

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA  
CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGIA MARINA**

---

**Determinación de *Vibrio cholerae* Toxigénico en Ostiones  
Destinados para Consumo Humano**

**TESIS**

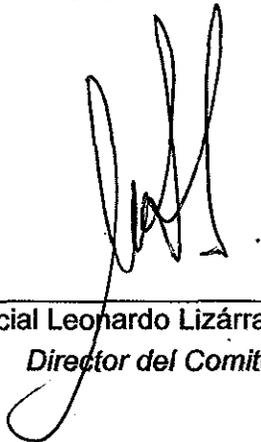
que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**JAIRO ANTONIO FUENTES PASCACIO**

**Ensenada, Baja California, México,  
2012.**

TESIS DEFENDIDA POR  
**JAIRO ANTONIO FUENTES PASCACIO**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida  
*Director del Comité*



---

Dr. Gilberto Gaxiola Castro  
*Miembro del Comité*



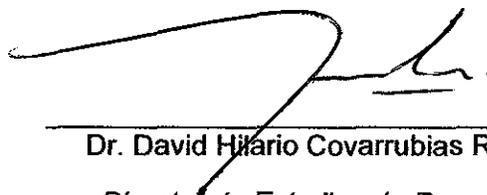
---

Dra. Edna Sánchez Castrejón  
*Miembro del Comité*



---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
*Coordinadora del programa de posgrado  
en Ciencias de la Vida*



---

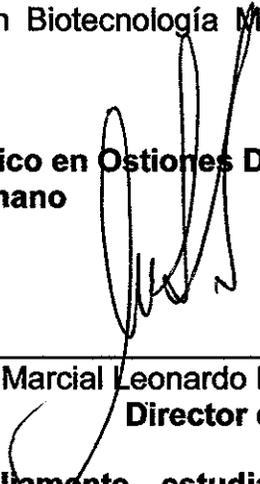
Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

24 de febrero de 2012

**RESUMEN** de la tesis de **Jairo Antonio Fuentes Pascacio**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida CON ORIENTACION en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. febrero de 2012.

**Determinación de *Vibrio cholerae* Toxigénico en Ostiones Destinados para Consumo Humano**

Resumen aprobado por:



---

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida  
Director de Tesis

*Vibrio cholerae* es una bacteria ampliamente estudiada por haber desencadenado las pandemias de cólera de siglos anteriores. Para que el cólera se presente es necesario que *V. cholerae* muestre la isla de patogenicidad donde se encuentran la toxina ctx A y otros factores de patogenicidad necesarios para que se genere la enfermedad del cólera.

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se centra en la determinación de *V. cholerae* toxigénico en zonas de cultivos de ostiones *Cassostrea gigas* en la Península Baja California y zonas cosechadas del ostión *Cassostrea virginica* en el Golfo de México, efectuando muestreos bimensuales durante los años 2010 y 2011 y comparándolos con la temperatura satelital oceánica de cuadrantes cercanos a las zonas de muestreo, con objeto de constatar su utilidad en la predicción de la incidencia de *V. cholerae* en función de la temperatura.

Durante el muestreo se detectó la presencia de *V. cholerae* O1 y no O1, toxigénico y no toxigénico para los meses de marzo y mayo del 2011 en la Península de Baja California. En el Golfo de México sólo se detectaron cepas de *V. cholerae* O1 toxigénicas en el mes de septiembre. La detección de *V. cholerae* en la Península de Baja California se efectuó en un intervalo de temperatura satelital entre 16 y 18.5 °C, en tanto que en el Golfo de México el intervalo de temperatura cuando se detectó *V. cholerae* toxigénico fue entre 25 y 28 °C.

La posible incidencia de *V. cholerae* toxigénico en esteros y lagunas costeras en México, debe ser considerado como un riesgo sanitario por lo que la comercialización de productos marinos debe contar con un certificado de no presencia en los lugares de cultivo o de cosecha.

**Palabras Clave:** *Vibrio cholerae*, temperatura superficial oceánica, *Cassostrea gigas*, *Cassostrea virginica*, toxigénico.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Jairo Antonio Fuentes Pascacio** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE DEGREE** in Life Sciences **WITH ORIENTATION** In Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México mes y año.

**Determination of Toxigenic *Vibrio Cholerae*  
in Human Consumed Oysters**

*Vibrio cholerae* has been studied widely because of the seven cholera pandemics in the past centuries. An outbreak of cholera has to be developed by a *V. cholerae* with a pathogenicity island in their chromosome where are located the cholera toxin ctx A and other virulent factors that are necessary for the development of the disease.

The present work focuses on the determination of toxigenic *V. cholerae* in *Cassostrea gigas* oyster farms in Baja California peninsula and *Cassostrea virginica* harvested in the Gulf of Mexico, but collected in Mexico City where they are commercialized. Oysters were sampled bimonthly during the years 2010 and 2011, and satellite ocean temperature were recorded at ocean quadrants near sampling sites in order to verify their usefulness in predicting the incidence of *V. cholerae* related to surface temperatures.

We have detected the presence of *V. cholerae* O1 y no O1, toxigenic and no toxigenic for March and May 2011 in the Baja California peninsula. In the Golfo de México we have detected toxigenic *V. cholerae* O1 only in September 2011 in the coastal lagoon of Tamiahua, where the most of their oysters production is sending to Mexico City.

In the Baja California peninsula *V. cholerae* was detected in a satellite temperature range between 16 y 18.5 °C, but at the Gulf of Mexico positive detection were accomplished in temperatures between 25 y 28 °C.

The fact that it is possible to isolate *V. cholerae* in Mexican estuaries or coastal lagoons, has to be considered as a potential sanitary risk, therefore, a *V. cholerae* free certification in culture or harvesting areas has to be mandatory for the commercialization of seafood.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, superficial sea temperature, *Cassostrea gigas*, *Cassostrea virginica*, toxigenic.

## Dedicatoria

A mis padres:

Rubén Fuentes de la Cruz y Miriam Guadalupe Pascacio Jiménez  
Gracias a sus enseñanzas, consejos y gran confianza he logrado las metas que me propongo.

A mis hermanos:

Alma Yazmín Fuentes Pascacio y Rubén Alejandro Fuentes Pascacio

A mi familia Chiapaneca

A mi familia Oaxaqueña

A mi familia veracruzana

## Agradecimientos:

Un Agradecimiento al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, al departamento de Biotecnología Marina, por el apoyo que siempre me brindaron y con el cual he logrado terminar mi grado profesional.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme proporcionado la beca #316124 durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Leonardo Lizárraga-Partida por haberme dado la confianza y oportunidad de estar en su laboratorio, así como el interés que me presto para continuar desarrollando mi curiosidad y con ello aprender a disfrutar mucho mas la ciencia.

Mi eterno reconocimiento y agradecimiento a la M. C. Irma Wong Chang y Dr. Alfonso Vázquez Botello, por haberme brindado su amistad y un lugar muy cálido en su casa en la Cd. de México, así como ayudarme en mi formación académica. Muchísimas gracias también por las muestras que me enviaban y que con ello dieron luz y esperanza a mi tesis con la cual estoy finalizando.

Gracias al resto de mi comité de Tesis, a los doctores, Dr. Gilberto Gaxiola Castro y Dra. Edna Sánchez Castrejón por su valiosa colaboración en este trabajo, así como por sus atinadas observaciones y críticas en la redacción del trabajo.

Se agradece la colaboración de la granjas participantes, las cuales no se mencionan específicamente por razones de confidencialidad.

A Félix Olivares Quintero, muchísimas gracias carnal, estoy completamente en deuda de por vida, ya que me has apoyado en dos tesis como debes recordar. Gracias por tus consejos, tu paciencia, tus enseñanzas y "May the force be with you".

A Sergio Castillo por tu amistad, por escucharme y darme muy buenos consejos, gracias por los buenos recuerdos en el transcurso de la maestría y espero que siga la cosecha de ellos en un futuro.

Ana Castillo muchísimas gracias por permitirme conocerte, por la confianza, por los buenos momentos que pasamos durante toda la maestría a lado de tu novio Sergio.

Tanya Camacho y Pavel Lugo, gracias, gracias, gracias, gracias por su amistad, por sus consejos de laboratorio, consejos personales y por las grandes aventuras que pasamos.

Gracias querido compañero de laboratorio y amigo Abraham Guerrero, por ti aprendí mucho desde mis inicios en el laboratorio, sin ti me hubiera sido difícil aprender estas cosas de molecular.

A mi queridísima Valeria Revilla que gracias a su colaboración y pasión en este proyecto, logramos obtener resultados mutuamente benéficos. Gracias también por las buenas charlas, sonreír y hacer ruido en el laboratorio.

Karla Cervantes y Ramón Fuentes, muchísimas gracias por su amistad tan valiosa, su apoyo incondicional y brindarme una linda sonrisa, mañana, tarde y noche, durante mi desarrollo académico.

A Ricardo Gonzales, por brindarme su amistad y confianza para incluirme en el proyecto del Golfo de México, realizando dos de los viajes que nunca olvidare en un buque oceanográfico.

A Samanta Jiménez y su hijita Sofie que me brindaron su amistad y muchos momentos de alegría, muchísimas gracias.

Leonora Martínez, muchas gracias por tu amistad durante este proceso, por los buenos ratos, por las platicas tan amenas, se que cuento contigo durante mucho tiempo.

Andrea Figueroa, muchas gracias por tu amistad y por decirme que nunca me estreso. Pero aunque no lo creas si me estreso y mucho.

Gilberto muchas gracias por tu amistad y ayudarme en esos malos momentos de debilidad en la maestría, un abrazo.

Viviana Oloño muchas gracias por la paciencia y gran ayuda cuando estuve en el D.F. en la estancia de la UNAM.

Y Muchas gracias a todos los que me acompañaron en mi generación y curso de los años de maestría: Pilar Martínez, Mayra López, Noemí Sánchez, Tzitziki Loeza, Claudia Miranda, David Martínez, Ceres Molina, Liliana López Zambrano, Dolores Camacho, Laura Camacho, José Obrador, Fernando, Yosef Chavez, Flor Sánchez, Diego Delgado, Mariela Brito, David Navarro.

Un agradecimiento a Jovana Machado Gastelum y a su esposo Carlos quienes me recibieron y me brindaron un lugar donde quedarme cuando empecé con la aventura en CICESE.

Agradezco a Angélica Pedraza Díaz quien me ha acompañado estos últimos meses durante la redacción de la tesis, teniéndome mucha paciencia y brindándome mucho amor.

Y a todos aquellos que no menciono pero que estuvieron directamente o indirectamente apoyándome durante este proceso, muchísimas gracias de todo corazón.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen español</b> .....	i
<b>Resumen inglés</b> .....	ii
<b>Dedicatorias</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	Vi
<b>Lista de Figuras</b> .....	viii
<b>Lista de Tablas</b> .....	xi
<b>I. Introducción</b> .....	1
<b>II. Generalidades</b> .....	3
<b>II.1 <i>Crassostrea spp.</i></b> .....	3
<b>II.1.1 <i>Crassostrea gigas</i> (ostión japonés)</b> .....	3
<b>II.1.2. <i>Crassostrea virginica</i></b> .....	3
<b>II.1.3. <i>Vibrio cholerae</i></b> .....	4
<b>III. Justificación</b> .....	6
<b>IV. Hipótesis</b> .....	6
<b>V. Objetivo General</b> .....	7
<b>V.1 Objetivos Particulares</b> .....	7
<b>VI. Materiales y Métodos</b> .....	8
<b>VI.1. Zona de Muestreo</b> .....	8
<b>VI.1.1. Península de Baja California</b> .....	8
<b>VI.1.2. Golfo de México</b> .....	9
<b>VI.2. Metodología</b> .....	10
<b>VI.2.1. Procesamiento de muestra, cultivo y detección por PCR</b> .....	10
<b>VI.2.1. Temperatura Superficial Oceánica</b> .....	13
<b>VII. Resultados</b> .....	14
<b>VII.1. Península de Baja California</b> .....	14
<b>VII.1.1 Bahía de Todos Santos</b> .....	14
<b>VII.1.1.2. Muestreo Mayo 2011</b> .....	14
<b>VII.1.2 Bahía de San Quintín</b> .....	17
<b>VII.1.2.1. Muestreo Mayo 2011</b> .....	17
<b>VII.1.3 Laguna de Guerrero Negro</b> .....	19
<b>VII.1.3.1. Muestreo de Marzo 2011</b> .....	19
<b>VII.1.3.2. Muestreo de Mayo 2011</b> .....	22
<b>VII.1.4. Laguna San Ignacio</b> .....	25
<b>VII.1.4.1. Muestreo Mayo 2011</b> .....	25
<b>VII.1.5. Bahía Magdalena</b> .....	27
<b>VII.1.5.1. Muestreo Marzo 2011</b> .....	27
<b>VII.2. Golfo de México (Lagunas costeras del Edo. de Veracruz)</b> .....	31

**CONTENIDO (continuación)**

<b>VII.2.1. Laguna de Tamiahua.....</b>	<b>31</b>
<b>VII.2.1.1 Muestreo de septiembre 2010.....</b>	<b>31</b>
<b>VII.2.1.2 Muestreo de Abril 2011.....</b>	<b>31</b>
<b>VII.2.2. Laguna de Tampamachoco.....</b>	<b>32</b>
<b>VII.2.2.1. Muestreo de Septiembre 2010.....</b>	<b>32</b>
<b>VII.3. Cholix A.....</b>	<b>36</b>
<b>VII.4. Temperatura satelital.....</b>	<b>36</b>
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>37</b>
<b>IX. Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
<b>X. Recomendaciones.....</b>	<b>46</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Áreas de muestreo en la Península de Baja California	8
2	Áreas de muestreo del Golfo de México	9
3	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Bahía de Todos Santos. Mayo.	16
4	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Bahía de Todos Santos. Mayo.	16
5	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen ctxA (Fragmento esperado de 308 pb) presenten en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo San Quintín. Mayo.	18
6	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presenten en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo San Quintín. Mayo.	18
7	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presenten en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo San Quintín. Mayo.	19
8	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Guerrero Negro. Marzo.	20
9	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen ctx A presenten en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Guerrero Negro. Marzo.	21
10	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen ctxA (Fragmento esperado de 308 pb) presente en <i>V. cholerae</i> colonias únicas. Muestreo Guerrero Negro. Marzo.	21

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
11	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en <i>V. cholerae</i> colonias únicas. Muestreo Guerrero Negro. Marzo.	22
12	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen <i>ctxA</i> (Fragmento esperado de 308 pb) presente en diluciones del homogenizado. Muestreo Guerrero Negro. Mayo.	23
13	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en diluciones del homogenizado. Muestreo Guerrero Negro. Mayo.	24
14	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en diluciones del homogenizado. Muestreo Guerrero Negro. Mayo.	24
15	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Bahía San Ignacio. Mayo.	26
16	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Bahía San Ignacio. Mayo.	26
17	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen <i>ompW</i> (Fragmento esperado 588 pb) presente en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Bahía Magdalena. Marzo.	28
18	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen <i>ctxA</i> (Fragmento esperado de 308 pb) presente en <i>V. cholerae</i> medio APA. Muestreo Bahía Magdalena. Marzo.	28
19	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del serogrupo O1 en diluciones del homogenizado. Muestreo Bahía Magdalena. Marzo.	29

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
20	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen <i>ompW</i> (Fragmento esperado 588 pb) presente en <i>V. cholerae</i> , en colonias únicas. Muestreo Lagunas de Tamiahua (TH) y Tampamachoco (CO) – septiembre – 2010.	32
21	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en <i>V. cholerae</i> , en colonias únicas. Muestreo Lagunas de Tamiahua (TH) y Tampamachoco (CO) – septiembre-2010.	35
22	Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen <i>cbxA</i> (Fragmento esperado de 308 pb)  = Positivo) y <i>O1</i> (Fragmento esperado de 192 pb)  = Positivo) presente en <i>V. cholerae</i> , en colonias únicas. Muestreo Lagunas de Tamiahua (TH) y Tampamachoco (CO) – septiembre – 2010.	35
23	Temperatura superficial oceánica cercana a las zonas de muestreo. Presencia de <i>V. cholerae</i> .	39
24	Comparación de temperaturas oceánicas cercana a las zonas de muestreo en Bahía de Todos Santos tomadas por satélite (NOAA) y temperaturas in situ entre los años 1979 y 1980	44
25	Comparación de temperaturas oceánicas cercana a las zonas de muestreo en San Quintín tomadas por satélite (NOAA) y temperaturas in situ entre los años 1979 y 1980	44
26	Comparación de temperaturas oceánicas cercana a las zonas de muestreo en Bahía Magdalena tomadas por satélite (NOAA) y temperaturas obtenidas de imágenes AVHRR mensuales promedio de 1996 a 2001	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Cepas control utilizadas para la identificación de <i>V. cholerae</i> ctx A +, chx A+, O1 y O139.	13
II	Resumen de las muestras procedentes de Bahía de Todos Santos, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	15
III	Resumen de las muestras procedentes de San Quintín, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	17
IV	Resumen de las muestras, procedentes de Guerrero Negro, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	20
V	Resumen de las colonias únicas aisladas, procedentes de Guerrero Negro, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	21
VI	Resumen de las muestras procedentes de Guerrero Negro, , las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	23

## LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
VII	Resumen de las muestras procedentes de Bahía San Ignacio, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	25
VIII	Resumen de las muestras procedentes de Bahía Magdalena, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OmpW, CTX, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.	27
IX	Resumen de los muestreos realizados en la Península de Baja California.	30
X	Comparación de las zonas de muestreos por meses, presencia y ausencia de <i>Vibrio cholerae</i> toxigénico en el Golfo de México. La comparación de esta tabla es de colonias únicas aisladas en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.	33

## I. Introducción

El consumo de productos marinos se ha incrementado de manera significativa a nivel mundial, razón por la cual organismos sanitarios nacionales e internacionales han implementado programas para evaluar el riesgo sanitario que conlleva el consumo de estos productos en especial de aquellos que son consumidos de manera cruda, los cuales pueden contener organismos patógenos para el ser humano.

Los invertebrados marinos destinados para la alimentación humana son un grupo muy redituable para la economía mundial. Sin embargo, el conocimiento sobre las infecciones microbianas sólo está disponible para una pequeña fracción de estos, en especial para los moluscos bivalvos. Estos organismos pueden retener altas concentraciones de bacterias patógenas como pudiera ser el caso de *Vibrio cholerae*, que es una de las bacterias más estudiadas ya que ha sido causante de siete pandemias en siglos pasados (Pollitzer, 1959). De los más de 200 serogrupos de *V. cholerae*, sólo el O1 y el O139 han mostrado capacidad para causar epidemias mundiales (pandemias), los demás, denominados no O1 / no O139 han llegado a presentar brotes aislados (Heymann, 2008).

La toxicidad de *V. cholerae* radica en la presencia de una isla de patogenicidad donde se localizan los genes que codifican para la producción de la toxina ctx A, así como de otros genes importantes para que esta toxina se exprese (Jermyn *et al.* 2006). En décadas pasadas se demostró que *V. cholerae* no toxigénico es una bacteria común en lagunas costeras y ambientes estuarinos, áreas que son utilizadas para la extracción y cultivo de moluscos bivalvos, así como para la captación de semilla de ostión. Su aparición o distribución está dada por distintos factores epidemiológicos y ambientales, los cuales pueden ser críticos para el desarrollo de epidemias en un contexto de cambios climáticos (Colwell, 1996).

Los organismos del género *Vibrio* son comúnmente aislados en el medio marino sin que necesariamente exista una correlación con altos niveles de contaminación orgánica o biológicos como la biomasa planctónica, factores que también son

importantes en la incidencia de otras bacterias patógenas, tal como es el caso de *Vibrio parahaemolyticus* o *Vibrio vulnificus* (Lipp et al. 2002). Tres de las principales variables ambientales que influyen en la aparición de *V. cholerae* son la salinidad, temperatura y turbidez (Zimmerman et al. 2007; Stauder et al. 2010). En México el ostión es cultivado en las costas del Pacífico en Baja California y Baja California Sur, estados que se encuentran al norte del país en tanto que en las lagunas costeras del Golfo de México en el Estado de Veracruz se cosecha en bancos naturales. El promedio de casos clínicos en México de 1991 a 2000 fue mayor en estados con costas en el Golfo de México, debido a las condiciones ambientales y socioeconómicas de la región, por lo que los moluscos bivalvos consumidos en nuestro país provenientes del Golfo de México fueron señalados como un posible factor en la incidencia y persistencia de casos de cólera (Lizárraga et al. 1998; Lizárraga y Quilici, 2008). En nuestro país el consumo de ostiones aumenta año con año, CONAPESCA registra para el 2010 una producción de 50,715 toneladas con ganancias de 195 millones de pesos aproximadamente.

En México no se han realizado estudios sistemáticos de *V. cholerae* en las zonas de cultivos o extracción de ostión, a pesar de la epidemia registrada de 1991 a 2000 y del reciente caso registrado en Sinaloa en 2011 (SINAVE/DGE/SALUD 2011. *Información preliminar*).

Los estudios sistemáticos para detectar a *V. cholerae* toxigénico cobran mayor importancia dado el brote epidémico registrado en Haití el cual ya se ha extendido a República Dominicana, así como la persistencia de miles de casos en el continente Africano (Ali et al. 2011).

El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de *V. cholerae* toxigénico en ostiones provenientes de las zonas de cultivo en la Península de Baja California, así como los cosechados en Veracruz que son enviados al mercado de mariscos "La Nueva Viga" en la Ciudad de México, y establecer la posible relación con temperaturas oceánicas registradas por satélite y sentar así las bases para un modelo predictivo.

## **II. Generalidades:**

### **II.1 *Crassostrea* spp:**

Los ostiones del género *Crassostrea* se agrupan en el *Phyllum* Mollusca, Clase Pelecypoda, Orden Pseudolamellibranchia y Familia Ostreidae. Son organismos filtro-alimentadores, con dos valvas desiguales, unidas por una charnela. Su longitud varía entre 8 y 30 cm según la especie. Las especies de mayor importancia económica en el mundo son *C. virginica*, *C. gigas*, *C. corteziensis*, *C. gasar*, *C. madrasensis*, *C. rhizophorae* y *C. iredalei* (FAO, Global Aquaculture Production 1950-2009)

#### **II.1.1 *Crassostrea gigas* (ostión japonés):**

El ostión del Pacífico es originario de Asia y se distribuye desde la Isla de Sakhalin (Karafuto) hacia el sur de Japón, Corea, China y el suroeste de Asia. En México existen cuatro zonas con granjas certificadas por COFEPRIS para la producción y exportación de ostión japonés: Sonora (SOR), Tamaulipas (TAM), Baja California (BC) y Baja California Sur (BCS). En Baja California se cuentan con granjas en Rincón Ballenas (Bahía de Todos Santos), Bahía Falsa (San Quintín), Laguna Manuela, Laguna Ojo de Liebre (Guerrero Negro). En BCS se cuenta con Rincón de los Ruíz, Estero el Coyote, La Bocana, Rincón Ballenas, Estero el Cardón y Bahía Magdalena entre otras ([http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/moluscos bivalvos](http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/moluscos_bivalvos)). En estas granjas de producción se obtuvieron para el 2008, 1689 toneladas con ganancias aproximadas de 23.5 millones de pesos.

#### **II.1.2. *Crassostrea virginica*:**

El ostión virgínico vive desde el Golfo de St. Lawrence en Canadá hasta el Golfo de México, el Caribe y las costas de Brasil y Argentina. Ha sido introducido en la Columbia Británica, Canadá; la costa oeste de los Estados Unidos de América;

Hawai; Australia; Japón; el Reino Unido, ([www.fao.org](http://www.fao.org) › [FAO](#) › [Pesca y Acuicultura](#)). Esta especie es la de mayor abundancia en las lagunas costeras del Golfo de México. La mayor producción se centra en las lagunas de Tamiahua, Mandinga y Tampamachoco, las cuales presentan bancos naturales cuya producción es comercializada en el mercado nacional y gran parte de ella es enviada al mercado de mariscos La Nueva Viga en la Cd. de México.

### ***II.1.3. Vibrio cholerae:***

Las especies del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y no producen esporas. Su forma recta o curva con un diámetro entre 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  y una longitud de 1.4-2.4  $\mu\text{m}$  (Chaudhuri y Chatterjee, 2009).

*V. cholerae* está separado en dos biotipos: el clásico y el Tor; los cuales se subdividen en tres serotipos: Ogawa, Inaba y Hikojima. Sin embargo, debido a la inestabilidad que presentan estos serotipos actualmente no se consideran como marcadores epidemiológicos confiables (Stroeher et al. 1992).

El serogrupo O1 de *V. cholerae* fue señalado como el responsable de las últimas siete pandemias. Sin embargo, en 1992 surgió el serogrupo O139 que causó una epidemia en el continente asiático (Ramamurthy et al. 1993; Islam et al. 1994).

Los serogrupos de *V. cholerae* presentan características similares tanto genéticas como bioquímicas. Sin embargo, las cepas que no se logran aglutinar con el antisuero O1 y O139 se conocen como *V. cholerae* no-O1 o en su caso no-O139 (Pollitzer, 1959; Gardner et al. 1987; Fernández y Alonso, 2009). Por lo regular estas cepas no son toxigénicas, pero si llegan a tener incidencia con gastroenteritis en caso de ingestión en seres humanos, generalmente se les asocia con casos esporádicos y pequeños brotes más que con epidemias (Desmarchelier, 1997).

Recientemente Purdy y colaboradores en el 2010, evidenciaron la presencia de una nueva toxina, cholix A en *V. cholerae* la cual fue detectada en diferentes serogrupos de *V. cholerae*, toxigénicos y no toxigénicos, aislados de casos clínicos, así como de muestras de lagunas costeras del Golfo de México. A pesar

de que en los casos clínicos se encontraba la presencia de la toxina aun no se ha demostrado su toxicidad en los humanos. Sin embargo, en estudios con ratones el daño en células pulmonares es contraria a la sintomatología que desarrolla la toxina CTX A

### **III. Justificación:**

Los riesgos sanitarios derivados del consumo de moluscos bivalvos deben de ser evaluados en diferentes regiones de nuestro país y relacionarlos con factores ambientales que varían en el año como la temperatura, tanto para aquellos que son destinados al mercado nacional, como internacional. *V. cholerae* es un patógeno que actualmente esta provocando estragos en el continente Africano pero también en Haití, país muy cercano al Golfo de México.

### **IV. Hipótesis:**

El ostión cultivado para consumo humano que proviene de zonas de cultivo y zonas de cosecha acumula *V. cholerae* toxigénico (CTX A) y produce la toxina Chx A. Su incidencia puede ser correlacionada con la temperatura superficial en zonas oceánicas correspondientes a la Península de Baja California en el Océano Pacífico y Lagunas costeras de Veracruz en el Golfo de México .

## **V. Objetivo General:**

Determinar la presencia de *V. cholerae* toxigénico (CTX A) en ostiones (*C. gigas*) cultivados en la Península de Baja California y en ostiones (*C. virginica*) cosechados en lagunas costeras del Golfo de México y su posible asociación con las temperaturas superficiales marinas.

### **V.1 Objetivos Particulares**

Determinar en ostiones cultivados, en la Península de Baja California y/o cosechados en lagunas costeras del Golfo de México:

- La presencia de *V. cholerae* indicada por el gen *ompW*.
- La presencia de la toxina ctx A
- Especificar si las cepas de *V. cholerae* CTX A positivo aisladas pertenecen a los serogrupos O1 o al O139 y en caso negativo señalar que es un organismo no O1 / no O139.
- Determinar presencia o ausencia de la toxina Cholix A en todos los organismos aislados pertenecientes a la especie *V. cholerae*.
- Relacionar la presencia/ausencia de *V. cholerae* toxigénico y no toxigénico con la temperatura superficial del Océano Pacífico y Golfo de México obtenidas por satélites.
- Proporcionar a los ostricultores, a las autoridades sanitarias y a organismos internacionales información sobre la calidad sanitaria de los ostiones cultivados o cosechados en diferentes regiones de la Republica Mexicana.

## VI. Materiales y Métodos

### VI.1. Zona de Muestreo

#### VI.1.1. Península de Baja California

El muestreo en Baja California se centra en cinco granjas de cultivo localizadas en Bahía de Todos Santos (TS) en Bahía San Quintín, (SQ) B.C. y en Laguna Guerrero Negro (GN), Laguna San Ignacio (IG) y Bahía Magdalena (BM) en BCS. Las granjas enviaron a CICESE bimensualmente una muestra representativa de mínimo 24 ostiones, cada una de ellas en las mismas condiciones que ellos comercializan su producto en México y en el extranjero (ver detalles en vibriomex : [www.google/vibriomex.mx](http://www.google/vibriomex.mx)).

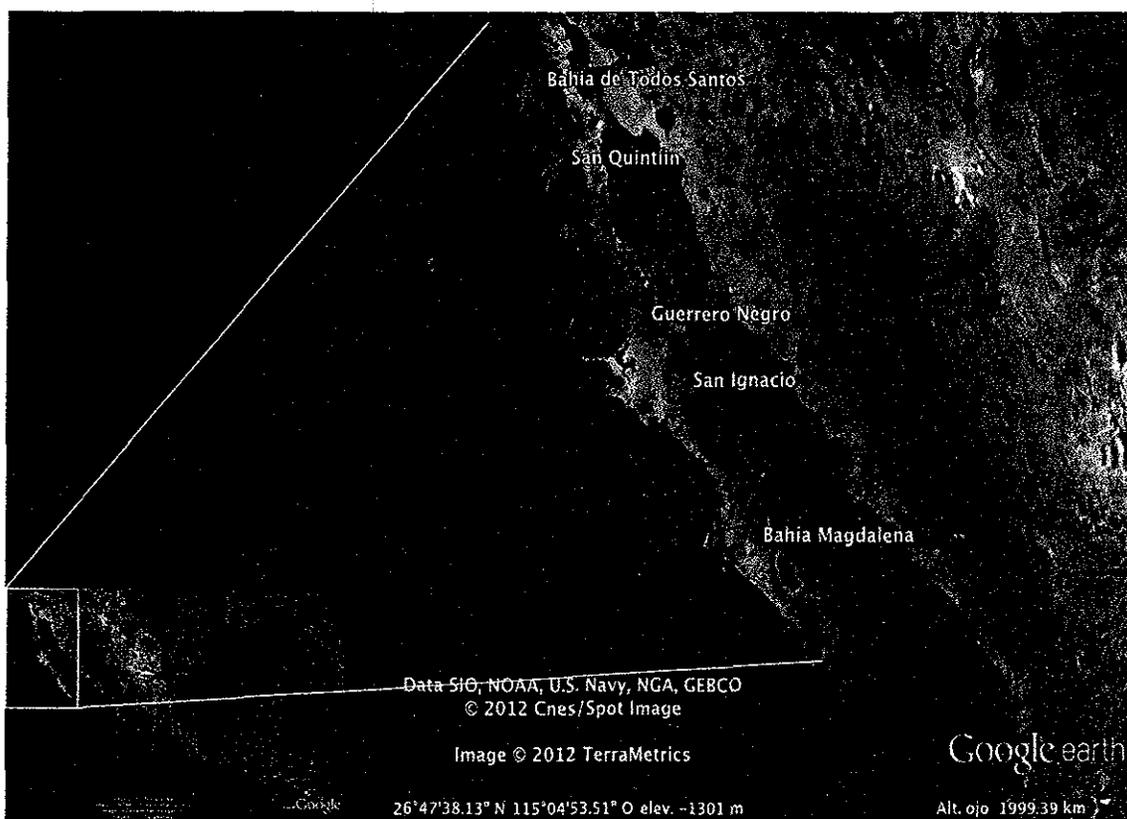
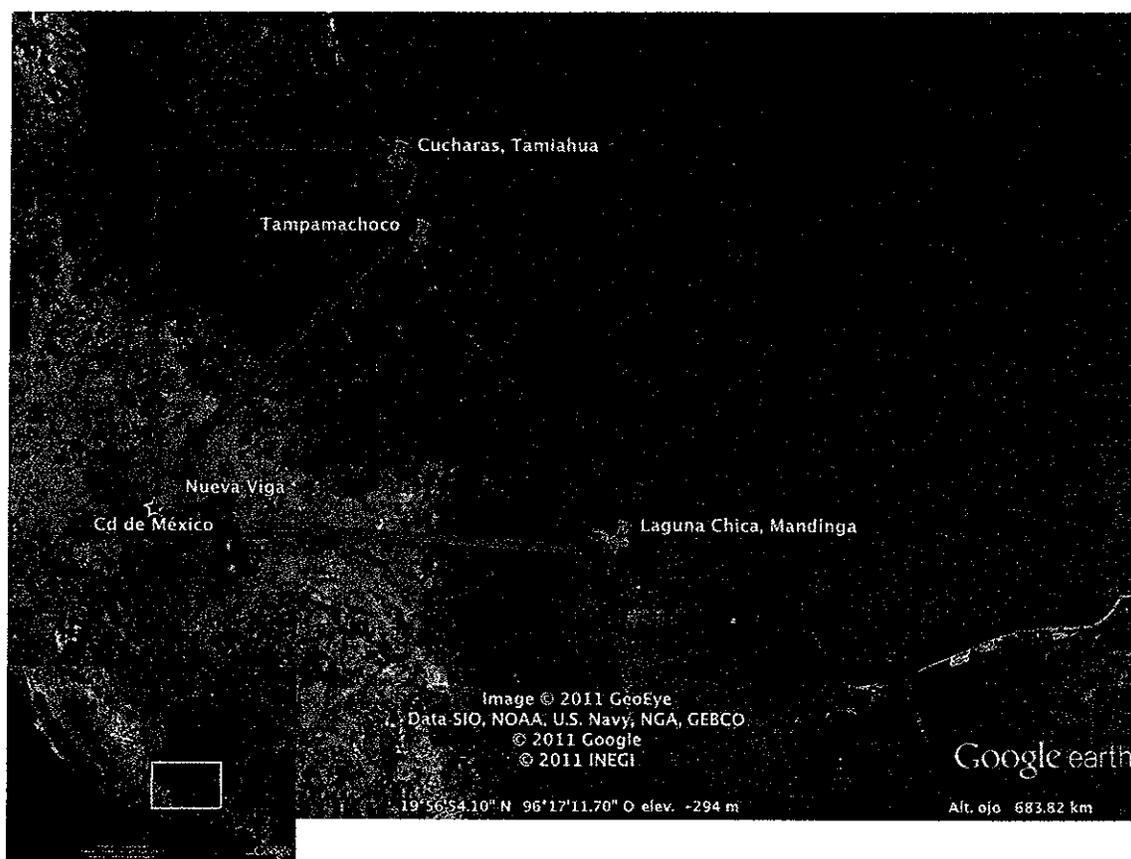


Figura 1. Áreas de muestreo en la Península de Baja California.

## VI.1.2. Golfo de México

Los ostiones del Golfo de México provienen de las lagunas de Tamiahua, Tampamachoco y Mandinga (Veracruz) pero las muestras son colectadas en puestos del mercado de mariscos La Nueva Viga en el Distrito Federal y fueron procesadas parcialmente en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología/UNAM.



**Figura 2. Áreas de muestreo del Golfo de México.**

## **VI.2. Metodología:**

Este estudio se inserta en el marco nacional e internacional de detección de vibrios patógenos en moluscos bivalvos (FAO/ Sector Salud 2009), por lo que la metodología que se siguió es común al equipo de laboratorios mexicanos agrupados bajo el nombre VIBRIOMEX, cuyos integrantes y logística de trabajo puede ser consultada en el blog [www.google/vibriomex.mx](http://www.google/vibriomex.mx).

### **VI.2.1. Procesamiento de muestra, cultivo y detección por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).**

De la muestra de más de 25 ostiones, se seleccionaron 10-12 y se limpiaron exteriormente para evitar toda posible contaminación asociada al exterior del organismo. Posteriormente se abrió cada ostión colectando la carne así como el líquido intervalvar para obtener 200 g de muestra. Se realizó un homogenizado agregándole 200 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfato salino) y 200 g de muestra en un vaso de licuadora estéril a máxima velocidad por 2 minutos, esto con el fin de tener una dilución 1:1. Del homogenizado se tomó una alícuota de 20 g y se resuspendió en 80 ml en PBS para obtener una dilución 1:10. De esta dilución se realizaron diluciones de 0.1, 0.01 y 0.001 por triplicado con tubos que contenían 9 ml de medio de enriquecimiento Agua Peptonada Alcalina (APA), y se incubaron 12-18 horas a una temperatura de 35° C (ver anexo I). Posteriormente se tomó una muestra de 400 µl para la extracción de ADN genómico por medio de choque térmico (ver anexo II).

Una vez obtenidas las extracciones de cada dilución con su respectivas réplicas (ver Anexo III), se les realizó pruebas con PCR punto final con los iniciadores de OmpW (Forward-CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG; Reverse-GAA CTT ATA ACC ACC CGC G) en un termociclador (MJ Research PTC-200) en tubos de 0.2 ml con un volumen final por cada reacción del mix de 15 µl. Cada reacción contiene 1 µl de templado de ADN, 0.77 µl de cada uno de los

iniciadores forward (F) y reverse (R) a [20µM], 0.77 µl de dNTP's a [2.5 mM], 0.09 µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase a [5u/µl] (Promega), 3 µl de Buffer Green 5x, 1.2 µl de MgCl<sub>2</sub> a [25mM] (Promega) y 7.4 µl de agua libres de DNAsas y RNAsas. La reacción fue sometida a 30 ciclos que conlleva una desnaturalización de 94 °C por 30 s, alineamiento con el ADN a 61.1 °C a 30 s y una extensión del iniciador de 72 °C a 30 s. Antes de que inicie el primer ciclo el mix es elevado a una temperatura de 94 °C por 5 min; con lo anterior se identificó la presencia o ausencia de *V. cholerae* (Nandi et al. 2000). En caso de no ser positiva la prueba se desecharon todas las muestras. Sin embargo, en caso de que alguna de las diluciones con medio de cultivo (APA) sean positivos, se extrae una azada de la parte superior del medio enriquecido y se resiembró en medio selectivo TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) y se deja incubó entre 12 y 18 horas a una temperatura de 35° C. Se aislaron de las cajas de TCBS 15 colonias amarillas tomando este color al aumentar el ácido láctico por la fermentación de la Sacarosa, las posibles cepas únicas de *V. cholerae* se resembraron en agar tripticosa al 3% NaCl (T1N3) y se incubaron a 35 °C durante 12-18 horas. Tanto a las colonias aisladas como a los medios enriquecidos en APA se les realizó el PCR's punto final con los siguientes iniciadores:

- a) Identificación de CTX A (F-ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC; R-ATA CCA TCC ATA TAT TTG GGA G) en un termociclador (MJ Research PTC-200) en tubos de 0.2 ml con un volumen final por cada reacción del mix de 15 µl. Cada reacción contiene 1.5 µl de templado de ADN, 0.1275 µl de cada uno de los iniciadores forward (F) y reverse (R) a [20µM], 1.26 µl de dNTP's a [2.5 mM], 0.125 µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase a [5u/µl] (Promega), 3 µl de Buffer Green 5x, 0.9 µl de MgCl<sub>2</sub> a [25mM] (Promega) y 7.96 µl de agua libres de DNAsas y RNAsas. La reacción fue sometida a 35 ciclos que conlleva una desnaturalización de 94 °C por 1 min, alineamiento con el ADN a 55.4 °C a 1 min y una extensión del iniciador de 72 °C a 1 min. Antes de que inicie el primer ciclo el mix es elevado a una temperatura de 94 °C por 5 min; estos iniciadores fueron publicados por Hoshino et al. (1998).

- b) Identificación de Cholix A (CHXA)-(F-TGG TGA AGA TTC TCC TGC AA; R-CTT GGA GAA ATG GAT GCG CTG) en un termociclador (MJ Research PTC-200) en tubos de 0.2 ml con un volumen final por cada reacción del mix de 12.5 µl. Cada reacción contiene 1 µl de templado de ADN, 0.15 µl de cada uno de los iniciadores forward (F) y reverse (R) a [20µM], 1 µl de dNTP's a [2.5 mM], 0.1 µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase a [5u/µl] (Promega), 2.5 µl de Buffer Green 5x, 0.8 µl de MgCl<sub>2</sub> a [25mM] (Promega) y 6.8 µl de agua libres de DNAsas y RNAsas. La reacción fue sometida a 30 ciclos que conlleva una desnaturalización de 94 °C por 1 min, alineamiento con el ADN a 58.6 °C a 30 s y una extensión del iniciador de 72 °C a 30 s. Antes de que inicie el primer ciclo el mix es elevado a una temperatura de 94 °C por 3 min; estos iniciadores fueron publicados por Purdy et al. (2010)
- c) La presencia de los serotipos O1 (F-GTT TCA CTG AAC AGA TGG G; R-GGT CAT CTG TAA GTA CAA C) y O139 (F-AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG; R-GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG) con las siguientes especificaciones para los dos: se utilizó termociclador (MJ Research PTC-200) en tubos de 0.2 ml con un volumen final por cada reacción del mix de 15 µl. Cada reacción contiene 1.5 µl de templado de ADN, 0.375 µl de cada uno de los iniciadores forward (F) y reverse (R) a [20µM], 1.26 µl de dNTP's a [2.5 mM], 0.125 µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase a [5u/µl] (Promega), 3 µl de Buffer Green 5x, 0.9 µl de MgCl<sub>2</sub> a [25mM] (Promega) y 7.465 µl de agua libres de DNAsas y RNAsas. La reacción fue sometida a 35 ciclos que conlleva una desnaturalización de 94 °C por 1 min, alineamiento con el ADN a 55.4 °C a 1 min y una extensión del iniciador de 72 °C a 1 min. Antes de que inicie el primer ciclo el mix es elevado a una temperatura de 94 °C por 5 min; estos iniciadores fueron descritos en la publicación de Hoshino et al. (1998).

Las cepas de *V. cholerae* (+) *ctxA* (+) *chx A*(+) ya fueran O1/O139 o no O1/O139 se integraron a la colección de CICESE en la División de Biología Experimental y Aplicada (DBEA).

**Tabla I. Cepas control utilizadas para la identificación de *V. cholerae*, ctx A +, chx A +, O1 y O139.**

<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Características</b>
CICESE 82	<i>V. cholerae</i> O1, El Tor	ompW+, ctx-, chxA+
CICESE 67	<i>V. cholerae</i> O139	ompW+, ctx+, chxA+
CICESE 52	<i>V. cholerae</i> O1, El Tor	ompW+, ctx+, chxA-

### **VI.2.1. Temperatura Superficial Oceánica**

Las temperaturas se obtuvieron cada semana en el mes de muestreo y se realizaba un promedio mensual a través de la página de la NOAA en Optimum Interpolation (OI) SST VZ GrADS. Para la Península de Baja California las siguientes latitudes, 20° N a 34° N y con las longitudes, 102° W a la 128° W. Para el Golfo de México las siguientes latitudes, 34° N a 18° N y con las longitudes, 72° W a la 98° W.

## **VII. Resultados**

### **VII.1. Península de Baja California:**

Los muestreos en la Península de Baja California evidenciaron resultados heterogéneos en las distintas áreas estudiadas. Los ostiones cultivados en toda la Península mostraron casos negativos para *V. cholerae* desde el muestreo de junio 2010 a enero 2011 con intervalos de temperaturas oceánicas registradas por satélite oscilando desde los 14.5 °C hasta los 25.5 °C, en un gradiente norte/sur. Las detecciones positivas para *V. cholerae* O1 toxigénico comenzaron a ser registradas en el mes de marzo 2011 y mayo 2011, pero nuevamente se obtuvieron resultados negativos en todas las granjas estudiadas en agosto de 2011.

A continuación se exponen los resultados en detalle para las zonas estudiadas de norte a sur durante muestreos realizados de Junio 2010 a Agosto 2011 y que presentaron resultados positivo para *V. cholerae* y los factores toxigénicos estudiados.

#### **VII.1.1 Bahía de Todos Santos**

##### **VII.1.1.2. Muestreo Mayo 2011**

La Bahía de Todos Santos en el mes de mayo es la zona de menor temperatura con aproximadamente 16 °C de acuerdo al gradiente de temperatura superficial marina. El fragmento esperado de ompW para la identificación de *V. cholerae* a 588 pares de bases se localizaron en la dilución 0.1 con una positiva de las tres réplicas, mientras que en la dilución 0.01 las tres réplicas fueron positivas para el gen, al igual que para la dilución 0.001 (Fig. 3).

Se detectó la presencia del serogrupo O1 en las extracciones de medio enriquecido (APA), identificándose en las tres diluciones (dilución 0.1, positivo en 1 réplica; dilución 0.01, positivo en dos de tres réplicas; dilución 0.001, positivo en las tres réplicas). En estos homogenizados no se detectó la toxina *ctxA*, ni la presencia del serogrupo O139. El patrón que se presenta de acuerdo a las

diluciones es que por lo menos una réplica de cada dilución pertenece al serogrupo O1 siendo estas no toxigénicas, es decir, negativas para ctxA, (tabla II). La toxina Cholix A se detectó en sólo una dilución (Fig. 4), sin embargo sólo se denomina toxigénicas a las cepas en homogenizados positivos para ctx A, ya que no se ha demostrado su patogenicidad en humanos. Sin embargo, se ha logrado describir en ratones, que tiene cierta afección hacia las factores de elongación en las células, provocando lisis celular (Purdy et al. 2010).

**Tabla II. Resumen de las muestras procedentes de Bahía de Todos Santos, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.**

<b>RÉPLICAS</b>	<b>DILUCIONES</b>	<b>OMPW</b>	<b>CTX A</b>	<b>CHX A</b>	<b>O1</b>	<b>O139</b>
1	0.1	-	-	-	-	-
2	0.1	+	-	-	+	-
3	0.1	-	-	-	-	-
1	0.01	+	-	-	+	-
2	0.01	+	-	-	+	-
3	0.01	+	-	-	-	-
1	0.001	+	-	-	+	-
2	0.001	+	-	+	+	-
3	0.001	+	-	-	+	-



**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Bahía Todos Santos. Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▼ = Positivo.**



**Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Bahía Todos Santos. Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: 11: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▼ = Positivo.**

## VII.1.2 Bahía de San Quintín

### VII.1.2.1. Muestreo mayo 2011

Los resultados obtenidos en la zona Bahía de San Quintín fueron inesperados ya que a una temperatura promedio de 16.5 °C, se identificó la presencia de *V. cholerae* en todas las diluciones. Sólo se puede subrayar un caso negativo para una réplica de la dilución 0.1, mientras que para la dilución 0.01 y 0.001 todas las réplicas dan una amplificación de la banda esperada para ompW (Fig. 5). Esta zona también presentó presencia de la toxina ctxA en todas las diluciones salvo en la primera réplica de la dilución 0.1 y la tercera réplica de la dilución 0.001 las que fueron positivas para ompW (tabla III).

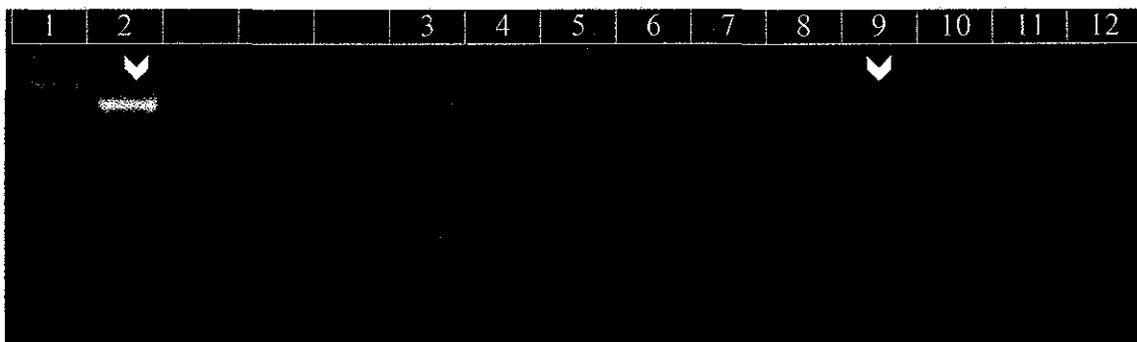
En la dilución 0.001 de la réplica 1 se detectó la presencia de la toxina Cholix A (Fig. 6), la toxina ctx A en organismos pertenecientes al serogrupo O1 (Fig. 7). En ninguna dilución se detectó al serogrupo O139.

**Tabla III. Resumen de las muestras procedentes de San Quintín, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.**

RÉPLICAS	DILUCIONES	OMPW	CTX A	CHX A	O1	O139
1	0.1	-	-	-	-	-
2	0.1	+	+	-	-	-
3	0.1	+	+	-	-	-
1	0.01	+	+	-	-	-
2	0.01	+	+	-	-	-
3	0.01	+	+	-	+	-
1	0.001	+	+	+	+	-
2	0.001	+	+	-	-	-
3	0.001	+	-	-	-	-



**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen *ctxA* (Fragmento esperado de 308 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo San Quintín. Mayo (1: *V. cholerae* CICESE 67, 2: Dilución 0.1-réplica 1, 3: Dilución 0.1-réplica 2, 4: Dilución 0.1-réplica 3, 5: Dilución 0.01-réplica 1, 6: Dilución 0.01-réplica 2, 7: Dilución 0.01-réplica 3, 8: Dilución 0.001-réplica 1, 9: Dilución 0.001-réplica 2, 10: Dilución 0.001-réplica 3, , 11: Blanco). ▼ = Positivo.**



**Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo San Quintín. Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 3: Dilución 0.1-réplica 2, 4: Dilución 0.1-réplica 3, 5: Dilución 0.01-réplica 1, 6: Dilución 0.01-réplica 2, 7: Dilución 0.01-réplica 3, 8: Dilución 0.001-réplica 1, 9: Dilución 0.001-réplica 2, 10: Dilución 0.001-réplica 3, 11: *V. cholerae* CICESE 67, 12: Blanco). ▼ = Positivo.**

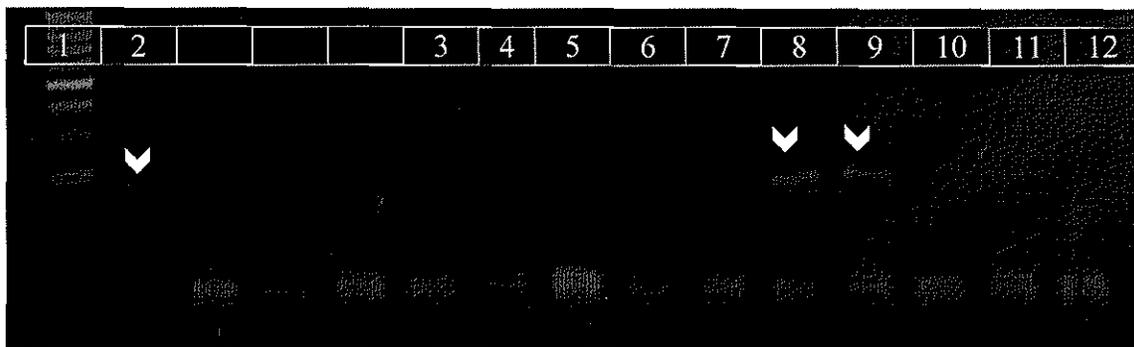


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) (Fragmento esperado 192 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo San Quintín. Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 11: Blanco). ▼ = Positivo.

### VII.1.3 Laguna de Guerrero Negro

#### VII.1.3.1. Muestreo de marzo 2011

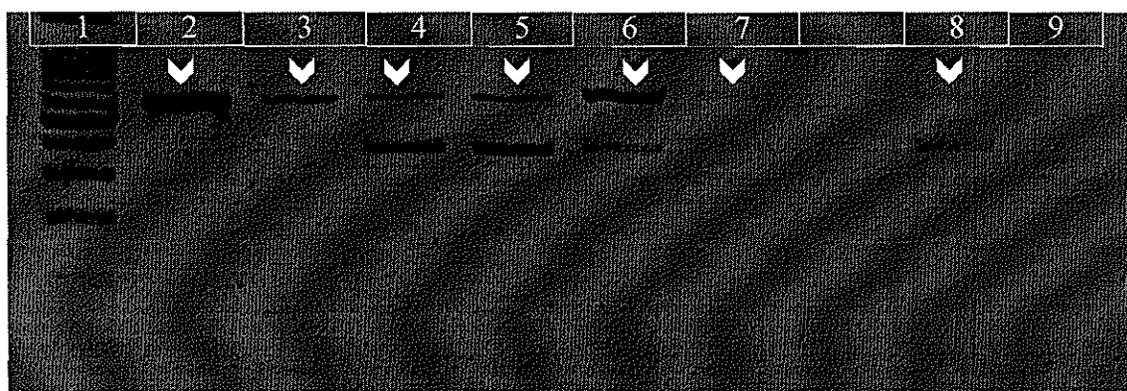
La presencia de *V. cholerae* fue detectada en varias diluciones del homogenizado sembrado en APA (tabla IV, Fig. 8 ) por medio de la expresión del gen *ompW*. Las diluciones positivas, en otras palabras, las que expresaron la banda correspondiente en el gel de electroforesis, son la 0.1 con dos réplicas, 0.01 con una réplica positiva y la dilución 0.001 con una sola banda positiva (Fig. 8). Se confirmó igualmente la presencia de la toxina ctx A en todas las que resultaron positivas a *ompW* (tabla IV, Fig. 9), pero ninguna de ellas correspondía a los serogrupos O1 u O139. Por lo tanto se detectaron cepas atípicas en las diluciones del homogenizado. Igualmente en todas estas muestras no se detectó la presencia de la toxina Cholix A.

A partir de las diluciones positivas del homogenizado se aislaron colonias en TCBS, las cuales por medio de análisis de PCR mostraron pertenecer al *V. cholerae*, pertenecer al serogrupo O1 y ser positivas a la toxina ctx A (tabla V y Fig. 10 y 11). Estos resultados no sólo confirman los obtenidos en el

homogenizado, sino que muestran que pertenecen al serogrupo O1, aspecto que no se logró esclarecer en los PCR del homogenizado. La temperatura de la zona costera detectada por satélite para el mes de marzo fue de 16 °C.

**Tabla IV. Resumen de las muestras, procedentes de Guerrero Negro, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.**

RÉPLICAS	DILUCIONES	OMPW	CTX A	CHX A	O1	O139
1	0.1	+	+	-	-	-
2	0.1	+	+	-	-	-
3	0.1	+	+	-	-	-
1	0.01	+	+	-	-	-
2	0.01	-	-	-	-	-
3	0.01	+	+	-	-	-
1	0.001	-	-	-	-	-
2	0.001	+	+	-	-	-
3	0.001	-	-	-	-	-



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación de *ompW* (Fragmento esperado 588 pb) medio APA. Muestreo Guerrero Negro. Marzo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 67, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 3, 8: Dilución 0.001-réplica 2, 9: blanco), por medio del gen *ompW*. ▼ = Positivo.**

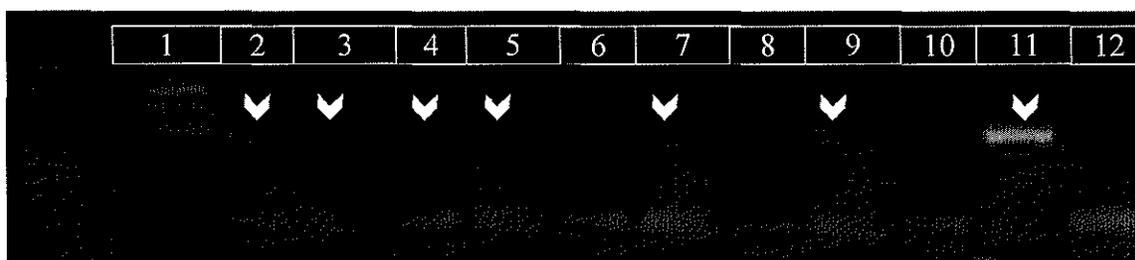


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen *ctxA* (Fragmento esperado de 308 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Guerrero Negro. Marzo (1: Escalera 100 pb, 2: Dilución 0.1-réplica 1, 3: Dilución 0.1-réplica 2, 4: Dilución 0.1-réplica 3, 5: Dilución 0.01-réplica 1, 6: Dilución 0.01-réplica 2, 7: Dilución 0.01-réplica 3, 8: Dilución 0.001-réplica 1, 9: Dilución 0.001-réplica 2, 10: Dilución 0.001-réplica 3, 11: *V. cholerae* CICESE 67, 12: Blanco). ▼ = Positivo.

Tabla V. Resumen de las colonias únicas aisladas, procedentes de Guerrero Negro, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.

Colonias únicas GN	OMPW	CTX A	CHX A	O1	O139
GN5-1 (marzo)	+	-	-	+	-
GN5-2 (marzo)	+	+	-	+	-
GN5-3 (marzo)	+	+	-	-	-
GN5-4 (marzo)	+	+	-	+	-



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen *ctxA* (Fragmento esperado de 308 pb) presente en *V. cholerae* colonias únicas. Muestreo Guerrero Negro. Marzo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 67, 4: GN5-1, 5: GN5-2, 6: GN5-3, 7: GN5-4, 8: Blanco). ▼ = Positivo.

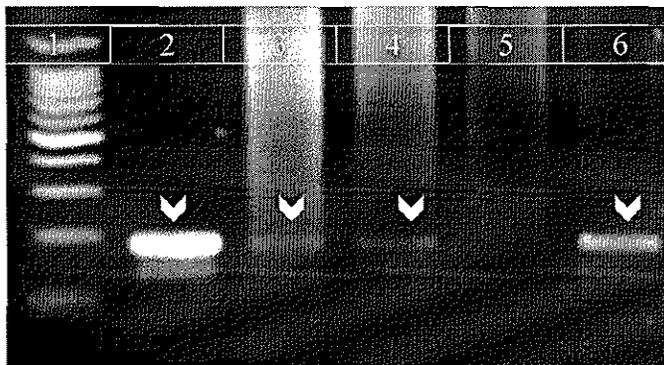


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en *V. cholerae* colonias únicas. Muestreo Guerrero Negro, Marzo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 67, 3: GN5-1, 4: GN5-2, 5: GN5-3, 6: GN5-4). ▼ = Positivo

### VII.1.3.2. Muestreo de mayo 2011

Los resultados obtenidos en este mes en Laguna de Guerrero Negro, vuelven a ser atípicos, ya que en los homogenizados en que se obtuvieron positivas para ompW, algunas muestras fueron O1 ctx (+) y en otras que fueron ctx A (+), no lo fueron ni para O1 ni para O139, por lo tanto son muestras correspondientes a *V. cholerae* toxigénicas no O1 no O139. (tabla VI, Fig. 12).

El fragmento esperado de ctxA (Fig. 12); se detectó en un aproximado de temperatura superficial de 17°C. Sin embargo a estos resultados se les agrega una nueva observación en la tabla VI referente a la presencia del serogrupo O1 en las primeras diluciones, teniendo como positivas las tres réplicas pertenecientes a 0.1 y la primera réplica para 0.01 (Fig. 13).

Con respecto a la toxina Cholix A, esta se detectó en la dilución 0.001-réplica 2 (Fig. 14). El serogrupo O139 dio negativo para todas las diluciones.

Tabla VI. Resumen de las muestras procedentes de Guerrero Negro, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.

RÉPLICAS	DILUCIONES	OMPW	CTX A	CHX A	O1	O139
1	0.1	+	+	-	+	-
2	0.1	+	-	-	+	-
3	0.1	+	+	-	+	-
1	0.01	+	-	-	+	-
2	0.01	+	-	-	-	-
3	0.01	+	+	-	-	-
1	0.001	+	+	-	-	-
2	0.001	+	-	+	-	-
3	0.001	-	-	-	-	-

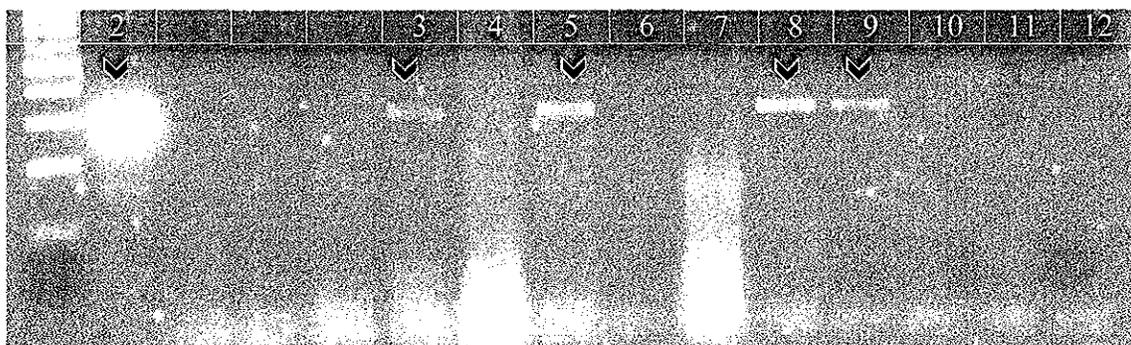


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen *ctxA* (Fragmento esperado de 308 pb) presente en diluciones del homogenizado. Muestreo Guerrero Negro. Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 67, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▼ = Positivo.

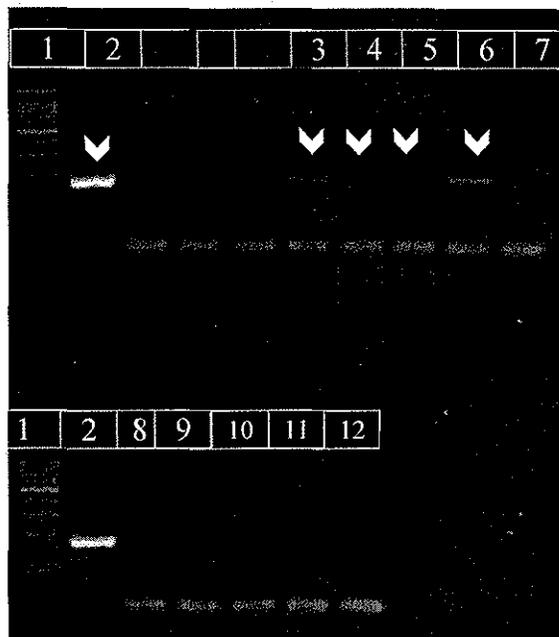


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en diluciones del homogenizado. Muestreo Guerrero Negro, Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▼ = Positivo.

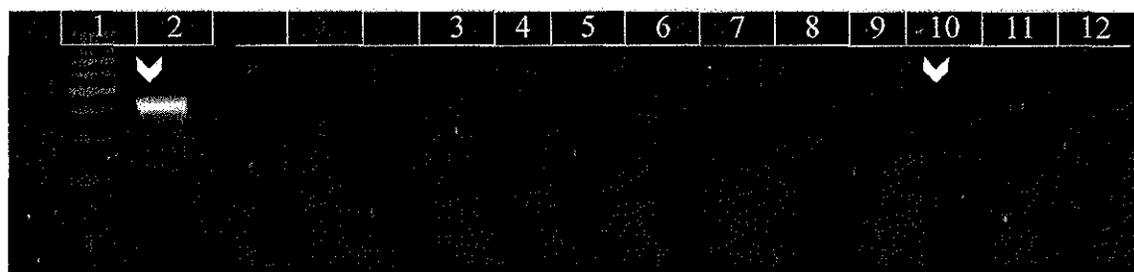


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen *cholix A* (Fragmento esperado de 534 pb) presente en diluciones del homogenizado. Muestreo Guerrero Negro, Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▼ = Positivo.

## VII.1.4. Laguna San Ignacio

### VII.1.4.1. Muestreo mayo 2011

En este mes se detectó la presencia de *V. cholerae* O1 no toxigénico en casi todas las diluciones (Fig. 15) lo cual es relativamente atípico, Cabe destacar que las diluciones negativas para la toxina ctxA presentaron resultados positivos para la toxina Cholix A, lo cuál no fue el caso del muestreo del mes de marzo. (ver Fig. 16 y tabla VII) O1, (1998). Estos resultados se obtuvieron cuando la temperatura de la zona oceánica cerca de la Laguna de San Ignacio fue de 18 °C.

**Tabla VII. Resumen de las muestras procedentes de Bahía San Ignacio, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.**

RÉPLICAS	DILUCIONES	OMPW	CTX A	CHX A	O1	O139
1	0.1	+	-	-	-	-
2	0.1	+	-	-	+	-
3	0.1	+	-	+	+	-
1	0.01	+	-	+	+	-
2	0.01	+	-	-	+	-
3	0.01	+	-	+	+	-
1	0.001	+	-	+	+	-
2	0.001	+	-	+	+	-
3	0.001	-	-	-	-	-



Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen O1 (Fragmento esperado 192 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Bahía San Ignacio, Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▽ = Positivo.

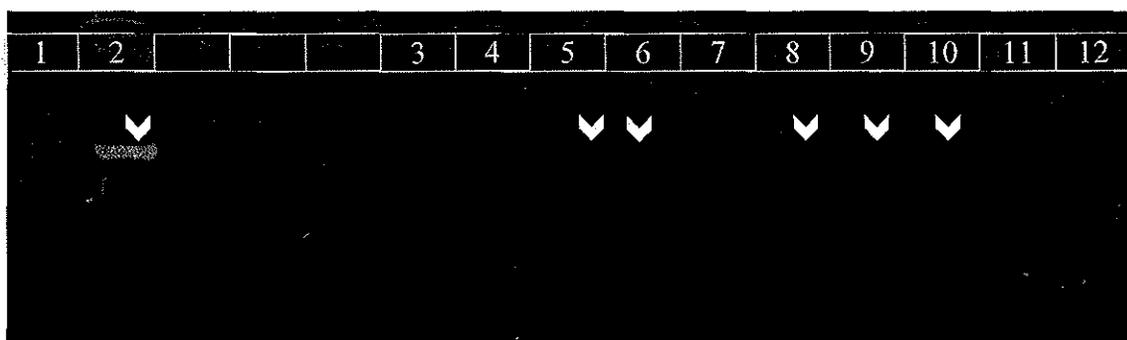


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Bahía San Ignacio, Mayo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: Dilución 0.1-réplica 1, 4: Dilución 0.1-réplica 2, 5: Dilución 0.1-réplica 3, 6: Dilución 0.01-réplica 1, 7: Dilución 0.01-réplica 2, 8: Dilución 0.01-réplica 3, 9: Dilución 0.001-réplica 1, 10: Dilución 0.001-réplica 2, 11: Dilución 0.001-réplica 3, 12: Blanco). ▽ = Positivo.

## VII.1.5. Bahía Magdalena

### VII.1.5.1. Muestreo Marzo 2011

En Bahía Magdalena se presentaron resultados positivos para el *gen ompW* en el mes de marzo en diferentes diluciones del homogenizado (tabla VIII, Fig. 17). La dilución 0.1 dio positivo a dos de las tres réplicas, otra dilución que presentó positivo fue de 0.01 con dos amplificaciones positivas de las tres réplicas, por último la dilución 0.001 sólo presentó una banda de aproximadamente 588 pares de bases de las tres réplicas (Fig. 17). En los homogenizados positivos para *ompW* se detectó la presencia de *ctxA* en tres de ellos Fig. 18) Sin embargo, no todas las muestras positivas para *ompW* y *ctxA* correspondieron al serogrupo O1 (Fig. 19). ni tampoco al O139, con esto volvemos a registrar resultados relativamente atípicos, con muestras *V. cholerae* (+), *ctx A* (+) pero no O1/ no O139. Estos resultados se obtuvieron con una temperatura satelital promedio de 18.5 °C.

Tabla VIII. Resumen de las muestras procedentes de Bahía Magdalena, las cuales se les realizó extracciones de ADN genómico de las diferentes diluciones en medio de cultivo APA, analizadas con los iniciadores de OMPW, CTX A, CHX A, O1 y O139. (+) Positivo, (-) Negativo.

RÉPLICAS	DILUCIONES	OMPW	CTX A	CHX A	O1	O139
1	0.1	+	+	-	-	-
2	0.1	+	+	-	-	-
3	0.1	-	-	-	+	-
1	0.01	-	-	-	-	-
2	0.01	+	+	-	+	-
3	0.01	+	-	-	-	-
1	0.001	-	-	-	+	-
2	0.001	+	-	-	-	-
3	0.001	-	-	-	+	-

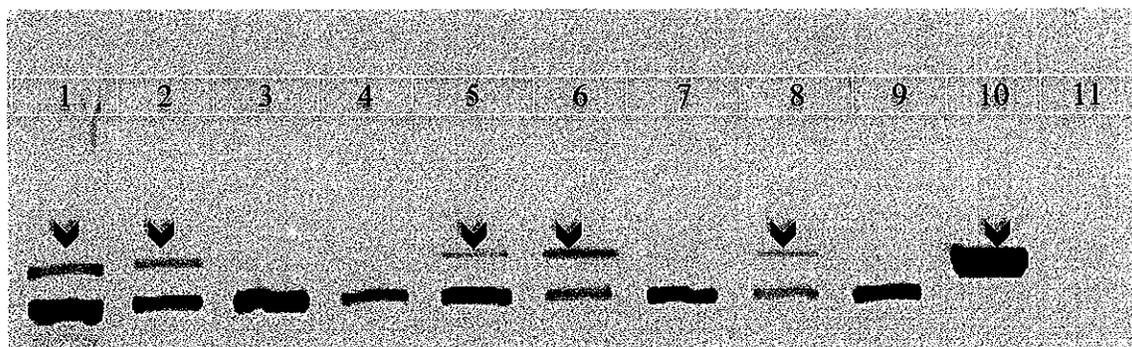


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del *gen ompW* (Fragmento esperado 588 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Bahía Magdalena. Marzo (1: Dilución 0.1-réplica 1, 2: Dilución 0.1-réplica 2, 3: Dilución 0.1-réplica 3, 4: Dilución 0.01-réplica 1, 5: Dilución 0.01-réplica 2, 6: Dilución 0.01-réplica 3, 7: Dilución 0.001-réplica 1, 8: Dilución 0.001-réplica 2, 9: Dilución 0.001-réplica 3, 10: *V. cholerae* CICESE 67, 12: Blanco). ▼ = Positivo.

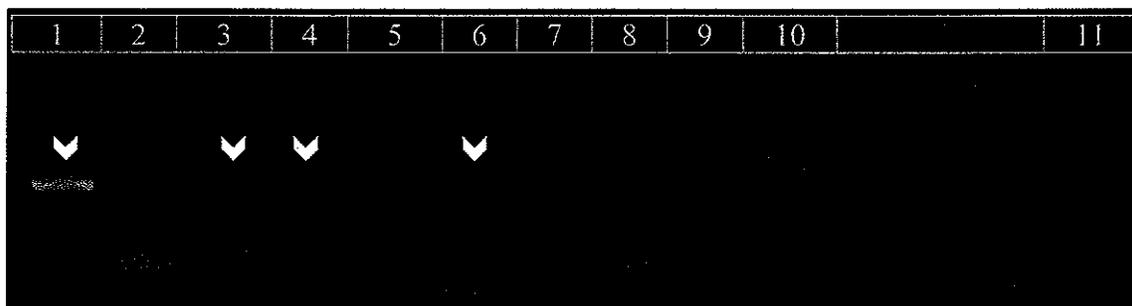


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del *gen ctxA* (Fragmento esperado de 308 pb) presente en *V. cholerae* medio APA. Muestreo Bahía Magdalena. Marzo (1: Control CICESE 67, 2: Dilución 0.1-réplica 1, 3: Dilución 0.1-réplica 2, 4: Dilución 0.1-réplica 3, 5: Dilución 0.01-réplica 1, 6: Dilución 0.01-réplica 2, 7: Dilución 0.01-réplica 3, 8: Dilución 0.001-réplica 1, 9: Dilución 0.001-réplica 2, 10: Dilución 0.001-réplica 3, 11: Blanco). ▼ = Positivo.

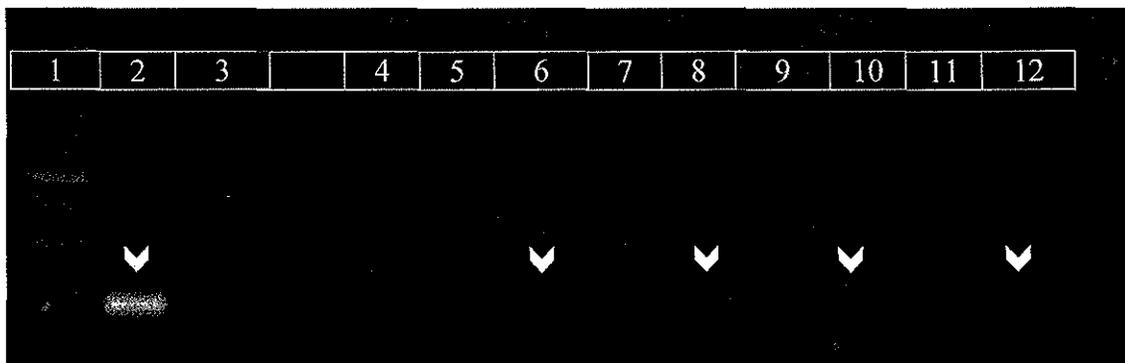


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del serogrupo O1 en diluciones del homogenizado. Muestreo Bahía Magdalena. Marzo (1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 67, 3: Blanco, 4: Dilución 0.1-réplica 1, 5: Dilución 0.1-réplica 2, 6: Dilución 0.1-réplica 3, 7: Dilución 0.01-réplica 1, 8: Dilución 0.01-réplica 2, 9: Dilución 0.01-réplica 3, 10: Dilución 0.001-réplica 1, 11: Dilución 0.001-réplica 2, 12: Dilución 0.001-réplica 3). ▼ = Positivo.

Tabla IX. Resumen de los muestreos realizados en la Península de Baja California

	jun-10	ago-10	nov-10	ene-11	mar-11	may-11	ago-11
<b>BAHÍA DE TODOS SANTOS</b>	18 °C	19 °C	16 °C	14.5 °C	15 °C	16 °C	18 °C
OMPW	-	-	-	-	-	+	-
CTX A	-	-	-	-	-	-	-
CHX A	-	-	-	-	-	+	-
O1	-	-	-	-	-	+	-
<b>BAHÍA DE SAN QUINTIN</b>	18 °C	19 °C	16.5 °C	15 °C	15.5 °C	16.5 °C	18 °C
OMPW	-	-	-	-	-	+	-
CTX A	-	-	-	-	-	+	-
CHX A	-	-	-	-	-	+	-
O1	-	-	-	-	-	+	-
<b>LAGUNA DE GUERRERO NEGRO</b>	17.5 °C	20 °C	16.5 °C	15.5 °C	16 °C	17 °C	19 °C
OMPW	-	-	-	-	+	+	-
CTX A	-	-	-	-	+	+	-
CHX A	-	-	-	-	-	+	-
O1	-	-	-	-	+	+	-
<b>LAGUNA DE SAN IGNACIO</b>	20 °C	23.5 °C	19 °C	17 °C	17 °C	18 °C	22 °C
OMPW	-	-	-	-	-	+	-
CTX A	-	-	-	-	-	-	-
CHX A	-	-	-	-	-	+	-
O1	-	-	-	-	-	+	-
<b>BAHIA MAGDALENA</b>	21 °C	25.5 °C	22 °C	18 °C	18.5 °C	19 °C	24 °C
OMPW	-	-	-	-	+	-	-
CTX A	-	-	-	-	+	-	-
CHX A	-	-	-	-	-	-	-
O1	-	-	-	-	+	-	-

## **VII.2. Golfo de México (Lagunas costeras del Edo. de Veracruz)**

Los resultados de los ostiones cosechados en estas lagunas y enviados al mercado de mariscos La Nueva Viga en el D.F. donde se compraron, muestran una detección positiva de *V. cholerae* O1 toxigénico en el primer muestreo de septiembre 2010. Sin embargo, en los siguientes muestreos de noviembre 2010, febrero de 2011, abril 2011 y julio 2011 no se obtuvo ninguna detección positiva de *V. cholerae* toxigénico (tabla X). Debe resaltarse que los ostiones fueron comprados en puestos de la Nueva Viga, por lo que desconocemos de que manera fueron transportados al D.F. y el tiempo transcurrido entre su cosecha y su venta en el D.F.

### **VII.2.1. Laguna de Tamiahua**

#### **VII.2.1.1 Muestreo de septiembre 2010**

En la tabla IX se puede observar que la presencia de *V. cholerae* pertenecientes a la laguna costera de Tamiahua al Estado de Veracruz, ubicada en el Golfo de México, donde sólo se pudo detectar en el mes de septiembre para el año 2010 a una temperatura superficial promedio mensual de 29 °C. La presencia de las toxinas CTX A, Cholix A, así como la detección del serogrupo O1, nos indica un dato muy interesante ya que por esta temporada de muestreo se estaba presentando la epidemia de cólera en Haití, país relativamente cercano a México.

#### **VII.2.1.2 Muestreo de abril 2011**

Para el muestreo de abril en el 2011 se volvió a tener incidencia de *V. cholerae* en la laguna de Tamiahua (Tabla X), a una temperatura superficial promedio mensual de 25 °C. Sin embargo, estas colonias aisladas y analizadas no presentaron indicios de CTX A, CHX A, ni la presencia del gen perteneciente a los serogrupos O1 y O139.

## VII.2.2. Laguna de Tampamachoco

### VII.2.2.1. Muestreo de septiembre 2010

En la tabla X se puede observar que la presencia de *V. cholerae* pertenecientes a la laguna costera de Tampamachoco en el Estado de Veracruz, posicionada en el Golfo de México, se detectó la toxina ctx A y el serotipo O1 sólo en el mes de septiembre para el año 2010 a una temperatura superficial promedio mensual de 29 °C. Con los métodos moleculares dio información positiva de la toxina CTX A, Cholix A, así como la presencia del serotipo O1. En estas fechas se estaba presentando la epidemia de cólera en Haití (Ali et al. 2011).

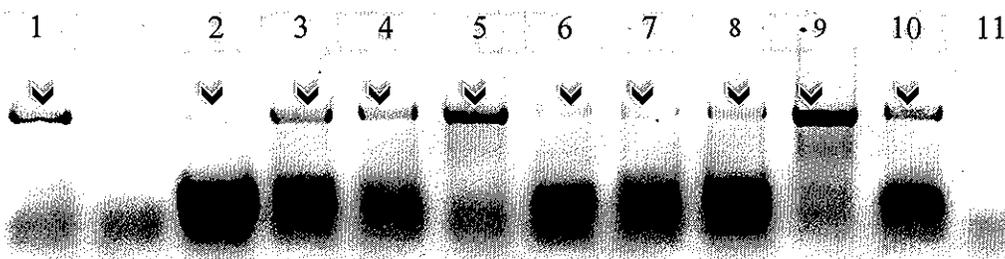


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen *ompW* (Fragmento esperado 588 pb) presente en *V. cholerae*, en colonias únicas. Muestreo Bahía Tamiahua (TH) y Tampamachoco (CO) – septiembre (1: *V. cholerae* CICESE 82, 2: TH A2 1, 3: TH A3, 4: TH A6, 5: TH A8, 6: TH A11, 7: TH A13, 8: TH A18, 9: CO A268, 10: CO A269, 11: Blanco). ▼ = Positivo.

**Tabla X. Comparación de las zonas de muestreos por meses, presencia y ausencia de *V. cholerae* toxigénico en el Golfo de México. La comparación de esta tabla es de colonias únicas aisladas en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.**

	<b>Temp. Prom.</b>	<b>Tamiahua</b>	<b>OmpW</b>	<b>CTX A</b>	<b>Cholix A</b>	<b>O1</b>	<b>O139</b>
<b>Septiembre - 2010</b>	<b>28 ° C</b>	A2	+	+	+	+	-
		A3	+	+	+	-	-
		A6	+	+	+	-	-
		A8	+	+	+	-	-
		A11	+	+	+	+	-
		A13	+	+	+	-	-
		A18	+	+	+	-	-
<b>Septiembre - 2010</b>		<b>Mandinga</b>					
	<b>28 ° C</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Septiembre - 2010</b>		<b>Tampamachoco</b>					
	<b>28 ° C</b>	A268	+	+	-	+	-
		A269	+	+	-	+	-
<b>Noviembre - 2010</b>		<b>Tamiahua</b>					
	<b>27 ° C</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Noviembre- 2010</b>		<b>Mandinga</b>					
	<b>27 ° C</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Noviembre- 2010</b>		<b>Tampamachoco</b>					

	27 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Febrero – 2011</b>		<b>Tamiahua</b>					
	24 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Febrero- 2011</b>		<b>Mandinga</b>					
	24 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Febrero- 2011</b>		<b>Tampamachoco</b>					
	24 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Abril– 2011</b>		<b>Tamiahua</b>					
	25 ° C	+	+	-	-	-	-
<b>Abril- 2011</b>		<b>Mandinga</b>					
	25 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Abril- 2011</b>		<b>Tampamachoco</b>					
	25 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Julio – 2011</b>		<b>Tamiahua</b>					
	28° C	-	-	-	-	-	-
<b>Julio-2011</b>		<b>Mandinga</b>					
	28 ° C	-	-	-	-	-	-
<b>Julio- 2011</b>		<b>Tampamachoco</b>					
	28 ° C	-	-	-	-	-	-

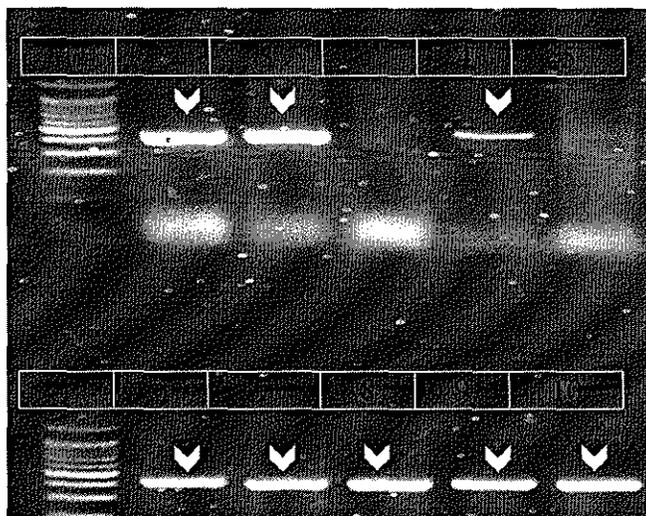


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen Cholix A (Fragmento esperado de 534 pb) presente en *V. cholerae*, en colonias únicas. Muestreo Lagunas de Tamiahua (TH) y Tampamachoco (CO) – septiembre-2010 (1: escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 82, 3: TH A2 1, 4: TH A3, 5: Blanco, 6: TH A6, 7: TH A8, 8: TH A11, 9: TH A13, 10: TH A18, ) = Positivo.

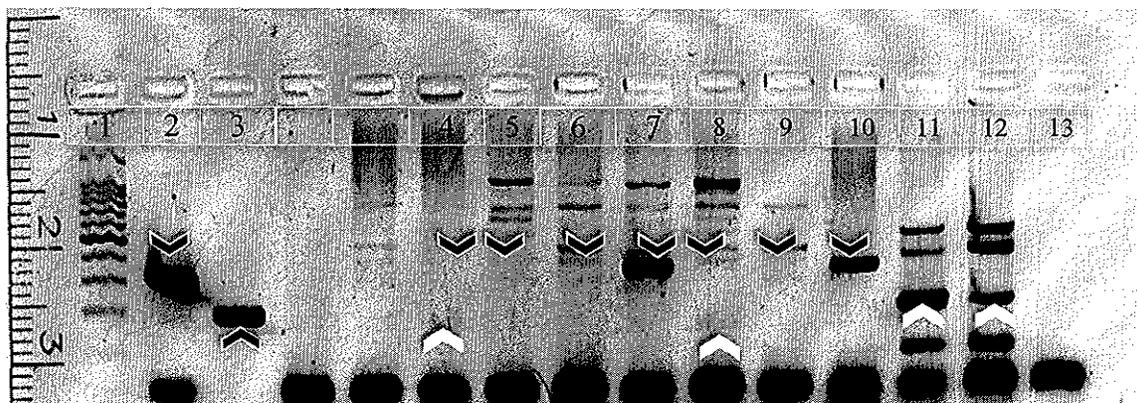


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa [2%] para identificación del gen ctxA (Fragmento esperado de 308 pb) = Positivo) y O1 (Fragmento esperado de 192 pb) = Positivo) presente en *V. cholerae*, en colonias únicas. Muestreo Lagunas de Tamiahua (TH) y Tampamachoco (CO) – septiembre - 2010(1: Escalera 100 pb, 2: *V. cholerae* CICESE 67 – ctxA, 3: *V. cholerae* CICESE 82 - O1, 4:TH A2 1, 5: TH A3, 6: TH A6, 7: TH A8, 8: TH A11, 9: TH A13, 10: TH A18, 11: CO A268, 12: CO A269, 13: Blanco).

### **VII.3. Cholix A**

La toxina Cholix A, se detectó sólo en homogenizados de muestras *V. cholerae* tanto O1 como no O1/ no O139, así como en las muestras positivas y negativas para la toxina ctxA en diferentes localidades y diferentes temperaturas satelitales de las áreas oceánicas cercanos a las zonas de cultivo.

### **VII.4. Temperatura satelital**

En las muestras correspondientes al mes de junio de 2010 fueron negativas para *V. cholerae* en un gradiente de temperatura aproximado entre 18 °C en Bahía de Todos Santos en Baja California y de 21 °C en Bahía Magdalena correspondiente al sitio de muestreo en Baja California Sur. Este patrón se presentó en el siguiente muestreo realizado en el mes de agosto donde se puede establecer que el gradiente de temperatura fue de 19 °C a 25.5 °C observando este incremento en las aguas del Pacífico con un gradiente norte a sur. Para los inicios de invierno la temperatura bajó, teniendo un intervalo entre 16 °C y 22 °C en promedio en el mes de noviembre del 2010 y para enero 2011 un intervalo de 14.5 °C y 18 °C en promedio. Estos últimos dos meses así como los anteriores resultaron negativos para la detección de *V. cholerae* (tabla IX).

## VIII. Discusión

La metodología empleada en el presente trabajo tiene dos niveles de detección, el primero con una sensibilidad elevada se utilizó para identificar a *V. cholerae* y sus factores toxigénicos con un ADN obtenido por choque térmico del homogenizado del molusco, por lo cual pudimos determinar la presencia en concentraciones muy bajas del factor investigado. Al obtener resultados positivos en dicho homogenizado se trató de aislar la colonia correspondiente al factor toxigénico existente (CTX A), no obteniendo en la mayoría de los casos resultados efectivos, probablemente debido a la baja concentración de *V. cholerae* positivo para este gen. Solamente en los meses de marzo en la zona de Laguna Guerrero Negro, pudimos tener una detección positiva en el homogenizado y aislar varias colonias únicas de *V. cholerae* O1, ctx A y chx A, lo cual nos hace suponer que en esta área y en este muestreo había una concentración más elevada de esta bacteria patógena.

Con la información recabada en este estudio no podemos explicar la presencia de colonias de esta bacteria patógena en Laguna de Guerrero Negro durante el mes de marzo 2011, máxime que en el siguiente muestreo de mayo 2011 solo se detectó en el homogenizado y para agosto 2011 no se detectó ni siquiera en el homogenizado, por lo que no se intentó el aislamiento de colonias.

Las detecciones de positivas para *V. cholerae* O1, ctx A y chx A en el homogenizado se obtuvieron en los meses de marzo 2011 en Laguna de Guerrero Negro y en Bahía Magdalena y en mayo 2011 estas detecciones positivas se obtuvieron para los ostiones estudiados en Bahía de San Quintín y Laguna de Guerrero Negro

Con respecto a la identificación positiva de la nueva toxina Chx A cuya patogenicidad en el humano no ha sido demostrada, esta fue encontrada en las diferentes zonas tanto en organismos ctx A positivos o negativos. La relación con las temperaturas obtenidas por satélite y la aparición de *V. cholerae* (en homogenizados), indica que las detecciones positivas se presentan en un intervalo de temperatura entre 16 y 18.5 °C para todas las áreas estudiadas, siendo

cercana a los 16 °C en Bahía de Todos Santos y a los 18.5 °C en Bahía Magdalena, por lo tanto en un gradiente norte/sur. En las zonas de Laguna de San Ignacio y Bahía Magdalena, donde se registran temperaturas cercanas a los 25 °C, no obtuvimos resultados positivos en los homogenizados estudiados, por lo que en la Península de Baja California, temperaturas mayores de 20 °C no parecen favorecer la incidencia de *V. cholerae* toxigénico o no toxigénico (Fig. 23). El aislamiento de microorganismos con técnicas clásicas presenta agudos errores de identificación, sobre todo en *V. cholerae* donde es imprescindible evidenciar sus factores de patogenicidad. En el único antecedente sobre patógenos bacterianos en el ostión japonés cultivado en B.C. que encontramos (Vásquez-Yeomans et al. 2004), los autores no llegan a una identificación concreta, ni señalan la patogenicidad de las bacterias aisladas debido a que no emplearon técnicas moleculares por lo que la identificaciones registradas son muy dudosas.

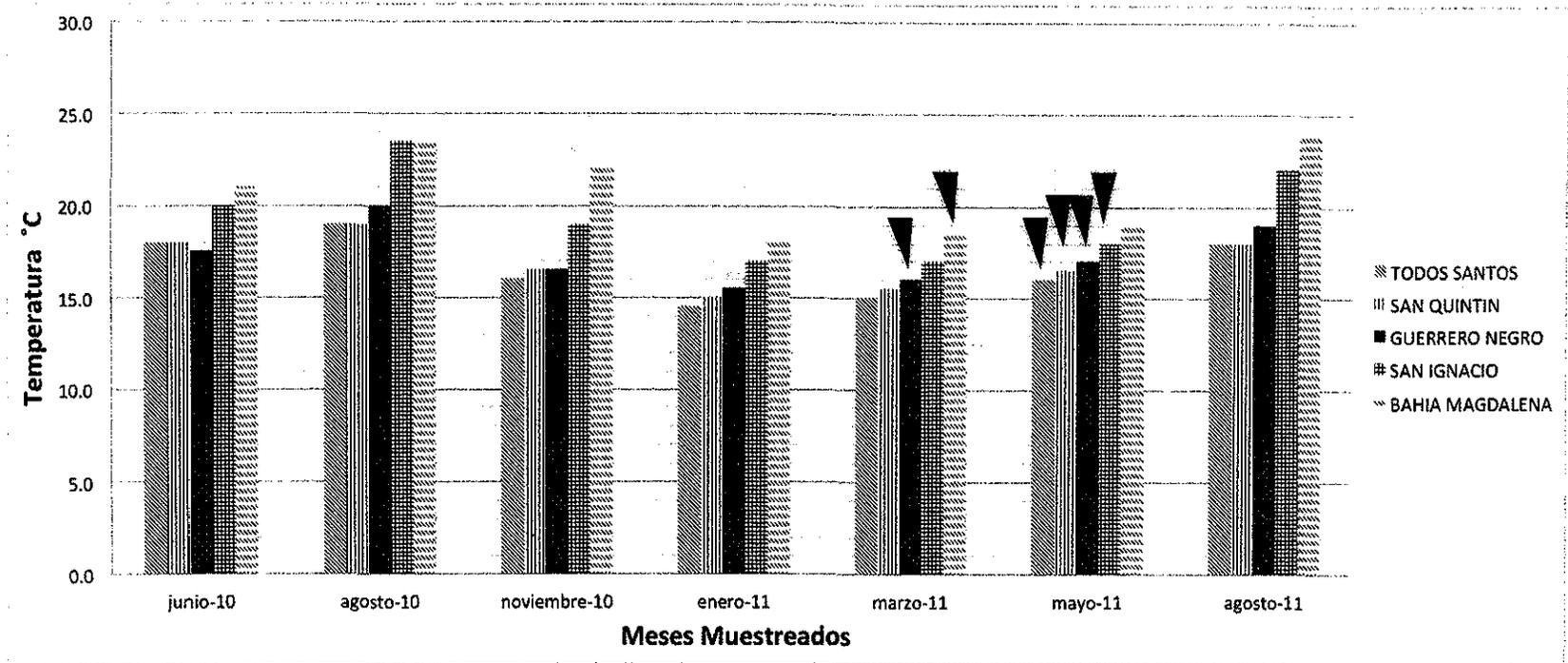


Figura 23. Temperatura superficial oceánica cercana a las zonas de muestreo. Presencia de *V. cholerae*

Las muestras de ostión provenientes de las lagunas costeras de Tamiahua y Tampamachoco en el Golfo de México, donde se obtuvieron colonias aisladas de *V. cholerae* O1, ctx A positivo, corresponden al mes de septiembre 2010 (tabla IX), al final de la temporada de lluvias y a una temperatura satelital promedio de 28 °C. En el Golfo de México la temporada de lluvias parece ser determinante en la incidencia de esta bacteria patógena, tal como se ve reflejado en el incremento de otros grupos bacterianos, como las bacterias coliformes, las bacterias degradadoras de petróleo y las bacterias heterótrofas en general en Laguna de Términos localizada en el Estado de Campeche (Lizárraga-Partida, 1996).

Murphree et al. (1991) estudiaron en laboratorio la retención de *V. cholerae* O1 ctxA negativo en el ostión *Cassostrea virginica* a 25 y 19 °C. Después de 48 h *V. cholerae* pudo ser detectado abundantemente en estanques con temperatura de 25 °C y en menor concentración a una temperatura de 19 °C. Colwell (1996), Borroto y Martínez (2000) y Tamplin y Carrillo (1991), constatan un aumento de casos de cólera al aumentar la temperatura superficial del océano, en un intervalo de 12 a 25 °C. Sin embargo, en nuestro estudio, la detección de *V. cholerae* O1 toxigénico tanto en homogenizados como en colonias aisladas se registró en muestras obtenidas de Laguna de Guerrero Negro en los meses de marzo y mayo, cuando se presentaron temperaturas entre 16 y 18.5 °C en promedio.

En las muestras procedentes del Golfo de México, la detección de colonias aisladas de *V. cholerae* O1 toxigénicas se registra en temperaturas promedio de zonas oceánicas cercanas a Tamiahua y Tampamachoco de 28 °C para el mes de septiembre de 2010 y de 25°C para el mes de abril 2011. Seidler y Evans (1984) realizan un estimado en zonas ambientales y nos indican que el intervalo óptimo de temperaturas para el crecimiento de *V. cholerae* se sitúa entre 21 °C y 28 °C, intervalo en el que se sitúan nuestras detecciones. Debe recordarse que las muestras fueron transportadas al D.F. sin tener cuidado de la temperatura, por lo que este intervalo de aislamiento es solamente indicativo.

Castañeda-Chávez et al. (2005) registraron la presencia de *V. cholerae* O1 no toxigénico en ostiones cosechados en Tampamachoco y Tamiahua durante los

meses de agosto y noviembre de 2001 teniendo temperaturas promedio de 18.72 a 32.35 °C y un intervalo de salinidad de 0.149 a 17.00 psu. Estos autores señala igualmente como una variable importante a la temporada de lluvias, la cual se extiende entre los meses de julio a septiembre en esta región del Golfo de México. Diversos autores, entre ellos Castañeda-Chávez et al. (2005), o Aulet et al. (2007), señalan que las altas temperaturas y el acarreo de nutrientes de tierra hacia las lagunas durante la temporada de lluvias como es el caso de Tamiahua y Tampamachoco en Veracruz, son variables importantes en la presencia y persistencia de *V. cholerae*. Cervantes et al. (1999) también constatan la presencia de *V. cholerae* O1 en muestras de ostión tomadas de marzo a octubre y de junio a noviembre de 1996 en Tamiahua y Tampamachoco. En nuestro muestreo de abril se detecta la presencia de *V. cholerae* no O1, pero en septiembre se registró *V. cholerae* O1 toxigénico.

La inestabilidad de los ecosistemas ocasionados por el cambio climático ha provocado el desplazamiento de las especies, aumentado las distribuciones globales, influyendo en la genética de los microorganismos patógenos a través de mutaciones o simples recombinaciones como la transferencia horizontal de genes, o dando lugar a nuevas interacciones entre huéspedes y agentes patógenos (Thompson, 2004). Es por ello que los cambios en las características ambientales y fisicoquímicas en lagunas costeras y esteros juegan un papel muy importante, puesto que pueden proporcionar a agentes patógenos y sus vectores condiciones óptimas para el crecimiento, sobrevivencia, transporte y dispersión (Huq y Colwell, 1996).

La presencia y prevalencia de vibrios patógenos donde no se habían reportado antes, han puesto de relieve la importancia potencial de los factores ambientales en la dispersión de patógenos. Estudios epidemiológicos sobre *V. cholerae*, indican la posibilidad de predecir un brote de cólera en zonas endémicas correlacionando variables obtenidas por satélite como la temperatura, productividad fitoplanctónica o el nivel medio del mar y los casos clínicos

presentes en zonas afectadas por el cólera (Pascual y Dobson, 2002; Koelle et al. 2005).

En 2011 México registró oficialmente ante la WHO ([www.who.int/wer](http://www.who.int/wer)) un caso clínico de cólera en el Estado de Sinaloa, por primera vez en once años ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)), por lo que una nueva epidemia como la de 1991-2000 pueda volver a presentarse, máxime cuando se están teniendo detecciones positivas de *V. cholerae* toxigénico (ctx A +) en el presente estudio. Este registro de *V. cholerae* ctxA (+) no se ha manifestado en casos clínicos de cólera, probablemente porque la mayoría de nuestras detecciones se efectuaron sobre homogenizados de ostión (a excepción del muestreo de marzo en Laguna de Guerrero Negro), por lo que en condiciones en las que *V. cholerae* pudo estar en muy baja concentración, o en estadio viable pero no cultivable.

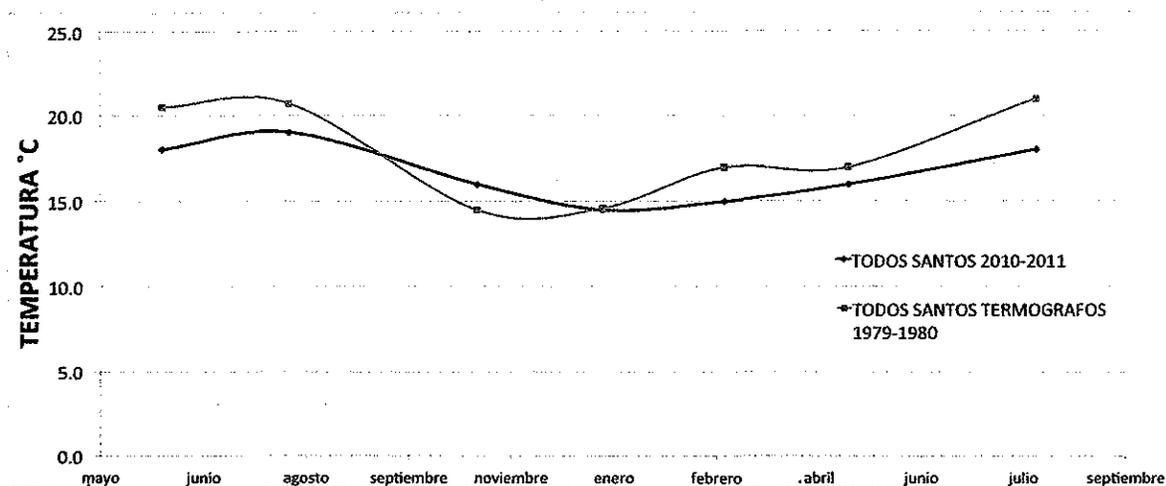
Valentin y Beadfield (1954), Postgate (1969), Jannasch (1969), Stevenson (1978), Kurath y Morita (1983), entre otros autores, postulan la hipótesis de bacterias no esporuladas entran en una etapa de reposo o latencia y no crecen en los medios de cultivos tradicionales, pero conserva su viabilidad e inclusive su virulencia, aspectos que sólo pueden ser detectados con técnicas que no impliquen cultivo del organismo. Xu et al. (1982) demostraron la presencia de *V. cholerae* toxigénico por medio de método de tinción de anticuerpos a pesar de que las células no podían ser cultivadas en medios bacteriológicos. Igualmente, estos autores comprobaron que pueden mantener su actividad metabólica, sintetizar la toxina del cólera y la capacidad de volver a crecer o salir del Estado de latencia con estímulos apropiados, tales como la transición al intestino de mamíferos (Colwell y Huq, 1994; Gauthier, 2000; Lleo et al. 2000). Igualmente Chaiyanan et al. (2001) detectan con la obtención de antígenos y métodos moleculares, toxinas correspondientes a la isla de patogenicidad de *V. cholerae*, como la ctxA, toxR, TCP y zot en células viables pero no cultivables.

Estos resultados son particularmente interesantes en el caso de *V. cholerae*, ya que en ambientes acuáticos se desarrolla en biofilms sobre superficies sólidas como micro o macrofauna, lo cual le permite permanecer viable pero no cultivable

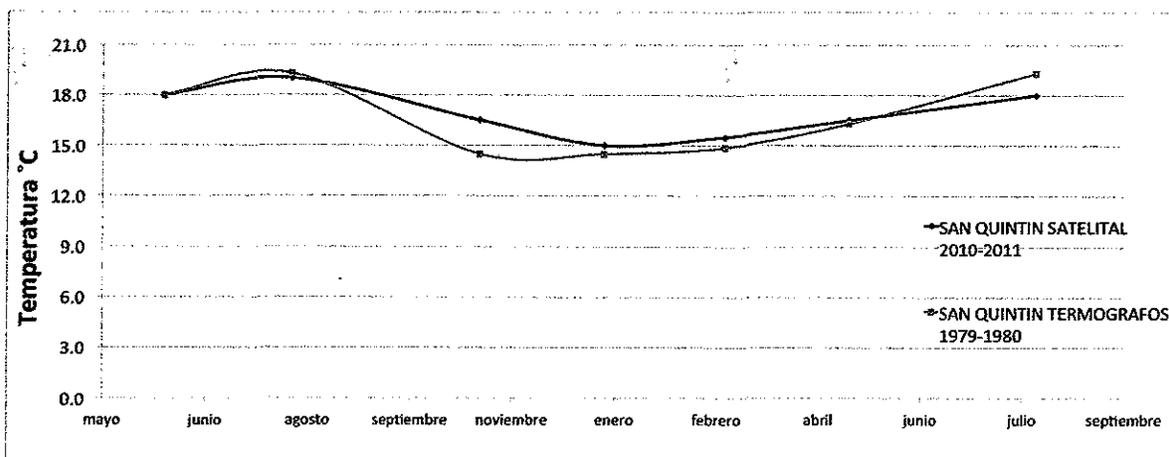
por mucho tiempo, sin causar eventos toxigénicos hacia el humano a través del consumo de alimentos provenientes del mar como podrían ser los ostiones (Huq et al. 2000).

Lo anterior brinda una posible explicación al hecho de detectar *V. cholerae* ctx A(+) en homogenizados y no aislar colonias únicas de la bacteria, ya que estos estudios indican que no pierden la capacidad de producir toxinas como lo demostramos en nuestros métodos moleculares donde por medio de los iniciadores utilizados, demostramos la presencia de la toxina colérica ctxA en homogenizados.

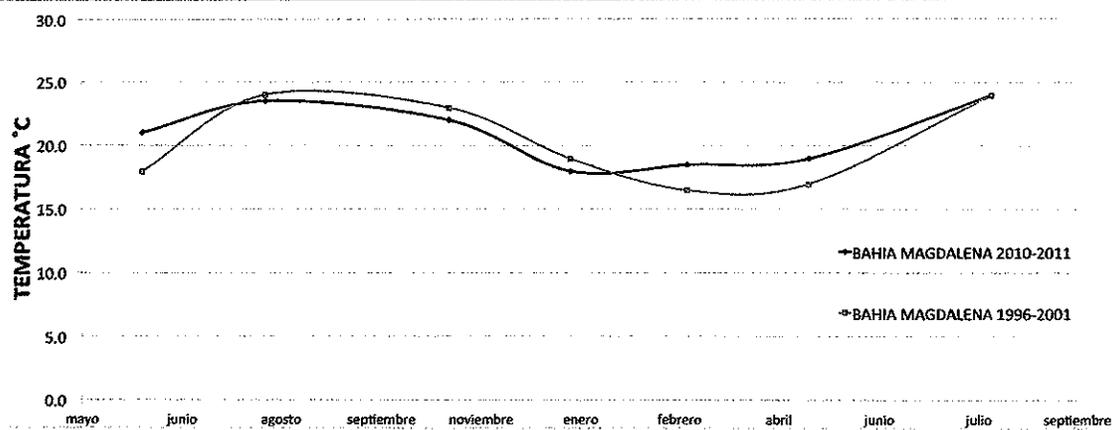
El registro continuo de temperaturas en las zonas ostrícolas no ha sido implementado en las diferentes granjas o zonas de cosecha y por esta razón sólo utilizamos temperaturas de satélite de zonas oceánicas cercanas a las zonas de muestreo en B.C. o de cosecha en el Golfo de México. La comparación de nuestros datos satelitales con registros de temperatura anteriores a nuestro estudio (Fig. 24, 25 y 26) respaldan la utilización por la variación mínima entre estos y así establecerse como base para un modelo preventivo en las relaciones que se hicieron entre la temperatura satelital y la detección positiva de *V. cholerae*, por lo que nuestro estudio constituye un primer paso para la prevención de la incidencia de *V. cholerae* toxigénico y no toxigénico tanto en la Península de Baja California como en el sur del Golfo de México.



**Figura 24.** Comparación de temperaturas oceánicas cercana a las zonas de muestreo en Bahía de Todos Santos tomadas por satélite (NOAA) de mayo 2010 a julio 2011 y temperaturas in situ entre los años 1979 y 1980 reportados por Álvarez-Borrego y Álvarez-Borrego (1982).



**Figura 25.** Comparación de temperaturas oceánicas cercana a las zonas de muestreo en San Quintín tomadas por satélite (NOAA) de mayo 2010 a julio 2011 y temperaturas in situ entre los años 1979 y 1980 reportadas por Álvarez-Borrego y Álvarez-Borrego (1982).



**Figura 26. Comparación de temperaturas oceánicas cercana a las zonas de muestreo en Bahía Magdalena tomadas por satélite (NOAA) de mayo 2010 a julio 2011 y temperaturas obtenidas de imágenes AVHRR mensuales de 1996 a 2001 reportadas por Zaitsev et al. (2010).**

## **IX. Conclusiones:**

Se detectó la presencia de *V. cholerae* O1 y no O1 toxigénico (ctxA +) por primera vez en ostiones cultivados en la Península de Baja California. Sin embargo, el Sistema Salud Mexicano (SSA, COFREPRIS, ISSESALUD), no registró oficialmente ningún caso clínico de cólera en 2010 o 2011.

El intervalo de temperatura satelital en el que se registraron resultados positivos para *V. cholerae* O1 toxigénico (ctxA +) y no toxigénico fue entre 16 y 18.5 °C para las zonas oceánicas del Océano Pacífico.

En Golfo de México se detectó la presencia de *V. cholerae* O1 toxigénico (ctxA +) en un intervalo de temperatura entre 25 y 28 °C, al final de la temporada de lluvias, que parece ser un factor clave para la incidencia de este patógeno.

La toxina Cholix A se detectó tanto en el Océano Pacífico como en el Golfo de México, en *V. cholerae* O1 y no O1, toxigénico o no toxigénico.

## **X. Recomendaciones**

Es necesario la implementación de métodos moleculares en cuanto a estudios para la detección de patógenos como *V. cholerae*.

Es preciso incluir termógrafos en las áreas de cultivo.

Extraer muestras in situ de ostión cultivado y/o cosechado y así tener una comparación bacteriológica con las zonas de comercio.

Extender el muestreo para incluir otras especies filtradoras que se cultiven en lagunas costeras o esteros y así determinar si existe la presencia o ausencia de vibrios patógenos.

## Referencias Bibliográficas:

- Ali A., Chen Y., Johnson J.A., Redden E., Mayette Y., Rashid M.H., Colin O. Y Morris J. 2011. Recent clonal origin of cholera in Haiti. *Emerg Infect Dis*. Vol: 10.3201/eid1704.10197. 37 p.
- Aulet, O., Cecilia, M., y Binsztein, N. (2008) Phytoplankton-linked viable non-culturable *Vibrio cholerae* O1 (VNC) from rivers in Tucuman, Argentina. *J Plankton Res* 30: 367–377 p.
- Borroto, R. J., y R. Martínez-Piedra. 2000. Geographical patterns of cholera in México, 1991–1996. *Int. J. Epidemiol.* 29:764–772 p.
- Castañeda-Chávez, M. R., V. Pardío Sedas, E. Orrantia Borunda y F. Lango Reynoso. 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. *Mar. Pollut. Bull.* 50:1641–1648 p.
- Cervantes Cianca, R.C., Gómez Barrón, J.M., Delgado Zamorano, G.G., Martínez Quijano, F., 1999. Extensos de proyectos de investigación. Recursos y Medio Ambiente, vol. III-b. Instituto Tecnológico del Mar No. 1. Boca del Río, Veracruz, México.
- Chaiyanan, S., Huq, A., Mangel, T., y Colwell, R.R. (2001). Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Syst Appl Microbiol* 24, 331–341 p.
- Chaudhuri K. Y Chatterjee S. N. 2009. Cholera Toxins. Springer. Primera edición. Alemania. 299 p.
- Colwell, R. 1996. Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. *Science* 274, 2025–2031 p.
- Colwell R.R., y Huq, A. 1994. Vibrios in the environment: Viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: K. Wachsmuth, P. A. Blake, y R. Olsvik (eds), *Vibrio cholerae* and Cholera: *Molecular to Global Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, DC. 117–133 p.

- Desmarchelier, P.M. 1997. Pathogenic Vibrios. In: A.D. Hocking, G. Arnold, I. Jenson, K. Newton y P. Sutherland, eds. Foodborne Microorganisms of Public Health Significance 5th Edition, 285 -312 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Yearbook of Fisheries Statistics: Summary tables. World aquaculture production of fish, crustaceans mollusks, etc., by principal species in 2007.
- Fernández, S. y Alonso, G. 2009. Cólera y *Vibrio cholerae*. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 40 (2): 50-69 p.
- Gauthier, M.J. 2000. Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In: R.R. Colwell y D.J. Grimes (eds), *Nonculturable Organisms in the Environment*. ASM Press, Washington, DC, 87–112 p.
- Gardner, A. D., y V. K. Venkatraman. 1935. The antigens of the cholera group of vibrios. J. Hyg. 35:262-282 p.
- Heymann D. L. 2008. Control of communicable diseases manual. 19th ed. American Public Health Association, Washington DC. 746 p.
- Hoshino, K., Yamasaki, S., Mukhopadhyay, A., Chakraborty, S., Basu, A., Bhattacharya, S., Nair, G., Shimada y T., Takeda. 1998. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 20: 201-207 p.
- Huq A y Colwell R. R. 1996. Environmental factors associated with emergence of disease with special reference to cholera. Eastern Medit Hlth J. 2:37-45 p.
- Huq, A., I. N. G. Rivera, y R. R. Colwell. 2000. Epidemiological significance of viable but nonculturable microorganisms. In: R. R. Colwell y D. J. Grimes (ed.), *Nonculturable microorganisms in the environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. 301–323 p.
- Islam MS, Drasar BS, Sack RB. 1994. Isolation of *Vibrio cholerae* O139 Synonym Bengal from the Aquatic Environment in Bangladesh: Implications for Disease Transmission. J Diarrh Dis Res. 1684:1686 p.

- Jermyn, W. S., O'Shea Y. A., Quirke, A. M., Boyd, E. F. 2006. "Genomics and the Evolution of Pathogenic *Vibrio cholerae*". In: V. L. Chan, P. M. Sherman y B. Bourke. Bacterial genomes and infectious diseases. Humana Press. Totowa, NJ, 227-254 p.
- Jannasch, H. W. 1969. Estimations of bacterial growth rates in natural waters. *J. Bacteriol.* 99:156–160 p.
- Jørgensen, R., Purdy, A. E. , Fieldhouse, R. J., Kimber, M. S. , Bartlett, D. H. y Merrill, A. R. 2008. Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 283: 10671-10678 p.
- Koelle K, Pascual M y Yunus M. 2005. Pathogen adaptation to seasonal forcing, climate change. *Proc Royal Soc London B* 272:971–977 p.
- Kurath, G., y Y. Morita. 1983. Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1206–1211 p.
- Lleo, M.M., Pierobon, S., Tafi, M.C., Signoretto, C., y Canepari, P. 2000. mRNA detection over time by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable populations maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol.*: 66, 4564–4567 p.
- Lipp, E.K., Huq, A., y Colwell, R.R. 2002. Effects of global climate on infectious disease: The cholera model. *Clin. Microbiol Rev.*: 15, 757–770 p.
- Lizárraga Partida, M.L. 1996. Microbiología del petróleo en el sur del Golfo de México. En: A.V. Botello, J. Rojas-Galavis, J.A. Benitez y D. Zarate Lomeli (Eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX, Serie Científica #5. México, 265-278 p.
- Lizárraga-Partida y M., Quilici, M. 2008. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1 strains including new non-toxigenic variants isolated in Mexico during the cholera epidemic, between 1991 and 2000. *Journal of Clinical Microbiology.* 47 (5): 1364-1371 p.
- Louis, V., E. Russek-Cohen, N. Choopun, I. Rivera, B. Gangle, S. Jiang, A D.C. Rubin, J. Patz, A. Huq, y R. Colwell. 2003. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2773–2785 p.

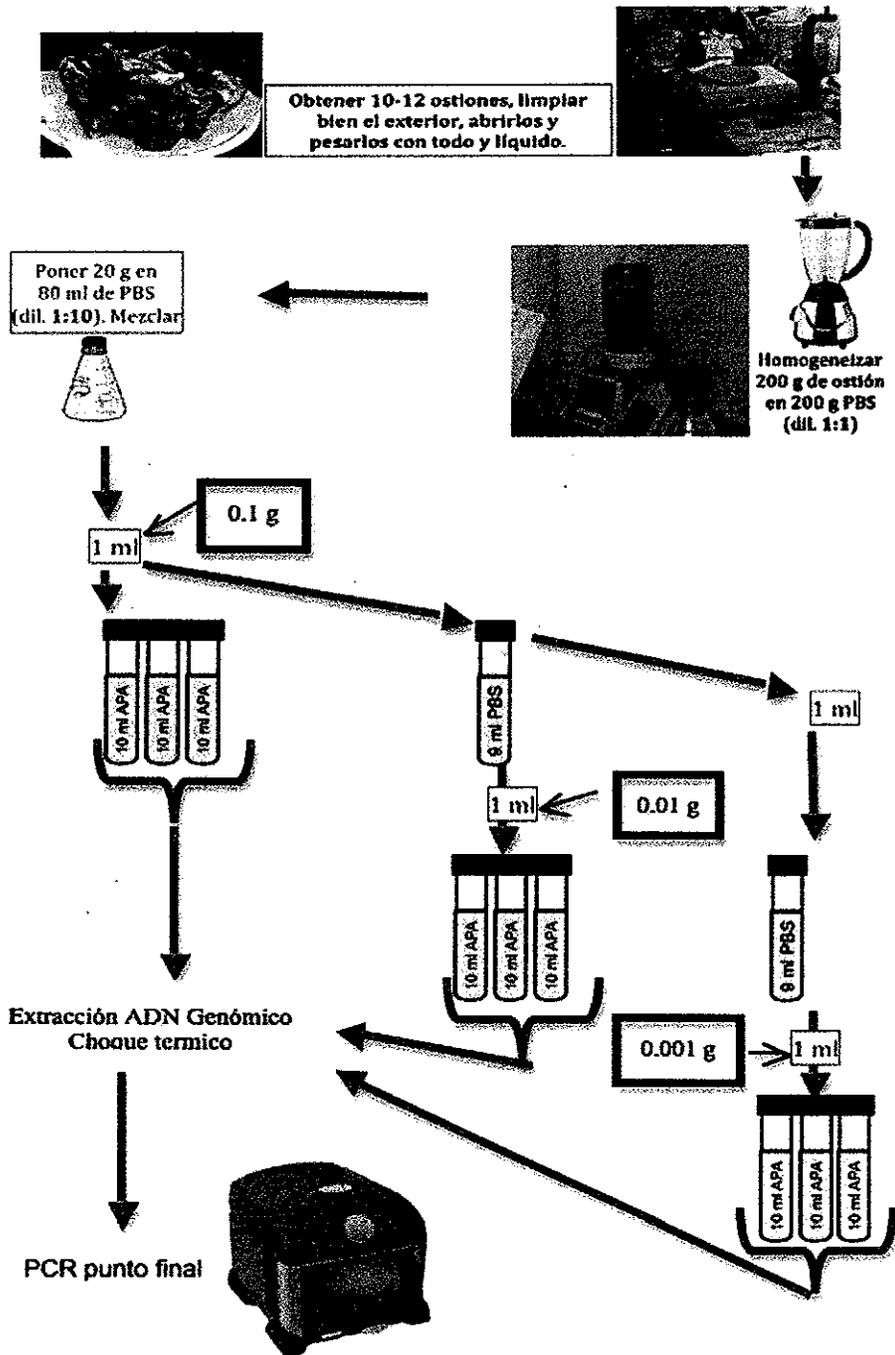
- Murphree, R. I., y M. L. Tamplin. 1991. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3656–3660 p.
- Nandi, B., R. K. Nandy, S. Mukhopadhyay, G. B. Nair, T. Shimada, y A. C. Ghose. 2000. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* Using primers targeted to the gene of outer membrane protein ompW. *Microbiology.* 38: 4145-4151 p.
- Seidler, R. J., y T. M. Evans. 1984. Computer-assisted analysis of *Vibrio* field data: four coastal areas. In: Robert L. Metcalf y Werner Stumm (ed.), *Vibrios in the environment. A volume in environmental science and technology.* Wiley-Interscience, New York. 411-425 p.
- SIEAP. 2003. Servicios de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/integra/Pesquero/fichaesp/ostion.pdf>)
- Stauder, M., Vezzulli, L., Pezzati, E., Repetto, B. y Pruzzo, C. 2010. Temperature affects *Vibrio cholerae* O1 El Tor persistence in the aquatic environment via an enhanced expression of GbpA and MSHA adhesins. *Environmental Microbiology Reports*, 2: 140–144 p.
- Stevenson, L. H. 1978. A case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microb. Ecol.* 4:127–133 p.
- Stroeher, U. H., L. E. Karageorgos, R. Morona, y P. A. Manning. 1992. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2566-2570 p.
- Pascual M, Bouma MJ, Dobson AP. 2002. Cholera and climate: revisiting the quantitative evidence. *Microbes and Infection* 4:237-245 p.
- Pollitzer, R. 1959. *Cholerae*. World Health organization. Geneva, Switzerland. 1001 p.
- Postgate, J. R. 1969. Viable counts and viability. In J. R. Norris y D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology.* Academic Press, Inc., London, United Kingdom. 611–628 p.

- Purdy, A., Rohwer, F., Edwards, R., Azam, F., y Bartlett, D. H. 2005. A glimpse into the expanded genome content of the *Vibrio cholerae* species through the identification of genes present in environmental strains. *J. Bacteriol.* 187: 2992-3001 p.
- Purdy, E. A., D. Balch, M. Lizarraga-Partida, M. S. Islam, J. Martinez-Urtaza, A. Huq, R. Colwell y D. Bartlett. 2010. Diversity and Distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol Rep*, 2, 198-207 p.
- Ramamurthy, T., S. Garg, R. Sharma, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, T. Shimada, T. Takeda, T. Karasawa, H. Kurazano, A. Pal, and Y. Takeda. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* O139 with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* 1993;341:703-704 p.
- Tamplin M, C. y Carrillo C. 1991. Environmental spread of *Vibrio cholerae* in Peru. *Lancet.* 338:1216-7 p.
- Valentine, R. C., y J. R. G. Bradfield. 1954. The urea method for bacterial viability counts with electron microscope and its relation to other viability counting method. *J. Gen. Microbiol.* 11:349-357 p.
- Vasquez Yeomans Rebeca, Caceres Martinez Jorge A., García Ortega Adrián M. 2004. Bacterias aisladas de las branquias del ostion japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Zoología.* 75: 2. 237-247 p.
- Xu, H. S., N. C. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, y R. R. Colwell. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8:313-323 p.
- Zimmerman, A.M., A. DePaola, J.C. Bowers, J.A. Krantz, J.L. Nordstrom, C.N. Johnson, y D.J. Grimes. 2007. Variability of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in northern Gulf of Mexico water and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7589-7596 p.

## ANEXOS

## ANEXO I

## Diagrama Procesado de Ostiones



## ANEXO II

### **Extracción Genómica para Bacterias por Choque Térmico**

- a. A partir de medio enriquecidos( dilución 0.1, 0.01 y 0.001, con sus respectivas réplicas) se tomo 400  $\mu$ l.
- b. Se calentó la muestra a una temperatura de 90 °C por 5 minutos con una incubadora para tubos de 2 ml en seco, posteriormente sometió una temperatura de -80 °C durante 5 min (Repetir 5 veces).
- c. Posteriormente se centrifugo la muestra a 13 000 G por 20 min. hasta formar un pellet que no se desprenda.
- d. El sobrenadante, donde debe estar el ADN, es transferido a un tubo de centrifuga de 1.5 ml
- e. Al tubo se le agregó 40  $\mu$ l de Acetato de sodio ([3M] pH 5.2), y 1 ml de etanol grado molecular
- f. Se trasladó la muestra al ultracongelador y dejo a -80 °C por 1 hora
- g. Se centrifugó 20 min. a 13 000 G
- h. Se decantó y se le agrego 1 ml de alcohol al 70%.
- i. Se agitó suavemente hasta que se desprenda el pellet
- j. Se centrifugó por 25 min. 13 000 G.
- k. Se eliminó el excedente de alcohol y se dejo secar a 35° C
- l. El pellet se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua libre de RNAsas y DNAsas
- m. A esta suspensión se midió en un Nanodrop (General electric nanovue) la concentración de ADN y en caso de que fuera mayor de 170ng por  $\mu$ l, se hizo una dilución en agua libre de RNAsas hasta obtener la concentración menor o igual de 170 ng/ $\mu$ l.
- n. Se congelo a -20 °C hasta su análisis

## ANEXO III

