



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

TÍTULO DE TESIS DE MAESTRÍA

**“DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA, SEROTIPIFICACIÓN Y
EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE
Vibrio parahaemolyticus AISLADAS DE CAMARÓN Y OSTIÓN EN SINALOA”**

T E S I S

QUE PRESENTA

LBG. CAROLINA LIRA MORALES

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS

DR. HÉCTOR MANUEL FLORES VILLASEÑOR

DR. VICENTE ADRIÁN CANIZALEZ ROMÁN

COMITÉ TUTORAL

DRA. NIDIA MARIBEL LEÓN SICAIROS

DR. URIEL ALBERTO ANGULO ZAMUDIO

DR. JORGE ADALBERTO VELÁZQUEZ ROMÁN

DR. CÉSAR PAUL LEY QUIÑONEZ

Culiacán, Sinaloa, México noviembre del 2023



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología en Salud de la Facultad de Medicina, perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), bajo la dirección del Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor (profesor e investigador, SNI-II encargado del Laboratorio de Biotecnología en Salud de la Facultad de Medicina UAS) y Dr. Vicente Adrián Canizalez Román (profesor e investigador, SNI-III encargado del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina (UAS)). Como asesores de tesis, participaron la Dra. Nidia Maribel León Sicaños, el Dr. Uriel Alberto Angulo Zamudio y el Dr. Jorge Adalberto Velázquez Román. Para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, Carolina Lira Morales recibió una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT,) con CVU 1152269 y número de apoyo 799026.

AGRADECIMIENTOS

De primera instancia agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para sostener los estudios de maestría y a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa por abrirme las puertas para poder llevar a cabo un proyecto de investigación.

A los doctores Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor y Dr. Vicente Adrián Canizalez Román por recibirme en sus laboratorios, por compartirme sus conocimientos, sobre todo por la paciencia al brindarme su apoyo a lo largo de este tiempo en el presente trabajo. Agradezco a la comisión revisora conformada por la Dra. Nidia Maribel León Sicairos, Dr. Uriel Alberto Angulo Zamudio, Dr. Jorge Adalberto Velázquez Román y Dr. César Paul Ley Quiñonez, por su apoyo y contribución para la redacción de la tesis para el mejoramiento de ella y gracias por estar siempre atentos a las necesidades académicas correspondientes.

Igualmente agradezco a la Dra. Erika por sus palabras de aliento que fue de gran ayuda en todo momento. Agradezco a mis compañeras de maestría, Shaamira, Daniela, Yareli, María, por el apoyo incondicional una a la otra a lo largo de la maestría, por las alegrías, aprendizajes y experiencias inolvidables que compartimos. Agradezco infinitamente a Pedro, Karla y Esmeralda por ser mis compañeros de aventura y confianzas, por su apoyo en todo momento dentro y fuera del laboratorio, además de brindarme su grandiosa amistad. A mi compañero César, por la motivación y sostén en el laboratorio. Agradezco a Juan Carlos por ser el hombro en cual apoyarme y por brindarme lo mejor de sí. En fin, mencionarlos a todos sería injusto ya que podría cometer una omisión, pero les doy gracias a todas las personas que formaron parte en esta etapa de mi vida, sin todos ustedes este trabajo no habría podido culminarse de otra manera.

DEDICATORIA

A los principales protagonistas de mi vida por ser la motivación para concluir este trabajo, sobre todo a mi mamá, mi abuelita, mi tío y mi hermana por todo el esfuerzo para encaminarme por el buen camino, pues sin ellos no lo hubiera logrado, sin más este documento es dedicado a mi familia y a todas esas amistades que se han convertido en mi familia.

Gracias por todo el cariño y el apoyo incondicional.

- Carolina Lira Morales

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
I. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
A. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA.....	9
1. GASTROENTERITIS.....	10
B. VIBRIO COMO AGENTE CAUSAL	11
C. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13
1. GENERALIDADES.....	13
2. FISIOPATOLOGÍA.....	15
3. VIBRIOSIS	17
a. DIAGNÓSTICO	18
b. TRATAMIENTO	19
4. FACTORES DE VIRULENCIA.....	19
5. RESISTENCIA BACTERIANA	21
6. SEROTIPOS.....	23
7. EPIDEMIOLOGÍA	25

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	30
V.	HIPÓTESIS	32
VI.	OBJETIVOS.....	33
	A. OBJETIVO GENERAL	33
	B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
	A. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	34
	B. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	34
	C. RECOLECCIÓN DE MUESTRA.....	34
	D. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO.....	37
	E. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
	1. LISADO BACTERIANO.....	38
	2. DETERMINACIÓN DE GENES TOXIGÉNICOS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
	3. DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A CEPAS PANDÉMICAS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	39
	F. SEROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42
	G. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	43
VIII.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
IX.	RESULTADOS	46

A.	IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46
1.	DETERMINACIÓN DE GENES TOXIGÉNICOS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46
2.	DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A CEPAS PANDÉMICAS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46
B.	SEROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	49
C.	EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	55
X.	DISCUSIÓN.....	67
XI.	CONCLUSIONES.....	75
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	76
XIII.	ABREVIATURAS	92
XIV.	ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en los municipios del estado de Sinaloa entre 2015 a 2021...36

Figura 2. Distribución geográfica de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* no toxigénicas aisladas de camarón y ostión en el estado de Sinaloa.....62

Figura 3. Distribución geográfica de los serogrupos circulantes de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostión en el estado de Sinaloa.....64

Figura 4. Distribución geográfica de los serovares circulantes de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostión en el estado de Sinaloa.....66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Esquema antigénico para <i>V. parahaemolyticus</i>	24
Cuadro 2. Oligonucleótidos para la identificación de genes de factores de virulencia de cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41
Cuadro 3. Puntos de corte CLSI 2020 para los antibióticos utilizados.....	44
Cuadro 4. Clasificación de las cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> aisladas entre el 2015 a 2021 en el estado de Sinaloa de acuerdo con sus genes de virulencia.....	48
Cuadro 5. Proporción y distribución geográfica de los serogrupos obtenidas de 136 aislamientos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> de muestras ambientales (camarón y ostión) en el periodo del 2015 y 2021.	51
Cuadro 6. Serogrupos y serovar de cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> aislados de muestras ambientales (camarón y ostión) en el periodo de 2015 a 2021.....	52

Cuadro 7. Proporción de resistencia antimicrobiana de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el estado de Sinaloa en el periodo de 2015 a 2021.....56

Cuadro 8. Perfil de resistencia a antibióticos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el estado de Sinaloa entre 2015 y 2021. 58

Cuadro 9. Número y categoría de resistencia a antibióticos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el estado de Sinaloa entre 2015 y 2021..... 60

I. RESUMEN

Vibrio parahaemolyticus ha conservado una importancia a nivel mundial ante los sistemas de salud pública debido a sus repercusiones negativas en el ser humano desde 1950 debido a los brotes de gastroenteritis asociados al consumo de alimentos contaminados con esta bacteria. En el estado de Sinaloa como en otros estados costeros de México los pescados y mariscos forman parte fundamental de su gastronomía siendo una de las principales fuentes de alimentación, por lo cual es de vital importancia el garantizar la inocuidad de dichos alimentos para evitar que se generen casos de gastroenteritis provocados por diferentes agentes bacterianos como *Vibrio parahaemolyticus*. En México en el año 2004 se presentó el primer brote de gastroenteritis por el consumo de alimentos contaminados con *Vibrio parahaemolyticus* pertenecientes a la clona pandémica O3:K6 que posee los clásicos factores de virulencia en Sinaloa. Desde entonces se han presentado brotes esporádicos en México y en el estado de Sinaloa hasta la fecha. Por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar los factores de virulencia, llevar a cabo la serotipificación y evaluar la resistencia antimicrobiana de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión en el estado de Sinaloa. Para la identificación de los clásicos factores de virulencia se utilizó métodos moleculares como PCR punto final, así como para la serotipificación se llevó a cabo mediante un kit de antisueros para *Vibrio parahaemolyticus* y finalmente la resistencia antimicrobiana se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer. Los resultados obtenidos en este estudio determinan que todas las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* son no toxigénicas, sin embargo, en dos cepas de dicho patógeno se logró detectar la presencia de genes de interés pertenecientes a las clonas pandémicas, una con los genes *toxRS/New* y *orf-8*, y la otra solo con el gen *orf-8*, posterior a la identificación de los genes de virulencia, se

realizó la serotipificación de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* se encontró 12 diferentes grupos O y 49 diferentes tipos K con un total de 78 diferentes serovares en las 136 cepas analizadas. El serogrupo más prevalente de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) fue el serogrupo O3 en el cual se identificó el 15.4% (21/136) de las cepas analizadas seguido por el serogrupo O4 en un 14.7% (20/136) y las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que no fueron reconocidas por antisueros O (OUT) con un 16.9% (23/136) del total de las cepas analizadas. Al analizar los serovares de mayor incidencia se encontró que el serovar OUT:KUT fue el más prevalente con un 14% (19/146) de las cepas analizadas, seguido por los serovares O2:KUT y O3:KUT con un 3.7% (5/136) de ambos serovares. Por otra parte, es importante mencionar que en el presente trabajo se logró detectar la presencia de nuevos serotipos en las costas del pacífico que no habían sido reportados previamente, en total se identificó 28 serovares respecto otros estudios de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de muestras ambientales. Finalmente al analizar los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Vibrio parahaemolyticus* se encontró con un alto porcentaje de cepas resistentes a los betalactámicos como ampicilina en un 96% (131/136) de las cepas analizadas, seguido de las cepas resistentes a de quinolonas y fluoroquinolonas como el ciprofloxacino en un 73% (33/136), así mismo también el 47% (64/136) de las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas como la cefotaxima, sin embargo es importante resaltar que todas las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* evaluadas en este estudio fueron sensibles a los antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol y tetraciclina. Por último, se encontró que un 44.11% (60/136) de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron clasificadas como multidrogorresistentes ya que son resistentes a tres o más antibióticos de diferentes familias diseminadas en las costas de Sinaloa, sin embargo, en otras investigaciones científicas realizadas por Velazquez-Roman y colaboradores en el año 2012 y de Jesús Hernández-Díaz y colaboradores en el año 2015,

reportaron solamente tres cepas de *Vibrio parahaemolyticus* multidrogorresistentes de manera conjunta, en un periodo de diez años del año 2004 a 2013 respecto a muestras ambientales, esto conlleva a observar que hubo un aumento de la multidrogorresistencia antimicrobiana del año 2015 al 2021 del presente estudio, con base a lo descrito anteriormente, cabe destacar que aunado a la aparición de nuevos serotipos circulantes y cepas multidrogorresistentes, por lo que es de enorme importancia continuar con la vigilancia epidemiológica para la detección oportuna de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en alimentos de consumo humano, de esta manera se podrá generar estrategias para la prevención y control de este patógeno, a su vez evitando brotes esporádicos de gastroenteritis y disminuir el uso indiscriminado de los antibióticos, para así salvaguardar la salud de la población Sinaloense.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus has retained a worldwide importance in public health systems due to its negative impact on humans since 1950 due to outbreaks of gastroenteritis associated with the consumption of food contaminated with this bacterium. In the state of Sinaloa, as in other coastal states of Mexico, fish and seafood are a fundamental part of its gastronomy being one of the main food sources, so it is of vital importance to ensure the safety of these foods to prevent cases of gastroenteritis caused by different bacterial agents such as *Vibrio parahaemolyticus*. In Mexico in 2004, the first outbreak of gastroenteritis due to the consumption of food contaminated with *Vibrio parahaemolyticus* belonging to the pandemic clone O3:K6, which has the classic virulence factors in Sinaloa. Since then, sporadic outbreaks have in Mexico and in the state of Sinaloa to date. Therefore, the objective of the present study was to determine the virulence factors, carry out serotyping and evaluate the antimicrobial resistance of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp and oysters in the state of Sinaloa. For the identification of classical virulence factors, molecular methods such as end-point PCR were used, was carried out using serotyping was carried out by means of an antiserum kit for *Vibrio parahaemolyticus* antisera kit and finally antimicrobial resistance was evaluated using the Kirby-Bauer method. The results obtained in this study determine that all strains of *Vibrio parahaemolyticus* are non-toxigenic; however, in two strains of this pathogen it was possible to detect the presence of genes of interest belonging to pandemic clones, one with the *toxRS/New* and *orf-8* genes, and the other with only the *orf-8* gene, after the identification of the virulence genes, serotyping of the *Vibrio parahaemolyticus* strains was carried out and 12 different O groups and 49 different K types were found, with a total of 78 different serovars in the 136

strains analyzed. The most prevalent serogroup of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from environmental samples (shrimp and oyster) was serogroup O3, which was identified in 15.4% (21/136) of the strains analyzed, followed by serogroup O4 in 14.7% (20/136) and *Vibrio parahaemolyticus* strains that were not recognized by antisera O (OUT) with 16.9% (23/136) of the total number of strains analyzed. When analyzing the serovars with the highest incidence, it was found that serovar OUT:KUT was the most prevalent with 14% (19/146) of the strains analyzed, followed by serovars O2:KUT and O3:KUT with 3.7% (5/136) of both serovars. On the other hand, it is important to mention that in the present work we were able to detect the presence of new serotypes in the Pacific coast that had not been previously reported; a total of 28 serovars were identified with respect to other studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental samples. Finally, when analyzing the antimicrobial resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus*, a high percentage of strains resistant to beta-lactams such as ampicillin was found in 96% (131/136) of the strains analyzed, followed by strains resistant to quinolones and fluoroquinolones such as ciprofloxacin in 73% (33/136), likewise, 47% (64/136) of the strains were resistant to cephalosporins such as cefotaxime; however, it is important to highlight that all the strains of *Vibrio parahaemolyticus* evaluated in this study were sensitive to the antibiotics nalidixic acid, chloramphenicol and tetracycline. Finally, it was found that 44.11% (60/136) of *Vibrio parahaemolyticus* strains were classified as multidrug-resistant because they are resistant to three or more antibiotics from different families disseminated in the coasts of Sinaloa, however, in other scientific research conducted by Velazquez-Roman and collaborators in 2012 and Jesús Hernández Díaz and collaborators in 2015, reported only three multidrug-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* jointly, in a ten-year period from 2004 to 2013 with respect to environmental samples, this leads to observe that there were only three strains of *Vibrio parahaemolyticus* multidrug-resistant in a ten-year period from 2004 to 2013.

This leads to the observation that there was a significant increase in multidrug resistant antimicrobial multidrug resistance from 2015 to 2021 of this study, based on what was described above, it should be noted that together with the emergence of new circulating serotypes and multidrug-resistant strains and multidrug-resistant strains, so it is extremely important to continue epidemiological surveillance for It is therefore of great importance to continue epidemiological surveillance for the timely detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains in food for human consumption, this will make it possible to generate strategies for the prevention and control of this pathogen, and in turn this will make it possible to generate strategies for the prevention and control of this pathogen, thus avoiding sporadic outbreaks of gastroenteritis and reducing the indiscriminate use of *Vibrio parahaemolyticus* in food. the indiscriminate use of antibiotics to safeguard the health of the Sinaloa population.

I. INTRODUCCIÓN

La inocuidad alimentaria es imprescindible en la vida diaria para mantener los alimentos aptos para el consumo humano esto es gracias a una serie de condiciones, regulaciones y medidas necesarias desde la preparación de estos hasta el almacenamiento y distribución, permitiendo certificar la seguridad de los alimentos, en el momento de que esto se lleva a cabo de manera inapropiada, los alimentos pueden adquirir contaminación por agentes externos como los metales pesados, así como también pueden ser contaminados por agentes biológicos como virus, parásitos, hongos, bacterias, afectando la salud del consumidor desde un malestar gastrointestinal hasta la muerte. En México, la intoxicación alimentaria alcanza los 500 mil casos al año (SENASICA, 2022) por lo que es un problema grave de salud, debido al consumo de alimentos o bebidas contaminadas por diversos patógenos, por consiguiente, en el año 2004 en el estado de Sinaloa hubo un gran brote de gastroenteritis que afectó alrededor de 1200 personas por el consumo de mariscos mal cocinados o crudos, estos mariscos estaban contaminados por el patógeno *Vibrio parahaemolyticus* perteneciente al grupo pandémico O3:K6 proveniente de Calcuta, India que logró diseminarse a varios continentes como Asia, África, Europa y América hasta llegar a la población sinaloense (Velazquez-Roman, León-Sicairos, de Jesus Hernández-Díaz, & Canizalez-Roman, 2014; Velazquez-Roman, León-Sicairos, Flores-Villaseñor, Villafaña-Rauda, & Canizalez-Roman, 2012), este patógeno tiene como manifestaciones clínicas una diarrea aguda líquida o una diarrea sanguinolenta, que es mediada por enterotoxinas ocasionando una invasión al epitelio intestinal mediante un mecanismo inflamatorio, esto es debido a que este microorganismo posee los clásicos factores de virulencia involucrados en el mecanismo de patogenicidad tales como TDH y TRH que tienen la capacidad de causar hemólisis en células eucarióticas (Raghunath, 2015) además posee otros genes característicos como los del grupo pandémico *toxRS/New* y *orf-8* que desempeñan un

papel importante en la infección por esta bacteria en el huésped (Nasu et al., 2000), sin embargo, los factores de virulencia junto a sus serotipos circulantes no es lo único que puede acarrear un daño a la salud del consumidor, si no que el aumento de la resistencia antimicrobiana en los últimos años, conlleva a la formación de cepas multidrogorresistentes, esta problemática implica que no existirán otras alternativas como tratamiento a casos más graves de gastroenteritis que pueden convertirse en una sepsis, las bacterias resistentes a múltiples antibióticos en mariscos y ambientes acuáticos es un problema de gran interés en el cultivo de peces, mariscos y en la salud humana (Parthasarathy et al., 2021), cabe mencionar que se ha demostrado en varios estudios que *Vibrio parahaemolyticus* es resistente a la ampicilina (de Jesús Hernández-Díaz et al., 2015; Sony et al., 2021; C. W. Tan et al., 2020; von Wintersdorff et al., 2016), así como también se ha reportado resistencia a cefalosporinas (cefotaxima) en *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarones (Elmahdi, DaSilva, & Parveen, 2016), es importante mencionar que es preferible que el antibiótico a prescribir sea basado en los resultados de los antibiogramas obtenidas de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que se encuentran en la misma distribución geográfica (Dutta, Kaushik, Kumar, & Bag, 2021). Por lo tanto, en este trabajo se determinó la presencia de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión del estado de Sinaloa, mediante la identificación de los principales genes relacionados a virulencia como *tdh* y *trh*, así como también la detección de genes pertenecientes al grupo pandémico *toxRs/new* y *orf-8* que se encuentran distribuidos en diversos serotipos circulantes con distintos perfiles de resistencia antimicrobiana que se encuentran diseminados a lo largo del estado, con lo descrito anteriormente esto permitirá un mayor entendimiento sobre el alcance de este agente causante de brotes, sin embargo, mediante su distribución geográfica se tendrá un control epidemiológico evitando posibles brotes en la población sinaloense.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

Las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud mundial que ha tenido una gran relevancia en los últimos años debido al mal almacenamiento u operación de estos, durante los últimos años los países han desarrollado diferentes estudios para determinar que patógenos son los causantes de las enfermedades en relación con los alimentos (Y. J. Li et al., 2022). La principal causa de infección es por el consumo de alimentos contaminados. Los alimentos provenientes del mar conforman una parte importante en la alimentación de los seres humanos además de representar una parte primordial en el mercado económico, por lo cual la regulación se ha vuelto más estricta además del reforzamiento en la investigación sobre enfermedades causadas por el consumo de estos mismos. Existen 3 especies patógenas que son principales causantes del aumento de las infecciones transmitidas por mariscos en todo el mundo; *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. (Bonnin-Jusserand et al., 2019). *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria marina, es causante de infecciones gastrointestinales además de otras complicaciones de salud, algunos de los síntomas por intoxicación de esta bacteria son; deshidratación, escalofríos y fiebre, puede llegar a ser letal en pacientes inmunodeprimidos de no ser atendida a tiempo, en los últimos años las infecciones provocadas por esta bacteria han aumentado debido a su amplia existencia en ambientes marinos, además del aumento de casos clínicos en regiones donde se creía que las condiciones eran inadecuadas para el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, por lo cual se propone que es una bacteria en constante cambio y que se está convirtiendo en un patógeno más grave (J. Liu et al., 2021). Es importante considerar la

gastroenteritis y otras infecciones por patógenos específicos para evaluar la carga de enfermedades causadas por los alimentos (Y. J. Li et al., 2022).

1. GASTROENTERITIS

Una de las enfermedades infecciosas más común a lo que se enfrenta el sector salud es la gastroenteritis. La gastroenteritis es una inflamación de uno de los órganos importantes como estómago, intestino delgado y grueso, regularmente es causada por un microorganismo, es un padecimiento que va de la mano con los siguientes síntomas: náuseas con o sin vómitos, diarrea acuosa o sanguinolenta, dolor de cabeza, calambres abdominales y en algunos casos se puede tener la presencia de fiebre (Getto, Zeserson, & Breyer, 2011; H. Zhang, Morrison, & Tang, 2015) cabe destacar que la causa no es exclusivamente biológica también se han encontrado otras cuestiones como la ingesta de fármacos o toxinas químicas (Takedani et al., 2021). Las infecciones gastrointestinales pueden ser causadas por muchos microorganismos incluidos algunos virus como rotavirus, norovirus, así como también por bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas*, *Listeria monocytogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* a nivel mundial este patógeno se ha encontrado involucrado en brotes de gastroenteritis bacteriana (Graves, 2013; Humphries & Linscott, 2015; H. Zhang et al., 2015). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que anualmente hay más de 350 millones de casos de gastroenteritis en los Estados Unidos, los cuales de estos solo 48 millones son causados por bacterias obtenidas por vía de transmisión alimenticio (Graves, 2013). Las bacterias causan gastroenteritis por varios mecanismos, una de ellas es por la acción de toxinas expresadas por enteropatógenos produciendo una secreción excesiva de líquidos en el intestino delgado, así

como también el daño inflamatorio de la mucosa ileal lo que conlleva a la producción de sangre, y por último no menos importante es la invasión de la bacteria mediante el tejido de la mucosa hasta el sistema reticuloendotelial (Humphries & Linscott, 2015). La mayoría de los pacientes logran recuperarse, gracias a la identificación del patógeno de manera temprana mediante el diagnóstico tradicional de un cultivo bacteriano de heces o detección molecular, por lo que también se toma en cuenta el historial del contacto directo acerca de los alimentos o agua contaminados a los que se estuvo expuesto, todo esto permite la atención rápida a los pacientes para controlar los síntomas, además de proporcionar información precisa ante la administración de antibióticos, así como también prevenir la propagación de los gérmenes entre huéspedes (Balsalobre-Arenas & Alarcón-Cavero, 2017; Vila, Alvarez-Martínez, Buesa, & Castillo, 2009).

B. VIBRIO COMO AGENTE CAUSAL

La familia *Vibrionaceae* pertenece a *Gamma-Proteobacteria*, está constituido ampliamente por bacterias que se encuentra en los ecosistemas acuáticos, a pesar de estar presente en el agua, sedimentos y organismos acuáticos, los microorganismos pertenecientes a esta familia requieren adaptarse a condiciones adecuadas para sobrevivir, esto incluye a huésped mamífero animales y/o humanos provocando que en algunos casos dependiendo de la especie desencadena sus mecanismos de patogenicidad dando como resultado múltiples enfermedades, ya sea oftalmológicas, dermatológicas y digestivas como la gastroenteritis (Hammerl, Ritchie, Leoni, Banerjee, & Strauch, 2022). Los *Vibrionaceae* son bacterias Gram-negativos anaerobios facultativos, bacilos, quimioorganotróficos, poseen en su interior oxidasa, además de tener uno o más flagelos polares lo que le permiten movilidad, así como también son mesófilos, muchos

de estos son halófilas con requerimientos absolutos de NaCl, mientras que otros son capaces de sobrevivir en concentraciones altas de sal (Gregory & Boyd, 2021; Thompson, Iida, & Swings, 2004), a pesar de sus factores de virulencia para causar enfermedades graves tanto en humanos y animales, estos son los consumidores más importantes de quitina que toma el segundo lugar en ser el polímero más abundante seguido de la celulosa en los océanos (Souza, Almeida, Colwell, & Rivera, 2011). El tamaño del genoma entre las *Vibrionaceae* se encuentra alrededor de 4,0 a 6,0 megabases aproximadamente con un total de 4735 genes que se encuentra dividido en dos cromosomas circulares de tamaño desigual, donde los genes que se encuentran involucrados en procesos relacionados como la replicación, transcripción y traducción están presentes en un cromosoma y genes que se distinguen entre cepas bacterianas en otro cromosoma comúnmente conocido como plásmido (Gregory & Boyd, 2021). En la actualidad, existen más de 190 especies en la familia *Vibrionaceae*, la gran diversidad es en parte por cambios adaptativos, así como la adquisición de material genético por otras especies, por lo que estos son clasificados en 9 géneros (Jiang et al., 2021), los géneros mejor conocidos del grupo son *Aliivibrio*, *Photobacterium* y *Vibrio* (Brock, Madigan, Martinko, & Parker, 2003; Sawabe et al., 2013). Cabe destacar que el género *Vibrio* tiene más de 130 especies (Valdez et al., 2022), siendo este el más estudiado donde al menos 12 son reconocidas como agentes causantes de enfermedades infecciosas tanto endémicas como pandémicas en humanos (Thode, Rojek, Kozlowski, Ahmad, & Haugen, 2018), otras especies también patógenas como *Vibrio vulnificus* es oportunista en personas con enfermedades como diabetes mellitus, cirrosis, hepatitis y neoplasias malignas, aumentando las probabilidades de desarrollar septicemia, de igual manera esta bacteria se encuentra en grandes cantidades en moluscos bivalvos como las ostras y camarones causando gastroenteritis, además al tener una exposición de herida al agua del mar o ante la manipulación de mariscos puede provocar infecciones graves en la piel (Baker-

Austin et al., 2018), dentro del género también se encuentra *Vibrio alginolyticus*, que puede causar enfermedades otorrinolaringológicas y dermatológicas al estar expuesto al agua contaminada además que en animales acuáticos como los peces se observan lesiones cutáneas, bazo inflado, causando grandes pérdidas económicas para aquellos dependientes del negocio acuícola (Yin et al., 2022), por último la especie *Vibrio parahaemolyticus*, es patogénica en especies marítimas como los moluscos bivalvos como *Caridea* (camarón) y *Crassostrea* (ostiones), lo que es una amenaza potencial para la población consumidora de estos alimentos, causando estragos financieros en el ámbito pesquero (Chien, Chang, & Chien, 2021).

C. *Vibrio parahaemolyticus*

1. GENERALIDADES

Vibrio parahaemolyticus, origen latín *para*, junto a; *haema*, sangre; *lyticus*, disolvente (que disuelve la sangre) (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2017) es un patógeno oportunista en humanos, son bacterias móviles en forma de bacilos conformado por uno o más flagelos polares, halófilas es decir que crecen en aguas con cierta cantidad de salinidad, gram-negativas, anaerobias facultativas, halo-dependientes y no formadoras de esporas, que se encuentra en aguas marinas, dulces, estuarinos, costeras templadas y tropicales a nivel mundial (Valdez et al., 2022), esta bacteria es la principal causa de gastroenteritis transmitida por mariscos en todo el mundo, ya estos se adhieren al exoesqueleto quitinoso y al intestino de los crustáceos, desde cangrejos hasta copépodos plantónicos, lo que conlleva a ser un vector de *V. parahaemolyticus* en humanos (Elmahdi et al., 2016), recientemente este patógeno ha sido el causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones (Baker-Austin,

Stockley, Rangdale, & Martinez-Urtaza, 2010; Kyle D Brumfield et al., 2021; Chimalapati et al., 2018), sin embargo, no todas las cepas de *V. parahaemolyticus* son patógenas y capaces de causar enfermedades en especies marinas o en el hombre, cabe destacar que además de encontrarse libremente en el ambiente de agua salada, se puede detectar concentraciones más altas en mejillones ya que estos filtran solamente el agua concentrando las bacterias en su interior, además de la gastroenteritis puede causar otras enfermedades como infecciones de heridas, y en casos más graves puede ocurrir una septicemia. *Vibrio parahaemolyticus* requiere de condiciones adecuadas para su crecimiento y supervivencia, lo cual consiste en una cantidad absoluta de NaCl de 1% al 9% , teniendo como crecimiento óptimo al 3% (Whitaker et al., 2010), temperaturas entre 5°C y 43°C (Kalburge, Whitaker, & Boyd, 2014), su presencia en la época de invierno es escasa por lo tanto es aislada de muestras de sedimentos, por otro lado en verano los vibriones se encuentran en altas concentraciones en el agua de mar. La adaptación alta en sal en organismos como *Vibrio parahaemolyticus* dispara significativamente la supervivencia bajo un estrés ambiental como el estar en un medio ácido, condiciones similares a las de un huésped mamífero con el ácido clorhídrico que se encuentra dentro del estómago. Otra característica muy particular de *Vibrio parahaemolyticus*, es que no contiene la enzima necesaria para la fermentación de sacarosa ni de lactosa, es oxidasa positiva, ureasa positiva, por lo que le permite crecer en medios básicos con un pH de 9 para poder desarrollarse (Kalburge et al., 2014).

2. FISIOPATOLOGÍA

Vibrio parahaemolyticus causa diarrea en humanos y varias infecciones tanto en peces, camarones y ostiones. A pesar del aumento de casos de la gastroenteritis inducida por *V. parahaemolyticus* no hay una información vasta de como causa la enfermedad en el intestino, las cepas poseen varios factores de virulencia como la formación de biopelículas, sistemas de secreción de tipo III y VI, adhesinas, proteasas extracelulares, motilidad y actividad de fimbrias (Federici et al., 2018; Letchumanan, Chan, & Lee, 2014). De primera instancia el proceso de invasión se lleva a cabo de manera que *Vibrio parahaemolyticus* penetra en las células epiteliales intestinales mediante la unión inicial al huésped entre célula-célula que es llevada a cabo por la molécula de adhesión multivalente 7 (MAM7) esta contiene 7 dominios de entrada para poder unirse a la proteína de fibronectina y ácido fosfatídico de la membrana eucariótica, de macrófagos, fibroblastos y células epiteliales (M. Liu et al., 2018), por otro lado también se encuentra presente la adhesina VpadF es importante para unirse al colágeno tipo I que es una glicoproteína formadora de fibrillas, que se encuentra de manera abundante en el intestino delgado (Ming Liu & Chen, 2015) en conjunto con la bilis un componente del tracto gastrointestinal (Lingling Zhang et al., 2012) esta bacteria puede tomar dicha sustancia alcalina como señal de que ha llegado al intestino del huésped, para así desencadenar sus mecanismos de patogenicidad, liberando toxinas que inflaman el intestino, lo que da como resultado un cuadro clínico de gastroenteritis generando una diarrea acuosa (P. Li et al., 2016). Este patógeno requiere de la formación de biopelículas dentro de su huésped para la colonización y supervivencia (Yildiz & Visick, 2009). Las biopelículas son un acumulo de bacterias adheridas a una superficie celular, encapsuladas en una matriz extracelular, compuesta principalmente por proteínas, material genético como el ADN y polisacáridos (Watnick & Kolter, 2000), estos

mecanismos de patogenicidad fueron esclarecidos mediante la secuenciación del genoma completo de *V. parahaemolyticus* que fue en el año 2003 específicamente de la cepa RIMD2210633, donde se determinó la presencia de dos sistemas de secreción de tipo III (T3SS; T3SS1 y T3SS2) (Makino et al., 2003), el T3SS1 es codificado por el gen *vscF*. Este sistema de secreción en forma de proteína de “aguja” ejerce la función de liberar efectores en el citoplasma eucariota del huésped actuando como translocadores (Lian et al., 2021), este mismo se encuentra en todas las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* contribuyendo a la formación de biopelículas, motilidad y citotoxicidad, esta es regulada por una cascada de sistemas reguladores, proteínas denominadas exoenzima S como ExxA, ExxC, ExxD y ExxE (Kodama et al., 2010), mientras que el otro sistema de secreción T3SS2 es encargado de la evasión del sistema inmune mediante una regulación negativa de la respuesta inflamatoria celular de estas bacterias patógenas en el huésped (Hiyoshi, Kodama, Iida, & Honda, 2010), cuya expresión esta mediada por reguladores transcripcionales denominados VtrA, VtrB, VtrC, el regulador transcripcional VtrA actúa como una proteína transmembranal aumentando la expresión del gen *vtrB* que codifica la proteína VtrB y esta a su vez promueve la transcripción dirigida hacia los genes de T3SS2, esta encuentra presente en cepas positivas para el efecto de Kanagawa que consiste en una lisis a los eritrocitos, los genes que codifican VtrA y VtrC actúan como un complejo proteico en la superficie de la membrana de la bacteria simulando la estructura de un “barril” uniéndose a las sales biliares para hacer que el patógeno promueva la producción de toxinas (P. Li et al., 2016). Otro sistema de secreción es el de tipo VI (T6SS) tanto como T6SS1 y T6SS2, este último realiza el primer paso de la infección bacteriana mientras que T3SS2 exporta proteínas efectoras al citoplasma de la célula eucariota del huésped (Ben-Yaakov & Salomon, 2019).

3. VIBRIOSIS

Vibrio parahaemolyticus es el responsable de la mayoría de los casos con vibriosis es decir gastroenteritis, este padecimiento se adquiere a través de mariscos en condiciones insalubres o por la exposición al agua de mar (Baker-Austin et al., 2018), después de la ingestión para el desarrollo de la enfermedad se requiere de un periodo de incubación que suele durar de 5 a 72 horas (media, 24 horas)(Murray et al., 2017), teniendo manifestaciones clínicas una diarrea explosiva y acuosa con calambres abdominales, náuseas, vómitos, fiebre, dolores de cabeza y escalofríos, la enfermedad dura un promedio de tres días causando múltiples efectos devastadores en pacientes inmunosuprimidos muy jóvenes o ancianos, aunque no es exclusivo en esos individuos cabe recalcar que la vibriosis puede desarrollarse a cualquier edad, además de gastroenteritis puede causar en algunas ocasiones septicemia y necrosis rápida del tejido subcutáneo, en pacientes con diabetes, enfermedades renales, hepáticas, neoplasias malignas y SIDA, se requiere la ingestión de $2 \times 10^5 - 3 \times 10^7$ de células bacterianas para causar enfermedad en los individuos consumidores de dichos alimentos, aunque estas infecciones pueden producir rangos de enfermedades agudas, crónicas e incluso asintomáticas (Kalburge et al., 2014).

a. DIAGNÓSTICO

La principal razón de las enfermedades transmitidas por los alimentos, son el descuido de control de inocuidad alimentaria de los productos del mar en este caso por *Vibrio parahaemolyticus*, por ende, las herramientas adecuadas para su detección son clave para el control de los brotes.

Para la detección bacteriológica de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno causante de gastroenteritis, se requiere de prácticas tradicionales como una siembra de heces fecales de pacientes sospechosos con vibriosis si un paciente tiene diarrea acuosa o recientemente ha consumido mariscos crudos o pocos cocinados, particularmente camarón y ostiones, seleccionando un medio selectivo para el cultivo como el agar tiosulfato citrato sales biliares y sacarosa (TCBS) que es un medio estándar para aislar *V. parahaemolyticus* como colonias verdes sacarosa negativa, esta bacteria también puede identificarse mediante un medio de cultivo agar sangre (CHROMagar) por la observación del efecto de Kanagawa es decir la hemólisis de los eritrocitos (C. Kaysner & DePaola, 1998), además se realizan pruebas bioquímicas y serológicas como la positividad para la ureasa, siguiendo los manuales de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).

Los resultados positivos se pueden confirmar utilizando métodos de detección molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específico para *V. parahaemolyticus* con fines de identificación, detectando el gen *tdh* determinante de virulencia, el gen *trh*, el gen de hemolisina termolábil (*tlh*), el gen *tox R* y *orf-8* (Federici et al., 2018).

b. TRATAMIENTO

Para aliviar las manifestaciones clínicas como la diarrea acuosa causada por *Vibrio parahaemolyticus* se requiere de la rehidratación de líquidos por vía intravenosa y corrección de anomalías electrolíticas, en casos más graves como septicemia y heridas superficiales por este patógeno, se trata con antimicrobianos, como las cefalosporinas de tercera generación, doxiciclina y minociclina (Malcolm et al., 2018).

4. FACTORES DE VIRULENCIA

Las cepas de *Vibrio* spp. se someten a la transferencia horizontal de genes (HGT), donde el material genético se transfiere entre cepas e incluso especies. *Vibrio parahaemolyticus* posee dos genes que codifican toxinas estables al calor, como el gen de *tdh* para la expresión genética de Hemolisina Directa Termoestable (TDH) y el gen *trh* para codificar la Hemolisina Relacionada con la TDH (TRH) que causan vibriosis (L. Zhang & Orth, 2013) la diferencia entre estos radica en que la TDH es una toxina proteica formadora de poros de 165 residuos de aminoácidos con un único enlace disulfuro intramolecular cerca del extremo carboxilo (Tsunasawa et al., 1987), posee una fuerte actividad hemolítica, ya que esta se une a la membrana del eritrocito y forma poros alrededor de 2 nm, causando una lisis osmótica coloidal, este poro en particular permite la salida de iones cloruro que a su vez son activados por el calcio y agua atravesando la membrana celular, este flujo de iones alterado da como resultado una diarrea acuosa provocada por la infección (Daizo Hamada et al., 2007), una vez que esa toxina es purificada es estable a temperaturas como 100°C por 10 minutos (Shimohata & Takahashi,

2010). Cabe destacar que esta toxina contribuye a múltiples actividades biológicas en el huésped como cardiotoxicidad, citotoxicidad, y enterotoxicidad, así como también los sistemas de secreción T3SS1 contribuye principalmente al mecanismo de citotoxicidad, mientras que T3SS2 con la enterotoxicidad (D. Hamada et al., 2007; Hiyoshi et al., 2010). Se conoce que las concentraciones altas de NaCl, los ácidos biliares y los aminoácidos pueden promover la producción de TDH (Osawa, Arakawa, Okitsu, Yamai, & Watanabe, 2002). Por otro lado, la toxina TRH posee una actividad similar de hemólisis a TDH, solo que esta activa los canales de cloro, provocando una entrada de iones alterada, esta proteína es termolábil a temperaturas de 60°C por un lapso de 10 minutos (Raghunath, 2015). Una hemolisina adicional como la Hemolisina Termolábil (TLH), que codifica la fosfolipasa A2/lisofosfolipasa, no causa hemólisis en medios de agar Wagatsuma, que se encuentra en la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* usualmente es utilizado como marcador taxonómico para la identificación del agente causal (X. H. Zhang & Austin, 2005) pero además de esta existe otra secuencia genética que también es considerado como marcador taxonómico el R72H (Robert-Pillot, Guenole, & Fournier, 2002). Otros genes que codifican proteínas que participan en la virulencia de este patógeno, son el gen *orf-8* y el operón *toxRS* de secuencia única (*toxRS/New*), que son asociados a cepas pandémicas. El gen *orf-8* proveniente del fago f237 de *Vibrio parahaemolyticus* comparte homología con el fago filamentoso CTX de *Vibrio cholerae*, que contiene el marco de lectura abierto 8 (ORF-8), que este participa en el aumento de la virulencia de cepas O3:K6, mediante la expresión de una proteína de adherencia potenciando su unión a las células intestinales del huésped o mediante la adherencia a exosqueletos de organismos marinos (Nasu et al., 2000). El operón *toxRS/New* codifica proteínas transmembrana involucradas en la regulación de genes como los factores de virulencia (Matsumoto et al., 2000), cabe destacar que un aislado con la presencia de *tdh*, *toxRS/new* y/o *orf-8* puede considerarse una cepa pandémica,

mientras que una cepa patogénica posee *tdh* y/o *trh* y las cepas no patogénicas no contienen estos factores de virulencia (Okura et al., 2003). *Vibrio parahaemolyticus* posee dos tipos de flagelos que están asociados a la patogenicidad en el intestino, un flagelo polar formado por seis proteínas de flagelina envainado, que lo utiliza para motilidad, lo cual obtiene la energía requerida para la rotación del flagelo, mediante una fuerza motriz de sodio proporcionado por medios salinos, desplazándose de un extremo a otro con velocidades de hasta 60 $\mu\text{m/s}$, caso contrario en los medios sólidos disminuye esa velocidad de movimiento promoviendo la formación de un tipo de célula enjambre, induciendo la expresión de flagelos peritricos sin vaina hechos de una sola proteína flagelina, además de funcionar con la fuerza motriz del protón (McCarter, 1999). Estos mecanismos de virulencia influyen gran parte en la resistencia bacteriana para la supervivencia dentro del huésped humano al momento de la ingesta de antibióticos.

5. RESISTENCIA BACTERIANA

El perfil de resistencia bacteriana se determina comúnmente mediante un ensayo fenotípico como la difusión en disco de Kirby-Bauer, este método consiste en diferentes tipos de disco de antimicrobianos colocados en una placa de agar bacteriano, donde su interpretación está implicado en niveles como resistente, intermedio y sensible dependiendo del halo de inhibición, el mal uso de antibióticos profilácticos en la acuicultura para prevenir infecciones bacterianas y la propagación de dicho patógeno, promueve el efecto contrario al deseado (Chia Wanq Tan et al., 2020).

Antes del año del 2006 específicamente en el mes de mayo no existía ningún método estandarizado de prueba de susceptibilidad a los antibióticos para *Vibrio* spp. que no fuera el patógeno asociado al cólera humano, hasta esa fecha se publicó el documento CLSI donde se encuentra la información correspondiente de enterobacterias para *Vibrio* spp. para la selección de fármacos adecuados a esas bacterias (Jorgensen & Hindler, 2007). Los aislamientos de *V. parahaemolyticus* se examinan fenotípicamente para identificar la presencia de genes de resistencia a los antibióticos utilizando antimicrobianos distintos como la tetraciclina, cloranfenicol, las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina, amoxicilina, eritromicina, ampicilina, ácido nalidíxico (Wayne, 2009) así como también los inhibidores de la vía del folato (trimetoprima-sulfametoxazol), las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima) que se encuentran entre los antibióticos recomendados por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el tratamiento de *Vibrio* spp. través del método de difusión en disco Kirby-Bauer (Han, Walker, Janes, Prinyawiwatkul, & Ge, 2007).

Comúnmente *Vibrio* spp. se considera susceptible a la mayoría de todos los antibióticos disponibles para el tratamiento, sin embargo, este microorganismo es altamente resistente ante el fármaco antimicrobiano de ampicilina (AMP) (Chia Wanq Tan et al., 2020). Se ha recomendado la tetraciclina como antibiótico principal para el tratamiento de infección por *Vibrio*, si esto no es suficiente se utiliza otro tratamiento alternativo como la combinación de cefalosporinas de espectro expandido como ceftazidima y doxiciclina o una fluoroquinolona sola, para niños se prescribe el trimetoprim-sulfametoxazol más un aminoglucósido en quienes los antibióticos como doxiciclina y fluoroquinolonas están restringidos (Han et al., 2007; Manjusha & Sarita, 2011).

6. SEROTIPOS

La serotipificación es adecuada para los análisis epidemiológicos cuando emerge un brote de intoxicación por alimentos contaminados por organismos como la bacteria de *Vibrio parahaemolyticus* teniendo como clasificación serológica basado en la combinación de antígenos somático (O) y antígenos capsular (K), este método se realiza utilizando antisueros específicos para su detección lo cual existe disponibilidad para 11 de antígenos O y 71 de antígenos K, cinco de estos antígenos K pueden relacionarse con cualquiera de los antígenos del grupo O, cabe destacar que existen 76 combinaciones de serotipos reconocidos, aunque existen serotipos no tipificables conocidas como KUT u OUT (R. Li et al., 2021; G. Balakrish Nair et al., 2007).

Grupo O	Grupo K
1	1,25,26,32,38,41,56,58,64,69
2	3,28
3	4,5,6,7,27,30,31,33,37,43,45,48,54,57,58,59,65
4	4,8,9,10,11,12,13,34,42,49,53,55,63,67
5	5,15,17,30,47,60,61,68
6	6,18,46
7	7,19
8	8,20,21,22,39,70
9	9,23,44
10	19,24,52,66,71
11	36,40,50,51,61

Cuadro 1. Esquema antigénico para *V. parahaemolyticus* (Charles A Kaysner & DePaola).

7. EPIDEMIOLOGÍA

Vibrio parahaemolyticus fue descubierto por primera vez en Japón de 1950 por el bacteriólogo Tsunesaburo Fujino la cual fue denominada como *Pasteurella parahaemolytica*, que provocó un brote de gastroenteritis aguda que enfermó a 272 personas, las cuales 20 fallecieron por el consumo de “shirasu” una especie de sardina seco contaminado en Osaka, Japón (Broberg, Calder, & Orth, 2011), cabe destacar que este organismo no se asociaba con el género *Vibrio* debido a que el aislado en ese entonces tenía forma recta, pero años después Iwao Takikawa identificó a una bacteria de un brote de intoxicación alimentaria y descubrió la característica particular de los vibrios, es decir la propiedad halófila, dicha bacteria fue llamada como enteritis por *Pseudomonas*. Fujino y Sakazaki reexaminaron los aislados anteriores y determinaron que eran la misma especie del género *Vibrio*, dando como origen el nombre científico de *Vibrio parahaemolyticus* (Shinoda, 2011). En el año de 1960 se creía que dicho patógeno se encontraba delimitado en Japón, hasta que se encontraron más infecciones en otras distribuciones geográficas como en 1971 donde se detectó por primera vez *V. parahaemolyticus* en Estados Unidos por la ingestión de cangrejos contaminados (Molenda et al., 1972). Sin embargo, los brotes anteriores de *V. parahaemolyticus* no mostró características serológicas particulares homogéneos sino hasta en febrero de 1996, donde apareció el serovar O3:K6 como un solo grupo en Kolkata, India, este clon pandémico contiene los factores de virulencia típicas como *tdh*⁺ y *trh*⁻, *toxRS/new*⁺, *orf8*^{+/-} (Matsumoto et al., 2000), hasta la fecha, se han identificado 21 serotipos, denominados colectivamente serovariantes de O3:K6, siendo los más comunes O4:K68, O1:K25, O1:K41, O1:K26 y O1:KUT (G. Balakrish Nair et al., 2007). Las cepas de *V. parahaemolyticus* con este serogrupo en particular, han causado una pandemia de gastroenteritis, continuando su expansión en los últimos años, se ha reportado casos de muestras

clínicas en Asia, África, Europa y América donde este último específicamente en Chile, Perú, se han producido brotes de gran magnitud con un total de 14,517 casos .desde el año 1997 a febrero del 2006 (Gil et al., 2007).

En México solo se había reportado la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* no patogénico en los alimentos de origen marino procedentes de las costas de Yucatán, Quintana Roo, Tamaulipas y Sinaloa. En el año del 2004 en el sur Sinaloa, se presentó el primer brote y de gran magnitud de gastroenteritis aguda producido por la clona pandémica de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en México, donde se registraron a más de 1,250 casos clínicos que consumieron camarón crudo o poco cocinado extraído del complejo lagunar huizache-caimanero (Cabanillas-Beltrán et al., 2006; de Jesús Hernández-Díaz et al., 2015). Del año 2004 al 2010 se han reportado casos de varios brotes recurrentes y esporádicos de este patógeno a lo largo de todo el estado de Sinaloa de muestras aisladas del medio ambiente como el agua de estero, sedimento y molusco bivalvo como el camarón además de pacientes con diarrea, estas muestras fueron caracterizadas en el laboratorio de la Facultad de Medicina, UAS en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sinaloa (Canizalez-Roman, Flores-Villaseñor, Zazueta-Beltran, Muro-Amador, & León-Sicairos, 2011; Velazquez-Roman et al., 2012). En el año 2012 Velazquez-Roman y colaboradores en un estudio determinaron la prevalencia de cepas pandémicas de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de diversas muestras tanto clínicas como ambientales en el estado de Sinaloa, en muestras de agua de mar fue solo de 2.7% (50/1821), 36% en sedimento (24/65) y 18% en muestras de camarones (70/380), teniendo al serovar O3:K6 más predominante en cepas clínicas representando el 79.8% (123/154) del total de aislados, este estudio proporciono datos relevantes para la prevalencia del patógeno en las costas del Pacifico de México (Velazquez-Roman et al., 2012). El 19 de septiembre de 2017, se produjo una gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* a gran escala después de que los residentes de Seúl,

Corea consumieran calamar y láminas de huevo obtenidas de una contaminación cruzada usando la misma tabla de cortar y el mismo cuchillo en un centro de organización, de los cuales 299 visitantes, solamente 237 (79.3%) presentaron síntomas que posteriormente algunos fueron hospitalizados (Jung, 2018). Alrededor de 2018 y 2019 se detectaron infecciones por *Vibrio* asociadas a olas de calor en Alemania, donde se presentó 63 casos con infección por *Vibrio* de las cuales 38 fueron infecciones de heridas, 16 infecciones de oído, 6 casos de gastroenteritis, 2 de neumonía por la aspiración de agua del mar y un caso con septicemia severa, con menor frecuencia se detectó *V. parahaemolyticus* (n=5;8%) en el Mar Báltico Alemán (Brehm et al., 2021), y la aparición de un nuevo serotipo O10:K4 que aumentó en los últimos dos años en Huzhou, China siendo predominante en el año 2021, tomando como segundo lugar de serotipo común después del serovar pandémico O3:K6, en aislados de heces fecales de 11166 muestras, 598 salieron positivas para *Vibrio parahaemolyticus* teniendo en cuenta que el 86.8% de las muestras analizadas fueron resistentes a la ampicilina (P. Zhang et al., 2022).

Recientemente en 2021 se ha detectado la presencia de cepas toxigénicas de *V. parahaemolyticus* en ensaladas africanas, en Nigeria, lo que genera preocupación para la salud pública (Igbinosa, Beshiru, Igbinosa, Ogofure, & Uwhuba, 2021).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La gastroenteritis es un problema de salud pública a nivel mundial que se ha incrementado a lo largo del tiempo, esto es debido a múltiples factores como las infecciones bacterianas, además del cambio climático que permite la supervivencia de estos patógenos en diferentes ambientes incluidos los alimentos. En diferentes regiones del mundo recientemente se ha implicado a *Vibrio parahaemolyticus* como causante de grandes brotes desde 1996, con la diseminación del serotipo pandémico O3:K6. Hasta ahora, en México solo se ha reportado la presencia de un gran brote en el estado de Sinaloa en el año 2004, donde se infectaron alrededor de 1,250 personas y se reportó que dicho brote fue ocasionado por el serotipo pandémico (O3:K6) debido al consumo de camarón crudo o poco cocido extraído de un complejo lagunar. Con el fin de monitorear la prevalencia e incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en humanos y muestras ambientales para el control de su diseminación, nuestro grupo de investigación ha realizado diferentes trabajos donde se han reportado varios brotes esporádicos y recurrentes de gastroenteritis en el estado de Sinaloa, con diferentes clonas de *Vibrio parahaemolyticus* pero principalmente del serotipo pandémico O3:K6, en dichos estudios se analizaron muestras provenientes de pacientes con diarrea y de muestras de camarón, agua de estero y sedimento, además en estos estudios previos se reportó la presencia de bacterias multirresistentes a los principales antibióticos utilizados para su control lo que representa otra grave amenaza para la salud pública en México y en Sinaloa. Por lo tanto, es de gran importancia continuar con el monitoreo y vigilancia de este microorganismo reemergente en Sinaloa con el objetivo de determinar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón y ostión de Sinaloa durante los últimos años, esto nos permitirá identificar la distribución actual de los principales serotipos,

aparición de nuevos serotipos, la presencia de clonas pandémicas y finalmente los perfiles de resistencia antimicrobiana que estas bacterias puede tener.

IV. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial las enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso son uno de los principales problemas de salud pública y dentro de ellas las bacterias del género *Vibrio* han sido a lo largo del tiempo unas de las más importantes por lo cual *Vibrio parahaemolyticus* es uno de los microorganismos reemergentes de gran interés epidemiológico, debido a que es capaz de ocasionar brotes de gastroenteritis relacionados por el consumo de pescados y mariscos crudos o pocos cocidos como camarón y ostión. En México los casos de gastroenteritis causados por este microorganismo han ido incrementando en los últimos años ya que existe una gran cantidad de serotipos de *Vibrio parahaemolyticus* que difieren en su capacidad de virulencia, principalmente por la aparición de clonas toxigénicas y cepas pandémicas. En el estado de Sinaloa durante el periodo 2004 a 2013 se presentaron brotes de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* donde se demostró que más del 80% de los casos fueron generados por un serotipo en particular, el serovar O3:K6 perteneciente al grupo pandémico, así como también se determinó la presencia de cepas toxigénicas en aislados de muestras ambientales como agua de estero, sedimento y camarón. Durante los últimos años se desconoce la distribución de este microorganismo en los principales mariscos que se consumen en Sinaloa principalmente camarón y ostión, de igual forma no se conoce si estas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* son toxigénicas, si pertenecen al grupo pandémico (serotipo O3:K6 y otros serotipos), así como su perfil de resistencia ante los principales antibióticos utilizados para su control y tratamiento. Por lo tanto, el realizar este trabajo nos mostrará un panorama epidemiológico de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la distribución actual de las clonas de este microorganismo en los aislados de camarón y ostiones en Sinaloa, así como también el perfil de resistencia a los

antibióticos que estas bacterias presentan, por lo que estos aspectos nos permitirá avanzar en el mejor entendimiento de este patógeno , para poder establecer mejores medidas de control de inocuidad alimentaria, evitando posibles brotes en la población Sinaloense.

V. HIPÓTESIS

Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión del estado de Sinaloa presentan factores de virulencia que se encuentran distribuidos en diversos serovares con un perfil de resistencia a los principales antibióticos utilizados para su control y tratamiento.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores de virulencia, serotipificación y evaluación de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostión en Sinaloa.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los principales genes relacionados a virulencia y genes característicos del grupo pandémico (*tdh*, *trh*, *toxRs/new* y *orf-8*) en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión en Sinaloa.
2. Determinar los serotipos O y K de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión en el estado Sinaloa.
3. Analizar el perfil de susceptibilidad a los principales antibióticos utilizados para el tratamiento y control de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión en Sinaloa.
4. Conocer la distribución actual de cepas, serotipos y genes de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión en Sinaloa.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño de investigación es de ciencia básica de tipo de estudio descriptivo transversal.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostión del estado de Sinaloa, serán seleccionadas del Cepario del Laboratorio de Biotecnología de la salud y del Laboratorio de Biología Molecular, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

C. RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron recolectadas en 7 municipios del estado Sinaloa divididas en 3 regiones, la región norte que corresponde a los municipios de Ahome, Guasave y Angostura, la región centro comprendida por Navolato y Culiacán y la región sur comprendida por Mazatlán y Escuinapa recolectadas en el periodo del 2015 al 2021, se recolectó un total de 1,110 muestras de alimentos que fueron analizadas, sin embargo, se seleccionó solo 136 muestras donde se detectó la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y de estas 101 cepas de muestras de ostión y 35 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron aislados de muestras del

camarón, dichas muestras fueron recolectadas y transportadas en frío a una temperatura de 4 °C a 15 °C hasta su análisis bacteriológico correspondiente. Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron identificadas geográficamente de la siguiente manera, en la región norte se identificó 34 cepas lo que representa el 25% (34/136) del total y de ellas 23 fueron aisladas de ostión y 11 de camarón, por otro lado, en la región centro se identificaron 62 cepas lo que representa un el 45.5% (62/136) del total de las cepas analizadas, de las cuales 48 fueron aisladas en muestras de ostión y 14 de camarón, finalmente en la región sur se identificó en 40 muestras que representa un proporción de 29.41% (40/136) de las cuales 30 fueron aisladas en muestras de ostión y 10 en muestras de camarón, cabe mencionar lo descrito anteriormente, son zonas con producción pesquera, dedicadas a la captura y acuicultura, de las cuáles el pescado, camarón y ostión son las especies de mayor importancia (figura 1).

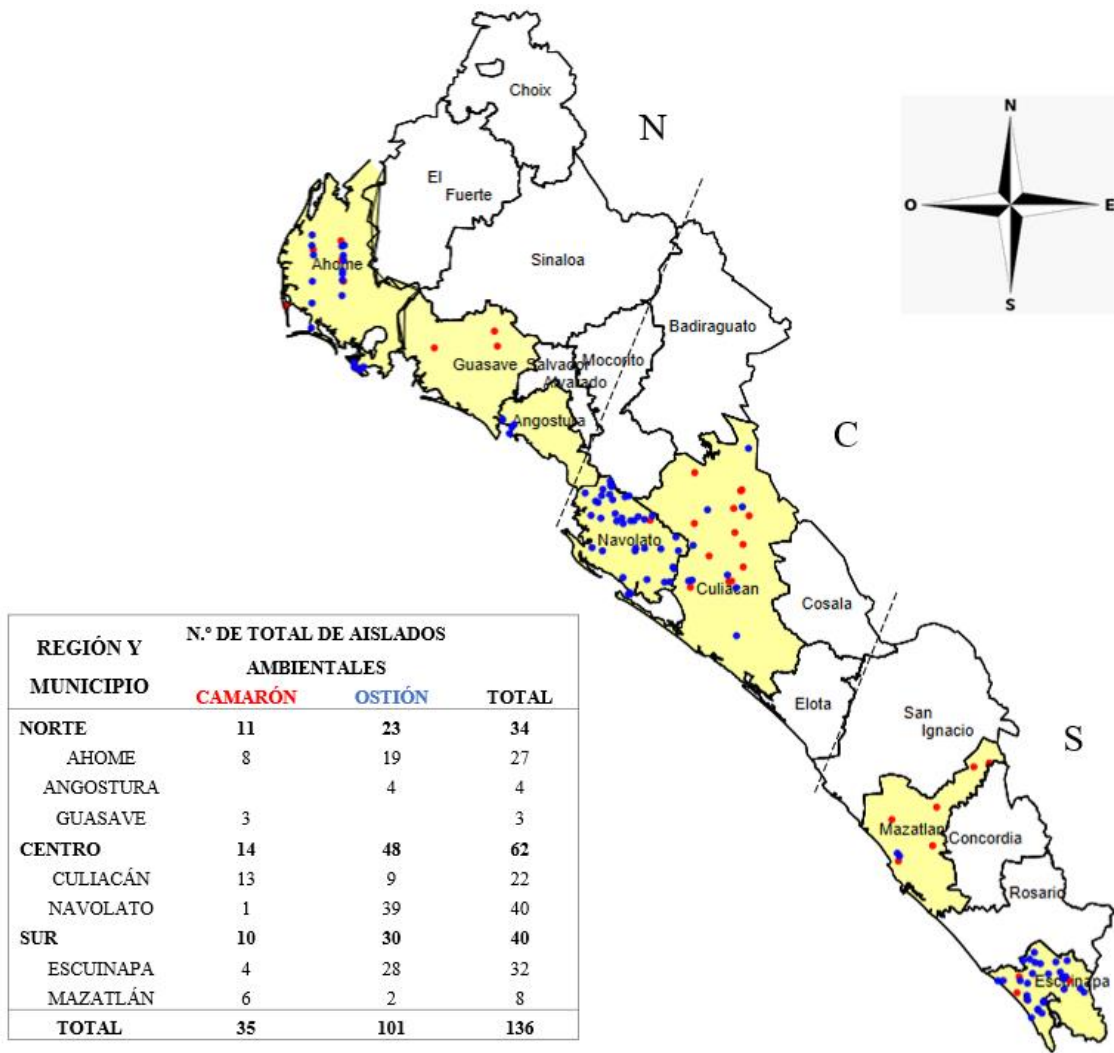


Figura 1. Distribución geográfica de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en los municipios del estado de Sinaloa entre 2015 a 2021. ^a N, región norte de Sinaloa; C, región central de Sinaloa; S, región sur del estado de Sinaloa.

D. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

Para el procesamiento de las muestras se llevó a cabo según lo descrito por el Manual Bacteriológico Analítico de la Administración de Alimentos y Medicamentos (BAM, por sus siglas en inglés) que consiste en homogenizar las muestras de camarón y ostión en un circulador peristáltico Stomacher-400 para posteriormente colocarlas en agua de peptona alcalina e incubar a 37°C durante 6-24 horas (Canizalez-Roman et al., 2011; Charles A Kaysner, De Paola, Jones, USA, & Drug Administration: Silver Spring, 2004), así como también se llevó a cabo la metodología descrita en 2011 por Canizalez-Román y colaboradores para el aislamiento de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que se realizó bajo los criterios metodológicos establecidos en el laboratorio de Biotecnología en Salud de la Facultad de Medicina. Finalmente para descartar resultados de falsos negativos se utilizaron cepas control: cepa ATCC (American Type Culture Collection) 17802 serotipo O1 *r72h(+)*, *tdh(-)*, *trh(-)*, *toxRS/New(-)* y *orf-8(-)* de *Vibrio parahaemolyticus*, así como también la cepa pandémica TX2103 serotipo O3:K6 *r72h(+)*, *tdh(+)*, *trh(-)*, *toxRS/New(+)* y *orf-8(+)* causante de brote en Texas, Estados Unidos, y la cepa de referencia *Vibrio parahaemolyticus* CAIM1772 serotipo O5:K17 *r72h(+)*, *tdh(+)*, *trh(+)*, *toxRS/New(-)* y *orf-8(-)* que fue donada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) de Sinaloa, México, una muestra proveniente de camarón, una vez que las cepas fueron identificadas fueron criopreservadas a -70°C a -80°C mediante un cultivo bacteriano que es caldo LB con 3% NaCl mezclado con un crioprotector glicerol al 15% (vol/vol), para hacer una suspensión densa, para así mantener las cepas de *Vibrio* viables para su posterior análisis.

E. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*

1. LISADO BACTERIANO

El método de extracción de ADN consistió en homogenizar 5 colonias del cultivo bacteriano en 200 μL de agua grado biología molecular. El tubo con la mezcla se coloca en un flotador de polipropileno que se incuba en un vaso de precipitado con agua en ebullición (aproximadamente a 100 °C) durante 10 minutos, al finalizar la incubación el tubo con la mezcla se agitó en vórtex durante 10 segundos a velocidad máxima y se centrifuga a 12,000 x g durante 30 segundos. Finalmente, el sobrenadante que contiene el ADN se transfirió a tubos eppendorff de 0.5 mL y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2. DETERMINACIÓN DE GENES TOXIGÉNICOS DE *Vibrio parahaemolyticus*

La presencia de los genes toxigénicos en *Vibrio parahaemolyticus* se llevó a cabo mediante PCR punto final de acuerdo con lo descrito por Bej y colaboradores (Bej et al., 1999), para identificar el gen del marcador taxonómico de *Vibrio parahaemolyticus* *r72h* (+) y genes relacionados a virulencia como hemolisina directa termoestable (*tdh*) y hemolisina relacionada a *tdh* (*trh*). La reacción de PCR consistió en 12.5 μL del reactivo Go Taq Green Máster Mix 2X (Promega), 1 μL de cada iniciador (F- sentido y R- antisentido) con una concentración de 0.4 μM (IDT) y 1 μL de ADN molde, el volumen se ajustó con agua (grado biología molecular) para un volumen final de 25 μL para cada reacción. Las condiciones de amplificación para estos genes fueron:

desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min, extensión final a 72°C por 5 min, manteniendo la temperatura a 4°C. Los ensayos de PCR se realizaron en un Termociclador Thermal Cycler C1000 (BIO-RAD). Una vez terminado el proceso de PCR se utilizaron 10 µL de cada producto de amplificación, los cuales fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con el colorante GelRed a una concentración de 1000X, finalmente para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó un sistema de imagen digital (Model El logia 100 Imagen System; Kodak). El tamaño de los fragmentos de PCR fue comparado con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega DNA step ladder).

3. DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A CEPAS PANDÉMICAS DE *Vibrio parahaemolyticus*

La identificación de los genes característicos de cepas pandémicas se llevó a cabo mediante PCR punto final para amplificar los genes *toxRS/New* y *orf-8* de *Vibrio parahaemolyticus*, de acuerdo con lo descrito en el año 2000 por Matsumoto colaboradores, así como Myers y colaboradores en el 2003 (Myers, Panicker, & Bej, 2003) (cuadro 2). Dichos oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR generan unos amplicones de 651 y 369 pb, respectivamente. La mezcla de PCR realizada consta de 12.5 µL del reactivo Go Taq Green Master Mix 2X (Promega), 1 µL de cada cebador (F- sentido y R-antisentido) 0.4 µM (Invitrogen), 1 µL de ADN molde y se ajustó el volumen con agua grado biología molecular para un volumen final de 25 µL en cada reacción. Los ensayos de PCR se realizaron en un Termociclador Thermal Cycler C1000 (BIO-RAD). Las condiciones de amplificación para el gen *toxRS/New* fueron las

siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, seguida de 25 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento de 45°C por 30 s y extensión de 72°C por 1 min, por último, una extensión final a 72°C por 5 min, y se mantendrá a 4°C. Por otra parte, las condiciones de amplificación para el gen *orf-8* fueron: desnaturalización a de 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, alineamiento a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, por último, una extensión final a 72°C por 5 min, manteniendo la temperatura a 4°C. Una vez terminado el proceso de PCR se utilizaron 10 µL de cada producto de amplificación, los cuales fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con el colorante GelRed a una concentración de 1000X, finalmente los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron en un sistema de imagen digital (Model E1 logia 100 Imagen System; Kodak). El tamaño de los fragmentos de PCR fue comparado con un marcador de tamaño molecular de 100pb (Promega DNA step ladder).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de factores de virulencia de cepas de *Vibrio parahaemolyticus*.

GEN	CEBADOR	TAMAÑO (pb)	REFERENCIA
<i>tdh</i>	F: 5'-GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC-3' R: 5'-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC-3'	269	
<i>trh</i>	F: 5'-TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3' R: 5'-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3'	500	(Bej et al., 1999)
<i>toxRs/New</i>	F: 5'-TAA TGA GGT AGA AAC A-3' R: 5'-ACG TAA CGG GCC TAC A-3'	651	(Matsumoto et al., 2000)
<i>orf-8</i>	F: 5'-AGG ACG CAG TTA CGC TTG ATG-3' R: 5'-CTA ACG CAT TGT CCC TTT GTA G-3'	369	(Myers et al., 2003)

^a *tdh*: Hemolisina directa termoestable; *trh*: Hemolisina relacionada con TDH; *toxRS/New*:

Operón de secuencia única; *orf-8*: Marco de lectura abierto 8.

F. SEROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus*

Los diferentes serovares O:K de cada cepa de *Vibrio parahaemolyticus* se determinaron mediante pruebas de aglutinación con antisueros específicos de conejo (Denka Seiken, Tokio, Japón), este proceso se realizó a partir de 11 antisueros del antígeno somático (O) y 71 antisueros del antígeno capsular (K) de acuerdo con la metodología descrita ampliamente en el laboratorio de Biotecnología en Salud de la Facultad de Medicina (Velazquez-Roman et al., 2012) y a las instrucciones del fabricante, de manera que las cepas se incubaron a 37°C en medio LB con NaCl al 3% durante la toda la noche para poder recolectar colonias que posteriormente fueron disueltas en 500 µL de solución salina y se homogenizó mediante vórtex, el antígeno capsular (K) se encuentra en la superficie bacteriana, por lo tanto se utilizó la suspensión bacteriana de forma directa con los antisueros, sin embargo, el antígeno somático (O) se encuentra en el interior de la bacteria por lo que es necesario desnaturalizarlo calentando la suspensión bacteriana durante 30 minutos a 100°C de esta manera logramos liberar el antígeno somático (O) que es termoestable. Esta suspensión bacteriana se utilizó para el proceso de aglutinación del antígeno somático (O). Por último, de acuerdo con el esquema de clasificación antigénica para *Vibrio parahaemolyticus* proporcionado por el fabricante se determinó cada uno de los serotipos de las cepas evaluadas.

G. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Para la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos, se utilizó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, de acuerdo con lo descrito por el Instituto de Estandarización para Laboratorios Clínicos (CLSI) con referencia a los criterios de interpretación para otras no enterobacterias en las Directrices de prueba de sensibilidad a fármacos (CLSI, 2020) Los sensidiscos a utilizados fueron: ampicilina (AMP: 10 µg), ceftazidima (CAZ: 30 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT: 1.23ug/23.75 µg), ciprofloxacino (CIP: 5 µg), ácido nalidíxico (NAL: 30 µg), gentamicina (GEN: 10 µg), cefotaxima (CTX: 30 µg), cloranfenicol (CHL: 30 µg) y tetraciclina (TET: 30 µg) (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Se inoculó de 1-3 colonias en caldo de agar Müller-Hinton a partir de cultivos axénicos y se incubaron hasta alcanzar la turbidez 0.5 del estándar de McFarland, posteriormente mediante un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, se inocularon en placas de agar Müller-Hinton sobre toda la superficie del medio de cultivo, posteriormente se colocaron los sensidiscos impregnados con los antibióticos mediante un dispensador y se incubaron a 37°C durante 18-20 horas. Finalmente, se realizó la medición de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros con un vernier digital de precisión y de acuerdo con los criterios del CLSI (cuadro 3) las cepas se agruparon en resistentes, intermedio o susceptibles a los antimicrobianos evaluados.

Cuadro 3. Puntos de corte CLSI 2020 para los antibióticos utilizados.

AGENTE ANTIMICROBIANO	Categorías interpretativas y puntos de corte del diámetro de la zona (mm)		
	S	I	R
Betalactámicos			
Ampicilina	≥17	14-16	≤13
Cefalosporinas			
<i>Ceftazidima</i>	≥21	18-20	≤17
<i>Cefotaxima</i>	≥26	23-25	≤22
Sulfonamidas			
<i>Sulfametoxazol-trimetoprima</i>	≥16	11-15	≤10
Quinolonas y fluoroquinolonas			
<i>Ciprofloxacino</i>	≥26	22-25	≤21
<i>Ácido Nalidíxico</i>	≥19	14-18	≥13
Aminoglucósidos			
Gentamicina	≥15	13-14	≥12
Fenicoles			
<i>Cloranfenicol</i>	≥18	13-17	≤12
Tetraciclinas			
<i>Tetraciclina</i>	≥15	12-14	≤11

^a S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El registro de información obtenida se organizó mediante una base de datos en Excel, tomando en cuenta las variables como nominales dicotómicas ya sea la ausencia o presencia del gen de interés como cepas patogénicas, no patogénicas y cepas pandémicas, de igual manera como las variables ordinales del perfil de susceptibilidad antimicrobiana (susceptible, intermedio y resistente). Las asociaciones entre las variables nominales serán mediante métodos descriptivos. Una vez recopilado los resultados fueron sometidos a una descripción de los datos obtenidos mediante tablas y gráficos, además de utilizar frecuencias relativas (%) para variables cualitativas. Los análisis de distribución de clonas, serotipos circulantes y genes de factores relacionados a virulencia de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostiones en Sinaloa, se realizará mediante mapas con el software Epi info 7.

IX. RESULTADOS

A. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*

1. DETERMINACIÓN DE GENES TOXIGÉNICOS DE *Vibrio parahaemolyticus*

El primer objetivo del trabajo fue determinar la presencia de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénica, por lo cual se realizó la identificación de los genes *tdh* y *trh* mediante PCR punto final. Se analizaron las 136 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (35 aisladas de camarón y 101 aisladas de ostión) encontrando que no se detectó la presencia de ninguno de los genes que codifican para las clásicas toxinas en las cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, por lo que todas las cepas del presente estudio fueron clasificadas como cepas no patogénicas (cuadro 5).

2. DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A CEPAS PANDÉMICAS DE *Vibrio parahaemolyticus*

Una vez determinado que ninguna de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de las muestras de camarón y ostión fueron toxigénicas, se realizó la detección de genes de virulencia asociados a las cepas pandémicas que son *toxRS/New* y *orf-8*. Es importante mencionar que a pesar de no encontrar ninguna cepa con los clásicos factores de virulencia *tdh* y *trh* se logró identificar una cepa que contenía el gen *orf-8* de una muestra de ostión obtenida de Mazatlán, Sinaloa, y otra cepa que contenía los dos genes tanto *toxRS/New* como *orf-8* obtenida de una

muestra de ostión de Culiacán, con estos datos se tiene un 2.7% del total de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con genes de la clona pandémica. Sin embargo, estas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* no pueden clasificarse como cepas pandémicas debido a que adicionalmente estas cepas requieren contar con la presencia del gen *tdh* junto con los genes *toxRS/New*, *orf-8* para ser considerada pandémica. Finalmente, en el resto de las cepas (n=134, 98.5%) no se logró detectar ninguno de los genes pertenecientes al grupo pandémico (cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas entre el 2015 a 2021 en el estado de Sinaloa de acuerdo con sus genes de virulencia.

CLASIFICACIÓN	GENES				FUENTE DE AISLAMIENTO		REGIÓN		
	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS/New</i>	<i>orf-8</i>	CAMARÓN n=35	OSTIÓN n=101	N n=34	C n=62	S n=40
No toxigénicas	-	-	-	-	35	101	34	62	40
Toxigénicas	+	+	-	-	0	0	0	0	0
Pandémicas	+	-	+	+	0	0	0	0	0
TOTAL					136		136		

^a N, región norte de Sinaloa; C, región central de Sinaloa; S, región sur del estado de Sinaloa. Nota: Cepas no toxigénicas: Una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con presencia de los genes *toxRS/New* y *orf-8*. (O3:K4, CULIACAN) y otra cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con presencia del gen de interés *orf-8*. (O3:KUT, MAZATLÁN).

B. SEROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus*

El segundo objetivo del presente trabajo fue identificar los diferentes serotipos de las 136 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* mediante aglutinación con anticuerpos específicos para el antígeno O y K. Al realizar la serotipificación de las 136 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* se encontró que el 61% (83/136) se tipificaron tanto el antígeno O y el antígeno K de forma conjunta. Además, se determinó que el 16.9% (23/136) no fueron tipificables por antisueros O (OUT), mientras que el 35% (48/136) no fue posible tipificar con los antisueros K (KUT). Finalmente se pudo identificar 12 diferentes grupos O, 49 diferentes grupos K, por lo tanto, de acuerdo con las combinaciones se logró identificar un total de 78 serovares. Los serogrupos O más prevalentes fueron el OUT que se encontró en el 16.9% (23/136) de las cepas, seguido por O3 que se encontró en el 15.4% (21/136) y el O4 en el 14.7% (20/136) de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (cuadro 5). Posteriormente se llevó a cabo la serotipificación de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de camarón y ostión que aglutinaron con los antisueros O, pero no con los antisueros K, se encontró que un 22% (30/136) de las cepas presentaron estas características antigénicas y los serovares más prevalentes fueron el O2:KUT y O3:KUT en 3.7% (5/136), el O4:KUT en un 2.9% (4/136) y O5:KUT, O8:KUT, O6:KUT, O1:KUT en un 2.2% (3/136). Posteriormente, se encontró que el 2.9% (4/136) de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que aglutinaron con los antisueros K pero no con el antisuero O, de ellas se determinó que dos fueron del serovar OUT:K68, uno del OUT:K42 y otro del OUT:K69. El resto de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* 61% (83/136) se pudo tipicar tanto con los antisueros O como con el antisuero K, de la combinación de esta, resultaron los siguientes serovares: O4:K68 en un 2.9% (4/136), O9:K44, O4:K55, O4:K34 que se encontró en 2.2% (3/136), así como también se encontró los serovares O4:K64, O8:K20, O1:K38, O2:K28,

O3:K30, O5:K51, O3:K33, O10:K64, O3:K37, OUT:K68, O1:K32 en un 1.5% (2/136), y los serovares menos prevalentes fueron el O1:K1, O1:K25, O1:K26, O1:K45, O1:K64, O1:K69, O2:K20, O2:K39, O2:K41, O2:K46, O2:K47, O3:K2, O3:K4, O3:K6, O3:K11, O3:K18, O3:K29, O3:K43, O3:K46, O3:K57, O3:K65, O4:K38, O4:K42, O4:K47, O4:K53, O5:K20, O5:K24, O5:K28, O5:K29, O5:K30, O5:K44, O5:K45, O5:K56, O5:K60, O5:K61, O5:K71, O6:K46, O6:K53, O7:K19, O8:K21, O8:K49, O8:K70, O9:K23, O9:K50, O10:K66, O10:K71, O11:K30, O11:K36, O11:K44, O11:K59 encontrando una cepa de cada serovar anteriormente descrito (cuadro 6).

Por último, se encontró cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que no aglutinaron por el antisuero O ni el antisuero K (OUT:KUT) en un 13.97% (19/136), sin embargo, los serovares más prevalentes en el presente trabajo fueron OUT:KUT, O3:KUT, O2:KUT de las 136 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) entre el período del 2015 y 2021. Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que cuentan con los genes pertenecientes a las clonas pandémicas *toxRS/New* y *orf-8*, una fue serovar de O3:K4 proveniente de la región centro específicamente del municipio de Culiacán y la otra fue serovar de O3:KUT desde la región sur del municipio de Mazatlán del estado de Sinaloa. Por otra parte, también se detectó la presencia de 28 serovares circulantes en las costas del pacifico que no habían sido reportadas anteriormente las cuales fueron: O2:K20, O2:K39, O2:K41, O2:K46, O2:K47, O3: K2, O3:K11, O3:K18, O4:K38, O4:K47, O4:K64, O5:K20, O5:K24, O5:K28, O5:K29, O5:K44, O5:K45, O5:K51, O5:K56, O5:K71, O6:K53, O8:K49, O9:K50, O11:K30, O11:K44, O11:K59, OUT: K68, OUT: K69. Finalmente, once serovares de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron identificados tanto en las muestras camarón y ostión, estas son: O1:K32, O1:KUT, O2:KUT, O3:KUT, O4:K34, O4:K68, O5:KUT, O6:KUT, O8:K20, O9:K44, OUT:KUT (cuadro 6).

Cuadro 5. Proporción de los serogrupos obtenidas de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el periodo del 2015 a 2021.

SEROGRUPO	PROPORCIÓN N.º TOTAL DE AISLADOS	N.º TOTAL DE AISLADOS AMBIENTALES	
		OSTIÓN	CAMARÓN
OUT	16.9% (23)	20	3
O3	15.4% (21)	16	5
O4	14.7% (20)	16	4
O5	11.8% (16)	9	7
O1	9.6% (13)	10	3
O2	8.8% (12)	9	3
O8	5.9% (8)	6	2
O9	4.4% (6)	4	2
O10	4.4% (6)	6	0
O11	3.7% (5)	2	3
O6	3.7% (5)	3	2
O7	0.7% (1)	0	1
TOTAL	100% (136)	101	35

^aOUT: untypable- no tipificable

Cuadro 6. Serogrupos y serovar de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el periodo de 2015 a 2021.

SEROGRUPO "O" Y SEROVAR	N.º TOTAL DE AISLADOS	NÚMERO DE AISLADOS AMBIENTALES DE:	
		OSTIÓN	CAMARÓN
O1			
O1:K1	1	1	
O1:K25	1	1	
O1:K26	1	1	
O1:K32	2	1	1
O1:K38	2	2	
O1:K45	1	1	
O1:K64	1		1
O1:K69	1	1	
O1:KUT	3	2	1
O2			
O2:K20	1	1	
O2:K28	2	2	
O2:K39	1	1	
O2:K41	1		1
O2:K46	1	1	
O2:K47	1	1	
O2:KUT	5	3	2
O3			
O3:K11	1	1	
O3:K18	1		1
O3:K2	1	1	
O3:K29	1	1	
O3:K30	2		2
O3:K33	2	2	
O3:K37	2	2	
O3:K4	1	1	
O3:K43	1	1	
O3:K46	1	1	
O3:K57	1	1	
O3:K6	1		1
O3:K65	1	1	
O3:KUT	5	4	1

(Continúa en la página siguiente)

Cuadro 6 (continuación)

SEROGRUPO "O" Y SEROVAR	N.º TOTAL DE AISLADOS	NÚMERO DE AISLADOS AMBIENTALES DE:	
		OSTIÓN	CAMARÓN
O4			
O4:K34	3	2	1
O4:K38	1	1	
O4:K42	1	1	
O4:K47	1	1	
O4:K53	1	1	
O4:K55	3	3	
O4:K64	2	2	
O4:K68	4	1	3
O4:KUT	4	4	
O5			
O5:K20	1		1
O5:K24	1	1	
O5:K28	1	1	
O5:K29	1	1	
O5:K30	1		1
O5:K44	1	1	
O5:K45	1	1	
O5:K51	2		2
O5:K56	1	1	
O5:K60	1	1	
O5:K61	1		1
O5:K71	1		1
O5:KUT	3	2	1
O6			
O6:K46	1	1	
O6:K53	1	1	
O6:KUT	3	1	2
O7			
O7:K19	1		1
O8			
O8:K20	2		2
O8:K21	1	1	
O8:K49	1	1	
O8:K70	1	1	
O8:KUT	3	3	

(Continúa en la página siguiente)

Cuadro 6 (continuación)

SEROGRUPO "O" Y SEROVAR	N.º TOTAL DE AISLADOS	NÚMERO DE AISLADOS AMBIENTALES DE:	
		OSTIÓN	CAMARÓN
O9			
O9:K23	1		1
O9:K44	3	2	1
O9:K50	1	1	
O9:KUT	1	1	
O10			
O10:K64	2	2	
O10:K66	1	1	
O10:K71	1	1	
O10:KUT	2	2	
O11			
O11:K30	1		1
O11:K36	1		1
O11:K44	1		1
O11:K59	1	1	
O11:KUT	1	1	
OUT			
OUT:K42	1	1	
OUT:K68	2	2	
OUT:K69	1	1	
OUT:KUT	19	16	3
TOTAL	136	101	35

^aOUT:KUT: untypable- no tipificable

C. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Finalmente se evaluaron los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (N=136) ante nueve de los principales antibióticos utilizados para su tratamiento y control. La susceptibilidad se determinó en base a los diámetros de los halos de inhibición conforme al crecimiento de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* mediante los criterios establecidos por el CLSI para enterobacterias. Los resultados muestran que el 98% (134/136) de las cepas fueron resistente por lo menos a uno de los antibióticos evaluados (cuadro 10). De manera individual el antibiótico menos eficaz de los nueve evaluados fue la ampicilina ya que el 96% (131/136) de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron resistentes a dicho antibiótico, seguido por ciprofloxacino con una proporción de 73% (99/136), cefotaxima con un 47% (64/136), ceftazidima con un 17% (23/136), gentamicina con un 8% (11/136) y trimetropin-sulfametazol ya que solamente una cepa fue resistente a este antibiótico (1/136), por otra parte no se encontró cepas de *Vibrio parahaemolyticus* resistentes a cloranfenicol, tetraciclina y ácido nalidíxico (cuadro 7).

Cuadro 7. Proporción de resistencia antimicrobiana de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el estado de Sinaloa en el periodo de 2015 a 2021.

CLASE Y AGENTE ANTIMICROBIANO	PROPORCIÓN DE RESISTENCIA n= 136	FUENTE DE AISLAMIENTO	
		CAMARÓN n=35	OSTIÓN n=131
Betalactámicos			
Ampicilina	131 (96%)	34	97
Cefalosporinas			
<i>Ceftazidima</i>	23 (17%)	8	15
<i>Cefotaxima</i>	64 (47%)	16	48
Sulfonamidas			
<i>Sulfametoxazol- trimetoprima</i>	1 (1%)	1	0
Quinolonas y fluoroquinolonas			
<i>Ciprofloxacino</i>	99 (73%)	28	71
<i>Ácido Nalidíxico</i>	0	0	0
Aminoglucósidos			
Gentamicina	11(8%)	6	5
Fenicoles			
<i>Cloranfenicol</i>	0	0	0
Tetraciclinas			
<i>Tetraciclina</i>	0	0	0

Posteriormente se determinó los diferentes perfiles de resistencia antimicrobiana de cada una de las cepas analizadas en el presente estudio y se encontró que el perfil de resistencia más frecuente en las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fue ampicilina y ciprofloxacino ya que se identificó en el 27.2% (37/136), seguido por el perfil ampicilina, ciprofloxacino y cefotaxima con un total de 23.5% (32/136) así como también el perfil ampicilina, ceftazidima, ciprofloxacino y cefotaxima representando un 12.3% (14/136) del total de las cepas analizadas.

Por otra parte, solamente se identificó dos cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que fueron susceptibles a los 9 antibióticos evaluados en el presente estudio y que son utilizados como tratamiento para este patógeno.

Finalmente, en base a los resultados se determinó las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* multidrogorresistentes (MDR) que son aquellas que presentan un perfil de resistencia a tres o más antibióticos de diferentes familias, al analizar los diferentes perfiles de resistencia se encontró que el 44.1% (60/136) fueron MDR (cuadro 8). Adicionalmente se identificó que los antibióticos a los cuales son resistentes con mayor frecuencia pertenecen a la familia de los betalactámicos, seguido de las cefalosporinas, aminoglucósidos, sulfonamidas, quinolonas y fluoroquinolonas principalmente.

Cuadro 8. Perfil de resistencia a antibióticos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el estado de Sinaloa entre 2015 y 2021.

PERFIL	PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	N.º TOTAL DE CEPAS RESISTENTES
1	SUSCEPTIBLE	1.47% (2)
2	AM	16.17% (22)
3	CIP	1.47% (2)
4	AM-CIP	27.20% (37)
5	AM-CTX	8.08% (11)
6	CIP-GM	0.73% (1)
7	AM-CAZ	0.73% (1)
8	AM-CIP-CTX	23.52% (32)
9	AM-CAZ-CIP	2.94% (4)
10	AM-CIP-GM	2.20% (3)
11	AM-CAZ-CIP-CTX	10.29% (14)
12	AM-CIP-GM-CTX	2.20% (3)
13	AM-CAZ-CIP-GM-CTX	2.20% (3)
14	AM-CAZ-SXT-GM-CTX	0.73% (1)
TOTAL		100% (136)

^aAM:ampicilina;CIP:ciprofloxacino;CXT:cefotaxima;CAZ:ceftazidima;GM:gentamicina;

SXT: sulfametoxazol-trimetoprima; NA: ácido nalidixico; C:cloranfenicol; TE: tetraciclina.

Por último, se llevó a cabo el análisis del perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K4 y O3:KUT provenientes de Culiacán y Mazatlán que portaban los genes pertenecientes al grupo pandémico como *toxRS/New* y *orf-8* y se encontró que ambas cepas presentaron el mismo perfil de resistencia AM-CIP-CTX (ampicilina, ciprofloxacino y cefotaxima), por lo tanto, estas fueron clasificadas como MDR (multidrogorresistente) (cuadro 9). Con los datos obtenidos se demostró un incremento en la resistencia antimicrobiana en las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con el paso del tiempo lo que implica un gran riesgo en la salud de la población sinaloense por el consumo de alimentos contaminados con estos microorganismos.

Cuadro 9. Número y categoría de resistencia a antibióticos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales (camarón y ostión) en el estado de Sinaloa entre 2015 y 2021.

RESISTENCIA POR NÚMERO DE ANTIBIÓTICO	NÚMERO DE CEPAS AISLADAS DE MUESTRAS AMBIENTALES n=136
0	2 (1.47 %)
1	24 (1.76%)
2	51 (37.5%)
3	39 (28.67%)
4	16 (11.76%)
5	4 (2.94%)
CATEGORÍA	
SUSCEPTIBLE	2 (1.47%)
RESISTENTE A CUALQUIER ANTIBIÓTICO	74 (54.41%)
MDR	60 (44.11%)

^a MDR: resistente a múltiples fármacos.

D. DISTRIBUCIÓN ACTUAL DE CEPAS, SEROTIPOS Y GENES DE VIRULENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*

El cuarto y último objetivo del trabajo fue conocer la distribución actual de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* patogénicas, no patogénicas y pandémicas en base a sus genes de virulencia y sus serotipos circulantes, todo esto con el fin de obtener un panorama epidemiológico que nos permitirá identificarlas para su posterior control para así evitar la posible diseminación de este patógeno. Es importante retomar que en el presente estudio no se identificó ninguna cepa toxigénica en las muestras analizadas correspondientes a las diferentes regiones del estado de Sinaloa, por lo que todas de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron clasificadas como no toxigénicas y se encontraron distribuidas geográficamente de la misma manera en la que fueron recolectadas (figura 2).

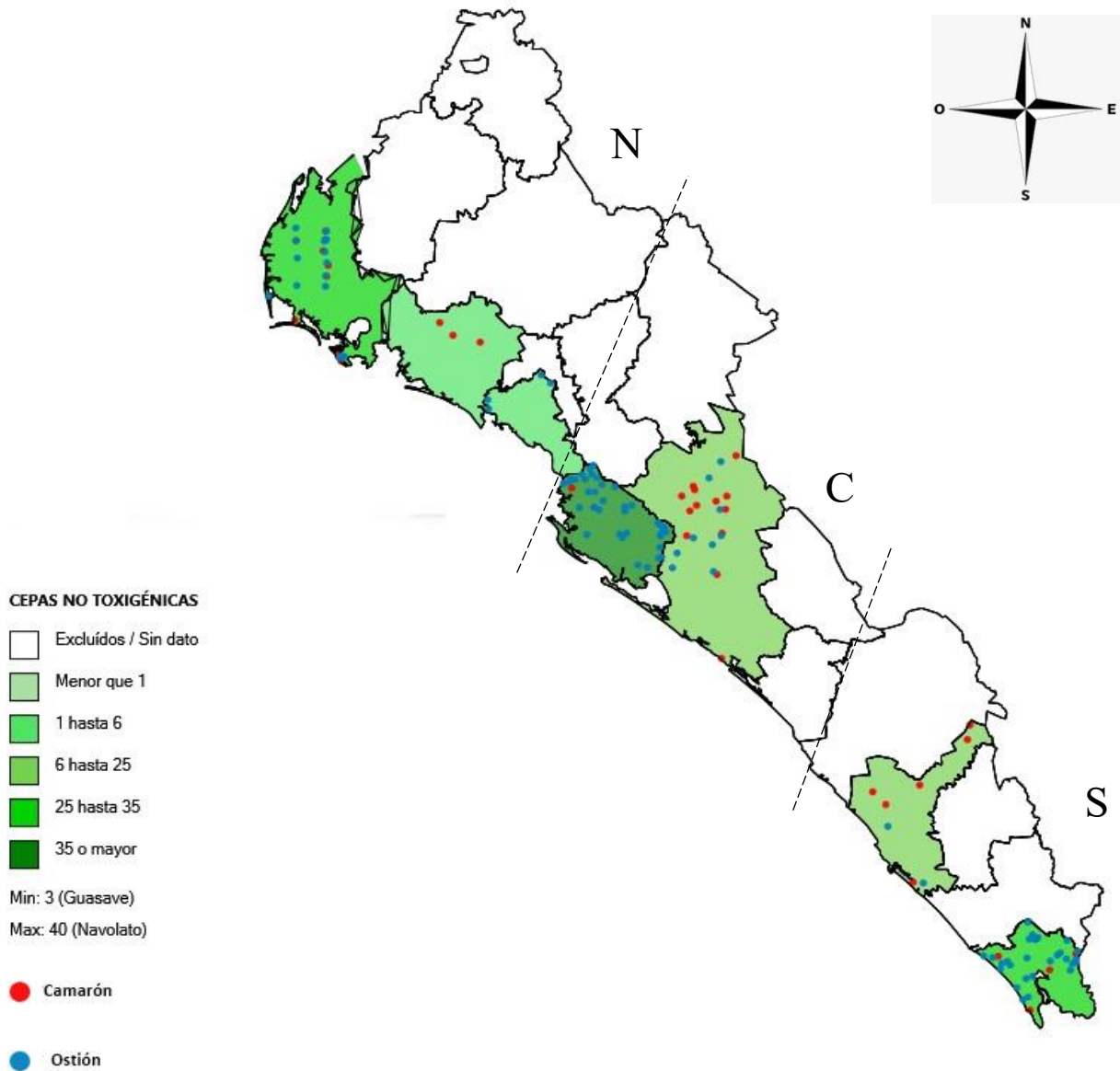


Figura 2. Distribución geográfica de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* no toxigénicas aisladas de camarón y ostión en el estado de Sinaloa. ^a N, región norte de Sinaloa; C, región central de Sinaloa; S, región sur del estado de Sinaloa.

Por otra parte, se determinó la distribución de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que fueron tipificados con antisueros O, se logró determinar que los diferentes serogrupos se encontraban dispersos en los diferentes municipios. El serogrupo más predominante O₁ con un 16.91% (23/136) fue encontrado a lo largo de todo el estado, excepto en el municipio de Guasave, sin embargo, la detección de las cepas *Vibrio parahaemolyticus* en este municipio fue muy baja a comparación de otros municipios de Sinaloa. Así mismo el segundo serogrupo más frecuente fue el O₃ que se encontró en un 15.4% (21/136) de las cepas analizadas, este no se logró identificar en los municipios Guasave y Angostura, por último, se puede observar que el resto de los serogrupos se encuentran dispersos en los siete municipios en las que las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fue detectada (figura 3).

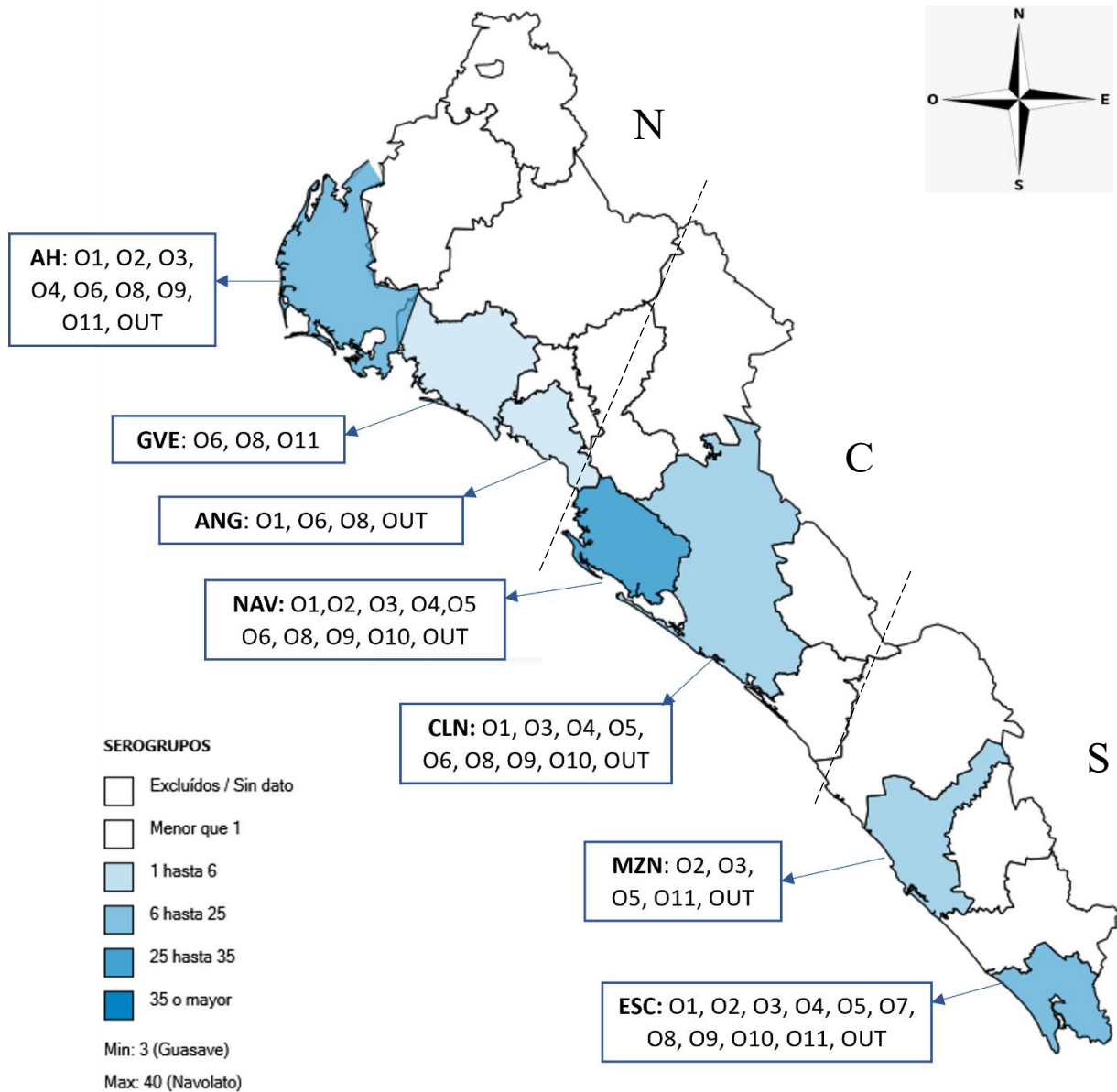


Figura 3. Distribución geográfica de los serogrupos circulantes de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostión en el estado de Sinaloa. ^a N, región norte de Sinaloa; C, región central de Sinaloa; S, región sur del estado de Sinaloa.

De la misma manera se reportó la distribución geográfica de los serovares de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* analizadas en el presente estudio, por lo que en la búsqueda del serovar pandémico con el fin de conocer su prevalencia en la costa del pacifico, esto nos dirigió a los resultados obtenidos donde se encontró solamente una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* que es fenotípicamente similar al serovar pandémico O3:K6 en el municipio de Escuinapa del estado de Sinaloa, no obstante, esta no portaba los genes característicos de las clonas pandémicas. Es de destacar que el serotipo más predominante fueron aquellas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que no tuvieron una aglutinación positiva con los antisueros O y K disponibles al momento de ser serotipificadas, en base a lo anterior, dichas cepas pertenecen al serovar OUT:KUT representando 13.9% (19/136) del total de las cepas analizadas que se encontraron en los municipios de Ahome, Navolato, Culiacán, Mazatlán y Escuinapa, sin embargo, este serovar no fue detectada en los municipios de Guasave y Angostura, es de mencionar que también hubo una gran diversidad serológica en la región centro específicamente de los municipios de Navolato que representa un total de 29 serovares distintos así como también en Culiacán se encontró un total de 20 serovares diferentes, además la gran diversidad de serovares también se presentó en mayor medida en la región sur del municipio de Escuinapa detectándose 26 serovares diferentes a comparación de la región norte (figura 4).

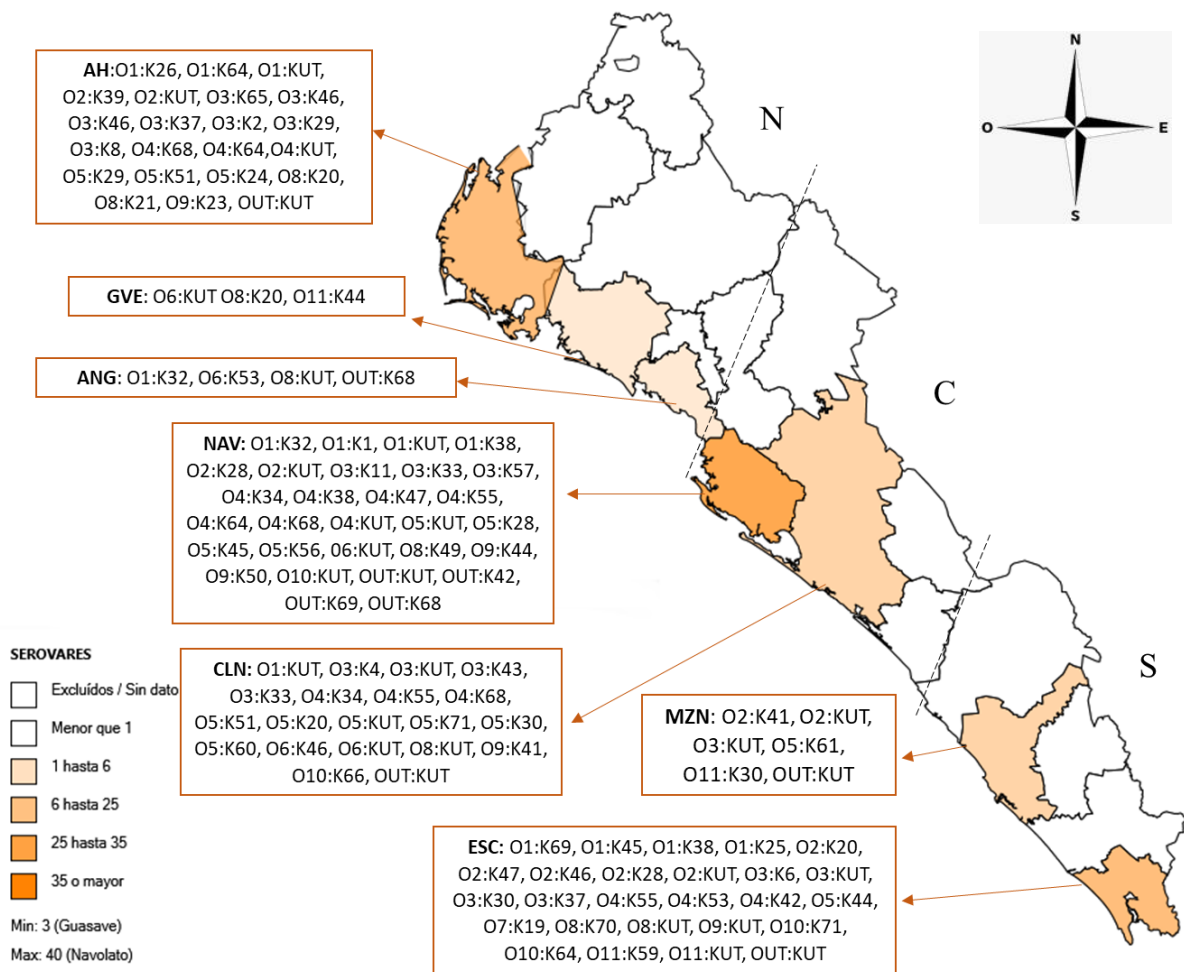


Figura 4. Distribución geográfica de los serovares circulantes de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostión en el estado de Sinaloa. ^a N, región norte de Sinaloa; C, región central de Sinaloa; S, región sur del estado de Sinaloa.

X. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales específicamente del camarón y ostión que fueron recolectadas a largo de todo el estado de Sinaloa del año 2015 al año 2021, esto con el fin de monitorear los factores de virulencia, sus serotipos circulantes y su perfil de resistencia antimicrobiana, estos datos serán útiles para fines epidemiológicos para el control de su diseminación por las costas del Pacífico asegurando la inocuidad alimentaria para la población sinaloense, este trabajo es similar al primer estudio realizado en el estado de Sinaloa, donde se informa sobre el primer brote de gastroenteritis en México causado por *Vibrio parahaemolyticus* debido al consumo de mariscos crudos o poco cocidos que ocurrió en el año del 2004 estos mariscos fueron obtenidos de la laguna Huizache-Caimanero, que se encuentra ubicado en el municipio de Mazatlán en la parte más al norte de la laguna y el resto al del Rosario, ambos municipios del estado de Sinaloa, este brote fue evaluado por Velazquez-Roman y colaboradores en el año del 2012, continuando el monitoreo de estas cepas causantes de diarrea hasta el año 2010, se llevó a cabo la detección de estas bacterias tanto en muestras clínicas como en muestras ambientales, respecto al medio ambiente las muestras que fueron analizadas en ese estudio fueron camarón sedimento y agua del mar, es de destacar que dicho patógeno una vez incorporado en el ser humano puede llegar a tener repercusiones gastrointestinales debido a una serie de factores que contribuyen dicho padecimiento, como las condiciones pobres de salubridad, las temperaturas altas, la salinidad moderada de las aguas costeras, la adquisición de material genético exógeno, estos factores en conjunto le permite sobrevivir ante los cambios bruscos en el medio ambiente (K. D. Brumfield et al., 2023; Ceccarelli, Hasan, Huq, & Colwell, 2013), no obstante, en el estudio anteriormente

mencionado se reportó que en las muestras ambientales analizadas en el periodo del año del 2004 al 2010, un total de 52% (75/144) portaban los principales genes de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*, es decir los genes clásicos *tdh* y *trh*,, no obstante la presencia de estos genes toxigénicos en el estado de Sinaloa siguió permaneciendo hasta el periodo del 2011 al 2013 en otro estudio que se llevó a cabo también en el estado de Sinaloa, (de Jesús Hernández-Díaz et al., 2015), los investigadores reportaron que el 65.2% (30/46) de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* obtenidas de camarón, sedimento y agua del mar fueron clasificadas como patógenas por la presencia del gen *tdh*, sin embargo, estos resultados no coinciden con los obtenidos del presente trabajo, debido a no se detectó ninguna cepa toxigénica de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón y ostión recolectadas en el año del 2015 al 2021, pero coincide con otros estudios que se han reportado desde otras distribuciones geográficas tanto en norteamérica, unión europea y en el medio asiático que determinaron que la presencia de genes toxigénicos en muestras ambientales es atípico representado un total del 0% al 6% (Alam, Tomochika, Miyoshi, & Shinoda, 2002; DePaola, Kaysner, Bowers, & Cook, 2000; C. A. Kaysner, Abeyta, Stott, Lilja, & Wekell, 1990; Vuddhakul et al., 2000; Wong et al., 2000) pero esto no descarta la posibilidad de que cepas no toxigénicas provenientes del medio ambiente pueda implicar un riesgo para la salud pública, ya que se ha reportado cepas de *Vibrio parahaemolyticus* sin la presencia de estos genes toxigénicos que causan un cuadro clínico de gastroenteritis debido a que poseen otros factores de virulencia que pueden estar involucrados en su mecanismo de patogenicidad (Ottaviani et al., 2020; Wagley et al., 2018), por otro lado es importante mencionar que esa detección de genes toxigénicos es más frecuente en muestras clínicas de pacientes con diarrea (G. B. Nair et al., 2007), es destacar que las aguas residuales que contienen las heces de personas infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* pueden llegar a desembocar a mar abierto por lo que esas bacterias que portan en su interior estos genes

virulentos toxigénicos pueden incorporarse en organismos marinos que son aptos para consumo humano como lo son el camarón y el ostión, por lo que una vez contaminados por el patógeno *Vibrio parahaemolyticus* sean ingeridos de nuevo por el consumidor puede presentar de nuevo una enfermedad gastrointestinal pero con mayor severidad clínica. Por otro lado, otros de los factores de virulencia que también se han asociado a cepas de *Vibrio parahaemolyticus* son los genes *toxRS/New* y *orf-8* que son característicos de las cepas pandémicas O3:K6 (Matsumoto et al., 2000). Velazquez-Roman y colaboradores en el año del 2012 reportaron que el 4.1% (6/144) de las muestras ambientales fueron cepas pandémicas, las cuales cuatro de estas contenían el gen *orf-8*, dos provenientes del agua del mar, otra en camarón y una obtenida del sedimento del agua de mar, todas pertenecientes al serotipo O3:K6, así como también se encontró una serovariante de la cepa pandémica con serovar O3:KUT que fue recolectada del agua del mar, de igual manera se detectó una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con serovar O10:KUT sin la presencia del gen *orf-8* pero obtenida del sedimento del agua del mar, todas encontradas en el periodo del 2004 y 2010, interesantemente uno de los resultados ya reportados coincide con el presente estudio donde se encontró una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* que fue fenotípicamente similar con el serovar O3:KUT, así como también presentó una similitud parcial en su genotipo, por lo que en el presente trabajo se determinó una detección positiva a uno de los genes pertenecientes a la clona pandémica el gen *orf-8*, dicha cepa fue obtenida de una muestra ambiental de ostión recolectada en Mazatlán en el año del 2018, es de destacar que la presencia de una cepa pandémica en otros periodos con el mismo serovar que fue obtenida de diferente muestra ambiental nos indica que aún prevalece aquellos genes pandémicos en cepas no pandémicas, demostrando que la transferencia horizontal de genes permite que las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en constante evolución adquieran los factores de virulencia (Ceccarelli et al., 2013), sin embargo, por la falta de conocimiento sobre el mecanismo de patogenicidad

aún no se han establecido nuevos genes de virulencia para un diagnóstico molecular que permite el monitoreo de este patógeno. Además de la búsqueda de genes toxigénicos y pandémicos, también se llevó a cabo la serotipificación de estas cepas con fines epidemiológicos por lo que en el presente trabajo la interacción de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con los antisueros permitió observar mediante aglutinación que las muestras ambientales de camarón y ostión presentan una gran serodiversidad sobre los antígenos que estas poseen, siendo el serogrupo más prevalente el serogrupo no tipificable O (OUT) con un 16.91% (23/136) seguido del serogrupo O3 con un 15.44% (21/136), estos resultados difieren de otro estudio reportado donde se analizaron muestras recolectadas del estado de Sinaloa en el auge del brote de gastroenteritis en el año del 2004, en dicho reporte se determinó que el serogrupo más predominante fue el O1 con un 26% (37/144) (Velazquez-Roman et al., 2012), seguido del serogrupo O3 con una proporción de un 15.3% del total de la muestras analizadas (22/144), se observó también la presencia de estos serogrupos circulantes en el periodo del 2011 al 2013 pero en ese estudio si coincidió con los serogrupos más predominantes en las costas del pacifico, de Jesús Hernández-Díaz L y col., 2015 concluyeron que el serogrupo más prevalente fue OUT con un 41.30% (19/46) seguido del serogrupo O3 con un 32.60% (15/46) del total, estos resultados nos demuestra que el serogrupo OUT y O3 se encuentra más presente en el medio ambiente. Es de destacar que los resultados del presente estudio también coinciden con un estudio previo acerca del Golfo de México donde se menciona que el serogrupo más predominante fue el O3 (Cabrera-García, Vázquez-Salinas, & Quiñones-Ramírez, 2004), puede ser que con el paso del tiempo haya podido migrar desde esa distribución geográfica a otra, ya sea incorporándose en la microbiota intestinal de animales salvajes como las tortugas en la que se ha detectado la presencia del patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en las costas del Pacífico (Zavala-Norzagaray et al., 2015), o provenientes de las superficies de los barcos como bioinvasiones adheridas

provenientes del medio oriente donde se ha detectado cepas patogénicas *tdh* y *trh* junto con el gen *orf-8* del serogrupo pandémico O3:K6 (Revilla-Castellanos 2012) así como también las aves migratorias acuáticas que pueden ser fácilmente colonizadas por *Vibrio parahaemolyticus* (Zheng et al., 2023) o desde el manejo de mariscos provenientes de diferentes comerciantes de mariscos, donde existió una interacción con otras bacterias que poseen distintas características genéticas intercambiando el material genético. Cabe destacar que se ha observado una disminución drástica de pasar a ninguna detección de cepas pandémicas de *Vibrio parahaemolyticus* del año 2015 al 2021 a los dos únicos estudios realizados en el estado de Sinaloa que abarca del año 2004 al año 2013 (Velazquez-Roman J, y col., 2012 y de Jesús Hernández-Díaz L y col., 2015) donde si se detectó mayormente la presencia de cepas pandémicas 2.7% (144) para las aisladas en el año 2004 al 2010 y 2.1% (46) aisladas del año 2011 al 2013. Velazquez-Roman y colaboradores en el año del 2012 identificaron seis serovares que no habían sido establecidas en la tipificación serológica emitida por el comité japonés, O3:K32, O3:K68, O4: K68, O6:K6, O8:K8 y O10:K52, por otra parte, de Jesús Hernández-Díaz L y colaboradores en el año 2015 también encontraron nuevos serovares como O4:K4, O5:K30, OUT: K6, en ambos estudios se analizaron muestras ambientales como sedimento, agua del mar y camarón recolectadas del año 2004 al 2013. En el presente estudio se detectaron alrededor de 28 serovares que no se han reportado de los aislados de las muestras ambientales camarón y ostión, lo serovares son: O2:K20, O2:K39, O2:K41, O2:K46, O2:K47, O3: K2, O3:K11, O3:K18, O4:K38, O4:K47, O4:K64, O5:K20, O5:K24, O5:K28, O5:K29, O5:K44, O5:K45, O5:K51, O5:K56, O5:K71, O6:K53, O8:K49, O9:K50, O11:K30, O11:K44, O11:K59, OUT: K68, OUT: K69, esto conlleva a que estos datos concuerdan con otros estudios ya reportados en que las cepas ambientales de *Vibrio parahaemolyticus* son muy diversos en su estructura antigénica, debido a que contienen altas tasas de recombinación en su genoma permitiendo la

supervivencia frente a los ambientes externos cambiantes, por lo que debe indagar más acerca de esto, para poder salvaguardar la salud de los consumidores, siendo que podría existir otros factores de virulencia con distintos serotipos circulantes que aún no han sido descubiertos diseminándose alrededor del mundo (G. B. Nair et al., 2007), cabe mencionar que si se detectó serovares similares en el presente estudio con otros estudios ya reportados, siendo que los más prevalentes en este estudio fueron los serovares OUT:KUT (19/136), O2:KUT, O3:KUT (5/136), O4:KUT, O4:K68 (4/136), O5:KUT, O8:KUT, O6:KUT (3/136) (de Jesús Hernández-Díaz et al., 2015; J. Li et al., 2016; Ottaviani et al., 2010; Velazquez-Roman et al., 2012). El motivo por el cual las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* son tan serodiversas de diferente fuente ambiental, podría deberse a que en las muestras analizadas de agua y sedimento del mar, no exista tanta presencia de dicho patógeno a comparación de las muestras analizadas en el presente estudio como el molusco bivalvo ostión, debido a como se había descrito anteriormente este organismo marino es un reservorio natural de múltiples bacterias incluyendo *Vibrio parahaemolyticus* acumulándose en su interior en gran medida debido al funcionamiento de las ostras que son filtradoras de agua del mar (Froelich & Noble, 2016), por ende la interacción con enterobacterias permite que adquieran otras características antigénicas mediante el intercambio de material genético (Yang et al., 2020), por otro lado en el camarón, también se observa una predisposición continua de cambio genéticos por sus diversas características fenotípicas que comparten en el mismo nicho biológico. Respecto a los sitios de recolección de las muestras ambientales, es de mencionar que se observó mayor diversidad serológica en la región centro del estado de Sinaloa específicamente en el municipio de Navolato (40/136), cabe mencionar que en el municipio de Navolato, Escuinapa y Ahone se encuentran delimitadas por múltiples Unidades de Producción Acuícola de Ostión todo esto regulado por una institución llamada CESASIN (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa) donde se producen alrededor de

853.95 toneladas (7 millones 116 mil 232 piezas) municipios en donde existen más instalaciones acuícolas o zonas pesqueras, por otro lado, se encontró solamente una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* que es fenotípicamente similar al serovar pandémico O3:K6 en el municipio de Escuinapa del estado de Sinaloa, no obstante, esta no portaba los genes característicos de las clonas pandémicas, por lo que no se conoce si esta cepa de *Vibrio parahaemolyticus* puede implicar un riesgo en la salud, es por ello por lo que requiere más investigación científica. En los últimos años se ha observado cepas de *Vibrio parahaemolyticus* resistentes a los antibióticos debido al abuso de estas en la acuicultura (Kang et al., 2017), sin embargo en otros estudios ha determinado en estudios anteriores que en las costas del estado de Sinaloa que las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de muestras ambientales en su mayoría presentan un perfil de resistencia ante el antibiótico de la ampicilina con un 89.7% (78/87) del periodo 2004-2010 y con un 100% (32/32) del total de muestras obtenidas del periodo del 2011-2013 (Velazquez-Roman J, y col., 2012 y de Jesús Hernández-Díaz L y col., 2015), en el presente estudio se determinó que en el periodo del 2015 al 2021 un aumento de la proporción de cepas resistentes al antibiótico ciprofloxacino con un 73% (99/136) a comparación del periodo 2004 al 2010 donde solo una muestra 1.1% (1/87) del total presentó resistencia al antibiótico anteriormente mencionado siendo que no se detectó cepas de *Vibrio parahaemolyticus* resistentes a ciprofloxacino en el periodo del 2011 al 2013. El total de las cepas ambientales fueron sensibles a los antibióticos como ácido nalidíxico, cloranfenicol y tetraciclina, por lo que siguen siendo eficaces contra *Vibrio parahaemolyticus* como tratamiento a gastroenteritis causada por este patógeno, resultados que también se observó en otros estudios reportados como Velazquez-Roman J, y colaboradores en el 2012 y de Jesús Hernández-Díaz L y colaboradores en el 2015. Se determinó que de los 136 aislados reveló que 74 de ellos (54.41%) eran resistentes en al menos un agente antimicrobiano, mientras que solamente dos (1.47%) cepas fueron sensibles a

todos los antibióticos utilizados en el presente estudio, por otro lado 60 (44.11%) cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron multidrogoresistentes que en su mayoría fueron a betalactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas y fluroquinolonas, por lo que aumentó considerablemente las cepas resistentes a dos o más antibióticos (multirresistentes) en comparación con el periodo del 2004-2010 donde se detectó solamente dos cepas resistente (2/87) en al menos tres fármacos o más, siendo que se encontró en menos medida en el periodo 2011-2013 con una cepa multirresistente (1/32) (de Jesús Hernández-Díaz et al., 2015; Velazquez-Roman et al., 2012). Es por ello que es necesario continuar con la investigación de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana para la detección de estos patrones de resistencia y se disminuya el uso indiscriminado de estos fármacos para evitar una farmacoressitencia. Estos resultados nos muestran la persistencia de *Vibrio parahaemolyticus* en organismos marinos como camarón y ostión, por lo que es necesario mantener una cadena de frío para inhibir el desarrollo de esta bacteria ya que una vez expuestos a una temperatura ambiente estas bacterias pueden multiplicarse (Phuvasate, Chen, & Su, 2012) representando un riesgo para los consumidores. Por consiguiente, es muy importante desarrollar medidas de control para poder garantizar la seguridad alimentaria disminuyendo los riesgos de infección que *Vibrio parahaemolyticus*, todo esto mediante la vigilancia epidemiológica, así como también métodos moleculares para la detección de dicho patógeno en el medio ambiente, para el aislamiento y la identificación de esta bacteria que ha estado involucrada en muchos brotes de gastroenteritis alrededor del mundo.

XI. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* se analizaron molecularmente, serológicamente, además de evaluar su perfil de resistencia antimicrobiana, obtenidas de tres regiones representando todo el estado de Sinaloa del periodo del 2015 al 2021.
2. El total de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* son no toxigénicas, por otro lado, el 1.47% (2/136) se detectó la presencia de genes de interés pertenecientes a las clonas pandémicas, siendo una con genes *toxRS/New* y *orf-8*, y la otra con el gen *orf-8*.
3. El serogrupo más prevalente de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en las muestras ambientales (camarón y ostión) fue O3 representando el 15.44% (21/136) y el O4 14.71% (20/136) así como también aquellas que no fueron reconocidas por antisueros O (OUT) con un 16.91% (23/136) del total.
4. Los serovares de mayor incidencia fueron OUT: KUT 13.97% (19/146), O2: KUT 3.68% (5/136), O3: KUT 3.68% (5/136).
5. Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* presentaron un perfil de resistencia más común con ampicilina 96% (131/136) seguido de ciprofloxacino 73% (33/136), así como también a la cefotaxima 47% (64/136).
6. Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* multidrogorresistentes es decir aquellas que presentan resistencia a tres o más antibióticos de diferente familia representaron un total de 44.11% (60/136) del periodo del 2015 al 2021.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, M. J., Tomochika, K. I., Miyoshi, S. I., & Shinoda, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol Lett*, 208(1), 83-87. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11064.x
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-19. doi:10.1038/s41572-018-0005-8
- Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., & Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 7-18.
- Balsalobre-Arenas, L., & Alarcón-Cavero, T. (2017). Rapid diagnosis of gastrointestinal tract infections due to parasites, viruses, and bacteria. [Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 35(6), 367-376. doi:10.1016/j.eimc.2017.01.002
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C., Jones, D. D., & Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods*, 36(3), 215-225. doi:10.1016/s0167-7012(99)00037-8
- Ben-Yaakov, R., & Salomon, D. (2019). The regulatory network of *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Environmental microbiology*, 21(7), 2248-2260. doi:10.1111/1462-2920.14594

- Bonnin-Jusserand, M., Copin, S., Le Bris, C., Brauge, T., Gay, M., Brisabois, A., . . . Midelet-Bourdin, G. (2019). *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *59*(4), 597-610. doi:10.1080/10408398.2017.1384715
- Brehm, T. T., Berneking, L., Sena Martins, M., Dupke, S., Jacob, D., Drechsel, O., . . . German Vibrio Study, G. (2021). Heatwave-associated *Vibrio* infections in Germany, 2018 and 2019. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, *26*(41), 2002041. doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.41.2002041
- Broberg, C. A., Calder, T. J., & Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and infection*, *13*(12-13), 992-1001. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.013
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*: Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.
- Brumfield, K. D., Chen, A. J., Gangwar, M., Usmani, M., Hasan, N. A., Jutla, A. S., . . . Colwell, R. R. (2023). Environmental Factors Influencing Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*, *89*(6), e0030723. doi:10.1128/aem.00307-23
- Brumfield, K. D., Usmani, M., Chen, K. M., Gangwar, M., Jutla, A. S., Huq, A., & Colwell, R. R. J. E. M. (2021). Environmental parameters associated with incidence and transmission of pathogenic *Vibrio* spp.
- Cabanillas-Beltrán, H., E, L. L.-M., Romero, R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M., . . . Gomez-Gil, B. (2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic

- Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol Lett*, 265(1), 76-80.
doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00475.x
- Cabrera-García, M. E., Vázquez-Salinas, C., & Quiñones-Ramírez, E. I. (2004). Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6401-6406. doi:10.1128/aem.70.11.6401-6406.2004
- Canizalez-Roman, A., Flores-Villaseñor, H., Zazueta-Beltran, J., Muro-Amador, S., & León-Sicairos, N. (2011). Comparative evaluation of a chromogenic agar medium-PCR protocol with a conventional method for isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains from environmental and clinical samples. *Can J Microbiol*, 57(2), 136-142. doi:10.1139/w10-108
- Ceccarelli, D., Hasan, N. A., Huq, A., & Colwell, R. R. (2013). Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 97. doi:10.3389/fcimb.2013.00097
- Chien, S.-C., Chang, C.-C., & Chien, S.-C. (2021). Spontaneous small bowel perforation secondary to *Vibrio parahaemolyticus* infection: A case report. *World journal of clinical cases*, 9(5), 1210-1214. doi:10.12998/wjcc.v9.i5.1210
- Chimalapati, S., de Souza Santos, M., Servage, K., De Nisco, N. J., Dalia, A. B., & Orth, K. (2018). Natural Transformation in *Vibrio parahaemolyticus*: a Rapid Method To Create Genetic Deletions. *J Bacteriol*, 200(15), e00032-00018. doi:10.1128/JB.00032-18
- CLSI (2020) CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. Vol. 40.
- de Jesús Hernández-Díaz, L., León-Sicairos, N., Velázquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., Guadron-Llanos, A. M., Martínez-García, J. J., . . . Canizalez-Roman, A. (2015). A

- pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone causing most associated diarrhea cases in the Pacific Northwest coast of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 6, 221. doi:10.3389/fmicb.2015.00221
- DePaola, A., Kaysner, C. A., Bowers, J., & Cook, D. W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4649-4654. doi:10.1128/aem.66.11.4649-4654.2000
- Dutta, D., Kaushik, A., Kumar, D., & Bag, S. (2021). Foodborne Pathogenic Vibrios: Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology*, 12, 638331. doi:10.3389/fmicb.2021.638331
- Elmahdi, S., DaSilva, L. V., & Parveen, S. (2016). Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 57, 128-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.008>
- Federici, S., Serrazanetti, D. I., Guerzoni, M. E., Campana, R., Ciandrini, E., Baffone, W., & Gianotti, A. (2018). Development of a rapid PCR protocol to detect *Vibrio parahaemolyticus* in clams. *Journal of food science and technology*, 55(2), 749-759. doi:10.1007/s13197-017-2986-9
- Froelich, B. A., & Noble, R. T. (2016). *Vibrio* bacteria in raw oysters: managing risks to human health. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371(1689). doi:10.1098/rstb.2015.0209
- Getto, L., Zeserson, E., & Breyer, M. (2011). Vomiting, diarrhea, constipation, and gastroenteritis. *Emergency medicine clinics of North America*, 29(2), 211-viii. doi:10.1016/j.emc.2011.01.005
- Gil, A. I., Miranda, H., Lanata, C. F., Prada, A., Hall, E. R., Barreno, C. M., . . . Nair, G. B. (2007). O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic

- clone associated with diarrhea in Peru. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(4), 324-328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.08.003>
- Graves, N. S. (2013). Acute gastroenteritis. *Primary care*, 40(3), 727-741. doi:10.1016/j.pop.2013.05.006
- Gregory, G. J., & Boyd, E. F. (2021). Stressed out: Bacterial response to high salinity using compatible solute biosynthesis and uptake systems, lessons from Vibrionaceae. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 1014-1027. doi:10.1016/j.csbj.2021.01.030
- Hamada, D., Higurashi, T., Mayanagi, K., Miyata, T., Fukui, T., Iida, T., . . . Yanagihara, I. (2007). Tetrameric Structure of Thermostable Direct Hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* Revealed by Ultracentrifugation, Small-angle X-ray Scattering and Electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 365(1), 187-195. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.070>
- Hamada, D., Higurashi, T., Mayanagi, K., Miyata, T., Fukui, T., Iida, T., . . . Yanagihara, I. (2007). Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle X-ray scattering and electron microscopy. *J Mol Biol*, 365(1), 187-195. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.070
- Hammerl, J. A., Ritchie, J. M., Leoni, F., Banerjee, S., & Strauch, E. (2022). Editorial: Molecular Adaptations of Vibrionaceae to Changing Environments, Volume II. *Frontiers in microbiology*, 13, 863038-863038. doi:10.3389/fmicb.2022.863038
- Han, F., Walker, R. D., Janes, M. E., Prinyawiwatkul, W., & Ge, B. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and environmental microbiology*, 73(21), 7096-7098. doi:10.1128/AEM.01116-07

- Hiyoshi, H., Kodama, T., Iida, T., & Honda, T. (2010). Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and immunity*, 78(4), 1772-1780.
- Humphries, R. M., & Linscott, A. J. (2015). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 3-31. doi:10.1128/CMR.00073-14
- Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Igbinosa, I. H., Ogofure, A. G., & Uwhuba, K. E. (2021). Prevalence and Characterization of Food-Borne *Vibrio parahaemolyticus* From African Salad in Southern Nigeria. *Frontiers in microbiology*, 12, 632266-632266. doi:10.3389/fmicb.2021.632266
- Jiang, C., Tanaka, M., Nishikawa, S., Mino, S., Romalde, J. L., Thompson, F. L., . . . Sawabe, T. (2021). *Vibrio* Clade 3.0: New Vibrionaceae Evolutionary Units Using Genome-Based Approach. *Current Microbiology*, 79(1), 10. doi:10.1007/s00284-021-02725-0
- Jorgensen, J. H., & Hindler, J. F. (2007). New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Clin Infect Dis*, 44(2), 280-286. doi:10.1086/510431
- Jung, S. W. (2018). A foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Vibrio parahaemolyticus* associated with cross-contamination from squid in Korea. *Epidemiol Health*, 40, e2018056. doi:10.4178/epih.e2018056
- Kalburge, S. S., Whitaker, W. B., & Boyd, E. F. (2014). High-Salt Preadaptation of *Vibrio parahaemolyticus* Enhances Survival in Response to Lethal Environmental Stresses. *Journal of Food Protection*, 77(2), 246-253. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-241
- Kang, C. H., Shin, Y., Jang, S., Yu, H., Kim, S., An, S., . . . So, J. S. (2017). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various

- antibiotics and prevalence of virulence genes. *Mar Pollut Bull*, 118(1-2), 261-266.
doi:10.1016/j.marpolbul.2017.02.070
- Kaysner, C., & DePaola, A. (1998). *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp., chapter 9. *Bacteriological analytical manual online*, 8th ed., revision A.
- Kaysner, C. A., Abeyta, C., Jr., Stott, R. F., Lilja, J. L., & Wekell, M. M. (1990). Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. *Applied and environmental microbiology*, 56(4), 904-907. doi:10.1128/aem.56.4.904-907.1990
- Kaysner, C. A., De Paola, A., Jones, J. J. B. A. M., USA, F., & Drug Administration: Silver Spring, M., USA. (2004). BAM chapter 9: *Vibrio*. 8.
- Kaysner, C. A., & DePaola, A. BAM Chapter 9: *Vibrio*.
- Kodama, T., Yamazaki, C., Park, K.-S., Akeda, Y., Iida, T., & Honda, T. J. F. m. l. (2010). Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS. *311*(1), 10-17.
- Letchumanan, V., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in microbiology*, 5, 705-705. doi:10.3389/fmicb.2014.00705
- Li, J., Xue, F., Yang, Z., Zhang, X., Zeng, D., Chao, G., . . . Li, B. J. F. i. m. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* strains of pandemic serotypes identified from clinical and environmental samples from Jiangsu, China. 7, 787.
- Li, P., Rivera-Cancel, G., Kinch, L. N., Salomon, D., Tomchick, D. R., Grishin, N. V., & Orth, K. (2016). Bile salt receptor complex activates a pathogenic type III secretion system. *eLife*, 5, e15718. doi:10.7554/eLife.15718

- Li, R., Wang, J., Wang, L., Hu, B., Liu, Z., Sun, N., . . . Guo, X. (2021). Genetic and serological characterization of capsular antigen untypeable *Vibrio parahaemolyticus* strains reveal novel K serotypes and epidemiological characteristics in Shandong, China. *Int J Food Microbiol*, *347*, 109188. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109188
- Li, Y. J., Yang, Y. F., Zhou, Y. J., Zhang, R. H., Liu, C. W., Liu, H., . . . Wu, Y. N. (2022). Estimating the burden of foodborne gastroenteritis due to nontyphoidal *Salmonella enterica*, *Shigella* and *Vibrio parahaemolyticus* in China. *PloS one*, *17*(11), e0277203. doi:10.1371/journal.pone.0277203
- Lian, L., Xue, J., Li, W., Ren, J., Tang, F., Liu, Y., . . . Dai, J. (2021). VscF in T3SS1 Helps to Translocate VPA0226 in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 652432-652432. doi:10.3389/fcimb.2021.652432
- Liu, J., Qin, K., Wu, C., Fu, K., Yu, X., & Zhou, L. (2021). De Novo Sequencing Provides Insights Into the Pathogenicity of Foodborne *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 652957. doi:10.3389/fcimb.2021.652957
- Liu, M., & Chen, S. (2015). A novel adhesive factor contributing to the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific reports*, *5*, 14449-14449. doi:10.1038/srep14449
- Liu, M., Yang, S., Zheng, C., Luo, X., Bei, W., & Cai, P. (2018). Binding to type I collagen is essential for the infectivity of *Vibrio parahaemolyticus* to host cells. *Cell Microbiol*, *20*(9), e12856. doi:10.1111/cmi.12856
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., . . . Iida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet*, *361*(9359), 743-749. doi:10.1016/s0140-6736(03)12659-1

- Malcolm, T. T. H., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Cheah, Y. K., Radzi, C., Kantilal, H. K., . . . Son, R. (2018). Simulation of improper food hygiene practices: A quantitative assessment of *Vibrio parahaemolyticus* distribution. *Int J Food Microbiol*, 284, 112-119. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.012
- Manjusha, S., & Sarita, G. B. (2011). Plasmid associated antibiotic resistance in *Vibrios* isolated from coastal waters of Kerala. *International Food Research Journal*, 18(3).
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., . . . Nishibuchi, M. (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J Clin Microbiol*, 38(2), 578-585. doi:10.1128/JCM.38.2.578-585.2000
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1(1), 51-57.
- Molenda, J. R., Johnson, W. G., Fishbein, M., Wentz, B., Mehlman, I. J., & Dadisman, T. A., Jr. (1972). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: laboratory aspects. *Applied microbiology*, 24(3), 444-448. doi:10.1128/am.24.3.444-448.1972
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología médica*: Elsevier Health Sciences.
- Myers, M. L., Panicker, G., & Bej, A. K. (2003). PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2194-2200. doi:10.1128/AEM.69.4.2194-2200.2003

- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., & Sack, D. A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 39-48. doi:10.1128/cmr.00025-06
- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., & Sack, D. A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 39-48. doi:10.1128/CMR.00025-06
- Nasu, H., Iida, T., Sugahara, T., Yamaichi, Y., Park, K. S., Yokoyama, K., . . . Honda, T. (2000). A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol*, 38(6), 2156-2161. doi:10.1128/JCM.38.6.2156-2161.2000
- Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., & Watanabe, H. (2003). Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*, 41(10), 4676-4682. doi:10.1128/JCM.41.10.4676-4682.2003
- Osawa, R., Arakawa, E., Okitsu, T., Yamai, S., & Watanabe, H. (2002). Levels of thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 and other serovars grown anaerobically with the presence of a bile acid. *Current Microbiology*, 44(4), 302-305.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Canonico, C., Potenziani, S., Santarelli, S., . . . Carraturo, A. J. E. M. R. (2010). Prevalence, serotyping and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels from Italian growing areas, Adriatic Sea. 2(1), 192-197.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Serra, R., Serracca, L., Decastelli, L., Rocchegiani, E., . . . Carraturo, A. (2020). Nontoxigenic *Vibrio parahaemolyticus* Strains Causing Acute Gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 50(12), 4141-4143. doi:10.1128/jcm.01993-12

- Parthasarathy, S., Das, S. C., Kumar, A., Chowdhury, G., Miyoshi, S. I., Dutta, S., & Mukhopadhyay, A. K. (2021). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Indian oyster and their probable implication in food chain. *World J Microbiol Biotechnol*, 37(8), 145. doi:10.1007/s11274-021-03113-3
- Phuvasate, S., Chen, M.-H., & Su, Y.-C. (2012). Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by depuration at various temperatures. *Food Microbiology*, 31(1), 51-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.004>
- Raghunath, P. (2015). Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in microbiology*, 5, 805-805. doi:10.3389/fmicb.2014.00805
- Robert-Pillot, A., Guenole, A., & Fournier, J. M. (2002). Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. *FEMS Microbiol Lett*, 215(1), 1-6. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11362.x
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Gao, F., Amin, A., Mino, S., . . . Hayashi, T. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00414
- Shimohata, T., & Takahashi, A. (2010). Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Med Invest*, 57(3-4), 179-182. doi:10.2152/jmi.57.179
- Shinoda, S. (2011). Sixty Years from the Discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and Some Recollections. *Biocontrol Science*, 16(4), 129-137. doi:10.4265/bio.16.129
- Sony, M., Sumithra, T., Anusree, V., Amala, P., Reshma, K., Alex, S., & Sanil, N. J. A. (2021). Antimicrobial resistance and virulence characteristics of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio*

- parahaemolyticus and *Vibrio harveyi* from natural disease outbreaks of marine/estuarine fishes. *539*, 736608.
- Souza, C. P., Almeida, B. C., Colwell, R. R., & Rivera, I. N. (2011). The importance of chitin in the marine environment. *Mar Biotechnol (NY)*, *13*(5), 823-830. doi:10.1007/s10126-011-9388-1
- Takedani, Y., Nakamura, T., Fukiwake, N., Imada, T., Mashino, J., & Morimoto, T. (2021). Clinical characteristics and factors related to antibiotic-associated diarrhea in elderly patients with pneumonia: a retrospective cohort study. *BMC Geriatrics*, *21*(1), 317. doi:10.1186/s12877-021-02267-x
- Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T. Y., Lee, E., Rollon, W. D., . . . Radu, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi journal of biological sciences*, *27*(6), 1602-1608. doi:10.1016/j.sjbs.2020.01.002
- Tan, C. W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T. Y., Lee, E., Rollon, W. D., . . . Radu, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi journal of biological sciences*, *27*(6), 1602-1608. doi:10.1016/j.sjbs.2020.01.002
- Thode, S. K., Rojek, E., Kozlowski, M., Ahmad, R., & Haugen, P. (2018). Distribution of siderophore gene systems on a Vibrionaceae phylogeny: Database searches, phylogenetic analyses and evolutionary perspectives. *PloS one*, *13*(2), e0191860-e0191860. doi:10.1371/journal.pone.0191860
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *68*(3), 403-431. doi:10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004

- Tsunasawa, S., Sugihara, A., Masaki, T., Sakiyama, F., Takeda, Y., Miwatani, T., & Narita, K. (1987). Amino Acid Sequence of Thermostable Direct Hemolysin Produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Biochemistry*, *101*(1), 111-121.
- Valdez, C., Costa, C., Simões, M., de Carvalho, C. C. C. R., Baptista, T., & Campos, M. J. (2022). Detection of mcr-1 Gene in Undefined Vibrio Species Isolated from Clams. *Microorganisms*, *10*(2), 394. doi:10.3390/microorganisms10020394
- Velazquez-Roman, J., León-Sicairos, N., de Jesus Hernández-Díaz, L., & Canizalez-Roman, A. (2014). Pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6 on the American continent. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *3*, 110-110. doi:10.3389/fcimb.2013.00110
- Velazquez-Roman, J., León-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Villafaña-Rauda, S., & Canizalez-Roman, A. (2012). Association of pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Applied and environmental microbiology*, *78*(6), 1794-1803. doi:10.1128/AEM.06953-11
- Vila, J., Alvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009). Microbiological diagnosis of gastrointestinal infections. [Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, *27*(7), 406-411. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.009
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., . . . Wolfs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, *7*, 173. doi:10.3389/fmicb.2016.00173
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprertthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., . . . Nishibuchi, M. (2000). Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a

- Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2685-2689. doi:10.1128/aem.66.6.2685-2689.2000
- Wagley, S., Borne, R., Harrison, J., Baker-Austin, C., Ottaviani, D., Leoni, F., . . . Titball, R. W. (2018). *Galleria mellonella* as an infection model to investigate virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Virulence*, 9(1), 197-207. doi:10.1080/21505594.2017.1384895
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*, 182(10), 2675-2679. doi:10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000
- Wayne, P. J. C. d. M.-S. (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests 19th ed. approved standard. 29(2011), M100-S121.
- Whitaker, W. B., Parent, M. A., Naughton, L. M., Richards, G. P., Blumerman, S. L., & Boyd, E. F. (2010). Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4720-4729. doi:10.1128/AEM.00474-10
- Wong, H. C., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Liu, D. P., . . . Lee, B. K. (2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 3981-3986. doi:10.1128/aem.66.9.3981-3986.2000
- Yang, L., Wang, Y., Yu, P., Ren, S., Zhu, Z., Jin, Y., . . . Chen, L. (2020). Prophage-Related Gene *VpaChn25_0724* Contributes to Cell Membrane Integrity and Growth of *Vibrio parahaemolyticus* CHN25. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 595709. doi:10.3389/fcimb.2020.595709
- Yildiz, F. H., & Visick, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in microbiology*, 17(3), 109-118. doi:10.1016/j.tim.2008.12.004

- Yin, Y., Yin, Y., Yang, H., Chen, Z., Zheng, J., & Peng, B. (2022). *Vibrio alginolyticus* Survives From Ofloxacin Stress by Metabolic Adjustment. *Frontiers in microbiology*, *13*, 818923-818923. doi:10.3389/fmicb.2022.818923
- Zavala-Norzagaray, A. A., Aguirre, A. A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., Ley-Quíñonez, C. P., . . . Canizalez-Roman, A. (2015). Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. *Frontiers in microbiology*, *6*, 635. doi:10.3389/fmicb.2015.00635
- Zhang, H., Morrison, S., & Tang, Y.-W. (2015). Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clinics in laboratory medicine*, *35*(2), 461-486. doi:10.1016/j.cll.2015.02.006
- Zhang, L., Krachler, A. M., Broberg, C. A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C. J., & Orth, K. (2012). Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell reports*, *1*(5), 453-460.
- Zhang, L., & Orth, K. (2013). Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr Opin Microbiol*, *16*(1), 70-77. doi:10.1016/j.mib.2013.02.002
- Zhang, P., Wu, X., Yuan, R., Yan, W., Xu, D., Ji, L., & Chen, L. (2022). Emergence and predominance of a new serotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Huzhou, China. *International Journal of Infectious Diseases*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.05.023>
- Zhang, X. H., & Austin, B. (2005). Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol*, *98*(5), 1011-1019. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02583.x
- Zheng, L., Yang, C., Chen, P., Zhu, L., Wen, H., Liu, M., . . . Guo, X. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* from Migratory Birds in China Carries an Extra Copy of tRNA-Gly

and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene qnrD. *Microbiol Spectr*, 11(4), e0217022. doi:10.1128/spectrum.02170-22

XIII. ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

NaCl: Cloruro sódico.

ORF-8: Marco de lectura abierto 8.

Pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

T3SS1: Sistema de secreción I.

T3SS2: Sistema de secreción II.

tdh: Hemolisina directa termoestable.

tlh: Hemolisina termolábil.

toxRS/New: Operón secuencia genética única.

trh: Hemolisina relacionada a tdh.

µl: Microlitro.

ATTC: Colección Americana de Cultivos (American Type Culture Collection).

LB: Luria Bertani.

XIV. ANEXOS

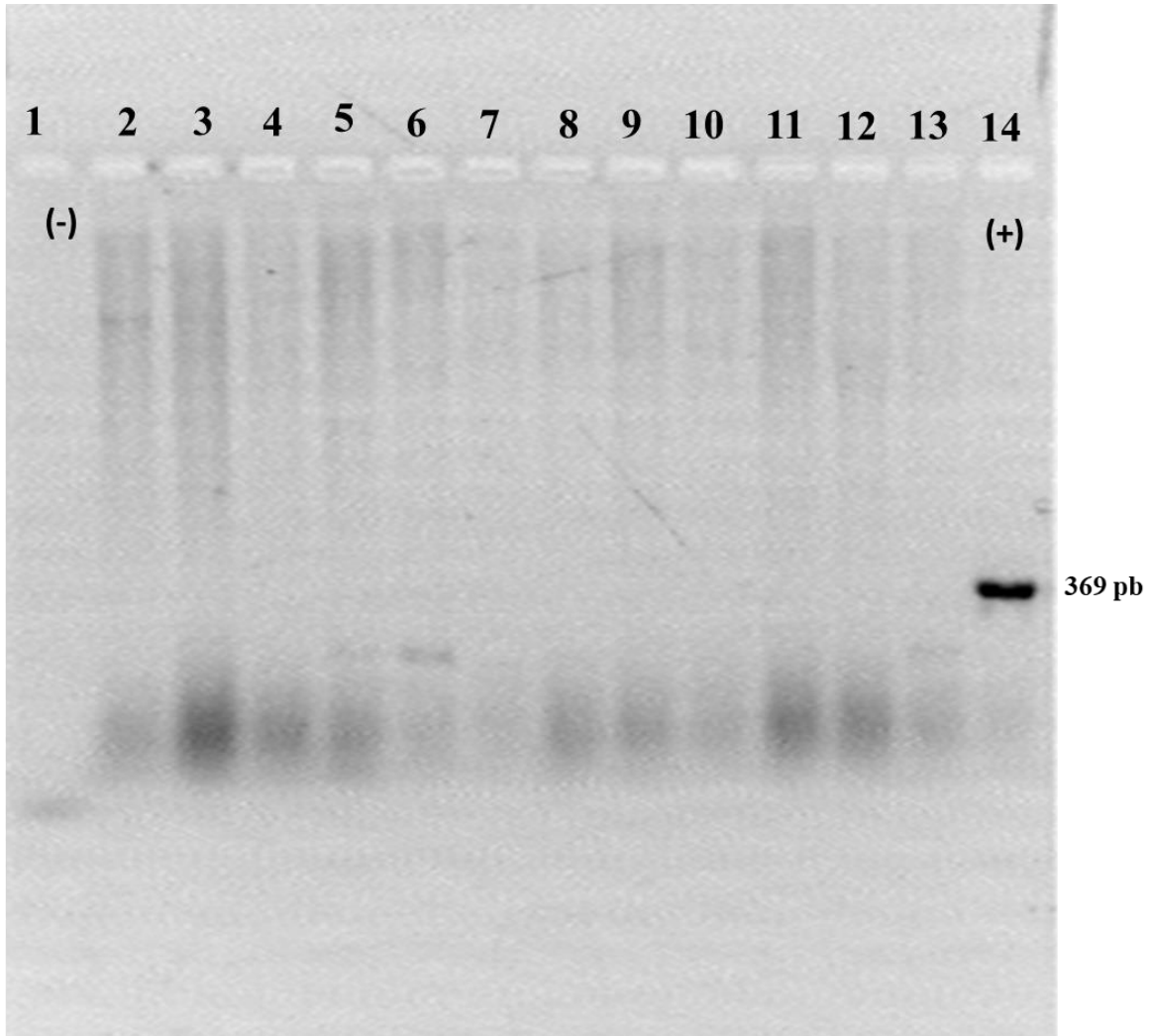


Figura 5. PCR monoplex con primers dirigidos al gen *orf-8* de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: control negativo, bandas inespecíficas. Carril 2-12: muestras negativas para el gen ORF-8. Carril 14: control positivo TX2103 del gen *orf-8* con un tamaño de 369 pb.

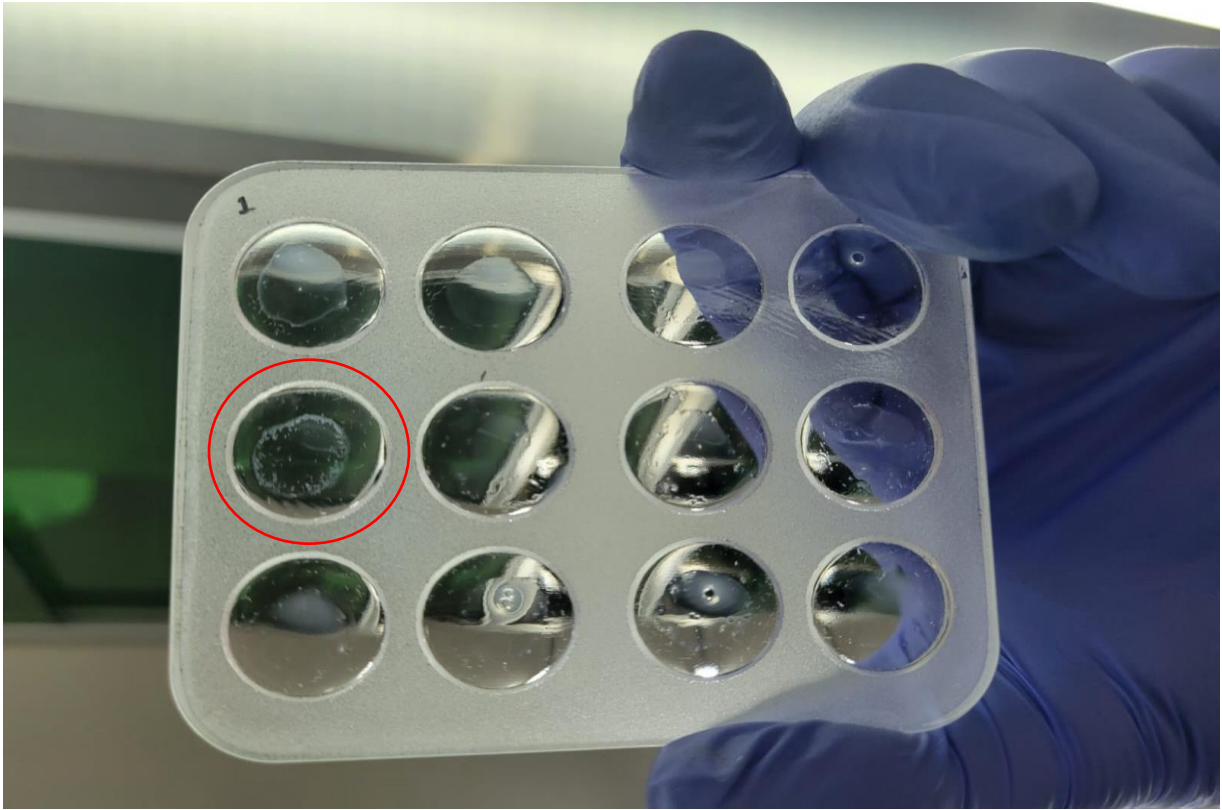


Figura 6. Aglutinación positiva de una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* proveniente de una muestra de camarón, se visualiza la interacción de uno de los 65 antiseros disponibles para el antígeno “K”. Pocillo marcado como número 1 es el control negativo, solución salina con cepa de *Vibrio parahaemolyticus*.



Figura 7. Aglutinación positiva de una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* proveniente de una muestra de ostión, se observa la interacción de los 11 antisueros disponibles para el antígeno “O” en todos los pocillos, por lo que se determina que es una cepa con serotipo O:137. Pocillo marcado como número 1 es el control negativo, solución salina con cepa de *Vibrio parahaemolyticus*.

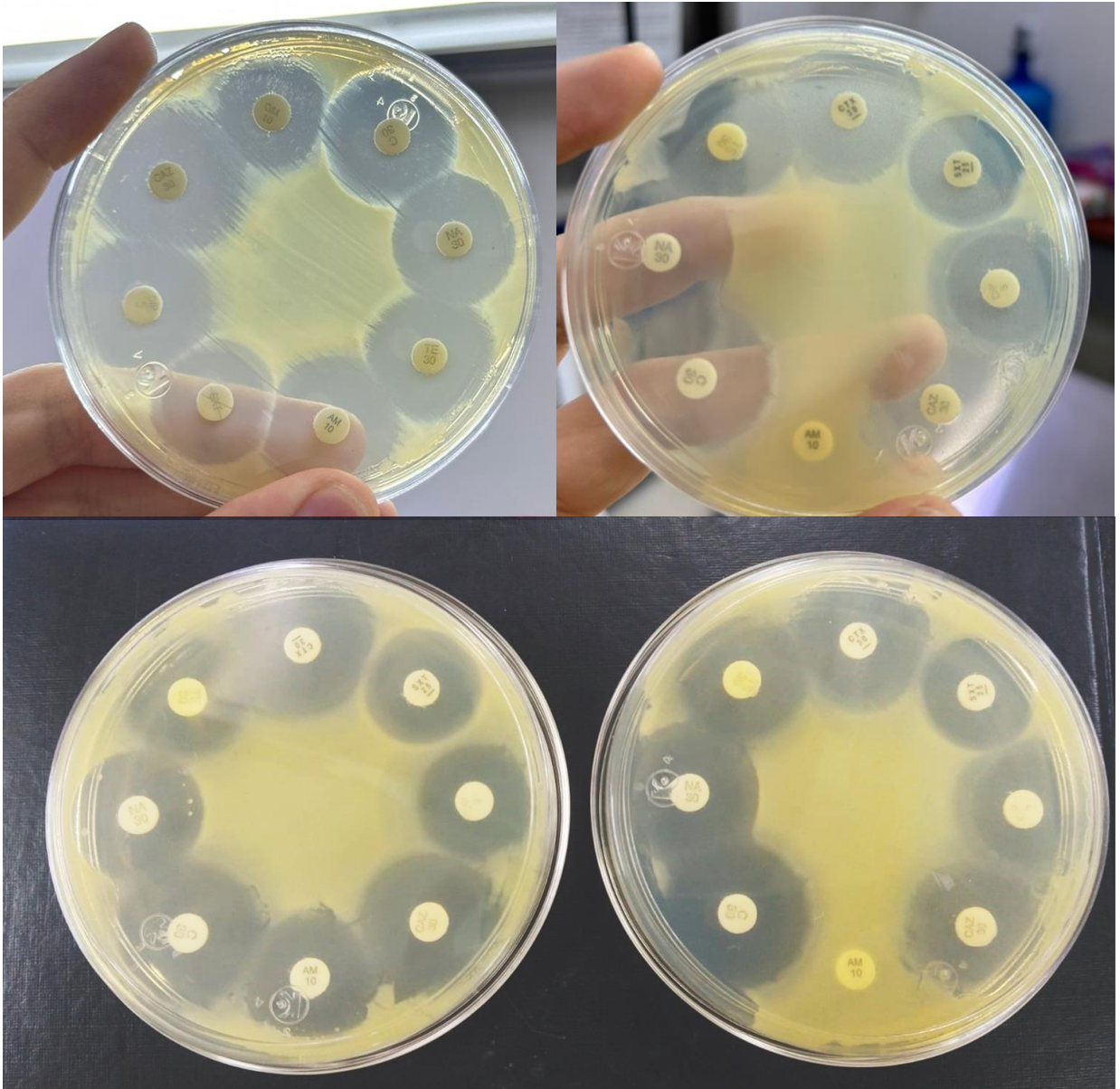


Figura 8. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* de los principales antibióticos para su control y tratamiento.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: MTE. Carolina Lira Morales

Por haber participado con el seminario de investigación biomédica "Detección de factores de virulencia, serotipificación y evaluación de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de camarón y ostiones en Sinaloa" durante la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2022 en el auditorio Héctor Melesio Cuén Ojeda dentro de las instalaciones del campus Dr. José Narro Robles de la Facultad de Medicina UAS.

"Sursum Versus"

Culiacán de Rosales, Sinaloa, noviembre del 2022.

Dr. Luis Alberto González García
Director



Universidad Autónoma
de Sinaloa
FACULTAD DE MEDICINA

Dr. Josué Camberos Barraza
Secretario Académico



JORNADA UNIVERSITARIA DEL
CONOCIMIENTO
UAS - 2022
CIENCIA Y VINCULACIÓN COMUNITARIA