ellos en Perú, Chile y México (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006, Fuenzalida *et al.*, 2006, Gil *et al.*, 2007).

Actualmente se ha registrado un incremento en la incidencia del serotipo O3:K6 en diferentes zonas geográficas, entre ellas México (Levine y Griffin, 1993; Okuda *et al.*, 1997 a y b; Chiou *et al.*, 2000; González-Escalona *et al.*, 2008, Velazquez-Roman *et al.*, 2012). En Taiwán (1995-2001), se registraron 2057 casos de gastroenteritis asociados a *V. parahaemolyticus*; los análisis mostraron la presencia de 40 diferentes serotipos, de los cuales el O3:K6 fue el predominante (Chiou *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2005). Qadri *et al.* (2003), analizaron cepas obtenidas de casos clínicos infectados con *V. parahaemolyticus* (*tdh*⁺) durante el 2000 y 2001 en la ciudad de Dhaka (Bangladesh), encontrando que el 42% de los pacientes estaba infectado con el serotipo O3:K6. Actualmente se han detectado otras serovariantes que presentan el fragmento ORF8, señalado como indicativo del grupo genéticamente relacionado a la cepa pandémica O3:K6, denominado complejo clonal 3 (CC3) por González-Escalona *et al.* (2008).

2.2.2 *Vibrio vulnificus*

Basados en análisis serológicos, bioquímicos y genéticos, se conocen tres biotipos de *V. vulnificus* (Arias *et al.*, 1997; Bisharat *et al.*, 2005 y 2007). La mayoría de las cepas aisladas de casos de infección en humanos pertenecen al biotipo 1 y es reconocido como el principal responsable en la mayoría de los casos de infección en humanos. El biotipo 2 es comúnmente asociado a infecciones en organismos acuáticos, principalmente en peces y ocasionalmente a casos de infección en humanos (Tison y Kelly, 1986; Amaro *et al.*, 1992). Ambos biotipos presenta una distribución mundial, principalmente en zonas tropicales (Zaidenstein *et al.*, 2008). En 1996 se identificó el biotipo 3 asociado a 62 casos de infección en humanos señalándolo como un clon recombinante de dos poblaciones de *V. vulnificus*, sin embargo solo ha sido reportado en Israel (Bisharat *et al.*, 2005 y 2007).

2.2.2.1 Genotipos de *Vibrio vulnificus*

Actualmente se han descrito dos genotipos en *V. vulnificus*, uno asociado a muestras ambientales (genotipo-E) y otro asociado a muestras clínicas (genotipo-C) (Rosche *et al.*, 2010; Morrison *et al.*, 2012). La divergencia genética entre los genotipos incluye análisis basados en 16S rRNA (Aznar *et al.*, 1994; Kim y Jeong, 2001; Nilsson *et al.*,

2003), rep-PCR (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2006), dimorfismo del gen de correlación a la virulencia (*vcg*) (Rosche *et al.*, 2005 y 2010), análisis de secuencias multilocus (MLST) (Bisharat *et al.*, 2005 y 2007; Cohen *et al.*, 2007; Bier *et al.*, 2013) y análisis comparativo del genoma (Morrison *et al.*, 2012).

Se han utilizado diferentes marcadores moleculares para identificar cepas asociadas a casos clínicos o potencialmente patógenas al humano (Roig *et al.*, 2010; Yongjun *et al.*, 2010), siendo el más común el uso del gen *vcg* propuesto por Rosche *et al.* (2005); estos autores desarrollaron una prueba de PCR para separar las cepas del genotipo-C y -E; y observaron que el dimorfismo en el gen *vcg* del tipo clínico (*vcgC*) se correlaciona principalmente a cepas obtenidas de casos clínicos y el genotipo del tipo ambiental (*vcgE*) se correlaciona a cepas obtenidas de muestras ambientales.

Diversos ensayos en ratones y diferentes líneas celulares han mostrado que estas diferencias se correlacionan con la capacidad de la patogenicidad de la cepa (Thiaville *et al.*, 2011), sin embargo algunas cepas aisladas del medio ambiente tienen la capacidad de causar infecciones. Tison y Kelly (1986), en ensayos de laboratorio mostraron que cepas de *V. vulnificus* obtenidas del medio ambiente presentaron una citotoxicidad similar en ratones que la causada por las cepas obtenidas de casos clínicos. El 86% de cepas obtenidas del medio ambiente fueron patógenas. Resultados similares son reportados por Thiaville *et al.* (2011); estos autores evaluaron cepas del biotipo 1, el 48% asociadas a casos clínicos y 52% a cepas ambientales. En sus análisis reportan que la mayoría (80%) de las cepas tenían la capacidad de causar lesiones cutáneas en ratones, sin embargo las cepas del genotipo-C causaron una mayor mortalidad (49%) que las cepas del genotipo-E (20%), no obstante, 9 cepas exhibieron una virulencia similar a las cepas del genotipo-C.

2.3 infección por *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*

V. parahaemolyticus y *V. vulnificus* son comúnmente asociadas a infección de heridas, gastroenteritis y septicemia, sin embargo *V. vulnificus* presenta un alto porcentaje de casos fatales (>50%) en personas inmunodeficientes (CDC, 2013), en tanto que con *V.*

parahaemolyticus se registran menos del 4% de casos fatales (Hlady y Klontz, 1996; Linkous y Oliver, 1999).

2.3.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Los síntomas asociados a *V. parahaemolyticus* se pueden presentar en un periodo de incubación de 4 a 96 horas, siendo la gastroenteritis la principal manifestación, cuyos síntomas son diarrea, náuseas, vómito, dolor de cabeza y fiebre (CDC, 2013). Los casos de infección se presenta mayormente por gastroenteritis (51%), y en menor proporción las infecciones de heridas (24%) y septicemia (17%) (Honda y Lida, 1993; Levine y Griffin, 1993; Hlady y Klontz, 1996).

2.3.2 *Vibrio vulnificus*

Los casos reportados de gastroenteritis para *V. vulnificus* son poco frecuentes, sin embargo las infecciones en piel y la septicemia son los casos clínicos más comunes causados por esta especie (Hlady y Klontz, 1996). La infección se puede desarrollar en un periodo < 24h, los síntomas de esta infección son fiebre, náuseas y formación de lesiones necróticas en las extremidades, en algunos casos se requiere de amputación (Chuang *et al.*, 1992; Strom y Paranjpye, 2000). La septicemia es la que presenta la mayor tasa de casos fatales reportados para esta especie (Hlady y Klontz, 1996; Linkous y Oliver, 1999).

2.4 Patogenicidad

La especies del género *Vibrio* presentan 2 cromosomas circulares comúnmente llamado cromosoma-I o mayor (~3.4 Mb) y cromosoma-II o menor (~1.8 Mb) (Yamaichi *et al.*, 1999; Kirkup *et al.*, 2010; Tiruvayipati *et al.*, 2013). El cromosoma-I tiene menor variabilidad genética intraespecífica y entre diferentes especies de este género, en tanto que el cromosoma-II es más variable y comúnmente ahí se encuentran los genes asociados a la patogenicidad (Boyd *et al.*, 2008).

2.4.1 *Vibrio parahaemolyticus*

A pesar de la amplia distribución de *V. parahaemolyticus* en el medio marino, solo algunas cepas son señaladas como agentes causantes de problemas de salud en el humano, siendo aquellas que presentan las hemolisinas TDH y TRH (Sakurai *et al.*, 1973; Osawa *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 2000). Algunos autores señalan que >99% de las cepas de *V. parahaemolyticus* obtenidas de medio ambiente carecen de los genes *tdh* y *trh* que codifican para estas toxinas (Thompson y Vanderzant, 1976; DePaola *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2002; Bilung *et al.*, 2005; Deepanjali *et al.*, 2005). Actualmente se han descrito al menos 65 genes asociados a las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*, que forman parte de una isla de patogenicidad VPal (80 kb), la cual contiene los genes *tdh*, *trh* y un conjunto de genes para el sistema de secreción del tipo III (Hida e Yamamoto, 1990; Izutsu *et al.*, 2008). Las VPal son elementos móviles que presentan genes asociados a patogenicidad como toxinas, así como elementos que pueden conferir resistencia a antibióticos, los cuales son adquiridos por transferencia horizontal. En *V. parahaemolyticus* se ha observado que presenta 7 islas de patogenicidad (VPal) que están principalmente asociadas a cepas patógenas, entre ellas el serotipo pandémico O3:K6 y a sus serovariantes (O1:K25, O1:K56, O4:K68 y O4:KUT, entre otras), siendo de gran importancia en el estudio de la patogenicidad de esta especie (Faruque *et al.*, 2003; Raskin *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2008).

2.4.2 Gen *rtxA1*, como factor de patogenicidad en *Vibrio vulnificus*

Al igual que en la gran mayoría de los vibrios, en esta especie los principales factores de patogenicidad están localizados en el cromosoma-II, cuyos genes codifican para polisacáridos capsulares, sistemas de asimilación de hierro, citolisina-hemolisina (VvhA), metaloproteasa (Vvp), fosfolipasa (Vpl), y la toxina “Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-Toxin” o denominada simplemente como MARTX_{Vv} (Boyd *et al.*, 2008; Roig *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2011). Debido a que estos factores también se detectan en cepas aisladas del ambiente, se asume que todas las cepas de *V. vulnificus* son capaces de causar infección o potencialmente patógenas (Thiaville *et al.*, 2011).

La Toxina MARTX_{VV} es uno de los factores de patogenicidad de *V. vulnificus* (Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010). Esta toxina puede inducir apoptosis afectando diversas vías metabólicas (Lee *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010), también tiene actividad hemolítica y puede inducir un rearrreglo en el citoesqueleto o la formación de protuberancias lo cual induce a la necrosis, por lo que ha sido considerado el principal factor de patogenicidad en *V. vulnificus* (Kim *et al.*, 2008; Kwak *et al.*, 2011). Las cepas a las cuales se les ha eliminado el gen *rtxA1* que codifica para MARTX_{VV} disminuye considerablemente su virulencia (Kwak *et al.*, 2011), así como su capacidad de supervivencia por lo cual se considera que puede estar implicada en la defensa de la bacteria evitando la fagocitosis (Lo *et al.*, 2011). Recientemente, Jeong y Satchell (2012) demostraron que la presencia del gen *rtxA1* es esencial durante los primeros momentos de la infección promoviendo la diseminación de la bacteria.

El gen *rtxA1* presenta dos zonas conservadas las cuales se encuentran en los extremos (región N y C de MARTX_{VV}, Figura 1), estas regiones puede presentar hasta un 97% de similitud entre las diferentes especies (Satchell, 2007). La zona variable o también conocida como zona interna, presenta diferentes dominios, y al orden de estos corresponde a las diferentes variantes de este gen en *V. vulnificus*; a la fecha se han señalado cuatro variantes, C (*rtxA1*-C), M (*rtxA1*-M), D (*rtxA1*-D) y O (*rtxA1*-O). Actualmente se han descrito 7 dominios para *rtxA1* en *V. vulnificus*; estos dominios presentan diferente funciones y han sido denominados como DUF (“*Domain of unknown function*”), RID (“*Rho GTPase*”), α/β (“ *α/β -Hydrolase*”), Mcf (“*Makes Caterpillar Floppy*”), CPD (“*Conserved cysteine protease domain*”), ACD (“*Actin Cross-linking domain*”) y el dominio PMT C1/C2, el cual tiene similitud con los dominios C1 y C2 de la toxina de *Pasteurella multocida* (Kwak *et al.*, 20011; Roig *et al.*, 2011).

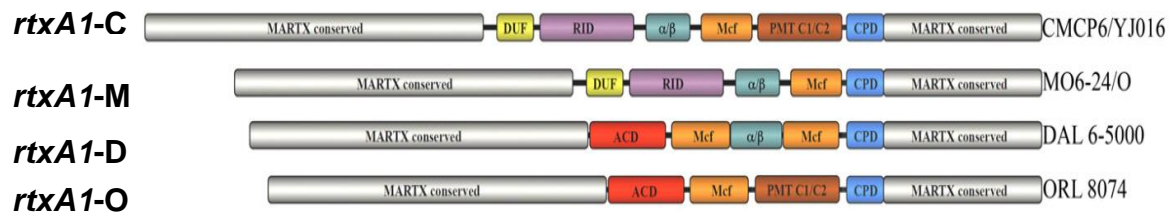


Figura 1. Estructura y organización de la toxina MARTX_{Vv} de *V. vulnificus* codificada por el gen *rtxA1*. La organización de los dominios (zona coloreada) define la variante del gen *rtxA1*. La nomenclatura de las variantes deriva de la cepa en la que fue descrita inicialmente. La figura fue obtenida de Kwak *et al.* (2011).

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Aislamiento de bacterias patógenas en bivalvos

3.1.1 Península de Baja California

Los muestreos en la península de Baja California, fueron realizados en cinco granjas de cultivo de ostión Japonés *C. gigas* localizadas en Bahía de Todos Santos (TS), Bahía Falsa en San Quintín (SQ), Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro (GN), en el estado de Baja California; Laguna San Ignacio (IG) y Bahía Magdalena (BM) en el estado de Baja California Sur (Figura 2). En cada zona de muestreo se obtuvo una muestra representativa de 24 ostiones, y fueron transportadas a Ensenada en las mismas condiciones que los productores envían los organismos a los mercados (vía terrestre, mantenidos en hielo). Las muestras fueron procesadas en un período menor a 24 h después de su cosecha, en el laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina, en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE).

3.1.2 Mercado de mariscos La Nueva Viga

Las cepas obtenidas del mercado La Nueva Viga en la ciudad de México, fueron aisladas por la M. en C. Irma Wong Chang del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) quién indicó que el Golfo de México es el origen más probable de los ostiones que se venden en este mercado. Las muestras fueron procesadas utilizando la misma metodología descrita en la sección 3.2 y las cepas aisladas fueron enviadas al laboratorio de Ecología Molecular (Biotecnología Marina, CICESE), para el análisis molecular.

3.1.3 Cepas de colección

Las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de casos clínicos fueron obtenidas de la colección del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y de "Collection of Aquatic Important Microorganisms" (CAIM,

<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán. Finalmente, se integraron cepas de la colección de CICESE, aisladas de bioincrustaciones adheridas a los cascos de barcos que procedían de Asia y que arribaron al puerto de Ensenada (Revilla-Castellanos, 2012). La lista de cepas estudiadas para ambas especies se presenta en las tablas 1 y 2.

3.2 Procesamiento de las muestras

De 9 a 12 organismos fueron escogidos de manera aleatoria de cada lote y procesados en condiciones estériles. Un total de 200 gramos (líquido, tejido muscular y vísceras) fue homogenizado con 200 ml de buffer de fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 Mm Na₂HPO₄ 7H₂O, 1.4 Mm KH₂PO₄, pH 7.3) y macerados durante dos minutos en una licuadora. Del macerado se tomaron 20 g y se homogenizaron con 80 ml de PBS. A partir de este homogenizado se realizaron tres diluciones (0.1, 0.01 y 0.001). De cada dilución se tomó una alícuota de 1 ml y se sembró en 10 ml del medio agua peptonada alcalina (1% peptona, 1% NaCl; APA), por triplicado y se incubo a 35°C durante 15 h. El ADN para efectuar análisis de PCR, se obtuvo muestreando 1 ml del homogenizado de cada réplica y realizando una lisis por choque térmico, sometiendo la muestra por 10 min a 95 °C seguido de 10 min a -20 °C, y repitiendo este paso de forma alternada, 5 veces. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante, donde se encuentra el ADN, fue utilizado para determinar la presencia y concentración en NMP/g (número más probable/gramo) de *V. parahaemolyticus* y de *V. vulnificus*, realizando los análisis de PCR por separado para cada especie como se describe en la sección 3.3.

3.2.1 Aislamiento de las cepas

De cada una de las réplicas positivas por PCR para *V. vulnificus* o *V. parahaemolyticus*, se tomó una azada y se sembró en cajas petri con medio agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), y se incubó por 15 h a 35°C. De cada caja se seleccionaron 15 colonias verdes y se resembraron en medio CHROMagar™ e incubaron a 35 °C durante 15 h. Las colonias que presentaron coloración malva (rojiza) indicativo de *V. parahaemolyticus*, o azul indicativo de *V. vulnificus*. Las colonias aisladas se

resembraron en cajas petri con medio agar Luria-Bertoni (LB), las cuales fueron incubadas a 35 °C por 15 h y almacenadas para análisis posteriores en la colección CICESE.

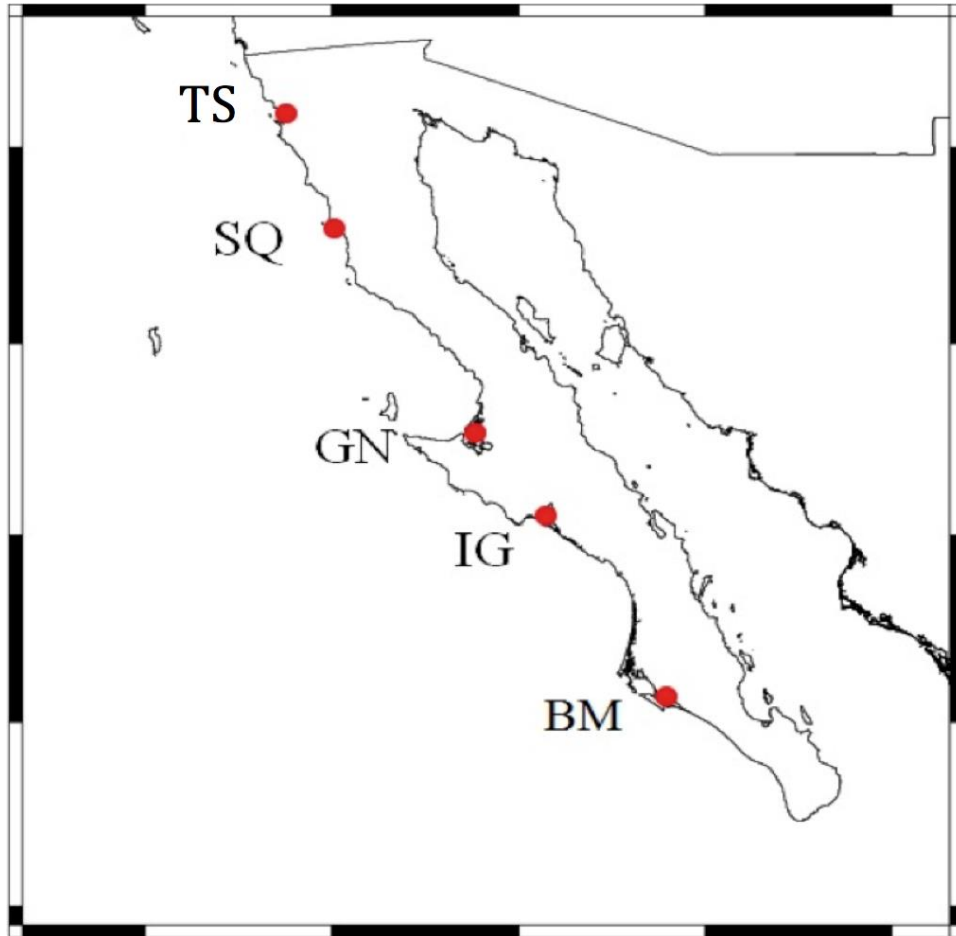


Figura 2. Ubicación geográfica de las diferentes zonas de muestreo, Bahía de Todos Santos (TS), Bahía Falsa en San Quintín (SQ), Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro (GN), en BC, Laguna San Ignacio (IG) y Bahía Magdalena (BM) en BCS.

Tabla 1. Características genotípicas y fenotípicas de las cepas de *V. parahaemolyticus* analizadas por PFGE. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para el análisis de MLST. Jap., Japón; Tex., Texas; SN, Sinaloa; HG, Hidalgo; MN, Michoacán; DF, Ciudad de México; TM, Tamaulipas; BC, Baja California; NL, Nuevo León; NA, no analizado; Bioincrus., Bioincrustaciones

Cepa	Colección de origen	Año	Origen	Edo.	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	ORF8	Serotipo
CAIM 728*	T3979	1951	Clínico	Jap.	+	-	-	O5:K12
CAIM 729 ^T *	TX2103	1998	Clínico	Tex.	+	-	+	O3:K6
CAIM 1400 ^T *	CAIM	2004	Clínico	SN	+	-	+	O3:K6
CAIM 1435*	CAIM	2004	Clínico	SN	+	-	-	NA
CAIM 1474*	CAIM	2004	Clínico	SN	+	-	+	O3:K6
CAIM 1477*	CAIM	2004	Clínico	SN	+	-	+	O3:K6
CAIM 1490*	CAIM	2004	Clínico	SN	+	-	+	O3:K6
CAIM 1693*	CAIM	2004	Clínico	SN	+	-	+	O3:K6
CAIM 1772	CAIM	2005	Camarón	SN	+	+	-	O5:K17
CICESE-170*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-171*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-172*	InDRE	1998	Clínico	DF	+	-	-	NA
CICESE-173*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-174*	InDRE	1998	Clínico	DF	+	-	+	O3:K6
CICESE-175*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-176*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-177*	InDRE	1998	Clínico	MN	+	-	+	O3:K6
CICESE-178*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-179*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-180*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-181*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-182*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-183*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-184*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-185*	InDRE	1998	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-186*	InDRE	1999	Clínico	HG	+	-	+	O3:K6
CICESE-187*	InDRE	2000	Clínico	TM	+	-	+	O3:K6
CICESE-188*	InDRE	2009	Clínico	NL	+	-	+	O3:K6
CICESE-250*	CICESE	2012	Bioincrus.	BC	+	-	-	NA
CICESE-251*	CICESE	2012	Bioincrus.	BC	+	-	-	NA
CICESE-253	CICESE	2012	Bioincrus.	BC	+	-	-	NA
CICESE-254	CICESE	2012	Bioincrus.	BC	+	-	-	NA
CICESE-273*	CICESE	2012	Bioincrus.	BC	+	-	+	O3:K6
CICESE-274	CICESE	2012	Bioincrus.	BC	+	-	-	NA
CICESE-374*	CICESE	2011	Ostión	DF	+	+	-	NA
CICESE-375*	CICESE	2011	Ostión	DF	+	+	-	NA
CICESE-376	CICESE	2011	Ostión	DF	+	+	-	NA
CICESE-390	CICESE	2011	Ostión	DF	+	+	-	NA

Tabla 2. Caracterización genotípica por *vcg* del tipo clínico (C) y ambiental (E) de las cepas de *V. vulnificus* utilizadas para el análisis por PFGE. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para los análisis por MLST y *rtxA1*.

Cepa	<i>vcg</i>	Cepa	<i>vcg</i>	Cepa	<i>vcg</i>	Cepa	<i>vcg</i>
CICESE-300*	E	CICESE-320*	E	CICESE-340	E	CICESE-357*	C
CICESE-301	E	CICESE-321*	E	CICESE-341	E	CICESE-359	C
CICESE-302*	E	CICESE-322	E	CICESE-342*	E	CICESE-360	C
CICESE-303	E	CICESE-323	E	CICESE-343	E	CICESE-361	C
CICESE-304	E	CICESE-325*	C	CICESE-344	E	CICESE-362	C
CICESE-305	E	CICESE-326	C	CICESE-345*	C	CICESE-363*	C
CICESE-306*	E	CICESE-328	C	CICESE-346*	C	CICESE-364	C
CICESE-307	E	CICESE-329	C	CICESE-347	C	CICESE-365	C
CICESE-308	E	CICESE-330	C	CICESE-348	C	CICESE-366	C
CICESE-309	E	CICESE-332*	E	CICESE-349	C	CICESE-368*	C
CICESE-310	E	CICESE-333	E	CICESE-350	C	CICESE-369*	C
CICESE-314*	C	CICESE-334	E	CICESE-351	C	CICESE-370	C
CICESE-316*	C	CICESE-335*	E	CICESE-352	C	CAIM 610 ^T	E
CICESE-317	C	CICESE-336	E	CICESE-353	C	CAIM 1215	E
CICESE-318	C	CICESE-338	E	CICESE-354	C	CAIM 1860	C
CICESE-319*	E	CICESE-339	E	CICESE-356	C		

3.3 Identificación molecular de las especies y sus factores de patogenicidad por PCR.

En el presente trabajo se siguió la metodología propuesta por el grupo de trabajo Vibriomex (<https://sites.google.com/site/vibriomex/home>), que está basada en lo descrito por Brauns *et al.* (1991), Bej *et al.* (1999), Fukui y Sawabe (2008) y FDA (2004). Para los estudios moleculares de cada cepa, el ADN se obtuvo con el kit Wizard Genomic (Promega®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En la detección de ambas especies se utilizó como testigo negativo *V. alginolyticus* CNRVC 950768 donada por CNRCV (“Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra, Institut Pasteur” de París, Francia).

3.3.1 *Vibrio parahaemolyticus*

La detección de *V. parahaemolyticus* se realizó por la presencia del gen *tlh* y por el fragmento *pR72H* que han sido utilizados como marcadores moleculares especie específicos (Lee *et al.*, 1995; Bej *et al.*, 1999). Las colonias positivas para *tlh* y *pR72H* fueron analizadas para los factores de patogenicidad (hemolisinas) *tdh* y *trh* (Bej *et al.*, 1999) característicos de la especie. Las cepas de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺/*trh*⁻ fueron analizadas para detectar el fragmento ORF8 característico del clon pandémico asociado al serotipo O3:K6 (Myers *et al.*, 2003). En cada análisis se integró como testigos positivos a las cepas CAIM 1400^T (*tdh*⁺/*trh*⁺/ORF8⁺) y 1772 (*tdh*⁺/*trh*⁺/ORF8⁻). Los oligonucleótidos utilizados para los análisis por PCR se enlistan en la tabla 3.

3.3.2 *Vibrio vulnificus*

La detección de *V. vulnificus* se realizó mediante la identificación del gen *vvhA* (Brauns *et al.*, 1991). Las colonias positivas para *vvhA* fueron utilizadas para la detección del genotipo *vcgC* o *vcgE* de acuerdo a lo descrito por Rosche *et al.* (2005). La cepa CAIM 610^T fue utilizada como control positivo (*vvhA*⁺/*vcgE*⁺). Los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la tabla 3.

3.4 Amplificación por PCR

La reacción por PCR (1X) se realizó con las siguientes concentraciones; 1.6 mM de solución MgCl₂, 0.8 mM de cada nucleótido (dNTPs, Promega®), 0.3 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.024 Uμl⁻¹ de *Taq* polimerasa (Promega®), y 1 μl del sobrenadante como templado de ADN. Cada reacción se aforó con agua libre de nucleasas a un volumen final de 12.5 μl.

La amplificación se inició con una desnaturalización a 94 °C por 10 min seguida de 35 ciclos. Cada ciclo consistió de 94 °C por 1 min, con un alineamiento cuya temperatura y tiempo de se describe en la tabla 2 para cada oligonucleótido y se finalizó el ciclo a 72 °C por 40 segundos y una extensión final de 72 °C por 5 min. La reacción se realizó en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal cyler (MJ Research). La separación de los

fragmentos se llevó a cabo por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y fueron visualizados mediante luz UV.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la detección de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, así como los factores de patogenicidad. Hemolisina termolábil, *tlh*; hemolisina directa termoestable, *tdh*; hemolisina directa termoestable relacionada, *trh*; fragmento *pR72H*; marco abierto de lectura, ORF8, citolisina-hemolisina, *vvhA*; gen de correlación a la virulencia, *vcg*. La °C/seg corresponde a la temperatura y tiempo de alineamiento de cada oligonucleótido y pb corresponde al amplicón en pares de bases.

Locus	Nombre/5'-3'	pb	°C/seg	Ref.
<i>V. parahaemolyticus</i>				
<i>tlh</i>	tlh-F, aaagcggattatgcagaagcactg	450	58/60	Bej <i>et al.</i> , 1999
	tlh-R, gctactttctagcattttctctgc			
<i>pR72H</i>	VP33, tgcaattcgataggggtgtaacc	387	58/45	Lee <i>et al.</i> , 1995
	VP32, cgaatccttgaacatacgcagc			
<i>trh</i>	trh-F, ttggcttcgatatttcagtatct	500	58/60	Bej <i>et al.</i> , 1999
	trh-R, cataacaaacatatgcccatttccg			
<i>tdh</i>	tdh-F, gtaaaggctctgacttttgac	269	58/60	Bej <i>et al.</i> , 1999
	tdh-R, tggaatagaaccttcattcacc			
ORF8	O3MM824, aggacgcagttacgcttgatg O3MM1192, ctaacgcattgtccctttag	369	60/30	Myers <i>et al.</i> , 2003
<i>V. vulnificus</i>				
<i>vvhA</i>	vvh-785, ccgcggtacaggttggcgca	519	62/60	FDA, 2004
	vvh-1303, cgccaccactttcgggcc			
	P1, agctgccgatagcgatct			
<i>vcg</i>	P2, ctcaattgacaatgatct	277	50/20	Rosche <i>et al.</i> , 2005
	P3, cgcttaggatgatcggtg			

3.5 Electroforesis de gel en campos pulsados (PFGE)

Los análisis de PFGE para tipificar las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Tabla 1) fueron implementados de acuerdo a la metodología descrita en el protocolo de "PulseNet" internacional (<http://www.pulsenetinternational.org>) para *V. cholerae*, con algunas modificaciones, la cual de manera resumida, se describe a continuación.

3.5.1 Preparación de los insertos

Colonias únicas de cada cepa fueron cultivadas en medio agar LB por 15 h a 35 °C. Las células se mezclaron en medio de resuspensión (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0) y diluidas a una densidad óptica de 0.8 (610 nm) con un espectrofotómetro (smartSpec™ 3000, Bio-Rad). Los insertos para cada cepa fueron preparados mezclando un volumen 1/1 de la suspensión de células y agarosa al 2% ("Low-melting Pulsed Field Certified Agarose™", BioRad) con 1mg/ml de proteinasa K. Los insertos fueron tratados en buffer de lisis (50mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0 con 1% N-Lauroilsarcosina) con proteinasa K (0.1 mg/ml) a 55 °C por 2 h y lavados 4 veces (cada 30 min) con solución TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0). Una sección de 2 x 5 x 1.2 mm del inserto fue equilibrado con buffer de restricción para posteriormente colocarlo en 20 µl de 1X buffer de restricción con 20 U de la enzima NotI (New England BioLabs, Mass, USA). La digestión se realizó a 37 °C por 4 h.

3.5.2 Condiciones de la electroforesis para PFGE

Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel al 1% de agarosa ("Pulsed Field Certified Agarose™", BioRad) en buffer TBE con un equipo CHEF Mapper system™ (BioRad) con dos bloques a 6 Vcm⁻² y un ángulo de 120° con las siguientes condiciones; el bloque 1 se corrió por 13 h, con pulsotipos de 2 s a 10 s, y el bloque 2, por 12 h con pulsotipos de 20 s a 25 s. Durante la electroforesis se agregó tiourea (50 µM) para detener la acción de la enzima. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (aproximadamente 1 h), enjuagados en TBE en agitación (aproximadamente 2 h). Los geles fueron documentados en condiciones de luz UV y los archivos fueron almacenados en formato TIF para su posterior análisis.

3.5.3 Análisis de fragmentos de restricción

Las imágenes generadas para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* fueron introducidas en el programa de uso científico GelCompar II™ (Applied Maths). A partir de los fragmentos de restricción (pulsotipos) generados para cada cepa, se generó un dendrograma para cada especie utilizando el algoritmo UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”). Como especie externa se utilizaron dos cepas de *V. cholerae* (CICESE-121 y 122).

3.6 Tipificación por análisis de secuencias multilocus (MLST)

Las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aisladas en el presente estudio, fueron estudiadas por la técnica MLST de acuerdo a lo descrito en la base de datos de <http://pubmlst.org> (pubMLST). Las cepas utilizadas para este análisis están señaladas en las tablas 1 y 2. La amplificación por PCR para ambas especies, se realizó con las siguientes concentraciones, 1.5 mM de MgCl₂, 0.125 mM de mezcla de dNTP's , 0.5 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.3 U de *Taq* polimerasa y 1.5 μl (50 μM) de ADN para la reacción. Cada reacción se realizó a un volumen final de 30 μl.

La amplificación de los locus para ambas especies se realizó con las siguientes condiciones. La desnaturalización inicial se realizó a 96 °C por 10 min seguido de 30 ciclos. Cada ciclo se realizó a 96 °C por 30 segundos de desnaturalización, 30 segundos de alineamiento a 58 °C para *V. parahaemolyticus* y 50 °C para *V. vulnificus*, 36 segundos de elongación a 72 °C y 5 min a 72 °C de elongación final. La reacción fue mantenida a 4 °C hasta su uso. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE y visualizados con bromuro de etidio, usando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen®, USA) para determinar el tamaño de los fragmentos. Los fragmentos de banda única obtenidos por MLST fueron purificados con el AxyPrep-PCR Kit™ (Axygen®, CA, USA) a partir del producto de PCR. Cada amplicón de *V. parahaemolyticus* fueron secuenciados en Seqxcel, Inc (San Diego, CA) con los oligonucleótidos M13F (tgtaaacgacggccagt) y M13R (caggaaacagctatgacc) a excepción de *recA* y *pntA* que fueron secuenciados con los oligonucleótidos “forward” (f) y “reverse” (r) diseñados para

el presente trabajo. Los amplicones de banda única de *V. vulnificus* fueron secuenciados con los oligonucleótidos f y r para cada locus (Tabla 5) en MacroGen (Seúl, Corea del Sur).

3.6.1 *Vibrio parahaemolyticus*

El análisis de MLST se realizó con 7 locus para *V. parahaemolyticus*, distribuidos en los dos cromosomas. Se utilizó *recA* (“RecA protein”), *dnaE* (“DNA polymerase III, alpha subunit”) y *gyrB* (“DNA gyrase, subunit B”), del cromosoma I; *dtdS* (“Threonine dehydrogenase”), *pntA* (“Transhydrogenase alpha subunit”), *pyrC* (“Dihydroorotase”), *tnaA* (“Tryptophanase”) del cromosoma II. Cada gen fue amplificado con los oligonucleótidos descritos por González-Escalona *et al.* (2008). Debido a que los oligonucleótidos descritos para *recA* y *pntA* presentaron múltiples bandas en la amplificación por PCR, se diseñaron nuevos oligonucleótidos para estos genes, el desarrollo se realizó con secuencias disponibles en GenBank e implementado con primers3 en Geneious Pro 4.8.5TM (Drummond *et al.*, 2010), los cuales se enlistan en la tabla 4.

3.6.2 *Vibrio vulnificus*

Para *V. vulnificus* se utilizaron seis locus, seleccionando 3 de cada cromosoma de acuerdo al mayor número los sitios polimórficos reportados por Bisharat *et al.* (2005). Los loci utilizados fueron *glp* (“glucose-6-phosphate isomerase”), *metG* (“methionyl-tRNA synthetase”) y *purM* (“phosphoribosylaminoimidazole synthetase”) del cromosoma I; *dtdS* (“threonine dehydrogenase”), *lysA* (“diaminopimelate decarboxylase”) y *pyrC* (“dihydroorotase”) del cromosoma II. Estos genes fueron amplificados de acuerdo a lo descrito por Bisharat *et al.* (2005) y enlistados en la tabla 5.

Tabla 4. Lista de los de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de *V. parahaemolyticus* mediante tipificación por MLST. Los oligonucleótidos señalados (*) fueron desarrollados para el presente estudio.

Locus	Nombre/5'-3'	Amplicón (pb)	Secuencia (pb)
<i>recA</i> *	vprecA-F, cgccgctgctaggtcaaa	919	731
	vprecA-R, cgcgatttctggatgctcacgc		
<i>dnaE</i>	dnaE-F, tgtaaacgacggccagtcgratmaccgctttcgccg	596	557
	dnaE-R, caggaaacagctatgaccgakatgtgtgagctgtttgc		
<i>gyrB</i>	gyrB-F, tgtaaacgacggccagtgaggbggtattcaagc	629	592
	gyrB-R, caggaaacagctatgaccgagtcaccctccacwatgta		
<i>dtdS</i>	dtdS-F, tgtaaacgacggccagttggccataaacgacattctga	497	458
	dtdS-R, caggaaacagctatgaccgagcaccacgtgtttagc		
<i>pntA</i> *	vppntA-F, ggtgctggagttcctgaccgtg	650	430
	vppntA-R, aacgcagcaggtgctaccga		
<i>pyrC</i>	pyrC-F, tgtaaacgacggccagtagcaaccggtaaaattgtcg	533	493
	pyrC-R, caggaaacagctatgaccagtgtaagaaccggcaciaa		
<i>tnaA</i>	tnaA-F, tgtaaacgacggccagttgtacgaaattgccacaaa	463	423
	tnaA-R, caggaaacagctatgaccaatatttccgccatcaac		

Tabla 5. Lista de los de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de *V. vulnificus* para la tipificación por MLST.

Locus	Nombre/ 5'-3'	Amplicón (pb)	Secuencia (pb)
<i>glp</i>	glp-A1, aacgttgatggactcacatcg	678	579
	glp-A2, cacagccggtgcaatgaag		
<i>metG</i>	metG-A1, acctgcctcagttgaaagc	695	621
	metG-A2, tgctgctgcaacaattcg		
<i>purM</i>	purM-A1, gtgctttatgcgaactaccaac	694	627
	purM-A2, cggccattcccagctctttc		
<i>dtdS</i>	dtdS-A1, ggtcacaaaaaacatcccag	724	645
	dtdS-A2, catttcacggccatagatacc		
<i>lysA</i>	lysA-A1, gcactacgcattaaaaccgct	862	789
	lysA-A2, gtttctgcaatcacatccacg		
<i>pyrC</i>	pyrC-A1, ctcatcatgccaacactgtc	698	423
	pyrC-A2, gcgtgagccgtgtaagag		

Tabla 6. Lista de los oligonucleótidos diseñados en el presente trabajo, para la amplificación y secuenciación de 6 dominios del gen *rtxA1* de *V. vulnificus*. La secuencia obtenida para cada dominio corresponde a la posición del cromosoma-II (del gen *rtxA1*) de la cepa CMCP6 (GenBank: AE016796).

Dominio	Nombre/ 5'-3'	Amplicón (pb)	Secuencia (pb)	Posición
DUF	duf-F, agcttgagagctatggttatagt	710	597	525262-525858
	duf-R, ccttcttcgccttcttgac			
RID	rid-F, tgtatctggatggaacggcg	756	678	523861-524538
	rid-R, cgtccatcatgctgtagctgg			
α/β	α/β -F, tgaccatgcggtagaaaatgg	711	642	522529-523170
	α/β -R, atcaagcgggtgctcgcttc			
Mcf	mcf-F, caagtctgagaagtacaaccga	603	513	521615-522126
	mcf-R, tcggacttgccgaagaaacg			
CPD	cpd-F, tcacaatcaaaatgtgaatgattggga	260	222	519538-519759
	cpd-R, cgaccatgaccactaactgccagcg			
PMT C1/C2	pmt-F, accgattggcgcacacctacca	-	642	520579-521220

3.7 Detección y caracterización del gen *rtxA1* de *Vibrio vulnificus*

Los análisis del gen *rtxA1* de *V. vulnificus* se realizó con base en lo descrito por Kwak *et al.* (2011) y Roig *et al.* (2011). Para este análisis se seleccionaron los dominios DUF, RID, α/β , Mcf, CPD y PMT C1/C2.

3.7.1 Diseño de oligonucleótidos para los dominios del gen *rtxA1*

Los oligonucleótidos f y r para los dominios DUF, RID, α/β , Mcf y CPD, fueron diseñados con primer3 implementado en Geneious Pro 4.8.5.™ Para determinar la presencia del dominio PMT C1/C2 se utilizó los oligonucleótidos mcf-F y cpd-R para amplificar 2619 pb (*rtxA1*-C) o 1110 pb (*rtxA1*-M). La amplificación correspondiente al *rtxA1*-C se secuenció con el oligonucleótido pmt-f y para *rtxA1*-M con mcf-f. Las secuencias de los oligonucleótidos, tamaño de amplificación y región de secuenciación se describen en la tabla 6.

3.7.2 Amplificación de los dominios del gen *rtxA1*

La mezcla de amplificación por PCR (1X) consistió de 1.5 mM de MgCl₂, 0.125 mM de dNTP's , 0.5 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.3 U de *Taq* polimerasa y 1 μl (50 μM) de ADN por reacción a 30 μl de volumen final. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 96 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos. Cada ciclo se realizó a 96 °C por 30 segundos de desnaturalización, 30 segundos de alineamiento a 53 °C, 36 segundos de elongación a 72 °C y 5 minutos a 72 °C de elongación final. La temperatura para amplificar el dominio PMT C1/C2 con los oligonucleótidos mcf-F y cpd-R se incrementó a 45 ciclos y 62 °C de temperatura de alineamiento. Las reacciones fueron mantenidas a 4 °C hasta su uso. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y visualizados con bromuro de etidio, usando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen®, USA) para determinar el tamaño de los fragmentos. Los productos de banda única fueron purificados como se describe en la sección 3.6 y secuenciados en SeqXcel Inc. (CA, USA).

3.8 Análisis de secuencias

La inspección y edición de las secuencias generadas en el presente trabajo se realizó en Geneious 4.8.5TM. Las secuencias obtenidas en los análisis de MLST fueron editadas tomando como referencia lo descrito en pubMLST para cada especie. Las secuencias obtenidas del gen *rtxA1* en *V. vulnificus* se editaron usando como referencia las secuencias descritas por Kwak *et al.* (2011) y Roig *et al.* (2011).

3.8.1 Análisis estadístico y filogenético

Los análisis estadísticos fueron implementados por separado para cada locus. El número de alelos, haplotipos, diversidad haplotípica (Hd), sitios polimórficos (SP), diversidad nucleotídica (π), variabilidad genética (θ) y proporción de sustitución sinónima y no sinónima (d_N/d_S) fueron calculados en DNASP 5.10.1 (Librado y Rozas, 2009).

A partir de las secuencias concatenadas para cada especie se realizó un análisis exploratorio, después del cual se seleccionó método Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter (1000 repeticiones) implementado en Mega 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011). Para *V. parahaemolyticus*, las secuencias de MLST fueron concatenadas en el siguiente orden: *dnaE*, *gyrB*, *recA*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* y *tnaA* y para *V. vulnificus*: *glp*, *metG*, *purM*, *dtdS*, *lysA* y *pyrC*. Los análisis del gen *rtxA1* para *V. vulnificus* se realizó con secuencias concatenadas en el siguiente orden: DUF, RID, α/β , Mcf, PMT C1/C2 y CPD. El índice de diferenciación genética (Fst) fue utilizado como medida para determinar la diferencia entre los grupos formados en *V. vulnificus*, el cual se implementó en DNASP 5.10.1.

3.8.2 Análisis comparativo

Para *V. parahaemolyticus* se realizó un análisis exploratorio con los perfiles alélicos (PA) correspondientes a 1148 ST disponibles en pubMLST, sin embargo, con los resultados obtenidos se delimitó a 100 ST, las cuales incluyeron a las presentes en el CC3 y el resto fueron escogidas de manera aleatoria. Los PA fueron utilizados para generar los complejos clonales (CC) en goeBURST 1.2.1 (Francisco *et al.*, 2009). De acuerdo a este programa, se considera como CC a la asociación de 3 o más PA, la asociación de dos PA se considero como doble y aquellos perfiles que no presentaron asociación se les consideró como PA único. Adicionalmente, se compararon las secuencias obtenidas en el presente trabajo con las secuencias de 68 cepas reportadas por González-Escalona *et al.* (2008) y Turner *et al.* (2013) como los mismos parámetros descritos en la sección 3.8.1.

El análisis comparativo del gen *rtxA1* de *V. vulnificus* se realizó con la implementación del índice Fst, el análisis filogenético con los parámetros descritos en la sección 3.8.1 y con el programa splitsTree v4 (Huson *et al.*, 2008). El análisis incluye las secuencias editadas de la variante C (*rtxA1*-C, 3294 pb) y M (*rtxA1*-M, 2652 pb) del gen *rtxA1* descritas por Kwak *et al.* (2011), Morrison *et al.* (2012) y Roig *et al.* (2011).

Capítulo 4. Resultados

4.1 Detección y caracterización molecular de *Vibrio parahaemolyticus*

4.1.1 Detección de *Vibrio parahaemolyticus* en la Península de Baja California

En el presente trabajo se detectó por PCR la presencia de *V. parahaemolyticus* en la península de Baja California en los 5 puntos de muestreo seleccionados para este estudio (Figura 2), siendo GN (en 5 muestreos) y BM (en 4 muestreos) donde se registró con mayor frecuencia (Figura 3). Las concentraciones se presentaron en rangos de 4 y 240 NMP/g, siendo en el mes de agosto donde se presentaron las concentraciones más altas, 240 NMP/g en TS, y 210 NMP/g en GN, sin embargo en BM la concentración más alta (193 NMP/g) se registró en enero. Esta última localidad fue la única donde se detectó la hemolisina *trh* a una baja concentración (3 NMP/g), sin embargo no fue posible aislar cepas que presentaran este gen.

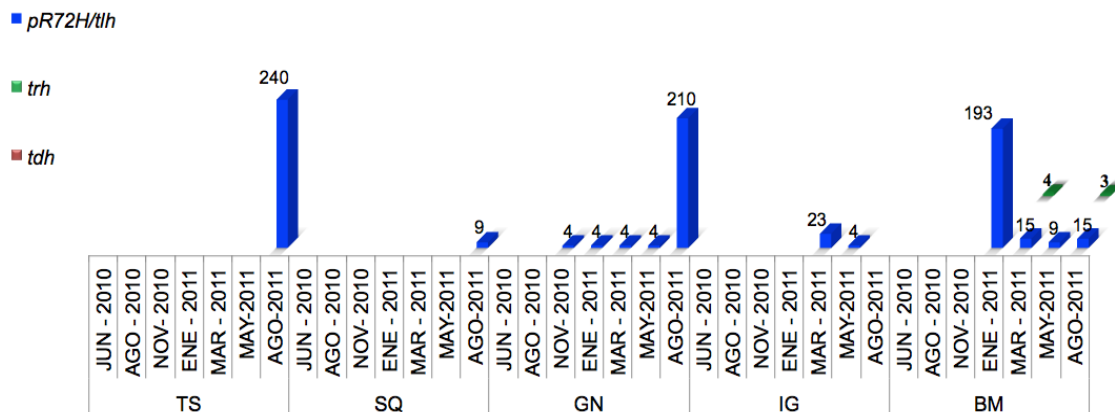


Figura 3. Concentraciones (NMP/g) de *V. parahaemolyticus* detectado por *pR72H*, *tlh* y sus factores de patogenicidad *tdh* y *trh* en muestras de ostión japonés *Crassostrea gigas*, en 5 localidades en la península de Baja California. Durante el período de muestreo no se detectó *V. vulnificus* con *vvhA*.

4.1.2 Detección de *Vibrio parahaemolyticus* en el Mercado La Nueva Viga, Ciudad de México

La detección de *V. parahaemolyticus* en muestras de ostión obtenidas del mercado La Nueva Viga se registró en la mayoría de los periodos de muestreo (Figura 4). La detección por PCR con los marcadores moleculares *tlh/pR72H* fue positiva de noviembre de 2010 a septiembre del 2011, periodo en que las concentraciones variaron entre 21 y 3500 NMP/g; a pesar de la constante detección de *V. parahaemolyticus*, las hemolisinas *tdh* y *trh* fueron detectadas únicamente en el mes de Julio del 2011 en concentraciones de 3 NMP/g; de esta muestra se aislaron cepas *tdh*⁺/*trh*⁺ las cuales fueron incorporadas a la colección de CICESE.

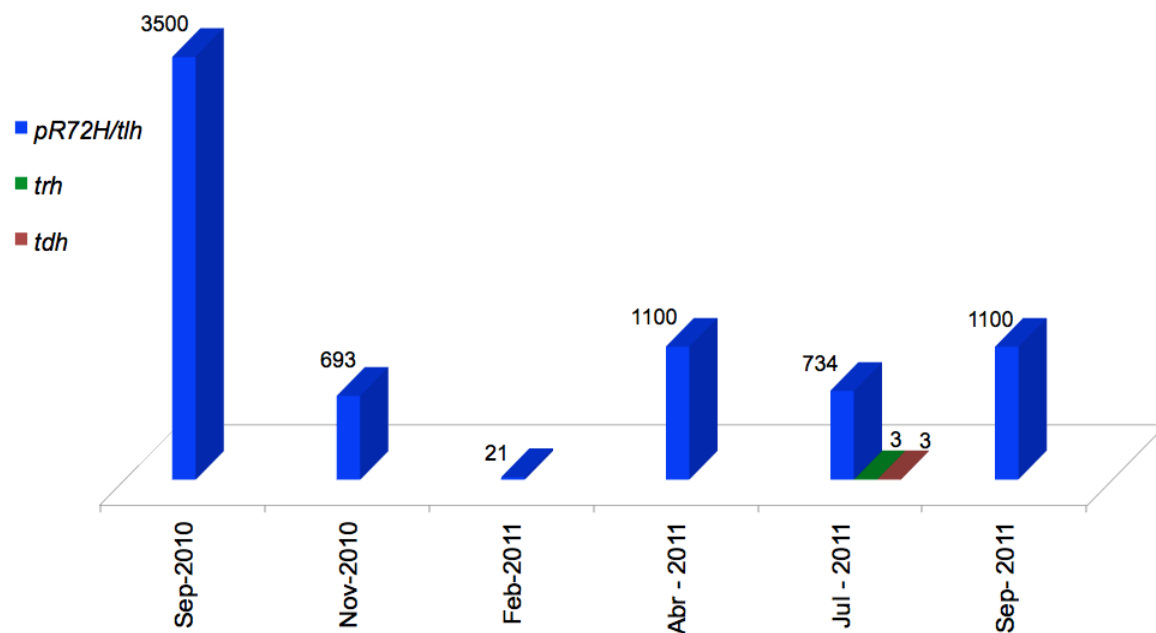


Figura 4. Concentraciones (NMP/g) de *V. parahaemolyticus* detectado por *pR72H* y *tlh* y sus factores de patogenicidad *tdh* y *trh* en muestras de ostión (*Crassostrea spp*) en el mercado La Nueva Viga, en la ciudad de México.

4.1.3 Caracterización molecular de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* obtenidas de colecciones

De las 101 cepas presuntivamente identificadas como *V. parahaemolyticus* y donadas por el InDRE, solo 55 de ellas fueron positivas para los marcadores moleculares especie específicos *tlh* y *pR72H* de la especie. De estas 55 cepas, 19 fueron tipificadas como *tdh*⁺/*trh*⁻ y 18 de ellas fueron ORF8⁺ por análisis de PCR. Quince cepas ORF8⁺ fueron aisladas en 1998 en tres entidades federativas (Hidalgo, Ciudad de México y Michoacán), las tres restantes fueron aisladas en los años de 1999, 2000, 2009 en 3 entidades federativas (Nuevo León, Tamaulipas e Hidalgo, respectivamente). Las 19 *tdh*⁺ cepas fueron incorporadas a la colección del CICESE (Tabla 1).

Seis cepas de la colección CICESE caracterizadas como *tdh*⁺/*trh*⁻, aisladas por Revilla-Castellanos (2012) de bioincrustaciones adheridas a los cascos de barcos de carga atracados en el puerto de Ensenada, fueron incorporadas en el presente estudio. Únicamente la cepa CICESE-273 fue caracterizada por PCR como ORF8⁺.

De las 8 cepas de la colección CAIM usadas en el presente trabajo, siete cepas se caracterizaron como *tdh*⁺/*trh*⁻ y solo seis de estas como ORF8⁺. Una cepa (CAIM 1772) se caracterizó como *tdh*⁺/*trh*⁺. Estos resultados fueron ratificados en CICESE y se describen en la tabla 1.

4.1.4 Serotipificación de *Vibrio parahaemolyticus* por anticuerpos para el serotipo O3:K6

Todas las cepas caracterizadas por PCR como *tdh*⁺/*trh*⁻/ORF8⁺ mostraron aglutinamiento con los anticuerpos O3 y K6. Las cepas de *V. parahaemolyticus* que presentaron aglutinamiento están descritas en la tabla 1.

4.2 PFGE de *Vibrio parahaemolyticus*

Treinta y ocho cepas de *V. parahaemolyticus* y dos cepas de *V. cholerae* (CICESE 121 y 122) fueron tipificadas mediante la técnica de PFGE con la enzima NotI (Tabla 1), analizando solamente los fragmentos con peso molecular mayor a 48.5 kb.

El análisis mediante PFGE con la enzima NotI separó las cepas en dos clados (Figura 5); uno conformado por todas las cepas de *V. parahaemolyticus* y otro conformado por las cepas de *V. cholerae*, con una similitud <20% entre los dos, lo que muestra una clara separación entre especies. A una similitud de 39%, el clado con cepas de *V. parahaemolyticus* se dividió en 8 clusters (A-H), con una similitud de 23%-41% entre ellos.

El clúster A, agrupó 4 cepas (*tdh*⁺/*trh*⁻) aisladas de muestras ambientales (osti6n), con dos pulsotipos que presentaron una similitud >94%. Las cepas CICESE-274, -172, CAIM 728 y 1435 tipificadas como *tdh*⁺/*trh*⁻, se presentaron como cepas 6nicas en los clusters B, H, D, y G respectivamente, sin embargo la similitud entre los 4 clusters fue menor a 30%. El cl6ster C present6 la cepa CAIM 1772 tipificada como *tdh*⁺/*trh*⁺, aislada de muestras ambientales (camar6n). El cl6ster F agrup6 4 cepas obtenidas de muestras ambientales (osti6n) tipificadas como *tdh*⁺/*trh*⁺, este cl6ster present6 2 pulsotipos con una similitud >74%.

El cl6ster E agrup6 25 cepas tipificadas como *tdh*⁺/*trh*⁻/ORF8⁺/O3:K6; este cl6ster present6 21 pulsotipos con una similitud entre 50 y 96%. De estas 25 cepas, 18 fueron aisladas de casos cl6nicos en M6xico (CICESE/InDRE), 5 del brote epid6mico registrado en Sinaloa durante 2003-2004 (CAIM), y una del brote epid6mico registrado en Texas, EUA (CAIM 729^T/TX2103). Solo una cepa (CICESE-273) asociada en este cl6ster fue aislada en M6xico de muestras ambientales (bioincrustaciones) en el 2012 (Figura 5).

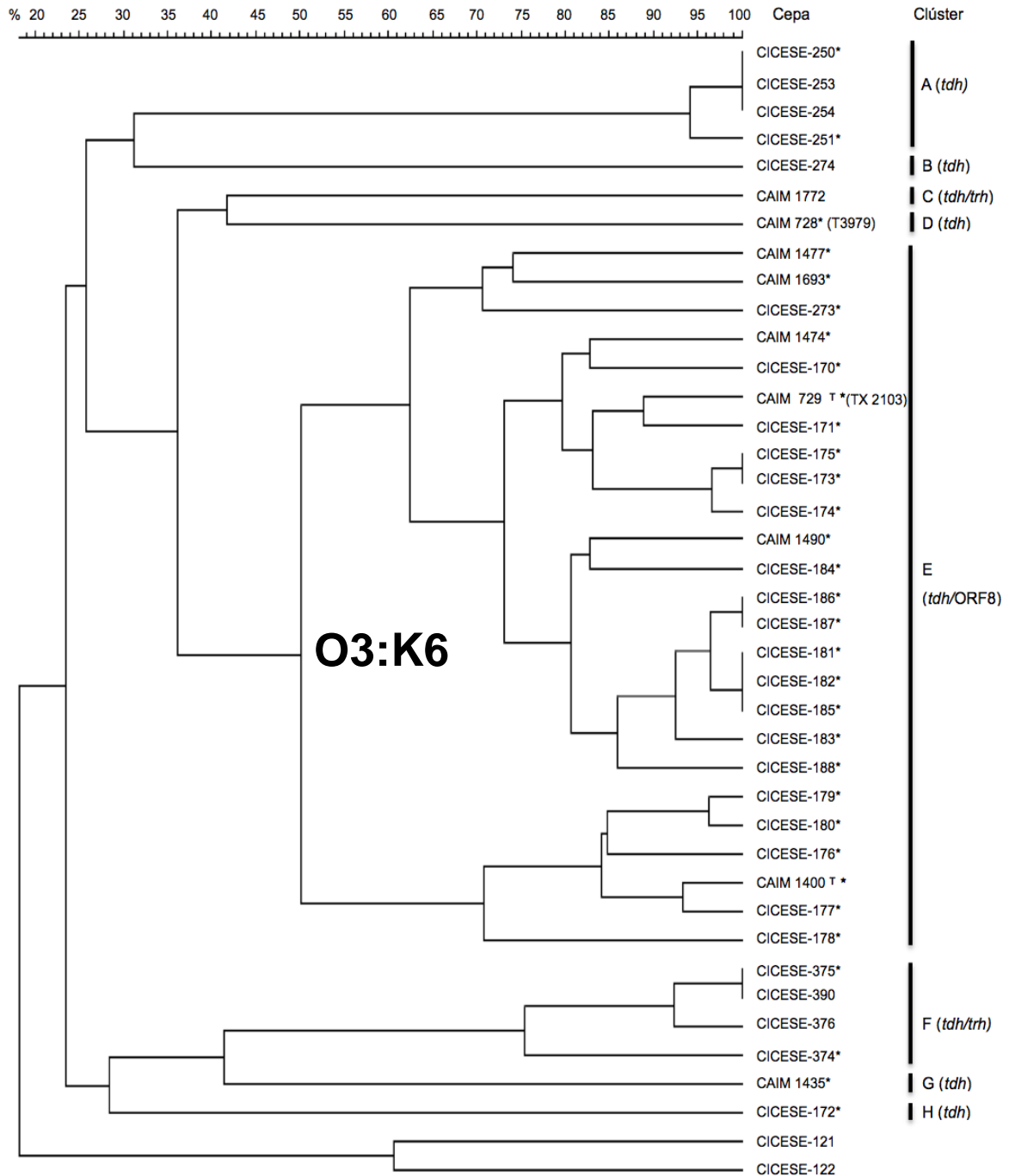


Figura 5. Caracterización de *V. parahaemolyticus* con la enzima de restricción NotI por PFGE, utilizando el algoritmo UPGMA. Las cepas CICESE-121 y CICESE-122 de *V. cholerae* se agrupan como el grupo externo. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para el análisis con la técnica de MLST.

4.3 MLST de *Vibrio parahaemolyticus*

4.3.1 Análisis descriptivo de MLST

De los resultados obtenidos en PFGE, se seleccionaron 32 cepas para el análisis de MLST. Se incluyeron las 25 cepas ORF8⁺/O3:K6, 5 cepas *tdh*⁺/*trh*⁻ y 2 *tdh*⁺/*trh*⁺ (Figura 5). Los análisis de las secuencias presentaron 43 alelos (Tabla 7); la mayoría de los loci presentaron 6 alelos a excepción de *gyrB* que presentó 7 alelos. Los alelos descritos en pubMLST correspondientes a *dnaE*-3, *recA*-19, *dtdS*-4, *pntA*-29, *pyrC*-4, *tnaA*-22, se presentaron en 25 cepas y *gyrB*-4 se presentó en 24 cepas (Tabla 8).

Tres alelos pertenecientes a *gyrB*, *tnaA* y *recA* presentaron 1-2 pb de diferencia en los análisis comparativos con las secuencias disponibles en PubMLST; estos alelos fueron secuenciados en ambas direcciones (“Forward y Reverse”), sometidos a la base de datos de pubMLST y fueron asignados como *gyrB*-415, *recA*-295 y *tnaA*-231.

4.3.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los 7 loci estudiados en *V. parahaemolyticus* presentó una diversidad haplotípica (Hd) en rangos de 0.381 (*dtdS*) y 0.44 (*gyrB*). La mayor diversidad nucleotídica se presentó en *recA* ($\pi = 0.01054$) y la menor en *pyrC* ($\pi = 0.00378$). La variabilidad genética de *dtdS* ($\theta = 0.01345$) fue la mayor y la de *dnaE* ($\theta = 0.00535$) la menor. El mayor número de sitios polimórficos los presentó *recA* con 34. El resto de la estadística de *V. parahaemolyticus* se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Descripción estadística de los 7 loci utilizados en el análisis de MLST de *V. parahaemolyticus*.

Locus	No. alelos	Hd	π	SP (%)	Θ
<i>dnaE</i>	6	0.391	0.00413	11(1.97)	0.00535
<i>gyrB</i>	7	0.44	0.00546	22(3.71)	0.00923
<i>recA</i>	6	0.391	0.01054	34(4.66)	0.01192
<i>dtdS</i>	6	0.381	0.00825	25(5.45)	0.01345
<i>pntA</i>	6	0.391	0.00571	14(3.25)	0.00808
<i>pyrC</i>	6	0.391	0.00378	13(2.63)	0.00655
<i>tnaA</i>	6	0.391	0.00633	14(3.30)	0.00822

4.3.3 Determinación de la secuencia tipo (ST) y perfil alélico (PA) de las cepas pandémicas O3:K6 de *Vibrio parahaemolyticus*

El análisis de MLST de los 7 loci concatenados (3682 pb) de *V. parahaemolyticus* presentó 7 ST en 32 cepas (Tabla 8), las cuales se agruparon en 3 clusters (Figura 6). El clúster MLST_{Vp-I} está conformado por 25 cepas las cuales fueron aisladas entre 1998-2012, y tipificadas como pandémicas (*tdh*⁺/*trh*⁻/ORF8⁺/O3:K6). La mayoría (24) de las cepas de este clúster, presentan la ST-3 con el PA *dnaE*-3, *gyrB*-4, *recA*-19, *dtdS*-4, *pntA*-29, *pyrC*-4 y *tnaA*-22, a excepción de la cepa CICESE-185 que presentó diferente ST (ST-1139) debido a un nuevo alelo (*gyrB*-415) reportado en el presente estudio (Tabla 8).

El clúster MLST_{Vp-II} agrupó 2 cepas (CICESE-374 y -375), tipificadas como *tdh*⁺/*trh*⁺, aisladas de muestras de ostiones en la ciudad de México, estas cepas presentaron la misma ST (ST-1141), la cual es reportada en el presente trabajo como nueva, ya que presentó un nuevo alelo (*tnaA*-231). El clúster MLST_{Vp-III} agrupó 5 cepas *tdh*⁺ en 4 ST, estas fueron aisladas tanto de muestras ambientales como de casos clínicos en diferentes zonas geográficas (Tabla 1). La cepa CAIM 728 presentó la ST-326 previamente descrita. Las cepas CICESE-250 y CICESE-251 presentaron ST-1140 reportada como nueva debido al alelo *recA*-295 descrito en el presente trabajo; las cepas CICESE-172 y CAIM 1435 con las ST-1138 y ST-1137 (respectivamente) también son reportadas como nuevas debido a que presentaron diferentes PA a los descritos previamente en pubMLST (Tabla 8).

4.3.4 Análisis comparativo

El análisis comparativo de las cepas descritas en el presente trabajo con los PA descritos en pubMLST (2015) y las secuencias de 68 cepas reportadas por González-Escalona *et al.*, 2008 y Turner *et al.*, 2013, agrupó las cepas ORF8/O3:K6 en el CC3, 24 de las cuales presentaron ST-3 como fundadora de este complejo (Figura 7 y 8). La cepa CAIM 728, se asoció como doble con la ST-89. Por otro lado las ST correspondientes a las cepas CAIM 1435, CICESE-172, CICESE-250, CICESE-251, CICESE-374 y CICESE-375 se agruparon como ST únicas (Figura 7).

Las comparación de las secuencias de cada locus con la secuencias de aminoácidos (aa) en la base de datos de pubMLST indica que las cepas tipificadas como O3:K6 presentaron el mismo perfil alélico de aa (*dnaE*-2, *gyrB*-1, *dtdS*-1, *pyrC*-1 y *tnaA*-1), por lo que la diferencia de una base en *gyrB* en la secuencia de la cepa CICESE-185 corresponde a un cambio sinónimo.

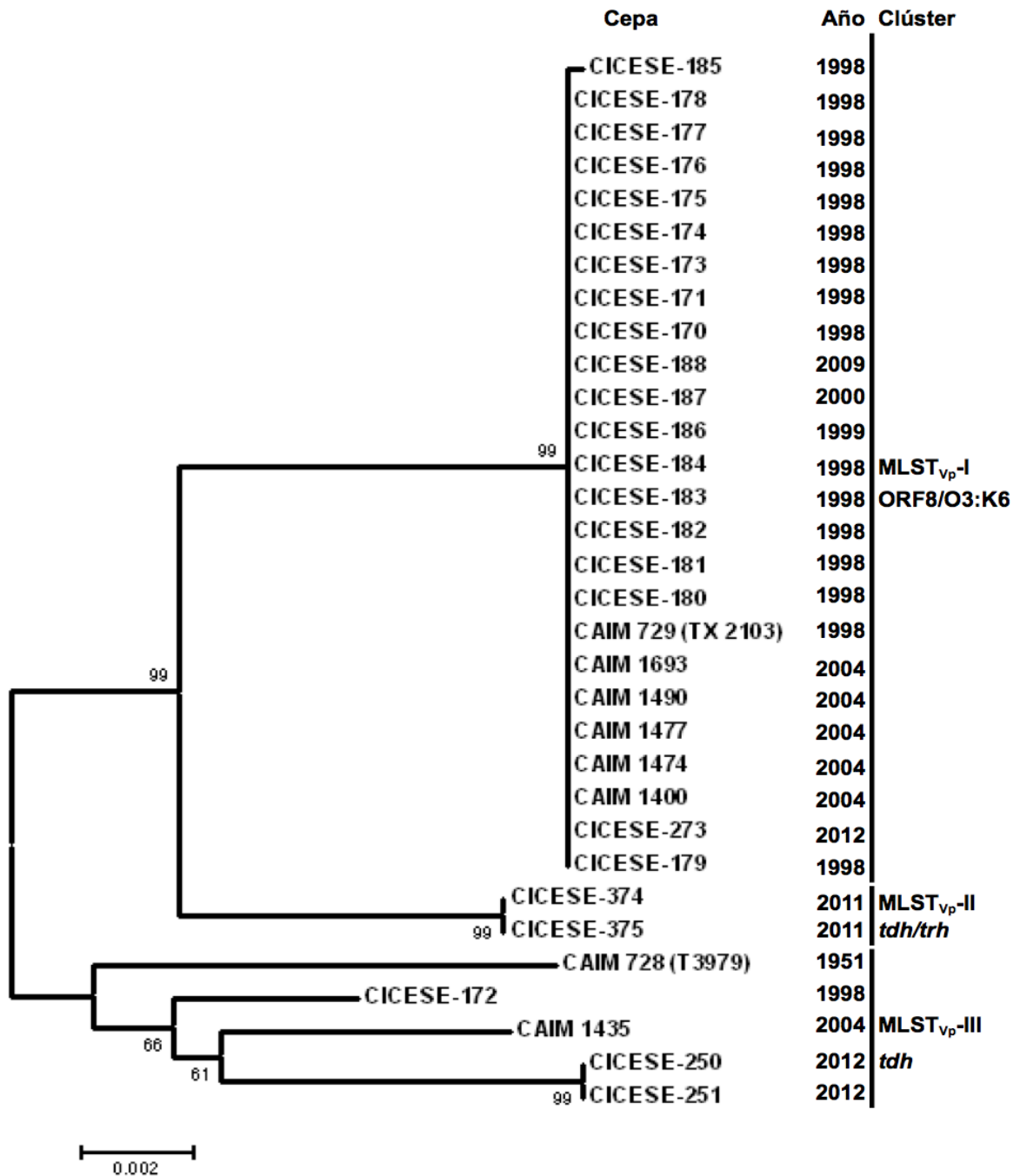


Figura 6. Análisis por MLST de *V. parahaemolyticus* con 7 genes concatenados (*dnaE*, *gyrB*, *recA*, *dtbS*, *pntA*, *pyrC* y *tnaA*). Las cepas tipificadas como ORF8/O3:K6 se asociaron en el mismo clúster y separadas del resto de las cepas, usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.

Tabla 8. Perfil alélico de los análisis de MLST para *V. parahaemolyticus*. Los alelos, ST, CC, o ST única (S) correspondientes a cada cepa, fueron obtenidos por comparación con pubMLST. Las cepas señaladas (*) presentaron un alelo nuevo o nuevo PA.

Cepa	<i>dnaE</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>dtdS</i>	<i>pntA</i>	<i>pyrC</i>	<i>tnaA</i>	ST	CC
CAIM 728*	28	28	44	46	61	49	38	326	D
CAIM 729 ^T	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CAIM 1400 ^T	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CAIM 1435*	45	336	143	7	14	46	20	1137	S
CAIM 1474	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CAIM 1477	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CAIM 1490	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CAIM 1693	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE-170	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE-171	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE-172*	10	159	31	88	26	109	57	1138	S
CICESE -173	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -174	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -175	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -176	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -177	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -178	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -179	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -180	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -181	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -182	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -183	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -184	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -185 *	3	415	19	4	29	4	22	1139	3
CICESE -186	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -187	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -188	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -250*	19	295	295	223	136	11	13	1140	S
CICESE -251*	19	295	295	223	136	11	13	1140	S
CICESE -273	3	4	19	4	29	4	22	3	3
CICESE -374*	51	57	75	353	45	78	231	1141	S
CICESE -375*	51	57	75	353	45	78	231	1141	S

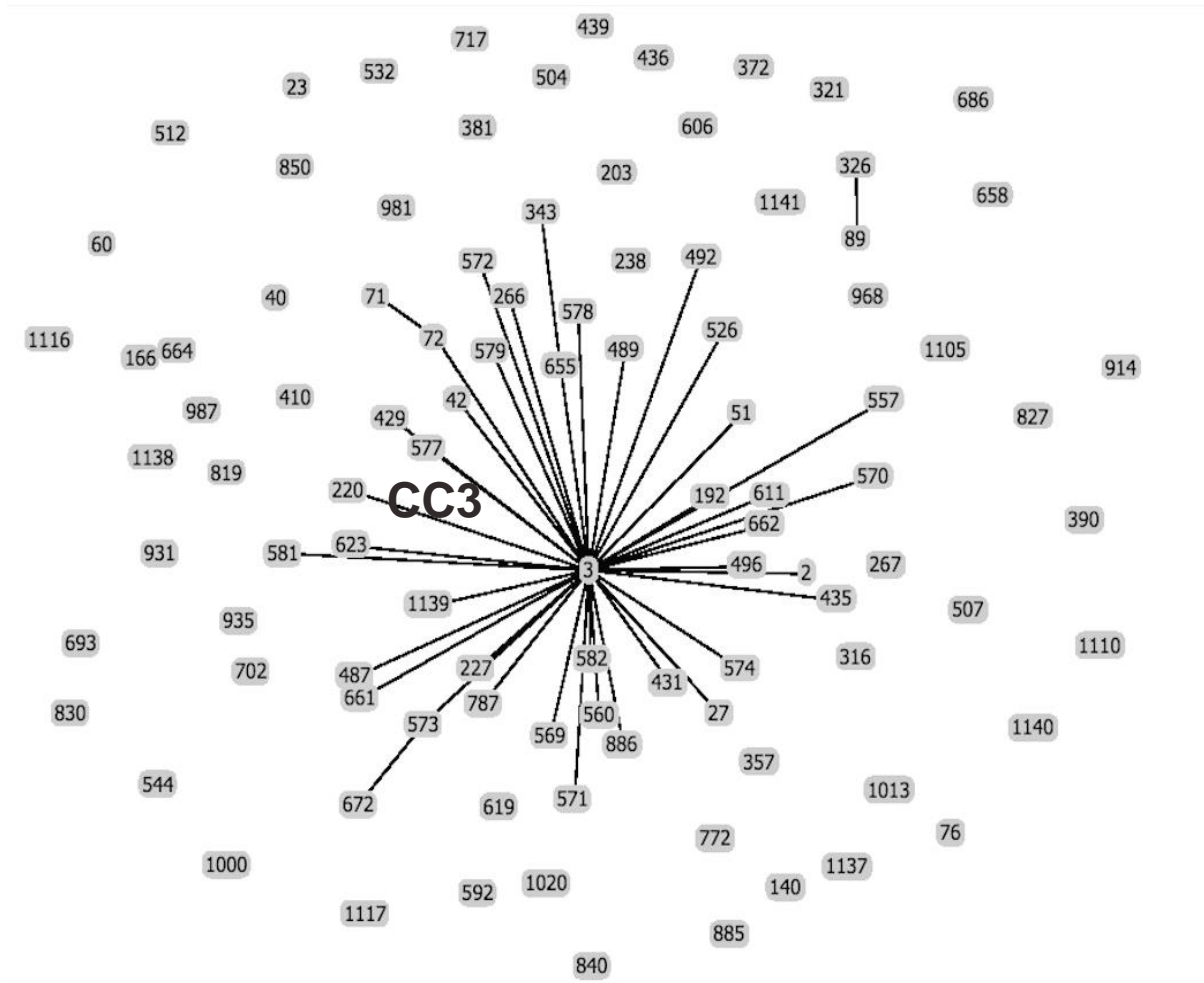


Figura 7. Análisis de *V. parahaemolyticus* mediante la comparación de los PA de 32 cepas estudiadas en el presente trabajo y 68 PA obtenidos de pubMLST e implementado en goeBURST 1.2.1. Las ST-3 y ST-1139 de las cepas CICESE tipificadas como ORF8⁺/O3:K6 se asociaron en el CC3 con 40 ST descritos en pubMLST. La ST-326 (CAIM 728), se asoció como doble a ST-89. Las ST-1137 (CAIM 1435), ST-1138 (CICESE-172), ST-1140 (CICESE-250 y CICESE-251) y ST-1141 (CICESE-374 y CICESE-375) se presentaron como ST únicas.

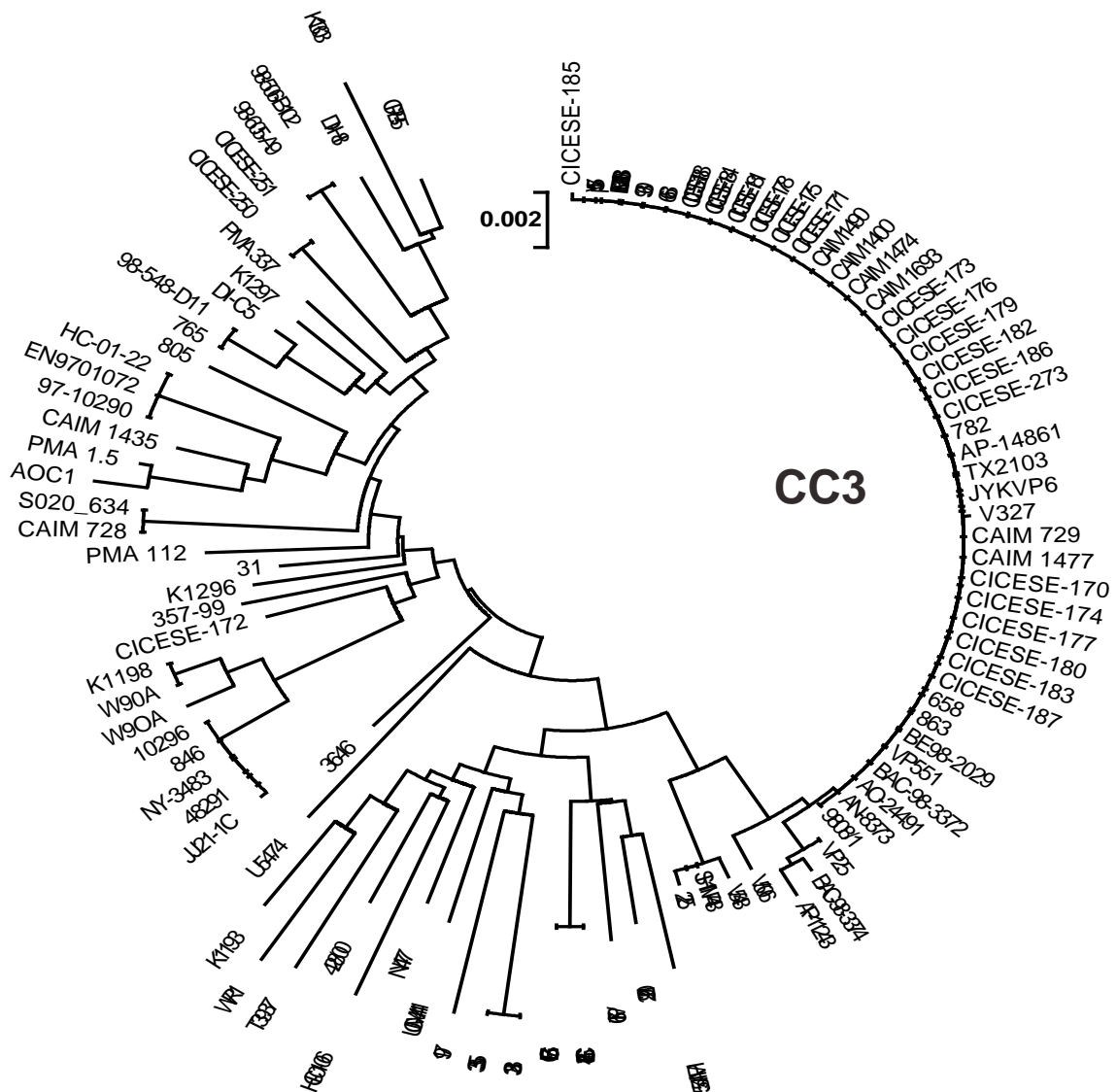


Figura 8. Análisis de *V. parahaemolyticus* mediante la comparación de las secuencias de 32 cepas generadas en el presente trabajo y las secuencias de 68 cepas reportadas por González-Escalona *et al.*, 2008 y Turner *et al.*, 2013. El análisis se implementó usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter. El CC3 agrupa a las cepas del clon pandémico.

4.4 Identificación y caracterización de *Vibrio vulnificus*

4.4.1 Detección de *Vibrio vulnificus* en la península de Baja California

Los análisis por PCR mediante el marcador molecular especie específico *vvhA* mostraron resultados negativos en los 35 muestreos realizados durante un año, en las granjas de cultivo de ostión, por lo que *V. vulnificus* no fue registrado en las muestras obtenidas en la península.

4.4.2 Detección de *Vibrio vulnificus* en muestras obtenidas del Mercado La Nueva Viga (Ciudad de México)

En las muestras del mercado La Nueva Viga, se detectó la presencia *V. vulnificus* (*vvhA*⁺) en los meses de febrero, junio y septiembre del 2011. La cuantificación mostró concentraciones en los rangos de 2 a 25 NMP/g (Figura 9). De las muestras positivas se aislaron 60 cepas, y su tipificación con el gen *vcg*, muestra que el 47% de las cepas aisladas correspondió al genotipo ambiental (*vcgE*) y un 53 % al genotipo clínico (*vcgC*).

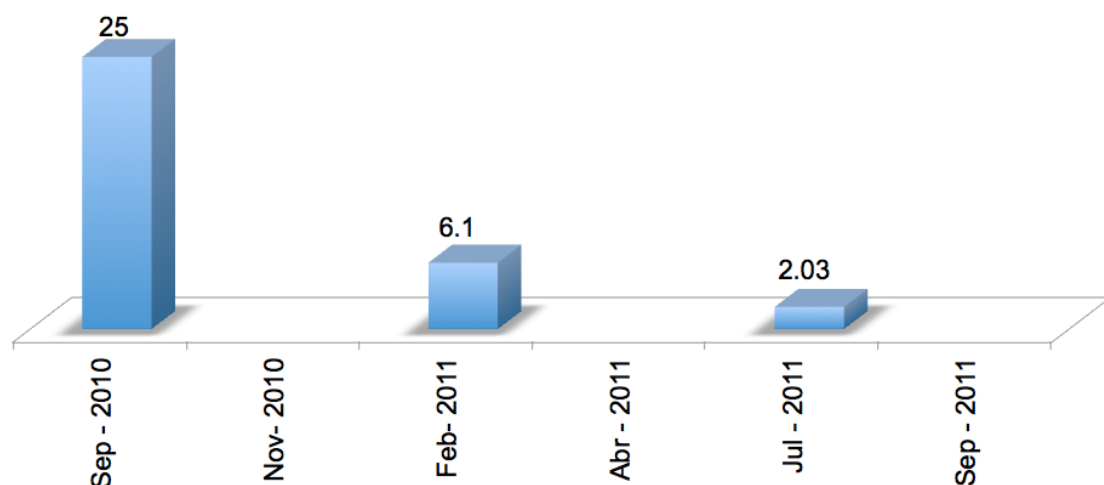


Figura 9. Concentraciones (NMP/g) de *V. vulnificus* por detección del gen *vvhA* obtenidas de muestras de ostión (*Crassostrea spp*) en el mercado La Nueva Viga, en la ciudad de México.

4.5 PFGE de *Vibrio vulnificus*

En el presente trabajo se tipificaron 63 cepas de *V. vulnificus* con la técnica PFGE con la enzima de restricción NotI (Tabla 2), analizando solamente 19 fragmentos restricción que presentaron un peso molecular mayor a 48.5 kb, los cuales generaron 38 pulsotipos (Figura 10).

El análisis comparativo por UPGMA de los pulsotipos (Figura 10), resultó en la formación de 2 clados, uno conformado por cepas de *V. vulnificus* y el otro por las cepas de *V. cholerae*. A 39% de similitud se formaron 9 clusters (A-I) con cepas de *V. vulnificus*, con una similitud que fluctuó entre 17 a 39% entre clusters. Cada clúster agrupó cepas que presentaron el mismo genotipo, *vcgE* o *vcgC*. Las cepas *vcgC* fueron agrupadas en 6 clusters (A, B, D, E, H e I) en donde, las cepas del clúster B presentaron el mayor porcentaje de similitud (>95%) y las del clúster A el menor (<52%). La mayoría de las cepas (29/30) del genotipo *vcgE*, se agruparon en 2 clusters (C y G), con una similitud de menor a 20% entre ellos. La similitud entre las cepas de cada clúster fue de 39% para el C y 44% para el G. La cepa CAIM 610^T (*vcgE*) se asoció con cepas ambientales del clúster G, y las cepas CAIM 1215 (*vcgE*) y CAIM 1860 (*vcgC*) se agruparon como cepas únicas en los clúster F e I respectivamente (Figura 10).

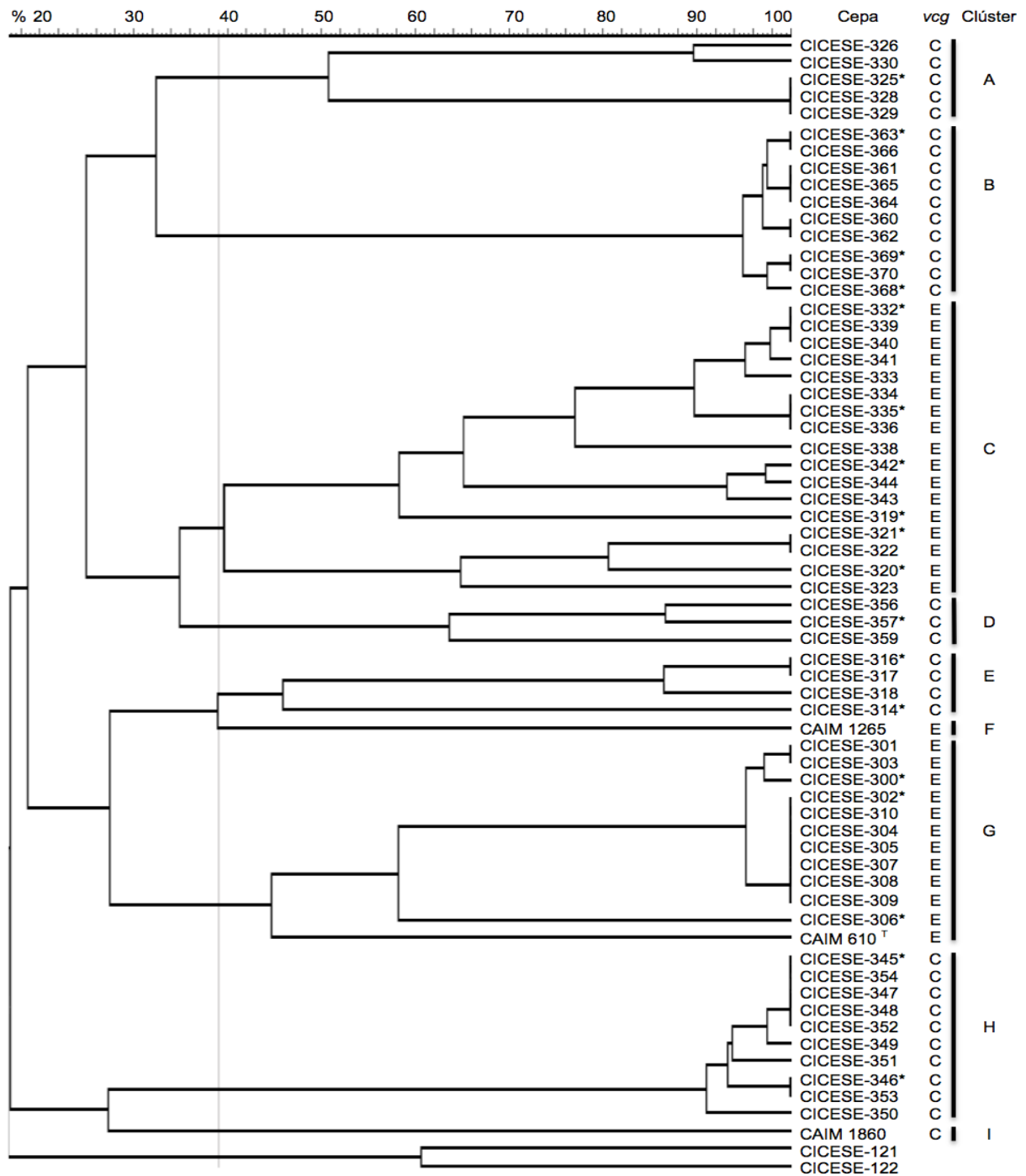


Figura 10. Caracterización de *V. vulnificus* mediante tipificación por PFGE con la enzima de restricción NotI, utilizando el algoritmo UPGMA. La cepa CICESE-121 y CICESE-122 de *V. cholerae* se agruparon como grupo externo. Las cepas marcadas (*) fueron seleccionadas para el estudio de MLST.

4.6 MLST de *Vibrio vulnificus*

De los resultados obtenidos en PFGE se seleccionaron 18 cepas correspondientes a los genotipos *vcgC* y *vcgE*, para el análisis de MLST (Tabla 2 y Figura 10) .

4.6.1 Análisis descriptivo de MLST de *Vibrio vulnificus*

Del análisis de los 6 loci estudiados por MLST para las 18 cepas, se obtuvieron 39 alelos (Tabla 9). Los loci *lysA* y *purM* presentaron el mayor número de alelos, con 8, y 7 respectivamente, el resto de los loci presentaron 6 alelos cada uno. Nueve alelos descritos en el presente trabajo (3 de *dtbS*; 2 de *purM* y *lysA*; 1 de *glp* y *pyrC*, son secuencias que presentaron de 1 a 2 pb de diferencia comparadas con las reportadas ya sea en PubMLST o en GenBank, por lo cual se les consideró como nuevos alelos. Estas secuencias fueron registradas en pubMLST como *purM*-56, *glp*-69, *pyrC*-77, *lysA*-90 y 91, y *dtbS*-94, 95, 96. Los alelos que se presentaron con mayor frecuencia fueron en la cepas analizadas fueron *pyrC*-17 que se presentó en 7 de las 18 cepas, sin embargo los alelos *metG*-2, *purM*-9 y *dtbS*-34 se presentaron en 6 cepas (Tabla 10).

4.6.2 Análisis estadístico de MLST de *Vibrio vulnificus*

La diversidad haplotípica (H_d) se presentó en rangos de 0.81 a 0.88 y la diversidad nucleotídica (π) en rangos entre 0.016 y 0.032. El locus *lysA* presentó la mayor variabilidad genética ($\theta=0.025$) en tanto que el número de sitios polimórficos (SP) varió por locus en rangos de 20 a 40 (Tabla 9).

La concatenación de los 6 loci (*glp*, *metG*, *purM*, *dtbS*, *lysA*, *pyrC*) para las 18 cepas fue resuelta en 9 secuencias tipo (ST); de las cuales 7 corresponden a 14 cepas que presentaron diferentes perfiles alélicos a los descritos en la base de datos PubMLST, debido a la presencia de uno o dos alelos reportados como nuevos en el presente trabajo. En la tabla 10 se describe los perfiles alélicos para las cepas analizadas por MLST.

El análisis de las secuencias concatenadas (*glp*, *metG*, *purM*, *dtdS*, *lysA* y *pyrC*) mediante el método de Neighbor-joining (Kimura-2-parameter model) presentó la divergencia de *V. vulnificus* en dos clusters (Figura 11). El clúster MLST_{VV-I} conformado por cepas *vcgC*, y el clúster MLST_{VV-II}, conformado por las 9 cepas *vcgE* y una *vcgC* (CICESE-357). El valor de diferenciación genética de *Fst* entre clusters fue de 0.65, sin embargo el valor de *Fst* en el análisis de las cepas para cada clúster fue bajo, 0.009 para MLST_{VV-I} y 0.06 para MLST_{VV-II}. En tanto que la diversidad nucleotídica y variabilidad genética fue mayor para el clúster MLST_{VV-I} ($\pi=0.01626$ y $\Theta=0.013$), que los valores obtenidos para el clúster MLST_{VV-II} ($\pi=0.008$ y $\Theta=0.006$). Las secuencias del clúster MLST_{VV-I} presentaron 4 ST con 91 sitios polimórficos, mientras que el MLST_{VV-II} presentó 5 ST con 52 sitios polimórficos. La divergencia entre los dos clusters mostró 36 diferencias fijas entre las secuencias.

Tabla 9. Análisis estadístico de los 6 loci estudiados para MLST en *V. vulnificus*. La tabla muestra diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), sitios polimórficos (SP) y variabilidad genética (Θ).

Locus	No. alelos	Hd	π	SP	θ
<i>glp</i>	6	0.81	0.025	30	0.018
<i>metG</i>	6	0.82	0.024	23	0.016
<i>purM</i>	7	0.85	0.016	22	0.014
<i>dtdS</i>	6	0.83	0.025	25	0.018
<i>lysA</i>	8	0.88	0.032	40	0.025
<i>pyrC</i>	6	0.81	0.022	20	0.013

Tabla 10. Perfil alélico de los análisis de MLST para *V. vulnificus*. Las cepas con * presentaron uno o más nuevos alelos.

Cepa	<i>glp</i>	<i>metG</i>	<i>purM</i>	<i>dtdS</i>	<i>lysA</i>	<i>pyrC</i>
CICESE-300*	8	9	56	94	32	19
CICESE-302*	8	9	56	94	32	19
CICESE-306*	8	9	56	94	32	19
CICESE-314*	16	5	4	29	90	16
CICESE-316*	16	5	4	29	90	16
CICESE-319*	69	2	9	34	25	17
CICESE-320*	69	2	9	34	4	17
CICESE-321*	69	2	9	34	4	17
CICESE-325	1	1	2	29	3	3
CICESE-332*	69	2	9	34	91	17
CICESE-335*	69	2	9	34	91	17
CICESE-342*	69	2	9	34	91	17
CICESE-345*	28	5	21	95	35	77
CICESE-346*	28	5	21	95	35	77
CICESE-357*	27	7	8	96	64	17
CICESE-363	28	25	55	39	4	43
CICESE-368	28	25	55	39	4	43
CICESE-369	28	25	55	39	4	43

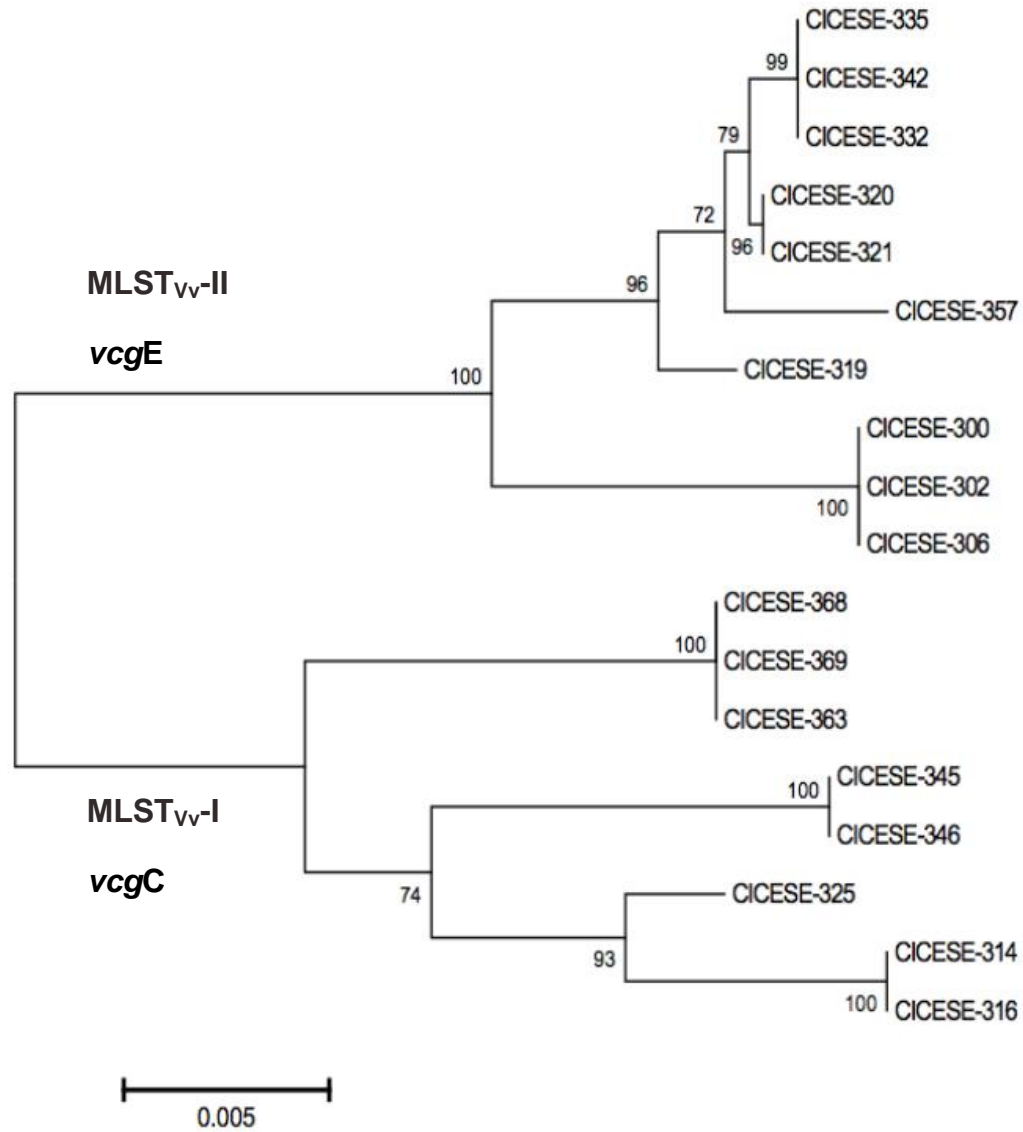


Figura 11. Análisis por MLST de 18 cepas de *V. vulnificus* por la secuenciación y concatenación de 6 genes (*glp*, *metG*, *purM*, *dtdS*, *lysA* y *pyrC*) usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.

4.7 Análisis del gen *rtxA1* de *Vibrio vulnificus*

Con los oligonucleótidos diseñados en este estudio, se amplificó y se secuenció exitosamente las 18 cepas seleccionadas para el análisis de los 5 dominios (DUF, RID, α/β , Mcf y CPD) del gen *rtxA1* de *V. vulnificus*. El tamaño de amplificación y secuenciación resultó de acuerdo al número de pb esperadas para cada uno (Tabla 6 y Figura 12a). Debido a que los dominios DUF, RID, α/β , Mcf y CPD son comunes para los tipos *rtxA1*-C y *rtxA1*-M de esta especie, se utilizaron los oligonucleótidos mcf-F y cpd-R para determinar la presencia del dominio PMT C1/C2 indicativo de *rtxA1*-C. Las 18 cepas analizadas amplificaron 2640 pb (Figura 12b) y las secuencias obtenidas con pmt-F, mostraron una similitud de hasta 99% con respecto a la región comprendida entre 10,867-11,508 pb del gen *rtxA1* de la cepa CMCP6 (GenBank: AE016796), por lo que estos resultados confirman la presencia del dominio PMT C1/C2, consecuentemente, las cepas CICESE de *V. vulnificus* estudiadas, corresponden a la variante *rtxA1*-C. Estos mismos oligonucleótidos (mcf-F y cpd-R), empleados con la cepa de referencia CAIM 610^T, presentaron un amplicón de 1100 pb y su secuenciación presentó un >99% de similitud con la región correspondiente a los dominios Mcf y CPD (9,958-10,960), con las secuencias reportadas para CECT529^T (GenBank; GU452644) determinada previamente como *rtxA1*-M, confirmando que estos oligonucleótidos pueden ser utilizados en la detección de ambos tipos de *rtxA1*.

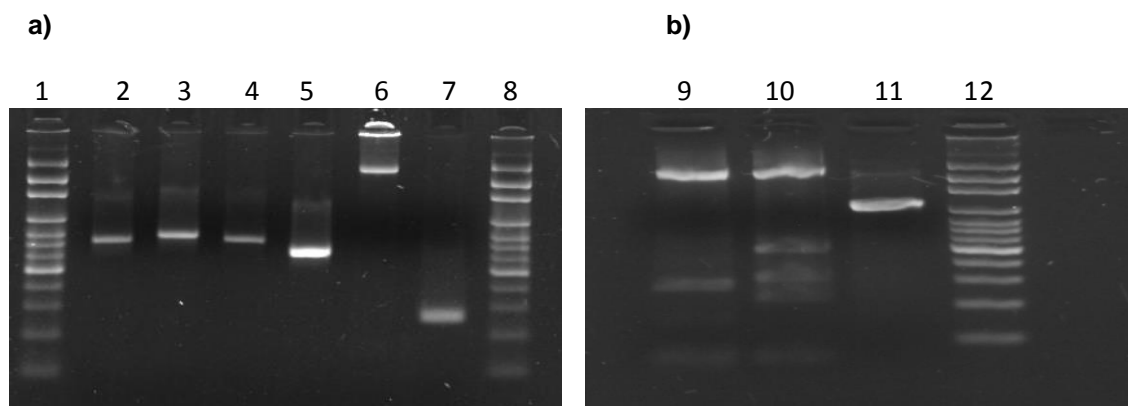


Figura 12. Amplificación con los oligonucleótidos desarrollados en el presente trabajo para la detección y secuenciación del gen *rtxA1* de *V. vulnificus*. a) línea 1 y 8 corresponden al marcador molecular (Axygen®); 2, DUF; 3, RID; 4, α/β ; 5, Mcf; 6, PMT C1/C2 y 7 CPD. b) amplificación mediante la combinación de los oligonucleótidos mcf-F y cpd-R, la línea 9 y 10, representan a CICESE-342 y CICESE-357 respectivamente, ambas amplificaron a 2640 pb; línea 11, CAIM 610^T la cual amplificó a 1100 pb y línea 12 el marcador molecular.

4.7.1 Análisis estadístico de las secuencias de *rtxA1-C*

El análisis de los 6 dominios de *rtxA1-C* fue resuelto en 56 alelos. Los análisis de diversidad nucleotídica (π) se presentó en rangos de 0.019 (α/β) a 0.055 (DUF). La mayor diversidad haplotípica ($Hd=0.94$) la presentó PMT C1/C2. El dominio RID presentó el mayor número de sitios polimórficos (74) y CPD presentó el menor (21). La diversidad genética (θ) se presentó en rangos de 0.017 (α/β) a 0.034 (DUF) para α/β y PMT C1/C2, respectivamente. El resto de la estadística para las secuencias de *rtxA1* se describe en la tabla 11.

La concatenación de las secuencias de los 6 dominios (DUF, RID, α/β , Mcf, PMT C1/C2 y CPD) presentó 18 ST separadas en dos clusters (Figura 13). El *rtxA1-I* está conformado por ocho cepas del genotipo *vcgC* con un mayor π (0.016). El clúster *rtxA1-II* está conformado por las 9 cepas del genotipo *vcgE* y una del genotipo *vcgC* (CICESE-357), con un menor π (0.008). El índice de diferenciación genética presentó un valor de $F_{st}=0.71$ entre clusters, lo que muestra una alta diferenciación entre clusters.

Tabla 11. Análisis estadístico de los dominios utilizados para el análisis del gen *rtxA1* en *V. vulnificus*.

Dominio	No. alelos	Hd	π	SP	θ
DUF	6	0.81	0.055	66 (11)	0.034
RID	9	0.89	0.032	74 (10.9)	0.033
α/β	9	0.88	0.019	38 (6)	0.017
Mcf	9	0.86	0.028	40 (8.4)	0.028
CPD	10	0.92	0.042	21(9.5)	0.027
PMT C1/C2	13	0.94	0.027	73 (11.3)	0.036

4.7.2 Análisis comparativo de *rtxA1*

El análisis comparativo de las cepas estudiadas en CICESE con respecto a las estudiadas por Kwak *et al.* (2011), separa las cepas en dos linajes, en concordancia con los resultados de estos autores. En el linaje-I se agruparon principalmente las cepas del genotipo-C y en el linaje-II se agruparon cepas del genotipo-E, (a excepción de CICESE-357). En cada linaje, se presenta una clara separación entre las cepas de la variante *rtxA1*-C, con las del *rtxA1*-M. Las cepas del linaje-I (*rtxA1*-C) presentan un bajo índice de diferenciación genética ($F_{st}=0.12$) con las cepas estudiadas por los autores antes mencionados, señaladas como altamente patógenas (Figura 14). En la tabla 12 se describen el resto de los resultados del análisis comparativo.

Tabla 12. Valores del índice F_{st} del análisis comparativo de las secuencias obtenidas en el presente estudio (CICESE) y las secuencias del Linaje-I y -II descritas por Kwak *et al.* (2011) para el gen *rtxA1* de *V. vulnificus*.

CICESE	Linaje-I	Linaje-II
<i>rtxA1</i> -I	0.12	0.49
<i>rtxA1</i> -II	0.61	0.3

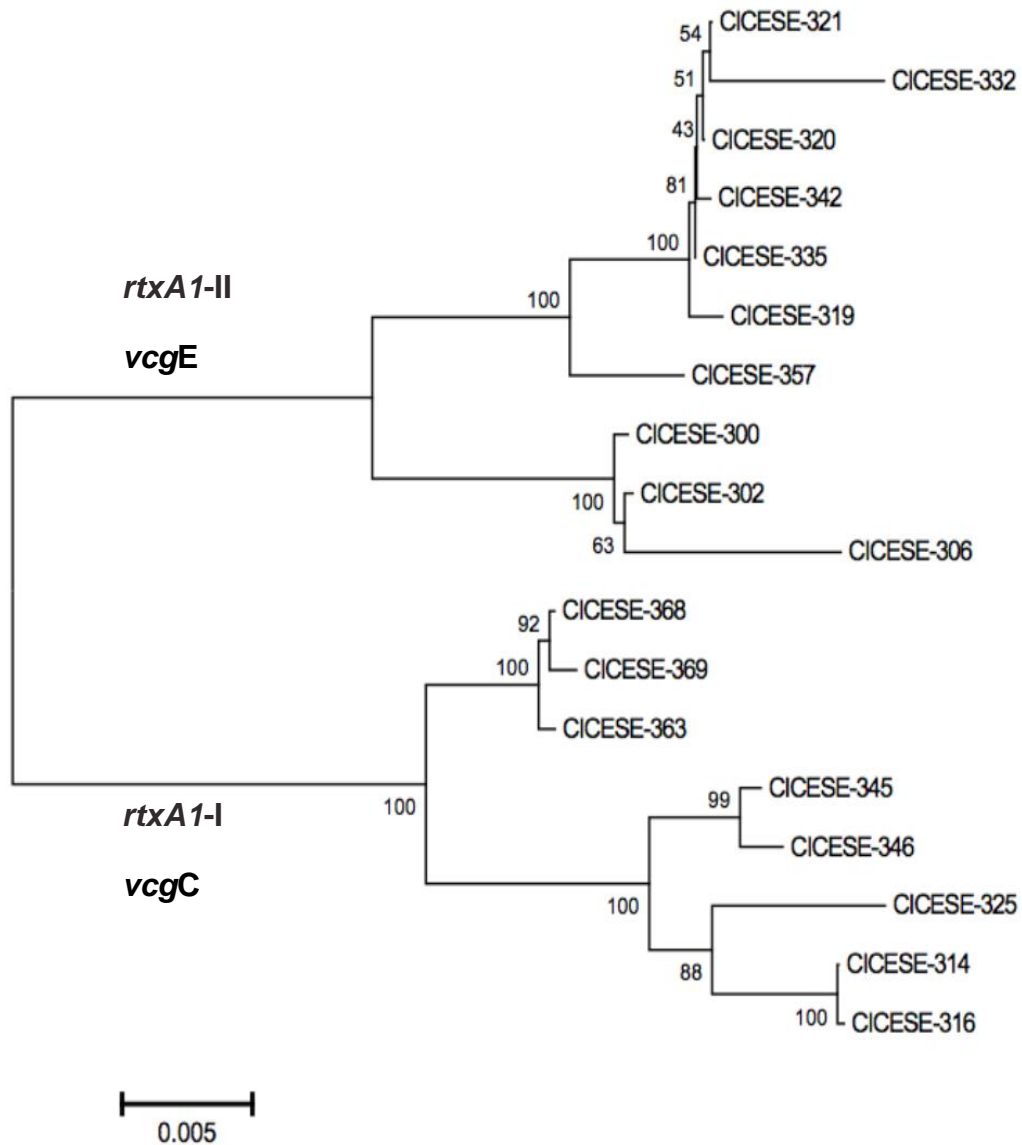


Figura 13. Análisis de las 18 cepas de *V. vulnificus* por secuenciación y concatenación de los 6 dominios (DUF, RID, α/β , Mcf, PMT C1/C2 y CPD) del gen *rtxA1*, usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.

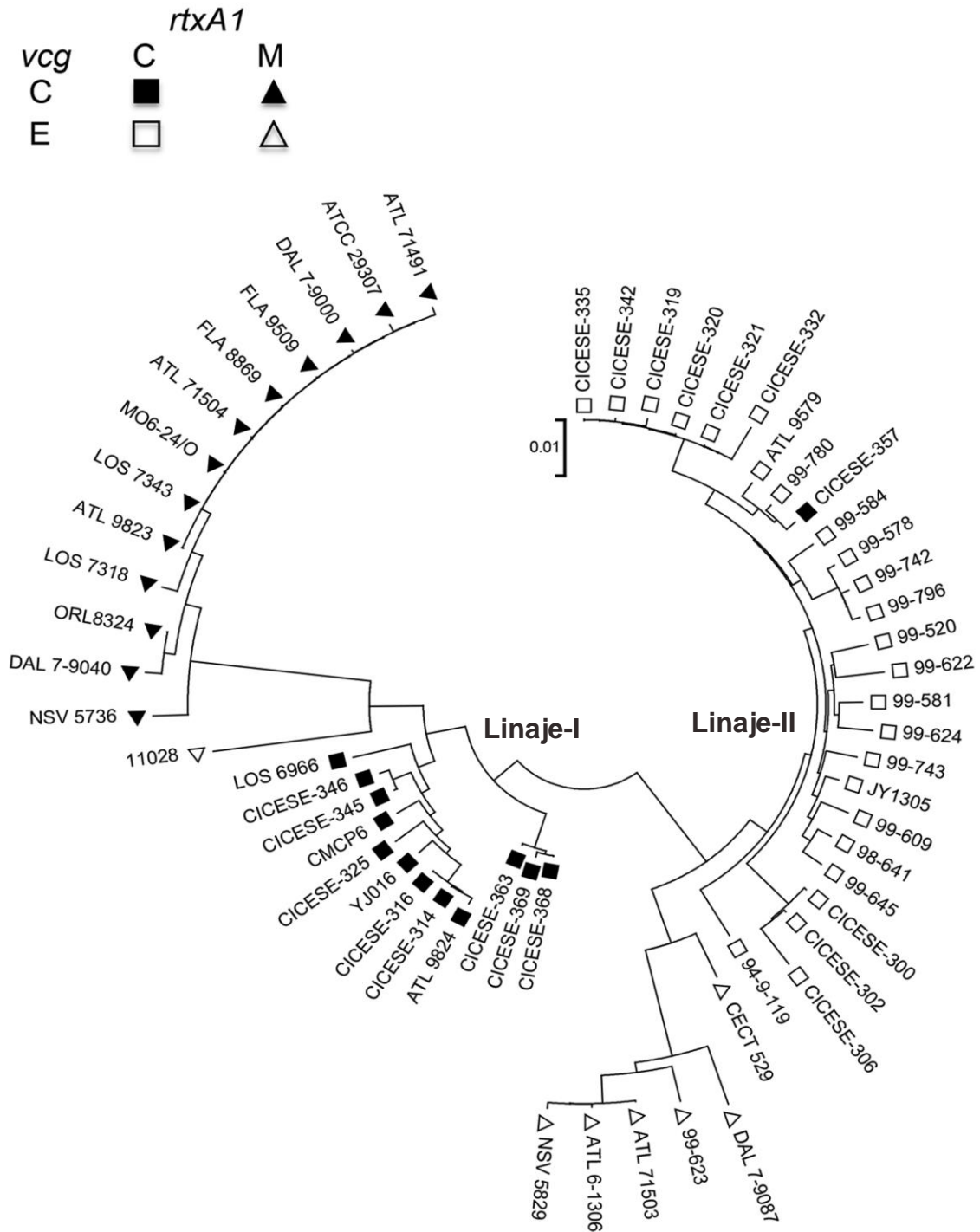


Figura 14. Análisis comparativo mediante la concatenación de las secuencias generadas para el gen *rtxA1* en las 18 cepas de *V. vulnificus* aisladas en el presente estudio (CICESE) y la comparación con secuencias obtenidas de GenBank y descritas por Kwak *et al.* (2011), Morrison *et al.* (2012) y Roig *et al.* (2011), usando Neighbor-Joining con el modelo Kimura-2-parameter.

4.8 Relación genética de *Vibrio vulnificus* obtenidas de muestras ambientales con cepas de referencia

Con el objetivo de darle mayor peso al análisis comparativo, se implementó un análisis alternativo en donde se concatenaron las secuencias de los loci utilizados en MLST (*glp*, *metG*, *purM*, *dtdS*, *lysA* y *pyrC*) y las secuencias de los seis dominios del gen *rtxA1* (DUF, RID, α/β , Mcf, PMT C1/C2 y CPD) tanto de las cepas estudiadas en CICESE, como de secuencias de MLST y *rtxA1* depositadas en bases de datos. Esta aproximación separó las 54 secuencias en dos clusters (Figura 15) con un delta score de 0.21 y Q-residuos 0.01. Las cepas asociadas al clúster I se agruparon con secuencias de referencia obtenidas de cepas aisladas de casos clínicos (genotipo-C). Las cepas CICESE-345 y 346 presentaron una similitud de 98.5% con CMCP6 y 98.7% con YJ016 señaladas como altamente patógenas por Thiaville *et al.* (2011). Las cepas correspondientes al clúster II se asociaron a cepas obtenidas de muestras ambientales (genotipo-E), nuevamente con la excepción de la cepa CICESE 357.

4.9 Secuencias

Las secuencias generadas en el presente trabajo se encuentran disponibles en GenBank con los números de acceso KP455743-KP455966 para *V. parahaemolyticus* y KM107564-KM107779 para *V. vulnificus*.

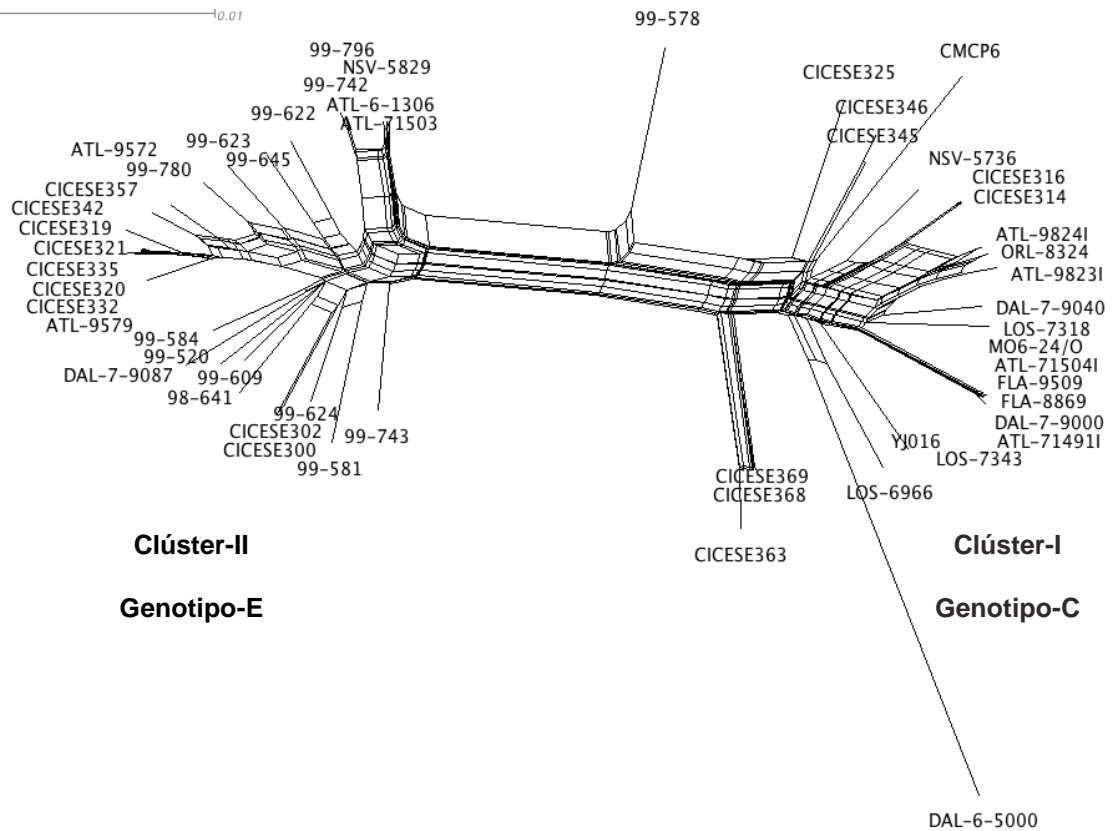


Figura 15. Análisis comparativo de *V. vulnificus* implementado en SplitsTree v4 con el análisis NeighborNet, mediante la concatenación de las secuencias de los 6 loci utilizados en MLST y los 6 dominios del gen *rtxA1* para las cepas aisladas en el presente trabajo (CICESE) y secuencias de referencia reportadas por Bisharat *et al.* (2005), Kwak *et al.* (2011) y Roig *et al.* (2011).

Capítulo 5. Discusión

5.1 incidencia de cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*

En el presente trabajo se estudiaron cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* aisladas en México de muestras ambientales y casos clínicos. Los análisis por métodos moleculares para ambas especies, así como la comparación con secuencias en base de datos (GenBank y pubMLST), indican la incidencia en México de cepas con una alta similitud genética con cepas señaladas como altamente patógenas por otros autores (González-Escalona *et al.*, 2008; Thiaville *et al.*, 2011, entre otros).

La normatividad mexicana (NOM 242-SSA1-2009), así como las normatividades de otros países, señalan que en los organismos marinos destinados al consumo humano no deben exceder una concentración de 10^4 NMP/g de *V. parahaemolyticus* y no registrar la presencia de *V. vulnificus*. Los resultados obtenidos en el mercado La Nueva Viga, indican que aunque las concentraciones de *V. parahaemolyticus* no exceden la normatividad, si se detectaron los genes *tdh* y *trh* indicativos de cepas patógenas, así como la presencia de *V. vulnificus*, la cual de acuerdo a la normatividad, no debe estar presente en ostiones destinados al consumo humano.

Las diferencias observadas en la detección de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en las dos zonas de muestreo puede ser debido a factores bióticos y abióticos presentes en la zona de donde se colectan los organismos, así como al manejo de los organismos durante su transporte y comercialización. Las lagunas costeras del Golfo de México, lugar de donde proceden de la mayoría de los ostiones comercializados en el mercado La Nueva Viga, pueden presentarse rangos de temperaturas entre 21 y 30 °C y de salinidades entre 2 y 29 PSU (De la Lanza-Espino y Lozano-Montes, 1999), condiciones muy propicias para el desarrollo de estos patógenos. En la Península de Baja California se presentan altas salinidades (>33 PSU) (Jerónimo y Gómez-Valdéz, 2006; Espinosa-Carreón *et al.*, 2015) que puede ser unos

de los factores para explicar la ausencia de *V. vulnificus*. Esta especie es más abundante en rangos de 20-25 PSU de salinidad (Randa *et al.*, 2004) y se presenta un notable decremento en su concentración a salinidades >30 PSU (Audemard *et al.*, 2011).

5.2 Caracterización Molecular

5.2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

El presente estudio muestra la presencia de la cepa O3:K6 desde 1998, asociada principalmente a casos clínicos en México; sin embargo el primer brote epidémico registrado en este país se presentó en el Noroeste durante el periodo de 2003-2004, registrándose más de 1200 casos (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006), e infecciones esporádicas en años subsecuentes en la misma región (Velazquez-Roman *et al.*, 2012). La cepa pandémica O3:K6 fue inicialmente aislada en el continente Americano en Perú en 1996, sin embargo el mayor número de casos de infección se presentó hasta 1998, año en el cuál se registraron brotes epidémicos en Chile (Gonzáles-Escalona *et al.*, 2008) y en Estados Unidos (Daniels *et al.*, 2000 b). El registro de estos brotes epidémicos coincide con un marcado evento del niño registrado de 1997 a 1998, por lo que Martínez-Urtaza *et al.* (2010), señala una posible relación entre las anomalías de la temperatura superficial del mar y los casos de infección por *V. parahaemolyticus*, por lo que su aparición en México podría estar relacionada a este evento.

En el análisis de PFGE, se incluyeron cepas aisladas en diferentes zonas geográficas y periodos de tiempo (Tabla 1). La tipificación de *V. parahaemolyticus* mediante PFGE con la enzima NotI agrupó las cepas pandémica O3:K6 en un mismo clúster presentando una clara separación del resto de las cepas (Figura 5). Resultados similares han sido reportados con esta técnica, por lo cual ha mostrado tener resolución para discriminar la cepa O3:K6 con las tipificadas como no pandémicas (Arakawa *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000; Lida *et al.*, 2001).

La caracterización por MLST de *V. parahaemolyticus* indica que la mayoría (24/25) de las cepas tipificadas como ORF8/O3:K6 (cluster MLST_{vp-I}, Figura 6) presentaron la ST-3 característica de la cepa pandémica (González-Escalona *et al.*, 2008), sin embargo todas las cepas se asocian en el CC3 (Figura 7). Este complejo (CC3) incluye más de 20 serovariantes genéticamente relacionadas con la cepa O3:K6 (Nair *et al.*, 2007), presentando diferencias genéticas con otras cepas (Chowdhury *et al.*, 2000 y 2004; Han *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2013). La comparación de las secuencias obtenidas en el presente estudio con los datos disponibles en pubMLST (2015), muestran una alta similitud genética asociando a la cepa pandémica (O3:K6) y sus serovariantes. Por lo tanto, las cepas O3:K6 aisladas en México desde 1998 al 2012 presentan las características moleculares del clon pandémico (Figura 8) que han sido aisladas en diferentes países desde 1996.

Los valores relativamente bajos en cuanto a la variabilidad genética y otros valores estadísticos (Tabla 7), pueden indicar un alto grado de homogeneidad entre la estructura poblacional del serotipo O3:K6, sin embargo, la interpretación de homogeneidad en el presente estudio, está condicionada a la similitud genética de cepas O3:K6 con las mismas características moleculares (*tdh*⁺, *trh*⁻, ORF8⁺, ST3, CC3). Estos resultados discrepan con la alta variabilidad genética comúnmente reportada en otros trabajos, en los cuales se incluyen cepas con diferentes serotipos y características moleculares (Bisharat *et al.*, 2007; González-Escalona *et al.*, 2008; Broza *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2013).

5.2.2 *Vibrio vulnificus*

La divergencia entre el genotipo-E y -C (ambiental y clínico) en *V. vulnificus*, ha sido ampliamente documentada, esto incluye trabajos con análisis de 16S rDNA (Aznar *et al.*, 1994; Kim y Jeong, 2001; Nilsson *et al.*, 2003), análisis de extragenoma palíndromo ADN por PCR (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2006), diferenciación por el gen *vcg* (Rosche *et al.*, 2005 y 2010), MLST (Bisharat *et al.* 2005 y 2007; Cohen *et al.*, 2007; Sanjuán *et al.*, 2011; Bier *et al.*, 2013;), *rtxA1* (Kwak *et al.*, 2011 y Roig *et al.*, 2011) y recientemente mediante la comparación de genomas (Morrison *et al.*, 2012). En las cepas utilizadas en el presente trabajo se presentó igualmente la separación de las cepas de *V.*

vulnificus de acuerdo a su genotipo mediante la tipificación por diferentes aproximaciones (Figura 10, 11, 13, 14 y 15), lo cual concuerda con los trabajos anteriormente citados. Sin embargo, esta divergencia genética ratificada en el presente estudio, no corresponde al origen de las muestras como se ha descrito en otros trabajos. Rosche *et al.* (2005), encontraron que 90% de las cepas de *V. vulnificus* tipo *vcgC* fueron aisladas de casos clínicos, en tanto que el 93% de las aisladas de muestras ambientales correspondían al tipo *vcgE*; los que los llevó a sugerir que estos genotipos constituían dos ecotipos (Roche *et al.*, 2010). En oposición con lo anterior, en el presente trabajo la incidencia de los dos genotipos fue muy similar (*vcgC*=53% y *vcgE*=47%), lo cual indica que la presencia de *V. vulnificus* se puede presentar en muestras ambientales en concentraciones muy similares para los dos genotipos (Tabla 2). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos por Warner y Oliver (2007), donde encontraron un porcentaje muy similar entre los dos genotipos *vcgC* (53.1%) y *vcgE* (43.9%) en muestras de agua de mar, sin embargo en ostiones, el genotipo *vcgE* fue el predominante (85%). Igualmente, Yokochi *et al.* (2013) encontraron que del 22 al 92% de las cepas de *V. vulnificus* aisladas en muestras ambientales (agua, peces y sedimento) fueron del genotipo *vcgC*.

Las cepas de *V. vulnificus* que fueron estudiadas por PFGE, se agruparon en 9 clusters, cada uno de ellos asociando cepas de un solo genotipo (C o E), con porcentajes de similitud variables en cada uno de ellos, sin embargo no se llega a la formación de dos clusters de acuerdo a su genotipo. Estos resultados nos muestran una baja homogeneidad entre la mayoría de las cepas tipificadas, inclusive al interior de algunos clusters.

La técnica de PFGE ha sido utilizada en el estudio de diferentes especies del género *Vibrio* (Wong *et al.*, 2005; Lizárraga-Partida y Quilici, 2009; Suffredini *et al.*, 2011), sin embargo esta técnica mostró un alto nivel de heterogeneidad entre los genotipos de *V. vulnificus* (Wong *et al.*, 2005) así como también una alta heterogeneidad entre las cepas del mismo genotipo (González-Escalona *et al.*, 2007), lo cuál concuerda con los resultados del presente trabajo.

Los análisis de MLST y *rtxA1* (Figura 11 y 13), presentan una marcada división de las cepas estudiadas de *V. vulnificus* en dos clusters, genéticamente distintos de acuerdo al genotipo-C o -E, con un alto valor de diferenciación genética (F_{st} = 0.65 y 0.71, respectivamente), lo cual confirma los resultados obtenidos por PCR para el gen *vcg* en muestras ambientales (osti6n), donde se registraron cepas con ambos genotipos.

El uso de secuencias cortas del gen *rtxA1* implementado en este estudio, es una estrategia eficiente para diferenciar entre 2 de las 4 variantes de *rtxA1* (C y M), as6 como para la separaci6n entre los dos genotipos (E y C; Figura 13) y su comparaci6n con secuencias de referencia previamente descritas de este gen (Figura 14), por lo que los an6lisis expuestos en el presente trabajo para *rtxA1* con secuencias cortas es una metodolog6a simple con resultados similares a los descritos por otros autores cuando se utiliza la totalidad de la secuencia del gen (Kwak *et al.*, 2011; Roig *et al.*, 2011).

La alta similitud de algunas cepas de origen ambiental con *vcgC*, con cepas de origen cl6nico con un alto grado de patogenicidad (Thiaville *et al.*, 2011), sugiere que las cepas del genotipo-C aisladas de ostiones, podr6an presentar un alto grado de patogenicidad como las cepas CMCP6 o YJ016 con las que se asociaron en los estudios comparativos tanto de *rtxA1* como de la concatenaci6n de MLST/*rtxA1* (Figura 14 y 15).

Los trabajos de Kwak *et al.* (2011) y Thiaville *et al.* (2011) indican que las cepas de *V. vulnificus* del genotipo-C tienen capacidad de producir un mayor grado de infecci6n y mortalidad que el genotipo-E. Igualmente Kwak *et al.* (2011) indica que la variante del gen *rtxA1*-C, registra un mayor grado de patogenicidad lo cual es importante en el presente estudio, dado que todas las cepas estudiadas presentaron esta variante.

Capítulo 6. Conclusiones

El presente trabajo constituye la primera evidencia, en orden cronológico, de que los casos de infección asociados a *V. parahaemolyticus* O3:K6 se han presentado desde 1998 en México, sin que se registrara un evento epidémico en este año. Así mismo este es el primer estudio enfocado a la descripción de las características moleculares tanto de *V. parahaemolyticus* como de *V. vulnificus* aisladas en nuestro país, empleando diferentes aproximaciones moleculares (PFGE , MLST y *rtxA1*).

Los oligonucleótidos *tlh* y *pR72H*, no mostraron diferencias en la detección de *V. parahaemolyticus*, por lo que pueden ser utilizados indistintamente, en función de la normativa del país al que vaya destinado un producto.

Los oligonucleótidos desarrollados para los dominios *recA* y *pntA* para el análisis por MLST de *V. parahaemolyticus*, así como los desarrollados para *rtxA1* en *V. vulnificus* mostraron una gran especificidad para los locus que fueron implementados, por lo que se recomienda su uso en futuros trabajos.

La separación por PCR en dos genotipos utilizando el gen *vcg*, concuerda con las diferentes aproximaciones genéticas utilizadas en este estudio, por lo que esta prueba puede ser de gran utilidad para la reglamentación sanitaria en ostiones con respecto a *V. vulnificus*, sobre todo cuando se presenta el genotipo clínico en altas proporciones como lo muestran los resultados de este trabajo.

El aislamiento de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en moluscos destinados para la alimentación en México, es indicativo del potencial riesgo sanitario que representa el consumo de ostiones contaminados con estas especies, en particular para personas con deficiencias inmunológicas o con enfermedades hepáticas.

Lista de Referencias

- Abbott, S. L., Powers, C., Kaysner, C. A., Takeda, Y., Ishibashi, M., Joseph, S. W. y Janda, J. M. (1989). Emergence of a Restricted Bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the Predominant Cause of *Vibrio*-Associated Gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(12), 2891-2893.
- Amaro, C., Biosca, E. G., Esteve, C., Fouz, B. y Toranzo, A. E. (1992). Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities. *Diseases of Aquatic organisms*, 13, 29-35.
- Arakawa, E., Murase, T., Shimada, T., Okitsu, T., Yamai, S. y Watanabe, H. (2000). Emergence and Prevalence of Novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Clone in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 52(6), 246-247.
- Arias, C. R., Garay, E. y Aznar, R. (1995). Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3476-3478.
- Arias, C. R., Verdonck, L., Swings, J., Garay, E. y Aznar, R. (1997). Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Applied Environmental Microbiology*, 63(7), 2600-2606.
- Audemard, C., Kator, H. I., Rhodes, M. W., Gallivan, T., Erskine, A. J., Leggett, A. T. y Reece, K. S. (2011). High Salinity Really as a Postharvest Processing Strategy to Reduce *Vibrio vulnificus* Level in Chesapeake Bay Oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Protection*, 74 (11), 1902-1907.
- Aznar, R., Ludwig, W., Amann R. I. y Schleifer, K. H. (1994). Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *International Journal Systematic Bacteriology*, 44(2), 330-337.
- Baizabal-Ramírez, O., Negrete-Pérez, M., Guerrero-Daza, D., Martínez-Herrera, N., Aburto-Desachy, Y. y Mata-Miranda, P. (2011). Choque séptico por *Vibrio vulnificus* en las costas del Golfo de México. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 49 (4), 433-436.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brashers, C. W., Vickery, M. C. L., Jones, D. D. y Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*, 36(2), 215-225.

- Bier, N., Bechlars, S., Diescher, S., Klein, F., Hauk, G., Duty, O., Strauch, E. y Dieckmann, R. (2013). Genotypic Diversity and Virulence Characteristics of Clinical and Environmental *Vibrio vulnificus* Isolates from the Baltic Sea Region. *Applied Environmental Microbiology*, 79(12), 3570-3581.
- Bilung, L. M., Radu, S., Bahaman, A. R., Rahim, R. A., Napis, S., Ling, M. W., Tanil, G. B. y Nishibuchi, M. (2005). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 252(1), 85–88.
- Bisharat, N., Amaro, C., Fouz, B., Llorens, A. y Cohen, D. I. (2007). Serological and molecular characteristics of *Vibrio vulnificus* biotype 3: evidence for high clonality. *Microbiology*, 153(3), 847–856.
- Bisharat, N., Cohen, D. I., Harding, R. M., Falush, D., Crook, D. W., Peto, T. y Maiden, M. C. (2005). Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerging Infectious Diseases* 11(1), 30-35.
- Boyd, E., Cohen, A., Naughton, L., Ussery, D., Binnewies, T., Stine, O. y Parent, M. A. (2008). Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*, 8(110), doi: 10.1186/1471-2180-8-110.
- Brauns, L. A., Hudson, M. C. y Oliver, J. D. (1991). Use of polymerase chain-reaction in the detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Applied Environmental Microbiology*, 57(9), 2651-2655.
- Broza, Y. Y., Raz, N., Lerner, L., Danin-Poleg, Y. y Kashi, Y. (2012). Genetic diversity of the human pathogen *Vibrio vulnificus*: a new phylogroup. *International Journal Food Microbiology*, 153(3), 436–443.
- Cabanillas-Beltrán, H., Llausás-Magaña, E., Romero, R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M., Ishibashi, M. y Gomez-Gil, B. (2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters*, 265(1), 76–80.
- Cabello, F. C., Espejo, R. T., Hernandez, M. C., Rioseco, M. L., Ulloa, J. y Vergara, J. A. (2007). *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Epidemic Diarrhea, Chile, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (4), 655-656.
- Castañón-González, J. A., Martínez de León, L., Miranda-Ruiz, R., Elena-Torres, R. y León-Gutiérrez, M. A. (1999). *Vibrio vulnificus* Infection in Mexico: Report of a Fatal Case. *Revista de Investigación Clínica*, 38(1), 23-25.
- Cavallo, R. A y Stabili, L. (2002). Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 36(15), 3719–3726.
- CDC. (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. Recuperado el 1 octubre de 2014, de: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00056324.html>.

- CDC. (2013). *Vibrio vulnificus*. Recuperado el 1 octubre de 2014, de: <http://www.cdc.gov/vibrio/vibriov.html>.
- Chatzidaki-Livanis, M., Hubbard, M. A., Gordon, K., Harwood, V. J. y Wright, A. C. (2006). Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Applied Environmental Microbiology*, 72(9), 6136–6141.
- Chiou, C. S., Hsu, S. Y., Chiu, S. I., Wang, T. K. y Chao, C. S. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as a cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4621-4625.
- Chowdhury, A., Ishibashi, M., Thiem, V. D., Tuyet, D. T. N., Tung, T. V., Chien, B. T., Seidlein, L. L., Canh, D. G., Clemens, J., Trach, D. D. y Nishibuchi, M. (2004). Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiology and Immunology*, 48(4), 319–27.
- Chowdhury, N. R., Chakraborty, S., Ramamurthy, T., Nishibuchi, M., Yamasaki, S., Takeda, Y. y Nair, G. B. (2000). Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerging Infectious Diseases*, 6(6), 631–636, doi: 10.3201/eid0606.000612.
- Chuang, Y. C., Yuan, C. Y., Liu, C. Y., Lan, C. K. y Huang, A. H. (1992). *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: Report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 15(2), 271–276.
- Chung, K. J., Cho, E. J., Kim, M. K., Kim, Y. R., Kim, S. H., Yang, H. Y., Chung, K. C., Lee, S. E., Rhee J. H., Choy H. E. y Lee, T. H. (2010). RtxA1-induced expression of the small GTPase Rac2 plays a key role in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), 97–105.
- Cohen, A. L., Oliver, J. D., DePaola, A., Feil, E. J. y Boyd, E. F. (2007). Emergence of a virulent clade of *Vibrio vulnificus* and correlation with the presence of a 33-kilobase genomic island. *Applied Environmental Microbiology*, 73(17), 5553–5565.
- Coleman, N. (1986). A Review of Introductions of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around the World and a Discussion of the Possible Ecological Consequences of Introducing the Species into Victoria, Australia. *Queescliff, Victoria, Australia. Marine Resources Man and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, technical report 56*, 39 pp.
- CONAPESCA. (2008). Anuario estadístico de pesca. Recuperado el 1 febrero del 2014, de : http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2008.
- CONAPESCA. (2010). Anuario estadístico de pesca. Recuperado el 1 febrero del 2014, de http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2010.

- Cook, D. W., Bowers, J. C. y DePaola, A. (2002). Density of total and pathogenic (*tdh+*) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. *Journal of Food Protection*, 65(12), 1873–80.
- Cornejo-Juárez, P., Rolón-Montes de Oca, A., Tinoco-Favila, J. C. y Sifuentes-Osornio J. (2000). Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus* serie de casos. *Revista de Investigación Clínica*, 52(6), 632-637.
- Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, F., Altekruise, S., Ray, B., Hammond, R. M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P. M. y Slutsker, L. (2000 a). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *Journal of Infectious Disease*, 181(5), 1661-6.
- Daniels, N. A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A. L., Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M. A., Pühr, N. D., Wells, J. G. y Angulo, F. J. (2000 b). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. *The Journal of the American Medical Association*, 284(12), 1541–1545.
- Dávalos-Mecalco, S. G. (2006). Determinación de algunos factores de virulencia en cepas de *Vibrio vulnificus*. Tesis de Licenciatura. UAM. Especialidad en Biotecnología, 76 p.
- De la Lanza-Espino, G. y Lozano-Montes, H. (1999). Comparación fisicoquímica de las lagunas de Alvarado y Términos. *Hidrobiología*, 9(1), 15-30.
- Deepanjali, H., Kumar, S., Karuasagar, I. y Karunasagar, I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3575–3580.
- DePaola, A., Kaysner, C. A., Bowers, J. y Cook, D. W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4649–4654.
- DePaola, A., Kaysner, C. A. y McPhearson, R. M. (1987). Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from Oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied and Environmental Microbiology*, 53(5), 1181-1182.
- DePaola, A., Nordstrom, J. A., Bowers, J., Wells, J. G. y Cook, D. W. (2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1521–1526.
- Drake, S. L., DePaola, A. y Jaykus L. A. (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 6, 120-144.

- Drummond, A. J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T. y Wilson, A. (2010). Geneious version 4.8.5. Recuperado el 8 abril de 2012, de: <http://www.geneious.com>.
- Espinosa-Carreón, T.L., Gaxiola-Castro, G., Durazo, R., De la Cruz-Orozco, M. E., Norzagaray-Campos, M. and Solana-Arellano, E. (2015). Influence off anomalous subarctic water intrusion on phytoplankton production of Baja California. *Continental Shelf Research*, 92, 108-121.
- FAO. (2008). El estado mundial de la pesca y acuicultura (SOFIA). Recuperado el 1 febrero de 2014, de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250s/i0250s00.pdf>.
- Faruque, S. M. y Mekalanos, J. J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiology*, 11(11), 505-510.
- FDA. (2004). Bacteriological analytical manual. Chapter 9, *Vibrio*. Recuperado el 5 abril de 2009, de: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>.
- Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M. y Carrico, J. A. (2009) Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*, 10(152), doi: 10.1186/1471-2105-10-152.
- Fuenzalida, L., Hernandez, C., Toro, J., Rioseco, M. L., Romero, J. y Espejo, R. T. (2006). *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environmental Microbiology*, 8(4), 675–683.
- Fukui, Y. y Sawabe, T. (2008). Rapid detection of *Vibrio harveyi* in seawater by real-time PCR. *Microbes Environ*, 23(2), 172-176.
- Fukushima, H. y Seki, R. (2004). Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(2), 221–229.
- Galván-Ángeles, E. (2004). Incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados en Baja California. Tesis de Maestría. CICESE. Departamento de Biotecnología Marina, 60 p.
- García-Esquivel, Z., González-Gómez, M. A., Lay-Lou, F. y Mejía-Trejo, A. (2004). Potencial ostrícola del brazo oeste de Bahía San Quintín: Biomasa actual y estimación preliminar de la capacidad de carga. *Ciencias Marinas*, 30(1A), 61-74.
- Gil, A. I., Miranda, H., Lanata, C. F., Prada, A., Hall, E. R., Barreno, C. M., Nusrin, S., Bhuiyan, N. A., Sack, D. A. y Nair, G. B. (2007). O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(4), 324-328.

- González-Escalona, N., Whitney, B., Jaykus, L.A., DePaola, A. (2007). Comparison of direct genome restriction enzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Vibrio vulnificus* and their correspondence with multilocus sequence typing data. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:7494–7500.
- González -Escalona, N., Martínez-Urtaza, J., Romero, J., Espejo, R. T., Jaykus, L. A. y DePaola, A. (2008). Determination of Molecular Phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* Strains by Multilocus Sequence Typing. *American Society for Microbiology*, 190(8), 2831-2840.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J. y Ollevier, F. (1997). Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 155, 387-399.
- Han, F., Walker, R. D., Janes, M. E., Prinyawiwatkul, W. y Ge, B. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 7096-7098.
- Han, H., Wong, H. C., Kan, B., Guo, Z., Zeng, X., Yin, S., Liu, X., Yang, R. y Zhou, D., (2008). Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics*, 9(1), 570, doi: 10.1186/1471-2164-9-570.
- Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M. y Kumagai, S. (2003). Prevalence of thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and coastal environment in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3883-3891.
- Hasegawa, H., Lind, E. J., Boin, M. A. y Häse, C. C. (2008). The extracellular metalloprotease of *vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4101-4110.
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B. y Colwell, R. R. (2002). Bacteria of the gamma-subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5498-5507.
- Hida, T. e Yamamoto, K. (1990). Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a Kanagawa-phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain. *Gene*, 93(1), 9-15.
- Hlady, W. G. y Klontz, K. C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *Journal of Infectious Diseases*, 173(5), 1176-1183.

- Honda, T. y Lida, T. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 4(2), 106-113.
- Hsueh, P. R., Lin C. Y., Tang, H. J., Lee, H. C., Liu, J. W., Liu, Y. C. y Chuang, Y. C. (2004). *Vibrio vulnificus* in Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8), 1363-1368.
- Huson, D. H., Kloepper, T. y Bryant, D. (2008). SplitsTree 4.0-Computation of phylogenetic trees and networks. *Bioinformatics*, 14, 68–73.
- lida, T., Hattori, A., Tagomori, K., Nasu, H., Naim, R. y Honda, T. (2001). Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3), 477-478.
- Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T. y lida, T. (2008). Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenonpositive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infection and Immunity*, 76(3), 1016–1023.
- Jeong, H. G. y Satchell, K. J. (2012). Additive function of *Vibrio vulnificus* MARTXVv and VvhA cytolysins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002581 doi: 10.1371/journal.ppat.1002581.
- Jerónimo, G. y Gómez-Valdés, J. (2006). Promedios de temperatura y salinidad sobre una superficie isopícnica en la capa superior del océano frente a Baja California. *Ciencias Marinas*, 32(4), 663–671.
- Johnston, J. M., Susan, F., Becker, M. P. H., Louise, M. y McFarland, D. P. H. (1986). Gastroenteritis in patients with stool isolates of *Vibrio vulnificus*. *The American Journal of Medicine*, 80(2), 336-338.
- Jones, M. K. y Oliver, J. D. (2009). *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis. *Infection And Immunity*, 77(5), 1723–1733.
- Julie, D., Solen, L., Antoine, V., Jaufrey, C., Annick, D. y Dominique, H. H. (2010). Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll *a*. *Environmental Microbiology*, 12(4), 929-937.
- Kaneko, T. y Colwell, R. R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*, 113(1), 24–32.
- Kaneko, T. y Colwell, R. R. (1975). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Applied Microbiology*, 30(2), 251–257.

- Kim, M. S. y Jeong, H. D. (2001). Development of 16S rRNA targeted PCR methods for detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments. *Aquaculture*, 193, 199–211.
- Kim, Y. R., Lee, S. E., Kook, H., Yeom, J. A., Na, H. S., Kim, S. Y., Chung, S. S., Choy, H. E. y Rhee, J. H. (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cellular Microbiology*, 10(4), 848-862.
- Kirkup Jr, B. C., Chang, L., Chang, S., Gevers, D. y Polz, M. F. (2010). *Vibrio* chromosomes share common history. *BMC Microbiology*, 10:137, doi:10.1186/1471-2180-10-137.
- Kirs, M., DePaola, A., Fyfe, R., Jones, J. L., Krantz, J., Van Laanen, A., Cotton, D. y Castle, M. (2011). A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 149-153.
- Kwak, J. S., Jeong H. G. y Satchell, K. J. (2011). *Vibrio vulnificus* *rtxA1* gene recombination generates toxin variants with altered potency during intestinal infection. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1645–1650.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvert, A. y Nicolas, J. L. (2006). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*, 8(12-13), 2715-2724.
- Lee, B. C., Choi, S. H. y Kim, T. S. (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 10, 1504-1513.
- Lee, C. Y., Pan, S. F. y Chen, C. H. (1995). Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1311–1317.
- Levine, W. C. y Griffin, P. M. (1993). *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance. *Journal of Infectious Disease*, 167(2), 479-483.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Linkous, D. A. y Oliver, J. D. (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*, 174, 207-214.
- Lipp, E. K. y Rose, J. B. (1997). The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 16(2), 620-40.

- Lizárraga-Partida, L. M. y Quilici, M. L. (2009). Molecular Analyses of *Vibrio cholerae* O1 Clinical Strains, Including New Nontoxigenic Variants Isolated in Mexico during the Cholera Epidemic Years between 1991 and 2000. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1364-1371.
- Lo, H. R., Lin, J. H., Chen, Y. H., Chen, C.L., Shao, C.P., Lai, Y. C. y Hor, L. I. (2011). RTX toxin enhances the survival of *Vibrio vulnificus* during infection by protecting the organism from phagocytosis. *Journal of Infectious Diseases*, 203(12), 1866–1874.
- Mahmoud, B. S. M. y Burrage, D. D. (2009). Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in pure culture, whole live and half shell oysters (*Crassostrea virginica*) by X-ray. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5), 572-578.
- Mahmud, Z. H, Kassu, A., Mohammad, A., Yamato, M., Bhuiyan, N. A., Nair, G. B. y Ota, F. (2006). Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan. *Microbiological Research*, 16(1), 25-37.
- Mahmud, Z. H., Neogi, 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 costal sea weed sand water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 64(2), 209-218.
- Martinez-Urtaza, J., Bower, J .C., Trinanes, J. y DePaola, A. (2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*, 43(7), 1780-1790.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H. C., Depaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J. y Nishibuchi, M. (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed pcr and *toxRS* sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 578–585.
- McLaughlin, J. B., DePaola, A., Bopp, C. A., Martinek, K. A., Napolilli, N. P., Allison, C. G., Murray, S. L., Thompson, E. C., Bird, M. M. y Middaugh, J. P. (2005). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine*, 353(14), 1463-1470.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. y Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, 5(5), 607–625.
- Morrison, S. S., Williams, T., Cain, A., Froelich, B., Taylor, C., Baker-Austin, C., Varner-Jeffreys, D., Hartnell, R., Oliver, J. D. y Gibas, C. J. (2012). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus* environmental isolates. *PLoS ONE*, 7(5), e37553 doi: 10.1371/journal.pone.0037553.
- Motes, M. L., De Paola, A., Cook, D. W., Veazey, J. E., Hunsucker, J. C., Garthright, W. E., Blodgett, R. J. y Chirtel, S. J. (1998). Influence of water temperature and

- salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1459–1465.
- Myers, M. L., Panicker, G. y Bej, A. K. (2003). PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2194-2200.
- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y. y Sack, D. A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 39–48.
- Nair, G. B., Sarkar, B. L., Abraham, M. y Pal, S.C. (1985). Serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from hydrobiologically dissimilar aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 724-726.
- Nigro, D. O., Hou, A., Vithanage, G., Fujioka, R. S. y Steward, G. F. (2011). Temporal and Spatial Variability in Culturable Pathogenic *Vibrio* spp in Lake Pontchartrain, Louisiana, following Hurricanes Katrina and Rita. *Applied And Environmental Microbiology*, 77(15), 5384-5393.
- Nilsson, W. B., Paranjypte, R. N., DePaola, A. y Strom, M. S. (2003). Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 442-446.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S. L., Janda, J. M. y Nishibuchi, M. (1997 a). Analysis of the Thermostable Direct Hemolysin (*tdh*) Gene and the *tdh*-Related Hemolysin (*trh*) Genes in Urease-Positive Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated on the West Coast of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 1965–1971.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mokhopadhyay, A. K., Nair, G. B. y Nishibuchi, M. (1997 b). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3150-3155.
- Osawa R, Okitsu, T., Morozumi, H. y 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-hemolysin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 725-727.
- Pan, T. M., Wang, T. K., Lee, C. L., Chien, S. W. y Horng, C.B. (1997). Food-Borne Disease Outbreaks Due to Bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), 1260-1262.
- Parveen, S., Hettiarachchi, K. A., Bowers, J. C., Jones, J. L., Tamplin, M. L., McKay, R., Beatty, W., Brohawn, K., DaSilva, L. V. y DePaola, A. (2008). Seasonal

- distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Journal of Food Microbiology*, 128(2), 354–361.
- Porrás-Cortés, G., Viana, J. J., Chavez, B. y Sierra, J. (1994). *Vibrio vulnificus* en México: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Revista de Investigación Clínica*, 46(6), 495-498.
- 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. y Nair, G. B. (2003). Adaptive and inflammatory immune response in patients infected with strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases*, 187(7), 1085-1096.
- Quilici, M. L., Robert-Pillot, A., Picart, J., Fournier, J. M. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emergence Infection Diseases*, 11(7), 1148-1149.
- Quiñones-Ramírez, E., Natividad B. I., Fernández, F. y Vázquez, S. C. (2010). *Vibrio vulnificus*: Understanding this pathogenic bacterium. *Review in Medical Microbiology*, 21(2), 21-27.
- Randa, M. A., Polz, M. F. y Lim, E. (2004). Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5469-5476.
- Raskin, D. M., Seshadri, R., Pukatzki, S. U. y Mekalanos, J. J. (2006). Bacterial genomics and pathogen evolution. *Cell*, 124(4), 703–714.
- Revilla-Castellanos, V. J. (2012). Las bioincrustaciones como vector de transferencia y reservorio de vibrios patógenos. Tesis de Maestría. CICESE. Departamento de Biotecnología Marina, 50 p.
- Reyes-Mendoza, M. A. (2004). Purificación y caracterización bioquímica de las toxinas producidas por *Vibrio vulnificus*. Tesis de Maestría. UAM. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, 69 p.
- Rippey, S.R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Review* 7(4), 419–425.
- Roig, F. J., González-Candelas, F. y Amaro, C. (2011). Domain organization and evolution of multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin in *Vibrio vulnificus*. *Applied Environmental Microbiology*, 77(2), 657–668.
- Roig, F. J., Sanjuán, E., Llorens, A. y Amaro, C. (2010). *piF* polymorphism-based PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains potentially dangerous to public health. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1328-1333.
- Rosche, T. M., Binder, E. A. y Oliver, J. D. (2010). *Vibrio vulnificus* genome suggests two distinct ecotypes. *Environmental Microbiology reports*, 2(1), 128-132.

- Rosche, T.M., Yano, Y. y Oliver, J.D. (2005). A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiology and Immunology*, 49(4), 381-389.
- Rosenberg, E. y Ben-Haim, Y. (2002). Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology*, 4(6), 318–326.
- Sakurai, J., Matsuzaki, A. y Miwatani, T. (1973). Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 8(5), 775–80.
- Sanjuán, E., González-Candelas, F. y Amaro, C. (2011). Polyphyletic origin of *Vibrio vulnificus* biotype 2 as revealed by sequence-based analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 688–695.
- Satchell, K. J. (2007). MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infection and Immunity*, 75(11), 5079-5084.
- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. y Ezura, Y. (2003). Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. haliotocoli* association. *Aquaculture*, 219, 671–679.
- Smith, P. J., Ozaki, H. y Fujio, Y. (1986). No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20(4), 569-574.
- Strom M. S. y Paranjpye, R. N. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 2(2), 177-188.
- Su, H. P. Chiu, S.I., Tsai, J. L., Lee, C. L. y Pan, T. M. (2005). Bacterial food-borne illness outbreaks in northern Taiwan, 1995–2001. *Journal of Infection Chemotherapy*, 11(3), 146-151.
- Suffredini, E., Lopez-Joven, C., Maddalena, L., Croci, L. y Roque, A. (2011). Pulsed-field gel electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6301–6304.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. y Muroga, K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organism*, 33(2), 111-118.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.

- Tarr, C. L., Patel, J. S., Pühr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A. y Strockbine, N. A. (2007). Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and *rpoB* Sequence Determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 134-140.
- Thiaville, P. C., Bourdage, K. L., Wright, A. C., Farrell-Evans, M., Garvan, C. W. y Gulig, P. A. (2011). Genotype is correlated with but does not predict virulence of *Vibrio vulnificus* biotype 1 in subcutaneously inoculated, iron dextran treated mice. *Infection and Immunity*, 79(3), 1194-1207.
- Thompson, C. A. y Vanderzant, C. (1976). Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. *Journal of Food Science*, 41(1), 204-205.
- Thompson, F. L., Iida, T. y Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403–431.
- Tiruvayipati, S., Bhassu, S., Kumar, N., Baddam, R., Shaik, S., Gurindapalli, A. K., Thong K. L. y Ahmed, N. (2013). Genome anatomy of the gastrointestinal pathogen, *Vibrio parahaemolyticus* of crustacean origin. *Gut Pathogens*, 5(1), 37, doi:10.1186/1757-4749-5-37.
- Tison, D. y Kelly, M. T. (1986). Virulence of *Vibrio vulnificus* Strains from Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1004-1006.
- Torres, L., Escobar, S., López, A. I., Marco, M. L. y Pobo, V. (2002). Wound Infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(7), 537-538.
- Turner, J. W., Paranjpye, R. N., Landis, E. D., Biryukov S. V., González-Escalona, N., Nilsson, W. B. y Strom, M. S. (2013). Population Structure of Clinical and Environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Pacific Northwest Coast of the United States. *PLoS ONE*, 8 (2), doi: 10.1371/journal.pone.0055726.
- Tuyet, D. T., Thiem, V. D., Seidlein, L. V., Chowdhury, A., Park, E., Canh, D. G., Chien, B. T., Tung, T. V., Naficy, A., Rao, M. R., Ali, M., Lee, H., Sy, T. H., Nichibuchi, M., Clemens, J. y Trach, D. D. (2002). Clinical, epidemiological, and socioeconomic analysis of an outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khanh Hoa province, Vietnam. *Journal Infectious Diseases*, 186(11), 1615–1620.
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S. y Swings, J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169, 121–132.
- Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J. y García-Ortega, A. M. (2004). Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 75(2), 237-243.

- Velazquez-Roman, J., León-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Villafaña-Rauda, S. y Canizalez-Roman, A. (2012). Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1794-1803.
- Warner, E. y Oliver, J.D. (2007). Population Structures of Two Genotypes of *Vibrio vulnificus* in Oysters (*Crassostrea virginica*) and Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 80-85.
- Wong, H. C., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Liu, D. P., Nishibushi, M. y Lee, B. K. (2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9), 3981-3986.
- Wong, H. C., Chen, C. H., Chung, Y. J., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Nishibuchi, M. y Lee, B. K. (2005). Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), 572–580.
- Wong, H. C., Chen, M. C., Liu, S. H. y Liu, D. P. (1999). Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *International Journal of Food Microbiology*, 52(3), 181-8.
- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K. S., Yamamoto, K. y Honda, T. (1999). Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Molecular Microbiology*, 31(5), 1513-1521.
- Yan, Y., Cui, Y., Han, H. Xiao, X., Wong, H. C., Tan, Y., Guo, Z., Liu, X., Yang, R. y Zhou, D. (2011). Extended MLST-based population genetics and phylogeny of *Vibrio parahaemolyticus* with high levels of recombination. *International Journal Food Microbiology*, 145(1), 106 –112.
- Yokochi, N., Tanaka, S., Matsumoto, K., Oishi, H. y Tashiro, Y. (2013). Distribution of virulence markers among *Vibrio vulnificus* isolates of clinical and environmental origin and regional characteristics in Japan. *PLoS One*, 8(1), doi: 10.1371/journal.pone.0055219.
- Yongjun, L., Zeju, Z., Yulong, Z., Xiaona, W., Lin, Z. y Xitai, H. (2010). A culture free method for detection of *Vibrio vulnificus* from coastal seawater based on loop-mediated isothermal amplification targeting *vcgC* gene. *Acta Oceanologica Sinica*, 29(2), 93-97.
- Yoon, K. S., Min, K. J., Jung, Y. J., Kwon, K. Y., Lee, J. K. y 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(5), 635– 641.

Zaidenstein, R., Sadik, C., Lerner, L., Valinsky, L., Kopelowitz, J., Yishai, R., Agmon, V., Parsons, M., Bopp, C. y Weinberger, M. (2008). Clinical Characteristics and Molecular Subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), 1875-1882.