



UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Búsqueda fenotípica y genotípica de
factores de virulencia no descritos en**

***Vibrio mimicus.*”
TESIS DOCTORAL**

P R E S E N T A:

M. en C. JOSÉ JULIO TERCERO ALBURO

Cotutor: Dr. CARLOS VÁZQUEZ SALINAS

Cotutor: Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

Asesor: Dr. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

MÉXICO, D.F

Abril 2015

“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

Este proyecto fue financiado por el CONACYT beca nacional número 47921.

El presente trabajo de investigación fue hecho en:

Laboratorio de Inocuidad Alimentaria del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

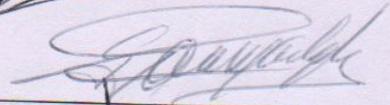
Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que Presentó el M. en C. José Julio Tercero Alburo el día 30 de abril del 2015.

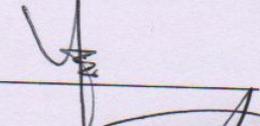
PRESIDENTE DR. CARLOS VÁZQUEZ SALINAS



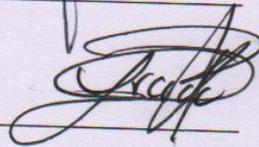
SECRETARIO DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ



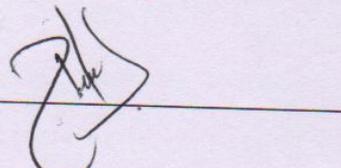
VOCAL DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ



VOCAL DRA. LILIA ARELY DE JESÚS PRADO BARRAGÁN



VOCAL DR. OSCAR RODOLFO RODAS SUÁREZ



Al universo:

Por permitirme conocer gente valiosa y permitirme conocerme a mí mismo un poco más

A Liza y Alex:

Por estar juntos en una nueva aventura, por su cariño, y apoyo invaluable... espero ser un ejemplo digno.

A Carmen y Maru:

Porque aún en los momentos más difíciles hemos estado juntos apoyándonos.

A Ana María Lacy

Gracias por sus consejos, amistad y confianza.

A. María Esther

Por ser un ejemplo de vida, gracias por tus enseñanzas.

A Alejandro, Isabel, Diana, Claudia, Rodolfo....

Nunca se rindan y mucho éxito...

A Chayo, Lupita, Tony, Enrico, Luis, Daniel, Marlene, Vero, Vania, Joaquín,

Ara, Gaby, Paco, Silvia..... y la lista es interminable....

Por compartir experiencias y grandes momentos, en las buenas y en las malas.

A mis sinodales:

Por sus consejos, observaciones y por el tomarse el tiempo para revisar este trabajo.

RESUMEN

Vibrio mimicus es una bacteria causante de gastroenteritis estrechamente relacionada con *V. cholerae*, puede provocar un cuadro diarreico agudo parecido al cólera o diarrea tipo disentería, su distribución es mundial. Se han identificado factores asociados con la virulencia, como hemolisinas, enterotoxinas, proteasas, fosfolipasas, aerobactina y hemaglutininas; sin embargo, se desconoce su mecanismo de patogenicidad. En especies patógenas del género *Vibrio*, como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, se han descrito estructuras como la cápsula, biopelículas, flagelo lateral y pili tipo IV, esenciales en la patogenicidad, que aún no se han descrito en *V. mimicus*, así como el sistema de secreción tipo III. Se estudiaron 20 cepas de *Vibrio mimicus* aisladas en muestras de agua (6), ostión (9) y pescado (5); se identificó la cápsula, biopelículas, flagelo lateral y pili tipo IV por microscopía electrónica, PCR y secuenciación. En las 20 cepas de la colección se observó e identificó la presencia de exopolisacárido capsular, formación de biopelículas *in vitro*, *swarming*, poliflagelación y presencia de pili; se identificaron genes homólogos a los descritos en otras bacterias del mismo género.

Por último se determinó que una cepa de la colección estudiada presenta un gen del SSTIII2 β . La identificación de estas estructuras en *V. mimicus* es una contribución a la biología y patogenia de este organismo.

ABSTRACT

Vibrio mimicus is a bacterium that causes gastroenteritis; it is closely related to *Vibrio cholerae*, and can cause acute diarrhea like cholera- or dysentery-type diarrhea. It is distributed worldwide. Factors associated with virulence (such as hemolysins, enterotoxins, proteases, phospholipases, aerobactin, and hemagglutinin) have been identified; however, its pathogenicity mechanism is still unknown. In pathogenic *Vibrio* species such as *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, capsule, biofilms, lateral flagellum, and type IV pili are structures described as essential for pathogenicity, also the presence of the secretion system type III. These structures had not been described in *V. mimicus* until this work. We used 20 *V. mimicus* strains isolated from water (6), oyster (9), and fish (5) samples and we were able to identify the capsule, biofilm, lateral flagellum, and type IV pili through phenotypic tests, electron microscopy, PCR, and sequencing. In all tested strains, we observed and identified the presence of capsular exopolysaccharide, biofilm formation in an *in vitro* model, as well as *swarming*, multiple flagellation, and pili. In addition, we identified homologous genes to those described in other bacteria of the genus in which these structures have been found. Likewise it was determined that only one strain has a gene from SSTIII2 β . Identification of these structures in *V. mimicus* is a contribution to the biology of this organism and can help to reveal its pathogenic behavior.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. HISTORIA	1
I.2. CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO	2
I.3. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN	3
I.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
I.4.1. Tipificación.....	5
I.5. PATOGÉNESIS.....	6
I.6. FACTORES DE VIRULENCIA	7
I.6.1. Cápsula	7
I.6.2. Biopelícula.....	9
I.6.3. Flagelo lateral.....	12
I.6.4. Pili tipo IV	16
I.6.5. Sistema de secreción tipo III	17
II. ANTECEDENTES	26
III. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACION	30
IV. HIPÓTESIS	30
V. OBJETIVOS	31
V.1. OBJETIVO GENERAL	31
V.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	31

VI.	JUSTIFICACIÓN.....	32
VII.	METODOLOGÍA.....	34
VII.1.	CEPAS.....	34
VII.2.	MÉTODOS GENERALES.....	35
VII.2.1.	Obtención de ADN genómico.....	35
VII.2.2.	Amplificación de los genes por la técnica de PCR.....	35
VII.2.3.	Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa.....	36
VII.2.4.	Cápsula.....	37
VII.2.5.	Biopelícula.....	38
VII.2.6.	Presencia del flagelo lateral.....	40
VII.2.7.	Presencia del pili tipo IV.....	42
VII.2.8.	Detección del de SSTIII (sistema de secreción tipo 3) y tipificación.....	43
VIII.	RESULTADOS.....	45
VIII.1.	PRESENCIA DE CÁPSULA.....	45
VIII.2.	FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.....	49
VIII.3.	PRESENCIA DEL FLAGELO LATERAL.....	54
VIII.3.1.	Ensayo de movilidad <i>Swimming</i>	54
VIII.3.2.	Ensayo de movilidad <i>Swarming</i>	55
VIII.4.	PRESENCIA DEL PILI TIPO IV.....	60
VIII.5.	SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (SSTIII).....	65
IX.	DISCUSIÓN.....	69
IX.1.	CÁPSULA.....	70

IX.2.	BIOPÉLÍCULA.....	72
IX.3.	FLAGELO LATERAL.....	73
IX.4.	PILI TIPO IV	75
IX.5.	SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III.....	77
X.	CONCLUSIONES	80
XI.	PERSPECTIVAS	81
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	82
XIII.	URL.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proteínas involucradas en la translocación del polisacárido capsular.....	9
Figura 2. Etapas en la formación de una biopelícula.....	12
Figura 3. Estructura básica de un flagelo bacteriano.....	14
Figura 4. El aparato SSTIII.	23
Figura 5. Diagrama general de trabajo.	33
Figura 6. Morfología colonial observada en agar rojo Congo.....	46
Figura 7. Electroferograma del producto amplificado de los genes <i>wzb</i>	47
Figura 8. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen <i>wzb</i>	47
Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión, donde se observa la cápsula.....	48
Figura 10. Producción de biopelículas.	
Figura 11. Biopelícula de <i>V. mimicus</i>	50
Figura 12. Electroferograma del producto amplificado del gen <i>rbmA</i>	51
Figura 13. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen <i>rbmA</i>	
Figura 14. Etapas en la formación de una biopelícula de <i>V. mimicus</i>	53
Figura 15. Biopelícula de <i>V. mimicus</i>	53
Figura 16. Movilidad tipo <i>Swimming</i>	54
Figura 17. Movilidad tipo <i>Swarming</i>	55
Figura 18. Electroferograma del producto amplificado del gen <i>lafA</i>	56
Figura 19. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen <i>lafA</i>	57
Figura 20. Preparación en fresco del crecimiento tipo <i>swarming</i>	58

Figura 21.	Microscopía electrónica de transmisión, flagelo lateral.....	59
Figura 22.	Distintos patrones de flagelación de <i>V. mimicus</i>	60
Figura 23.	Ensayo de Autoagregación.....	61
Figura 24.	Electroferograma del producto amplificado de los genes <i>pilA-B</i> .	62
Figura 25.	Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen <i>pilA</i>	62
Figura 26.	Microscopía electrónica de transmisión pili.....	64
Figura 27.	Electroferograma del producto amplificado de los genes <i>vcrβ</i>	65
Figura 28.	Electroferograma del producto amplificado de los genes <i>vscβ</i>	66
Figura 29.	Electroferograma del producto amplificado de los genes <i>vsca</i>	66
Figura 30.	Electroferograma del producto amplificado de los genes <i>vcra</i>	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas testigo	34
Cuadro 2 Lista de iniciadores usados en este trabajo.....	44
Gen	44
Número GenBank.....	44
Forward.....	44
Reverse	44
Tamaño.....	44
CUADRO 3 RESUMEN DE RESULTADOS.....	68

I. INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Vibrio* son habitantes naturales de ambientes acuáticos, se encuentran, asociados a otros organismos ya sea como patógeno o formando parte de su microbiota normal, por ende, su presencia es común en alimentos de origen marino (Ahn *et al.*, 2011; Albert *et al.*, 1997). Algunas especies del género son patógenas para humanos y para organismos marinos (Okada *et al.*, 2005; Zhang y Austin, 2005). Las cuatro especies patógenas principales para humanos son: *Vibrio cholerae* (agente causal del cólera), *Vibrio parahaemolyticus* (causa gastroenteritis, infección de heridas y septicemia), *Vibrio vulnificus* (causante de infección necrosante severa en heridas y septicemia invasiva fulminante) y *Vibrio mimicus* (origina gastroenteritis y en ocasiones diarrea tipo cólera). De este último, se desconocen los mecanismos involucrados en su patogenicidad; así mismo, también se desconocen los mecanismos que utiliza para su supervivencia en el ambiente (Chen *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2003; Vora *et al.*, 2005).

I.1. HISTORIA

Desde 1854, con los trabajos de Pacini y en 1883 con los de Koch se inició el estudio del género *Vibrio*. La primera especie que se describió fue *V. cholerae* como agente etiológico del cólera; el serotipo O1 ha causado siete pandemias y actualmente se cree que la octava será causada por el serotipo O139 (Faruque y Nair, 2002; Thompson *et al.*, 2004a)

Las cepas de *V. cholerae* con características bioquímicas atípicas se designaban como *V. cholerae* lisina descarboxilasa negativo y *V. cholerae* sacarosa negativo, entre otras acepciones. En 1981, Davis y colaboradores estudiaron cepas representativas de estos biogrupos, por técnicas de hibridación de DNA en cepas de *V. cholerae* típicas y en cepas atípicas por análisis fenotípicos extensos, concluyendo que la mayoría de las cepas atípicas correspondían a *V. cholerae*, pero el biogrupo que presentaba el marcador sacarosa negativo formaba un grupo independiente, por lo se propuso una nueva especie denominada como *Vibrio mimicus*. El nombre de esta bacteria hace alusión a que “imita” o es muy “semejante” a *V. cholerae* (Davis *et al.*, 1981).

I.2. CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO

V. mimicus y *V. cholerae* comparten múltiples características fenotípicas y genotípicas, como son: habitar en agua dulce, aglutinar con el mismo anticuerpo monoclonal dirigido contra el flagelo (Simonson y Siebeling, 1988), tener dos cromosomas (Okada *et al.*, 2005), e incluso tener capacidad de transferirse información genética entre ellos (Boyd *et al.*, 2000). Estudios filogenéticos han comprobado que estas dos especies son las que están más relacionadas entre sí dentro del género *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2004a) formando un grupo separado de las demás especies del género.

En cuanto a su taxonomía, se ubica en el Taxonomy Browser del NCBI (URL 1) de la siguiente forma:

- DOMINIO: *Bacteria*
- PHYLUM : *Proteobacteria*
- SECCION: *Gammaproteobacteria*
- CLASE: *Zymobacteria*
- ORDEN : *Vibrionales*
- FAMILIA : *Vibrionaceae*
- GÉNERO : *Vibrio*
- ESPECIE: *mimicus*

V. mimicus es un bacilo curvo Gram negativo, bajo condiciones de estrés, puede ser pleomórfico (Abd *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 1981; Janda *et al.*, 1988); catalasa y oxidasa positiva, móvil por un flagelo polar constitutivo. Es moderadamente halófilico, la presencia de iones Na^+ estimula su crecimiento, crece en intervalos de concentración de cloruro de sodio de 0 a 3%; sin embargo, algunas cepas son capaces de tolerar hasta 6%. El intervalo de pH en el cual se desarrolla oscila desde de 5 hasta 11 (Wong *et al.*, 1992). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, siendo la temperatura máxima de 45°C. Es capaz de sobrevivir a la congelación (hasta -30°C) ya que se ha aislado de alimentos congelados (Wong *et al.*, 2004). También se ha descrito su capacidad de reproducirse a temperaturas de refrigeración, de 4 a 10°C (Wong *et al.*, 2004).

I.3. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

El hábitat de *Vibrio mimicus* es acuático se ha aislado en costas, estuarios, ríos, lagos y lagunas de agua dulce y salada, generalmente de zonas cuya temperatura va

de templada a cálida. Las poblaciones de este microorganismo no se mantienen constantes a lo largo del año, debido a que factores ambientales como el pH, cantidad de materia orgánica, salinidad y temperatura afectan su desarrollo. Se ha reportado que en verano aumenta su concentración debido a que el calor promueve su proliferación. En cambio, las poblaciones disminuyen en invierno (cuando disminuye la temperatura de la columna de agua) (Chowdhury *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 1989; Vieira *et al.*, 2001). Se ha observado que bajo condiciones no favorables, las bacterias del género pasan a un estado de disminución de la actividad respiratoria llamado “viable no cultivable”, en el que no pueden ser detectados con los métodos convencionales, pero sí con técnicas de biología molecular y se ha descrito que, aún en este estadio, conservan su capacidad patogénica (Vora *et al.*, 2005).

I.4. EPIDEMIOLOGÍA

V. mimicus es reconocido como un patógeno humano, aunque también tiene importancia a nivel económico ya que es patógeno también para crustáceos y peces de importancia económica (Miyoshi *et al.*, 2014; Sanchez *et al.*, 2012; Shandera *et al.*, 1983; Vandenberghe *et al.*, 1999).

A partir de que en 1981 se identificó a *V. mimicus* como una especie distinta de *V. cholerae*, se comenzaron a tener indicios sobre la posible patogenicidad del mismo, uno de los primeros reportes es de Bangladesh en 1981, en el cual *V. mimicus* se vió involucrado en dos casos de otitis, uno en una persona de 39 años y el otro en un niño, ambos causados por la exposición al agua de mar, en el mismo reporte se

mencionan 17 casos de gastroenteritis en adultos que consumieron ostiones crudos, así como infección en heridas expuestas a agua de mar (Davis *et al.*, 1981).

Con el paso del tiempo, se han reportado más casos en otras partes del mundo, por ejemplo, en 1991 durante la epidemia de cólera en América Latina (que corresponde a la séptima pandemia), se asociaron casos de diarrea aguda debido a la presencia de *V. mimicus* en Costa Rica (Albert *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1996). Albert y cols. (1992) informaron de casos de diarrea severa y de un caso de bacteriemia en un niño, también causado por *V. mimicus*. En la parte norte de Brasil, se informó de casos de diarrea tipo cólera, identificando cepas atípicas de *V. cholerae* sacarosa negativo, que se confirmaron posteriormente como *V. mimicus* (Vieira *et al.*, 2001).

El 12 de febrero del año 2005, después de una fiesta de carnaval en Cuncashca provincia de Carhuaz en Perú, se produjo un brote de diarrea aguda que afectó a 32 personas, de las cuales 31 eran mayores de 5 años, en los que se determinó a *V. mimicus* como el agente causal (Cabezas *et al.*, 2005).

Probablemente debido al desarrollo de los métodos moleculares para diferenciar a *V. mimicus* de *V. cholerae*, se ha podido detectar en realidad a los agentes causales de brotes, un ejemplo de esto fue un brote causado por el consumo de aguas frescas, pescado y mariscos en Tailandia, en donde 306 personas presentaron gastroenteritis debida a *V. mimicus* (Chitov *et al.*, 2009).

1.4.1. Tipificación.

Los análisis para la detección, diagnóstico y caracterización del cólera (y de otras enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio*), se hace a través de

pruebas fenotípicas, valorando características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, así como por la composición antigénica de las cepas, sin embargo, a pesar de que son útiles solo aportan información general y en ocasiones dichos métodos no pueden discriminar entre dos especies relacionadas o entre 2 cepas distintas de la misma especie, con el tiempo han surgido nuevos parámetros más específicos que basados en enzimas, toxinas y algunos blancos moleculares permiten hacer dicha diferenciación (Rivera *et al.*, 1995).

Actualmente existen métodos de identificación con alto poder de discriminación, siendo incluso capaces de mostrar diferencias entre miembros de una misma especie. Dichos métodos se han usado con éxito en cepas de *V. cholerae* que están involucradas en brotes. Sin embargo, la caracterización molecular las bacterias de este género es difícil debido a que presentan gran diversidad genotípica (Keymer *et al.*, 2009), por mencionar un ejemplo en colecciones de *V. cholerae* no O1 se han encontrado diferencias importantes entre las cepas aisladas de distintas zonas geográficas (Bag *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2008).

I.5. PATOGÉNESIS

V. mimicus puede causar varios cuadros clínicos como gastroenteritis, otitis, infección de heridas, diarrea tipo cólera, disentería y en raras ocasiones causa septicemia. La dosis infectiva aún se desconoce, pero se ha considerado que puede ser similar a la de *V. cholerae* (10^4 a 10^9 UFC), debido a la estrecha relación entre ambos (Reidl y Klose, 2002). El periodo de incubación puede variar de persona a

persona, desde unas cuantas horas después de ingerir el alimento hasta tres a cuatro días, dependiendo del inóculo con el que se haya tenido contacto, de las características propias de la cepa y del estado inmune de la persona (Bi *et al.*, 2001).

I.6. FACTORES DE VIRULENCIA

En la actualidad, el mecanismo de patogenicidad de *V. mimicus* es poco conocido, no se sabe con exactitud de que estrategias infectivas se vale para poder colonizar una superficie biótica y generar un daño a su hospedero. Sin embargo, se han descrito algunos posibles factores de virulencia como hemolisinas, hemaglutininas, proteasas, sideróforos y enterotoxinas (Espineira *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2010; Shinoda *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2002). Existen otras estructuras bacterianas que no están descritos para este microorganismo y que son importantes para otros patógenos del mismo género, como la cápsula, capacidad de producir biopelículas, presencia de flagelos laterales, presencia de pili de tipo IV, sistemas de secreción de tipo III y VI y algunas hemolisinas (Aagesen y Hase, 2012; Jaques y McCarter, 2006; Okada *et al.*, 2010; Phippen y Oliver, 2015).

I.6.1. Cápsula

Las células bacterianas tienen la capacidad de secretar una gran variedad de moléculas, incluyendo polisacáridos muy complejos y proteínas. Algunas de estas moléculas se requieren para la viabilidad de la célula, mientras que otras son usadas para la interacción con el ambiente. Los polisacáridos pueden secretarse de dos maneras: En la primera, los polisacáridos se vierten al ambiente próximo a la célula

(exopolisacárido para la formación de biopelículas), en la segunda, los polisacáridos están asociados con la célula (cápsulas) (Drummelsmith y Whitfield, 2000; Wugeditsch *et al.*, 2001). La cápsula juega un papel crítico en las interacciones entre la bacteria y su ambiente más inmediato. Es una estructura que envuelve la superficie de la bacteria, compuesta por polisacáridos de masa molecular elevada anclada firmemente a la superficie celular. Está demostrado que esta estructura es un factor de virulencia, ofreciendo protección contra la respuesta inmune del hospedero (opsonización, fagocitosis y acción lítica del complemento) (Wugeditsch *et al.*, 2001). En algunos patógenos del género (como *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* O139) la cápsula es un factor importante de virulencia (Nesper *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2001; Wugeditsch *et al.*, 2001), de hecho en *V. cholerae* y *V. vulnificus* se ha descrito un agrupamiento de genes (*cluster*) dedicado a la biosíntesis de la cápsula, que es homólogo al de *Escherichia coli* del grupo 1, encontrándose que los productos génicos son altamente conservados en secuencia y función (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2006), sin embargo, a la fecha no han sido descritos para *V. mimicus*.

El proceso de síntesis de la cápsula es muy complejo e involucra un gran número de proteínas. Entre ellas se encuentran la lipoproteína Wza, que en su interior forma un canal de aproximadamente 4 nm de diámetro por donde se transloca el polisacárido capsular hacia la superficie de la bacteria. La proteína Wzc es una tirosina autocinasa y la proteína Wzb es una fosfatasa que brinda energía a todo el sistema por lo que es esencial para la expresión de la cápsula en la bacteria ya que se sabe

que el proceso de biosíntesis está sincronizado con el de translocación (Figura 1) (Beis *et al.*, 2004; Collins y Derrick, 2007; Drummelsmith y Whitfield, 2000; Wright *et al.*, 2001; Wugeditsch *et al.*, 2001).

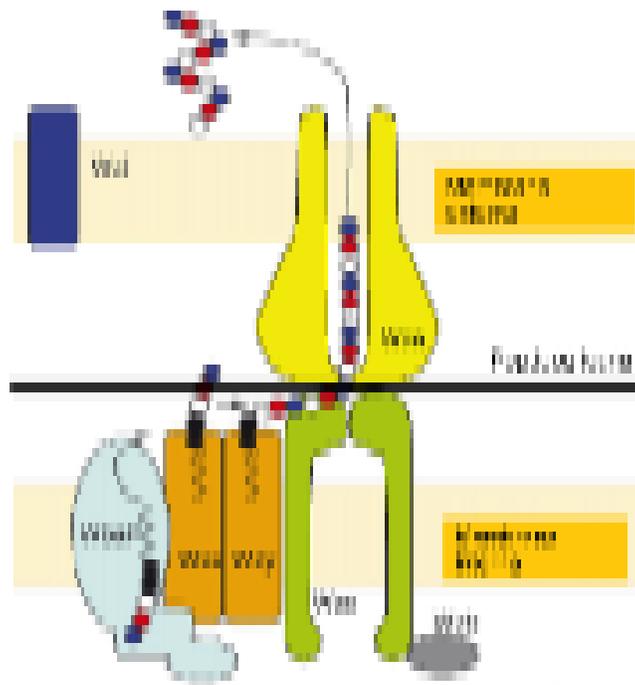


Figura 1. Proteínas involucradas en la translocación del polisacárido capsular. Las proteínas forman parte del sistema proteico involucrado en la síntesis y exportación del polisacárido capsular (Tomada de: Collins y Derrick 2007)

1.6.2. Biopelícula

La biopelícula es una comunidad de células bacterianas organizadas en una matriz de polisacáridos y que están adheridas a una superficie inerte o viva (Bilecen *et al.*, 2015).

Aunque la mayoría de las especies del género *Vibrio* son de vida libre, un pequeño grupo es capaz de formar interacciones patogénicas o simbióticas con organismos eucariotes. La adaptación a los cambios entre el ambiente acuático y su hospedero es crucial para la sobrevivencia y un factor clave es la formación de biopelícula, lo que facilita la obtención de nutrientes y ofrece protección contra depredadores y compuestos antimicrobianos (Yildiz, 2008). Se ha observado que *V. cholerae* es capaz de formar biopelícula sobre sustratos orgánicos como en la superficie de los copépodos, algas, plantas acuáticas y crustáceos, también las forma sobre sustratos inorgánicos, como sílice, vidrio, plásticos e incluso teflón (Yildiz *et al.*, 2014).

Faruque y colaboradores (2006) demostraron que en heces de pacientes con cólera se encuentran bacterias libres y agregados de aproximadamente 20 μm de diámetro relacionados con fragmentos de biopelícula los que son más infecciosas que las células libres. Esta información indica la importancia que tiene la formación de esta estructura en el ciclo de vida de *Vibrio cholerae*. En *V. fischeri* ha sido demostrado la importancia de la biopelícula que es fundamental en la colonización de peces y contribuye enormemente a la sobrevivencia y transmisibilidad al igual que en *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Yildiz y Visick, 2009).

Se han identificado moléculas y estructuras celulares que participan en la construcción de la biopelícula, como el flagelo polar y el lateral, diversos tipos de pili y polisacáridos; además de procesos de regulación de los sistemas de dos

componentes, el *quórum sensing* y moléculas pequeñas de señalización (c-di-GMP) (Yildiz y Visick, 2009). La formación de una biopelícula, inicia con la unión de las bacterias a una superficie (Figura 2. 1). Si las bacterias encuentran las condiciones adecuadas para su desarrollo disminuyen su movilidad y comienzan a multiplicarse y agregarse formando una microcolonia (Figura 2. 2). Posteriormente se inicia la producción de un exopolisacárido para tener una unión fuerte (Figura 2. 3), con la superficie y después se forman las estructuras tridimensionales para adquirir la arquitectura característica de la biopelícula (Figura 2. 4), todo regulado por medio de un sistema como el *quórum sensing*.

La biopelícula está madura cuando los canales para el flujo de agua están bien constituidos y cada bacteria modifica su metabolismo de acuerdo con el nicho en que se encuentre. Por último, la liberación de bacterias de la biopelícula o de pequeños fragmentos de la estructura serán los encargados de diseminar los microorganismos al medio (5), (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

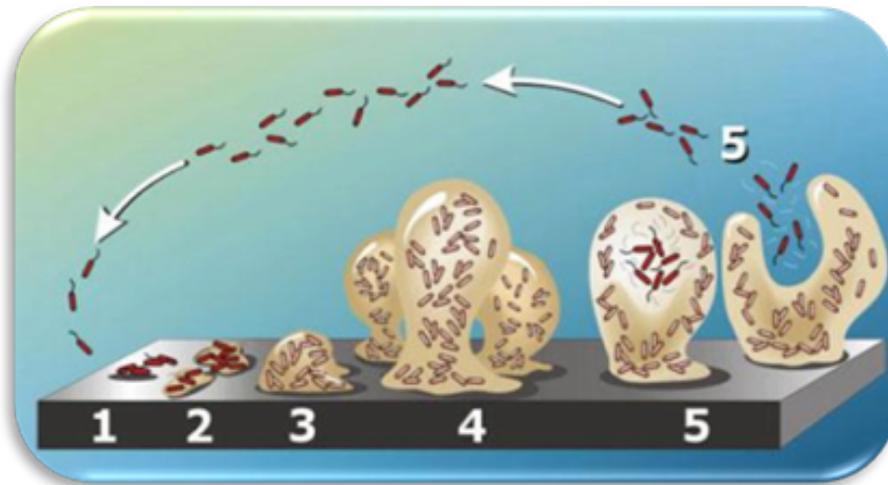


Figura 2. Etapas en la formación de una biopelícula.
1. Adherencia a la superficie
2. Formación de la microcolonia
3. Producción de exopolisacáridos
4. Maduración
5. Liberación.
(Tomado de Center of biofilm engineering 2003 MSU-Bozeman)

I.6.3. Flagelo lateral

La movilidad es una capacidad ancestral de las bacterias, se relaciona estrechamente con la quimiotaxis y es crucial para la colonización de ambientes naturales (Josenhans y Suerbaum, 2002). El flagelo bacteriano es la estructura de movilidad más estudiada, usado para la natación en ambientes acuáticos y/o para el *swarming* (movimiento bacteriano sobre una superficie sólida húmeda) (Stewart y McCarter, 2003b). La movilidad contribuye a la colonización de superficies bióticas y abióticas, característica importante en la formación de biopelículas (Kirov *et al.*, 2002). El flagelo lateral tiene funciones adicionales a la colonización de superficies; en *V. parahaemolyticus* se ha descrito que puede formar uniones entre las bacterias,

contribuyendo a la formación de la microcolonia. Por otra parte, también es esencial para la adherencia a la quitina y las interacciones con las células intestinales (Kirov *et al.*, 2004). La expresión de flagelos laterales, así como la construcción de una biopelícula, están controladas por *quórum sensing*, un sistema químico de señalización que censa la densidad bacteriana y coordina la expresión simultánea de genes. Sin embargo, son pocos los datos que se tienen al respecto, lo que abre la puerta a futuras investigaciones.

El flagelo está compuesto fundamentalmente por tres partes (Figura 3): el cuerpo basal, que ancla toda la estructura a la envoltura celular y además contiene el motor del flagelo, el gancho (que funciona como una conexión articulada entre el filamento y el motor) y el filamento, que está hecho de una proteína llamada flagelina (Terashima *et al.*, 2008).

El cuerpo basal es una estructura parecida a un bastón con una serie de anillos, compuesto, en bacterias Gram negativas, por un anillo L en la membrana externa, un anillo P en el plano de la peptidoglicana, un anillo MS localizado dentro y por encima de la membrana citoplásmica y un último anillo en el citoplasma (el C), el cual no participa en la movilidad pero que da dirección al movimiento (Figura 3).

Los flagelos actúan como propelas, miden aproximadamente 20 nm de diámetro y pueden medir varias veces el largo de la propia bacteria. En el género *Vibrio*, el flagelo es propulsado por una fuerza de iones de Na^+ y puede girar hasta aproximadamente 100,000 rpm (mucho más veloz que las 15000 rpm del flagelo de *Escherichia coli*, bacteria en la que la fuerza motriz de protones suministra la energía

para el movimiento del flagelo). La dirección de rotación del flagelo es reversible y la modulación depende de las señales del medio ambiente, lo que permite a la bacteria dirigirse hacia condiciones más favorables (Sowa y Berry, 2008).

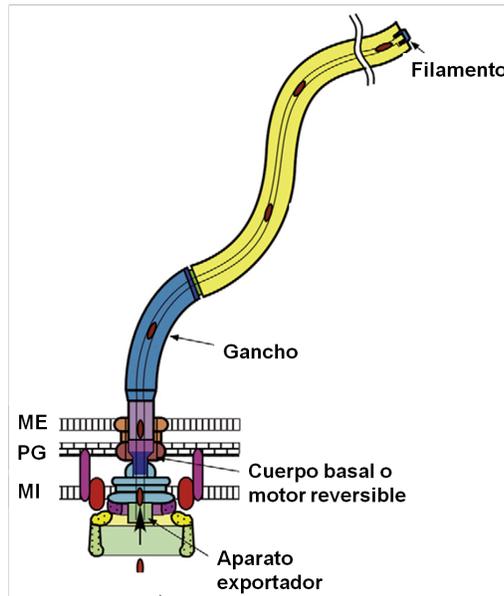


Figura 3. Estructura básica de un flagelo bacteriano. ME (Membrana Externa), PG (Peptidoglicano), MI (Membrana interna) Modificado de (Minamino *et al.*, 2008)

Algunas bacterias producen un solo flagelo polar, que puede presentarse envuelto (*Vibrio cholerae* o *Bdellovibrio bacteriovorus*) o desnudo (*Pseudomonas* spp. o las enterobacterias). El flagelo puede estar formado por subunidades de una misma proteína, como ocurre en *E. coli*, o de múltiples flagelinas, como ocurre en las especies del género *Vibrio* (Kirov *et al.*, 2002).

Algunas bacterias como *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas sobria* poseen un sistema flagelar doble (el polar *fla* y el lateral *laf*), en contraste con las enterobacterias, donde sólo aparece uno (Merino *et al.*, 2006). Los flagelos laterales

son los responsables del movimiento llamado *swarming*. En *V. parahaemolyticus*, cuando esto ocurre, se presenta una diferenciación celular, en la que las bacterias aumentan de tamaño, contienen múltiples copias del genoma y están hiperflageladas, a esta célula diferenciada se le llama “*swarmer*”, los flagelos laterales de estas formas bacterianas se encuentran desnudos y son propulsados por la fuerza motriz de protones (a diferencia del polar, que como ya se comentó, es envuelto y funciona por medio de una fuerza motriz de iones Na^+). El resultado de esta diferenciación celular es la rápida colonización de superficies (Stewart y McCarter, 2003a).

La organización genética responsable de la aparición de los flagelos se ha estudiado extensamente en *E. coli*, se sabe que hay aproximadamente 35 genes involucrados. En *V. parahaemolyticus* los dos sistemas flagelares tienen genes homólogos a los encontrados en *E. coli* sin embargo, también existen algunas diferencias en cuanto a la organización y regulación de los mismos (Kim y McCarter, 2007). En *V. parahaemolyticus* los genes del flagelo polar están localizados en el “cromosoma” grande y todos los genes del flagelo lateral están en el “cromosoma” pequeño, teniendo en ambos casos el mismo contenido de G-C que el resto del genoma. En contraste, los genes relacionados con la quimiotaxis se encuentran distribuidos en los dos “cromosomas”. Todos los sistemas flagelares que se han estudiado presentan un sistema complejo de regulación, debido al elevado costo energético que representa construir y hacer funcionar un flagelo. En este sistema tienen un

papel fundamental las proteínas llamadas H-NS (proteínas que se unen a ADN tipo histona)(Merino *et al.*, 2006).

1.6.4. Pili tipo IV

La adherencia a superficies es una propiedad común de las bacterias que les permite tener diversos estilos de vida, permitiendo a la misma especie colonizar diferentes nichos. En una gran variedad de bacterias existen estructuras filamentosas conocidas como pili o fimbrias. Existen diversos tipos, el tipo IV se distinguen de otros por ser polar y tener secuencias conservadas en la proteína estructural (la pilina). Esta última está sujeta al mismo mecanismo proteico de ensamble de las bacterias Gram negativas, recientemente descrito en Gram positivas y algunas cianobacterias (Pelicic, 2008). Se les atribuyen funciones múltiples, adherencia a superficies, agregación bacteriana, transferencia horizontal de material genético, facilitan la formación de microcolonias y biopelículas. Algunos pueden ser receptores para bacteriófagos, ayudan a la evasión de la respuesta inmune y también se ha descrito que participan en la señalización celular, además de estar implicados en otros tipos de movilidad (twitching) (Wall y Kaiser, 1999; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009).

En las bacterias patógenas del género *Vibrio*, esta estructura es reconocida como un factor de virulencia, en *V. vulnificus* tiene una participación importante en la colonización de superficies, formación de biopelículas y la adherencia a células epiteliales humanas (Paranjpye y Strom, 2005).

En *V. cholerae* se ha detectado la presencia de por lo menos 3 diferentes pili tipo IV, el primero de ellos en ser descrito, se encuentra en la isla de patogenicidad de *Vibrio* 1 (VPI1) llamado TCP (pili corregulado con la toxina), cuya función es ser factor de colonización esencial; además, se ha visto que es el receptor del bacteriófago filamentoso CTX ϕ portador de los genes de la toxina colérica (Karaolis *et al.*, 1999), el TCP favorece la colonización del intestino, debido a que colabora en las interacciones bacteria-bacteria durante la formación de la microcolonia (Reidl y Klose, 2002). Se ha descrito la presencia de otro gen que codifica para un pili tipo IV llamado *pil A*, homólogo del gen *pil A* en estructura y función al de *V. vulnificus* (Fullner y Mekalanos, 1999), los genes implicados en la síntesis de esta estructura es similar a la presentada por *Pseudomonas* spp. y *Aeromonas* spp.

Adicionalmente, *V. cholerae* cuenta con un tercer juego de genes que codifican para otro pili tipo IV llamado hemaglutinina sensible a manosa (MSHA), la cual está más relacionada con la adherencia a superficies abióticas ya que se expresa solo cuando la bacteria se encuentra en el medio ambiente (Hsiao *et al.*, 2009; Marsh y Taylor, 1999).

I.6.5. Sistema de secreción tipo III

Las bacterias Gram negativas secretan una variedad de proteínas en el espacio extracelular, las cuales requieren de un sistema de secreción que está diseñado específicamente para el transporte de macromoléculas a través de las dos membranas biológicas. Estas vías se han clasificados en cinco grupos principales: tipo I, II, III, IV y autotransportadores. La clasificación se basa en la naturaleza

molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (Ham y Orth, 2012).

Estos grupos se pueden subdividir en dos clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías SEC dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado SEC en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino-terminal; y las SEC independientes en la que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (Denks *et al.*, 2014)

Las vías de secreción tipo II y IV son SEC-dependientes. Estas vías involucran una etapa separada de transporte a través de la membrana interna antes de transportar a través de la membrana externa, mientras que difieren en la manera en que las proteínas son transportadas a través de la membrana externa. La exportación al periplásma se produce a través del sistema SEC en ambos casos. Una parte de la proteína de exportación dependiente de SEC, consiste en una subunidad pequeña (cerca de 30 aminoácidos) y mayoritariamente hidrofóbica, secuencia señal amino-terminal en la proteína exportada. La secuencia señal ayuda a la exportación de la proteína y se escinde por una peptidasa señal periplásmica cuando la proteína exportada llega al periplásma (Denks *et al.*, 2014).

Los autotransportadores presentan una vía SEC dependiente ya que utilizan la maquinaria SEC para atravesar la membrana interna; sin embargo, las proteínas no

requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa (Ham y Orth, 2012).

Las vías de secreción I y III son SEC independientes, por lo tanto no implican el procesamiento amino-terminal de la proteína secretada. Además, la secreción de la proteína a través de la última vía se da en un solo paso sin la presencia de intermediarios periplásmicos (Hueck, 1998).

Estudios recientes muestran que existen mecanismos de virulencia comunes entre diversos patógenos, uno de estos mecanismos es el sistema de secreción tipo III (SSTIII), el cual juega un papel crucial en la interacción hospedero-patógeno (Vilches *et al.*, 2004).

El SSTIII es un complejo macromolecular que transloca un gran número de proteínas llamadas efectoras dentro de las células eucariotas del hospedero. Una vez dentro del citoplasma, muchos efectores imitan la estructura y/o función de las proteínas eucarióticas con el fin de manipular la cascada de señalización y por lo tanto juegan un papel fundamental en la colonización, la invasión, la supervivencia y la virulencia (Tosi *et al.*, 2013).

Homólogos del SSTIII se han descrito en muchas especies bacterianas Gram negativas, incluyendo patógenos como algunas especies de los géneros *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*,

Xanthomonas y *Yersinia*, así como en *Escherichia coli* (Coburn *et al.*, 2007; Denks *et al.*, 2014; Hueck, 1998).

En el SSTIII es altamente conservado entre las bacterias que lo poseen, mientras que las proteínas secretadas por estos mismos, son muy divergentes y la variedad de enfermedades causadas por estos patógenos en diferentes hospederos es reflejo de la multitud de proteínas secretadas (Aagesen *et al.*, 2013; Altindis *et al.*, 2015; Hiyoshi *et al.*, 2015; Tosi *et al.*, 2013). Muchos patógenos Gram negativos pueden adquirir el SSTIII a través de algún mecanismo de transferencia horizontal de genes, lo anterior se sustenta en la observación de que estos sistemas a menudo se codifican en elementos extracromosómicos como plásmidos de virulencia o dentro de las islas de patogenicidad (PAIs) (Park *et al.*, 2004b).

El SSTIII es una estructura compleja constituida por aproximadamente 20 proteínas bacterianas (Coburn *et al.*, 2007), estos componentes se pueden dividir en al menos dos grupos, uno que consta de proteínas de membrana externa (ME), incluyendo una proteína con secuencia similar a la familia de las secretinas de los transportadores de proteínas, además de varias lipoproteínas menos conservadas. El otro grupo consta de varias proteínas integrales de membrana que comparten una similitud significativa con los componentes del aparato de biosíntesis flagelar de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Hueck, 1998). Las proteínas que conforman el SSTIII se denominan proteínas estructurales. Proteínas llamadas “translocadores” cumplen la función de translocar proteínas dentro del citoplasma de la célula hospedera; los efectores, son los factores de virulencia que inducen los cambios en la célula

huésped, lo que permite al patógeno la invasión para colonizar, multiplicarse y en muchos casos la persistencia crónica en el hospedero (Coburn *et al.*, 2007).

El cuerpo basal del aparato de inyección o “complejo de aguja” está compuesto principalmente de tres proteínas conservadas dispuestas en forma de anillos concéntricos (Schraidt y Marlovits, 2011). Dos de estos oligómeros se encuentran dentro de la membrana interna (MI), mientras que la secretina forma un oligómero en la ME. La porción de la ME del complejo de aguja está conectada a la plataforma de la MI por una estructura tubular (Schraidt y Marlovits, 2011; Spreter *et al.*, 2009). En el interior, la base de la aguja se asocia a la plataforma de la MI por un “adaptador”, cuya parte inferior llamada “copa” se orienta hacia el citoplasma (Schraidt y Marlovits, 2011; Veenendaal *et al.*, 2007).

Los efectores son entregados dentro de la copa, después de lo cual se exportan a través de la cavidad hueca de la aguja (Akeda *et al.*, 2012; Hayes, 1998).

Al entrar a la célula eucariota, los efectores imitan a las proteínas de la célula hospedera y así interfieren directamente con los procesos que promueven la asociación entre la bacteria y su hospedero, como la internalización bacteriana, manipular el citoesqueleto o atenuar la sistema inmune del huésped (Galan, 2009).

Como en sistema de secreción tipo I, las proteínas secretadas a través de la vía tipo III no están sujetas al procesamiento amino-terminal durante la secreción. La secuencia amino-terminal de la proteína secretada a través de la vía tipo III no comparte ninguna semejanza estructural reconocible que podría funcionar como una señal de secreción común. Recientemente se ha propuesto que la señal de secreción

reside en la región 5' del mRNA. La proteína secretada requiere pequeñas proteínas citoplásmicas con función de chaperonas para proteger los factores secretados de interacción prematura de otros componentes del sistema de secreción.

La secreción de proteínas, al menos en algunos casos, es regulada por el contacto con la superficie de las células blanco (Hueck, 1998).

La nomenclatura de las proteínas del SSTIII, está basada en la utilizada para los componentes de la maquinaria de secreción de las bacterias del género *Yersinia* que fueron en las primeras en que se describieron, incluye las siglas ysc (del inglés *Yersinia* secretion). De entre estas, existen 11 proteínas que están conservadas en los diferentes SSTIII y comparten similitud con el aparato de exportación del flagelo. La mayoría de las proteínas ubicadas en la membrana interna de la célula, están relacionadas con los componentes del cuerpo basal del flagelo y existen además algunas proteínas que son citosólicos o periféricos a la membrana y otro grupo no menos importantes son las enzimas que tienen actividad de ATPasa, las cuales le brindan al sistema la energía necesaria para funcionar (Hueck, 1998; Kudryashev *et al.*, 2015).

Los complejos secretores de los factores de virulencia, se han aislado y observado por microscopia electrónica en *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* y recientemente en *E. coli* enteropatógena y en bacterias del género *Vibrio*. La similitud entre los componentes estructurales de ésta maquinaria entre diversos géneros es notable, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo común de funcionamiento (Schraidt y Marlovits, 2011).

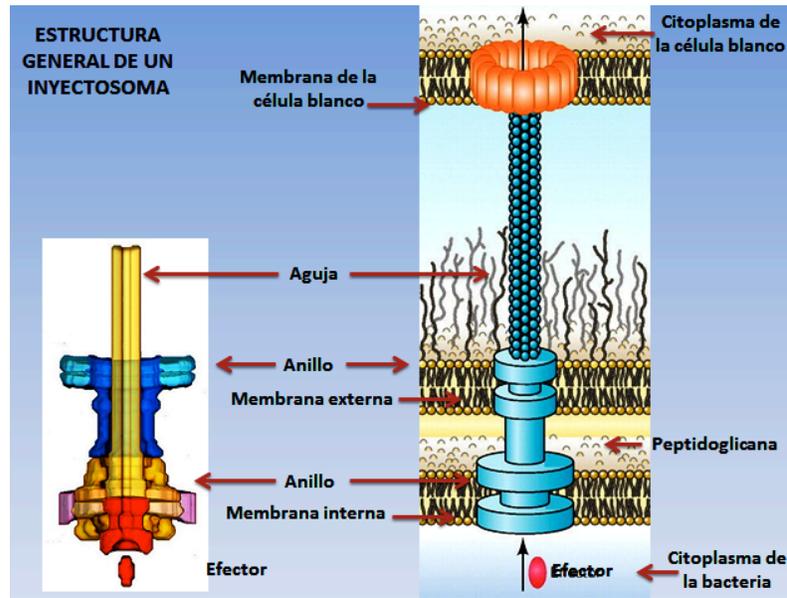


Figura 4. El aparato SSTIII.

Consiste en un par de anillos que proporcionan un camino a través de la membrana interna y externa de la bacteria. Una estructura en forma de aguja asociada con el anillo de la membrana externa y proyecciones de la superficie bacteriana, la aguja es hueca y las proteínas efectoras son transportadas a través del hueco hasta la célula blanco. Modificado de (Troisfontaines y Cornelis, 2005).

Vibrio parahaemolyticus fue la primer especie del género en la que se reportó la presencia del SSTIII (Makino *et al.*, 2003). La secuenciación del genoma de *V. parahaemolyticus* revela que posee dos clusters de genes del SSTIII, SSTIII1 y SSTIII2 (Ono *et al.*, 2006). Un juego de genes del SSTIII1 fue localizado en el cromosoma 1, mientras que SSTIII2 fue localizado en el cromosoma 2. La organización de los genes de SSTIII1 fue muy similar a la del SSTIII reportada para especies de *Yersinia*. En contraste, SSTIII2 no fue particularmente similar a ningún SSTIII reportado hasta la fecha (Makino *et al.*, 2003). El SSTIII1 se encuentra en la gran mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus*, mientras que SSTIII2 de manera general solo se presenta en cepas KP+ (fenómeno Kanagawa positivo).

El análisis del contenido de G/C reveló que en *V. parahaemolyticus* el SSTIII1 es constitutivo en la especie, mientras que SSTIII2 ha sido adquirido por transferencia horizontal de DNA; de igual forma en estudios recientes se ha encontrado que el SSTIII1 está involucrado en la actividad citotóxica de la bacteria, mientras que el SSTIII2, juega un papel importante en la enterotoxicidad y se considera un factor de patogenicidad importante en la enfermedad diarreica (Park *et al.*, 2004b). Los genes del SSTIII2 se localizan en una isla de patogenicidad (PAI) conocida como Vp-PAI (Izutsu *et al.*, 2008; Makino *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004a).

Se ha observado la presencia de genes homólogos al SSTIII en otros *Vibrios*, tales como *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. tubiashii* y *V. cholerae* serogrupo no O1 y no O139 (Park *et al.*, 2004b) (Chatterjee *et al.*, 2009b). Mientras que los SSTIII de *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. tubiashii* están más estrechamente relacionados con el SSTIII1 de *V. parahaemolyticus*, el de *V. cholerae* es similar al SSTIII2 de *V. parahaemolyticus* (Dziejman *et al.*, 2005). Esto sugiere que posiblemente más especies del género *Vibrio* cuenten también con SSTIII y que este tiene un papel en la secreción de proteínas en esos organismos durante la interacción con la célula eucariote (Park *et al.*, 2004b).

Como ya se mencionó anteriormente, *V. parahaemolyticus* posee dos juegos de SSTIII, el tipo SSTIII1 y el tipo SSTIII2. Este último es crítico para la virulencia del organismo y se clasifica en dos distintos filogrupos SSTIII2 α y SSTIII2 β . (Okada *et al.*, 2009), examinaron la distribución de genes del SSTIII en especies de *Vibrio* spp. diferentes de *V. parahaemolyticus*, analizaron 32 especies del género y se

detectaron muchos genes relacionados al SSTIII2 particularmente en tres especies, *V. cholerae*, *V. mimicus* y *V. hollisae* y la mayor parte de los genes esenciales del SSTIII estuvieron presentes en cepas de *V. cholerae* y *V. mimicus* SSTIII2-positivas. Por otra parte, en *V. mimicus* se identificaron genes tanto de SSTIII2 α como de SSTIII2 β . La organización de los clusters de genes del SSTIII2 en *V. mimicus* fue fundamentalmente similar a la de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en cepas que poseen tanto a SSTIII2 α como a SSTIII2 β (Matsuda *et al.*, 2010).

II. ANTECEDENTES

Previamente, en un trabajo anterior se describió factores asociados a la virulencia de *V. mimicus*, como hemolisinas, proteasas, sideróforos, enterotoxinas y la presencia de la VPI1 y del fago CTX ϕ , en la misma colección de 20 cepas de *V. mimicus* provenientes de la laguna de Pueblo Viejo Veracruz en el Golfo de México.

Por medio de pruebas fenotípicas como medios de cultivo con eritrocitos de carnero y conejo para determinar la actividad hemolítica, el medio CAS para la detección de sideróforos, medio de leche descremada para determinar proteasas, medio de yema de huevo para lipasa y lecitinasa, medio con almidón para amilasas y la tinción con rojo congo para la observación de la presencia de cápsula. (Baffone *et al.*, 2000)

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se buscaron los genes para la hemolisina (*vmhA*), fago CTX Φ (*ctxA* y *zot*), VPI1 (*tcpA* y *tox*), parte del operón de aerobactina (*iutA*, *Inc. iucD*) así como la presencia de un gen considerado en *V. cholerae* el regulador maestro de la virulencia (*toxR*). (Ai y Meng, 2001; Mathur y Waldor, 2004; Moon *et al.*, 2004; Shinoda *et al.*, 2004)

Se observó, la capacidad citotóxica sobre la línea celular CHO (células de ovario de hámster chino) y la adherencia sobre células HEp-2 (carcinoma laríngeo humano). Se encontró que el 100% de las cepas, tenían actividad proteolítica, lipolítica y solo el 40% amilolítica, lo que indica que entre los diversos aislados existen algunas diferencias entre sus capacidades metabólicas.

Las veinte cepas resultaron ser β -hemolíticas y poseen el gen de la hemolisina *vmhA*, algunos autores mencionan que este último es buen blanco para la identificación de *V. mimicus* (Shi *et al.*, 2006; Shinoda *et al.*, 2004). La hemolisina VMH (producto *vmhA*) se considera un factor de virulencia (Bi *et al.*, 2001; Shinoda *et al.*, 2004; Zhang y Austin, 2005), presenta actividad de hemolisina/citolisina y forma poros en la membrana de las células. Estos poros son permeables al agua y a iones pequeños, como Na^+ y K^+ , e induce cambios en la polaridad; esta despolarización activa canales para otros iones causando la pérdida de líquido y diarrea (Li *et al.*, 2005), es por ello que se le considera una toxina (Takahashi *et al.*, 2006). Por otra parte, no se logró encontrar en ninguna cepa al fago CTX Φ , ni a la VPI-1, hasta el momento no se han postulado las funciones o ventajas que confiere a *V. mimicus* la presencia del fago y la PAI, salvo la capacidad de ser toxigénicas y causar un cuadro clínico similar al cólera (Campos *et al.*, 1996). También se demostró que todas las cepas estudiadas presentan el gen *toxR* que (Provenzano y Klose, 2000; Shinoda *et al.*, 2004) reportan en todas las especies del género *Vibrio* y que codifica para una proteína transmembranal del sistema de dos componentes, que regula muchas de las funciones de virulencia en *V. mimicus* y *V. cholerae*. Su presencia faculta a *V. mimicus* para regular tanto funciones de virulencia propias como para cambiar el patrón de expresión de proteínas de membrana externa ante estímulos del ambiente, favoreciendo la colonización del intestino, la expresión de la hemolisina y la movilidad del flagelo (Skorupski y Taylor, 1997) además de las funciones de virulencia obtenidas a través de un evento de transferencia horizontal.

El 40% de las cepas producen sideróforos (moléculas que captan hierro del medio ambiente inmediato) de tipo hidroxamato en medio CAS a pesar de que en todas ellas se demostró que poseen los genes del operón de aerobactina. El papel de los sideróforos como factores de virulencia es muy controvertido, en otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* spp. y *Escherichia coli* invasivas, las bacterias pierden su patogenicidad al perder el operón de aerobactina. Esto indicaría que los mecanismos de captación de hierro son un factor clave durante el proceso de infección del hospedero, lo que haría de los sideróforos un posible blanco para el diseño de nuevos medicamentos (Tanabe *et al.*, 2010).

La presencia de cápsula es un factor de virulencia que no estaba reportado para *V. mimicus*, aunque en ese trabajo se evidenció en el 100% de las cepas estudiadas (20/20), por medio de la técnica de tinción con Rojo Congo. Del mismo modo, la expresión fenotípica se corroboró con evidencia genética. Para ello se eligió el gen *wza*, fundamental para la construcción de la cápsula donde todas las cepas amplificaron un producto de 500 pb cuya secuencia es homologa al gen *wza* de *V. cholerae*. Por otra parte el 75% de las cepas presentaron efecto citopático a las 3 horas de exposición al sobrenadante filtrado, observándose destrucción de la monocapa a las 6 horas de exposición. Los filtrados mostraron títulos desde 1:3 hasta 1:81. no se tenía antecedente sobre el efecto que produce *V. mimicus* en la línea celular CHO, la única información similar era el reporte de un efecto citotóxico sobre las líneas Y-1 (Campos *et al.*, 1996), CHSE-214 (Lee *et al.*, 2002) y T84(Li *et al.*, 2005). En todos estos casos se reporta la destrucción de la monocapa. Se

encontró que todas las cepas presentaron adherencia a la línea celular HEp-2, con un patrón de tipo agregativo. En *V. mimicus* la capacidad de adherirse a las células del intestino es un proceso multifactorial y se ha visto que las proteínas de la membrana externa, varias proteasas y el lipopolisacárido (LPS) tienen capacidades como hemaglutininas (Alam *et al.*, 2006). Todos estos resultados indican que las cepas de *V. mimicus* aisladas de alimentos poseen la capacidad de producir factores asociados con la virulencia.

III. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Es posible que cepas de *V. mimicus* aisladas en nuestro país presenten factores de virulencia aun no descritos? Y de ser así ¿Cuál es su papel en el mecanismo de patogenicidad?

IV. HIPÓTESIS

Algunas especies patógenas del género *Vibrio* presentan estructuras como cápsula, pili, flagelo lateral, biopelícula y sistema de secreción tipo III, considerados factores de virulencia. Si, en *V. mimicus* se demuestra la existencia de éstas estructuras, entonces se obtendrán nuevos elementos para postular un posible mecanismo de patogenicidad.

V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar fenotípica y genotípicamente la presencia de factores de virulencia aún no descritos para *Vibrio mimicus*.

V.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Definir si *V. mimicus* presenta cápsula, y los genes asociados a la biosíntesis de polisacáridos.
2. Determinar si *V. mimicus* tiene la capacidad de producir una biopelícula en un modelo “*in vitro*”.
3. Evaluar si *V. mimicus* presenta flagelos laterales, así como los genes homólogos a los descritos en otras especies del género *Vibrio*.
4. Determinar si *V. mimicus* posee un pili tipo IV.
5. Buscar marcadores del sistema de secreción tipo III en *V. mimicus* y determinar a qué subtipo pertenecen.

VI. JUSTIFICACIÓN

Vibrio mimicus es el cuarto patógeno más importante dentro del género *Vibrio*, sin embargo, se desconocen algunos aspectos asociados con su patogenicidad, como la cápsula, pili, flagelo lateral, biopelícula y el tipo de sistema de secreción tipo III, que presenta. Por lo que es de nuestro interés, identificar dichas estructuras en una colección de cepas nativas de México para tener nuevos elementos sobre las interacciones que tienen esta bacteria con su medio ambiente inmediato y su posible mecanismo de patogenicidad.

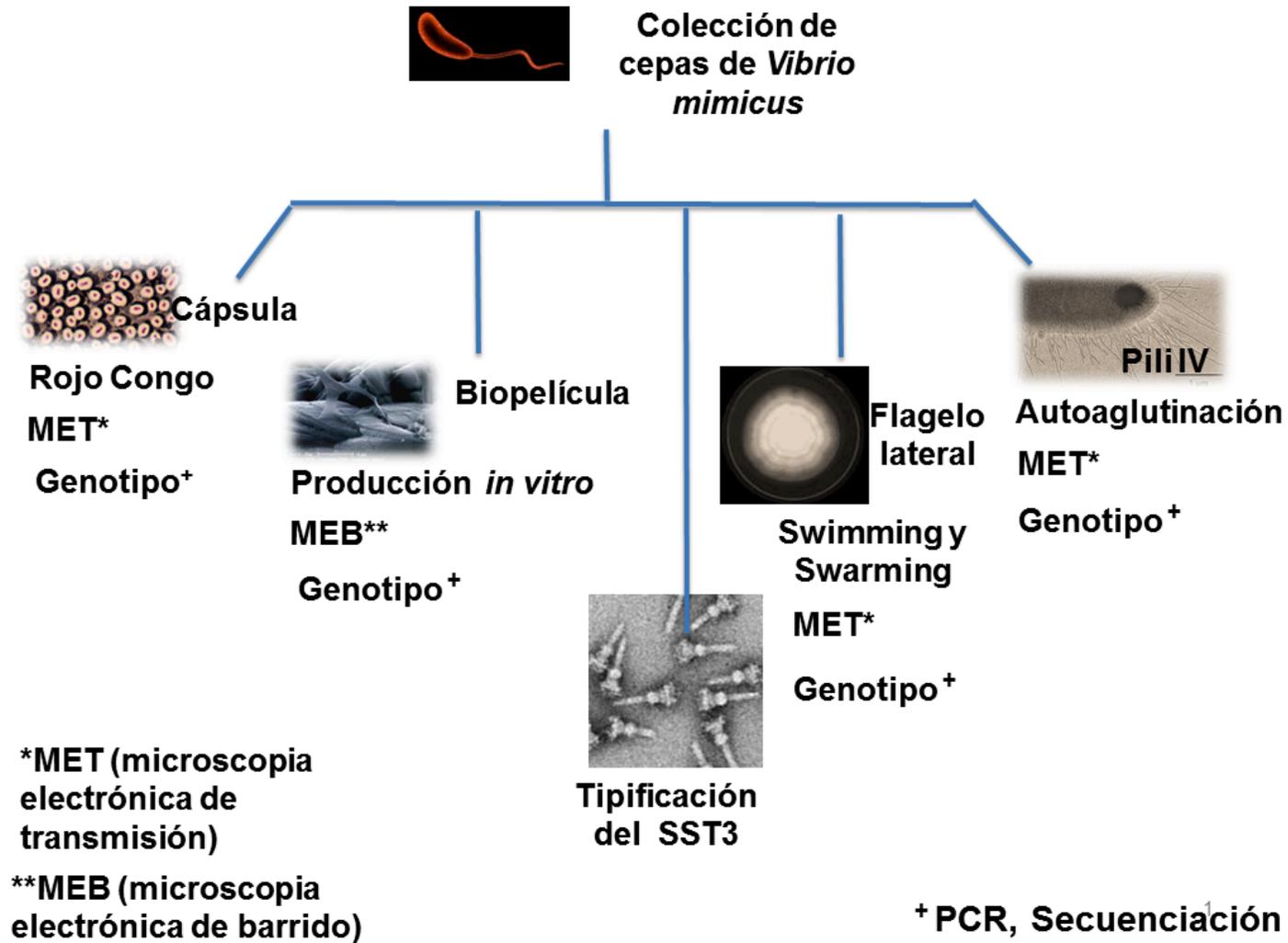


Figura 5.

Diagrama general de trabajo.

VII. METODOLOGÍA.

VII.1. CEPAS

Se trabajó con 20 cepas de *Vibrio mimicus* aisladas de la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz: 6 de muestras de agua, 5 de pescado y 9 de ostión. Además se utilizaron 8 cepas de colección como testigos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas testigo

Cepa	Características
<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653	<i>vmhA+</i> , <i>iutA+</i> , <i>vm toxR+</i> , CTX Φ -, VPI1-.
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29307	<i>vvhA+</i> , <i>vvtoxR+</i> , <i>pilA+</i> , <i>viuB+</i> , <i>wza+</i>
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Ogawa CLBM-ENCB	<i>hly+</i> , <i>vctoxR+</i> , CTX Φ +, VPI1+.
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba CLBM-ENCB	<i>hly+</i> , <i>vctoxR+</i> , CTX Φ +, VPI1+.
<i>V. parahaemolyticus</i> CAIM 727	O3:K5 <i>tdh</i> +, <i>trh</i> - SSTIII tipo 2 β +
<i>V. parahaemolyticus</i> clínica	SSTIII tipo 2 α + <i>tdh</i> +,
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	No posee pili
<i>Shigella flexneri</i> CLBM-ENCB	Inmóvil, no formadora de biopelícula

CLBM-ENCB = Colección del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. CAIM = Colección de microorganismos de importancia acuícola del CIAD Mazatlán

A las cepas de la colección se les confirmó pureza y posteriormente su identidad por medio de pruebas bioquímicas y la amplificación por PCR del gen *vmhA*.

VII.2. MÉTODOS GENERALES

VII.2.1. Obtención de ADN genómico

Las cepas se cultivaron en caldo Luria Bertani y se incubaron a 37°C durante 24 horas sin agitación. Para obtener el ADN se empleó el sistema Wizard® Genomic DNA Purification Kit, de la casa comercial PROMEGA®, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor.

VII.2.2. Amplificación de los genes por la técnica de PCR.

VII.2.2.1. Diseño de iniciadores y análisis bioinformático

Para el diseño de los iniciadores, se hizo una búsqueda en la base de datos del GenBank y con el algoritmo BLAST del NCBI, (URL 3) para obtener las secuencias de los genes homólogos relacionados con las estructuras descritas en otros patógenos del género, posteriormente se hizo el análisis bioinformático correspondiente utilizando el paquete DNASTAR® versión 7.1 de Lasergene, el programa Seaview 4.32 para encontrar regiones comunes entre las diferentes secuencias y buscar el loci adecuado para los iniciadores considerando los nucleótidos variables.

VII.2.2.2. Mezcla de reacción

Se preparó la mezcla de reacción con: 34.95 µL de agua destilada estéril, 5 µL de regulador 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl), 2.5 µL de MgCl₂ 50mM, 0.25 µL de la mezcla de dNTP (10 mM), 2.5 µL de cada iniciador (1 nM), 0.3 µL de *Taq*

polimerasa (5 U/ μ L) y 2 μ L de la solución que contiene el ADN (aproximadamente 100 ng). El volumen total de la mezcla de reacción será de 50 μ L. Las reacciones de PCR se estandarizaron y se desarrollaron en condiciones estándar en un termociclador, MultiGene Gradient DNA Thermal Cycler MIDSCI. Las condiciones de los ciclos tiempos y temperaturas utilizados para cada gen se determinaron con base en las características particulares de cada uno de los iniciadores que se diseñaron.

VII.2.2.3. Corrimiento electroforético

Se prepararon geles de agarosa desde 1% hasta 1.5% (p/v) dependiendo del tamaño del amplificado. Se mezclaron 4 μ L del producto de PCR con 1.5 μ L del regulador de carga [azul de bromofenol (0.25%), sacarosa (40%) y xileno cianol (0.25%)] y 9 μ L de agua. Las electroforesis se desarrollaron utilizando regulador Tris-Ácido acético glacial-EDTA (TAE), mediante la aplicación de 121 V durante una hora. Como referencia, se empleó un marcador de talla molecular de 100 pb (Invitrogen®).

La tinción de los geles se hizo con el sistema HydraGreen®. Los geles se observaron en un fotodocumentador Bio-Imagen systems®, que emite luz ultravioleta a una longitud de onda de 302 nm y se digitalizaron mediante en el programa MBE-IMG® (Mayor science®).

VII.2.3. Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa

Para la purificación de las bandas de los productos de PCR a partir de un gel de agarosa se usó el kit ILLUSTRATM GFXTM PCR DNA and gel band purification kit® de la casa comercial General Electric®, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

VII.2.4. Cápsula

- Prueba fenotípica, producción de exopolisacáridos (Freeman *et al.*, 1989)

Se cultivó cada una de las cepas en caldo soya y tripticaseína (TSC) de 18-24 horas a 37°C, posteriormente se sembró en placas conteniendo agar rojo Congo y se incubó 24 horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo, se describió la morfología colonial; se evaluó tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie, aspecto, luz reflejada, luz transmitida e incorporación del colorante a la colonia.

- Microscopía electrónica de transmisión (Stukalov *et al.*, 2008)

Todas las cepas se cultivaron toda la noche (aproximadamente 12 horas) en agar glicerol, incubado a 37°C, se hizo una suspensión ajustada al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland (1.5×10^8 UFC/mL), en regulador isotónico de fosfatos pH 7, posteriormente se colocaron 20 μ L de dicha suspensión sobre una rejilla de cobre de 200 mesh con recubrimiento de formvar/carbón durante 15 minutos.

A continuación, se eliminó el excedente por medio de papel filtro, y se adicionó solución de rojo de rutenio al 1% para contrastar las diferentes preparaciones y se dejó interactuar durante 10 minutos para contrastar. Se hizo un lavado con el mismo regulador y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 Electronic microscope.

- Prueba genotípica

Se diseñaron los iniciadores específicos para amplificar un gen homólogo a *wzb* (implicado con la síntesis y exportación del polisacárido capsular) Cuadro 2, a partir de las secuencias reportadas en el GenBank para *V. cholerae* y *V. vulnificus*, se hizo un alineamiento y se buscaron regiones conservadas. Posteriormente se estandarizó la reacción de PCR y obtenido el producto se purificó y se envió a secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa; cuando se obtuvo dicha secuencia, se analizó por medio de bioinformática para evitar errores y se comparó contra la base de datos utilizando el programa BLAST para verificar su identidad.

VII.2.5. Biopelícula

- Prueba fenotípica, producción de biopelícula *in vitro* (O'Toole, 2011)

Se cultivó cada una de las cepas en caldo TSC de 18-24 horas a 37°C. Posteriormente cada cultivo se centrifugó y se resuspendió en medio de cultivo fresco con una concentración de 3×10^8 UFC/mL. Finalmente, se colocaron 3 mL de la suspensión bacteriana, en placas de poliestireno de 6 pozos que se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo de cada uno de los pozos, teniendo cuidado de no romper la biopelícula, se lavó con agua destilada y se fijaron con glutaraldehído al 2.5%, posteriormente se lavaron de nuevo para

después teñir con cristal violeta al 0.4% durante un minuto, se lavan nuevamente en dos ocasiones y se deja secar al aire.

- Microscopía electrónica de barrido (Shime-Hattori *et al.*, 2006)

En una placa de poliestireno de 6 pozos se colocan cubreobjetos de vidrio redondos en el fondo, se hace el mismo procedimiento del experimento anterior para que se produzca una biopelícula, luego se retiró el medio de cultivo a diferentes tiempos con precaución para no romper la biopelícula, se lavó con regulador de PBS y se prefijó con glutaraldehído al 2% durante 2 horas, luego, se lavó 3 veces con solución de lavado (amortiguador de fosfatos de Sorensen 50 mL, sacarosa 5g, solución 1% de CaCl_2 5 gotas). Entonces cada pozo se postfijó con una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas, se hicieron 3 lavados más con solución de lavado.

Se deshidrataron las muestras agregando alcohol etílico, en concentraciones crecientes desde 10% hasta el 100%, con cambios cada 10 minutos.

Se dejó reposar 30 minutos en etanol absoluto, haciendo 3 cambios y finalmente se desmontaron los cubreobjetos de la placa y se secaron hasta el punto crítico en un secador. Los cubreobjetos, se montaron sobre portamuestras de aluminio y se cubrieron con oro con una ionizadora Desk II Denton Vacuum y se observaron con diferentes aumentos en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5800LV Scanning microscope.

- Prueba genotípica

Se diseñaron iniciadores específicos (Cuadro 2), para *V. mimicus* a partir de las secuencias reportadas en el GenBank para el gen *rbmA*, de *V. cholerae*, que codifica para una proteína estructural esencial que le da soporte la biopelícula.

Una vez estandarizada la reacción de PCR y obtenido el producto se envió a secuenciar al mismo lugar que el anterior y se hizo el análisis bioinformático correspondiente.

VII.2.6. Presencia del flagelo lateral

- Prueba fenotípica, ensayo de *swimming* y *swarming* (Canals *et al.*, 2006)

Las cepas fueron inoculadas en caldo TSC con 1% de NaCl, que se incubó durante 24 horas a 37°C, posteriormente, se tomaron 10 µL del cultivo y se inocularon en el centro de una caja de Petri, en un medio que contenía 0.3% de agar para observar el fenómeno de *swimming* y 0.6% de agar para observar el *swarming*. Las cajas se incubaron a 37°C durante 72 horas y se observaron las características y el tipo de crecimiento.

- Microscopía electrónica de transmisión (Tian *et al.*, 2008).

A partir de una caja de Petri que presentaba crecimiento característico como el del experimento anterior (*swarming*), se tomó una porción del crecimiento y se colocó sobre una gota de regulador de fosfatos pH 7 en una rejilla de cobre de 200 mesh con recubrimiento de formvar/carbón. A continuación, se absorbió el excedente con papel filtro y se contrastó con una solución de ácido fosfotúngstico pH 7 al 0.1% durante 10 minutos. Las muestras fueron sometidas a un lavado con regulador y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche para su posterior observación al microscopio electrónico de transmisión.

- Prueba genotípica

Los iniciadores para poner de manifiesto el gen homólogo a la flagelina lateral (*lafA*) de *V. mimicus* se diseñaron a partir de las secuencias depositadas en el GenBank de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (Cuadro 2). Una vez que se estandarizó la reacción de PCR, y se obtuvo el producto purificado se envió a secuenciar al mismo lugar que los demás y se analizó por métodos bioinformáticos para corroborar la identidad del mismo.

VII.2.7. Presencia del pili tipo IV

- Prueba fenotípica, ensayo de autoaglutinación (Chiang *et al.*, 1995)

Las cepas fueron inoculadas en caldo TSC adicionado con 1% de NaCl en matraces y fueron incubadas a 37° C por 18 horas en agitación. Posteriormente, cada uno de los matraces fue iluminado con una lámpara para buscar la presencia de agregados de crecimiento bacteriano sobre el seno del líquido, dichos agregados se consideran autoaglutinados, fenómeno que se correlaciona con la presencia de pili tipo IV.

- Microscopía electrónica de transmisión (Paranjpye y Strom, 2005).

A partir de un cultivo de toda la noche (12 horas aproximadamente) en caldo TCG (1% bacto triptona, 0.3% extracto de levadura, 0.5% NaCl, 0.3% NaHCO₃, 0.02% tioprolina, 0.1% L-acido glutámico, 1 mM EGTA), se hizo una suspensión ajustada al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland (1.5×10^8 UFC/mL), en regulador isotónico de fosfatos pH 7, posteriormente se colocaron 20 μ L de dicha suspensión sobre una rejilla de cobre de 200 mesh con recubrimiento de formvar/carbón durante 15 minutos.

A continuación, se retira el excedente con papel filtro y se colocó una solución de ácido fosfotúngstico al 1% pH 7.3 durante 10 minutos para contrastar la muestra.

Se hizo un lavado con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche para su posterior observación al microscopio electrónico de transmisión.

- Prueba genotípica

Se diseñaron los iniciadores para amplificar regiones homólogas a los genes *pilA* y *pilB* en *V. mimicus* a partir de las secuencias reportadas en el GenBank para *V. cholerae*, y *V. vulnificus* (Cuadro 2). Una vez estandarizada la reacción de PCR, y de que se obtuvo el producto de PCR purificado, fue enviado a secuenciar y cuando se obtuvo la secuencia se hizo el análisis bioinformático correspondiente.

VII.2.8. Detección del de SSTIII (sistema de secreción tipo 3) y tipificación (Okada *et al.*, 2010).

Para poner de manifiesto y tipificar el SST3 en *V. mimicus*, se utilizaron los iniciadores reportados por Okada y colaboradores en 2010 donde por medio de la amplificación por PRC de genes esenciales para el correcto ensamblaje y funcionamiento del sistema (Cuadro 2) se pretende en primer lugar observar si la colección de cepas de *V. mimicus* tiene un SST3 y de ser así, los iniciadores son capaces de diferenciar un subtipo espacial del SST3. Se estandarizaron las reacciones de PCR de acuerdo a las condiciones del autor y una vez obtenidos los productos se hizo el análisis correspondiente.

Cuadro 2 Lista de iniciadores usados en este trabajo

Gen	Número GenBank	Forward	Reverse	Tamaño
<i>wzb</i>	KJ916244	5'GAGTTTTTTTACCCAAGCCGC 3'	5'TAGTCGTCTGCGTTGGCAATAT 3'	804 pb
<i>rbmA</i>	KJ916243	5'CRCCMGCWGGATAGCTTTTA 3'	5'CARCGGCTTCTTWTGCRG 3'	304 pb
<i>lafA</i>	KJ916241	5'CGCTTCACTCGTTACTCAA 3'	5'GGCCTTCGTACCTGTT 3'	599 pb
<i>pilA-B</i>	KJ916242	5'GTGGTGGCRRTKATTGGTGT 3'	5'TGGTTGATAAAGCGGCTAAC 3'	900 pb
<i>vscα</i>	N/A	5'CCATTTCTTGGAGGGTTTC 3'	5'AGTGAAGGAGTVGTATCAAG 3'	1500 pb
<i>vscβ</i>	N/A	5'TCATATCAAGACACCGTCCG 3'	5'CAACTCCGTCAAACCCTTGC 3'	700 pb
<i>vcrα</i>	N/A	5'CCAGCAGTGTGATGATTGC 3'	5'CGACGACAGGTTTCGAACC 3'	1500 pb
<i>vcrβ</i>	N/A	5'GGTAACACTGCCTGGTGTGGTCATCG 3'	5'GTCTCTCAAAGTCCAACTCACCTGC 3'	400 pb

pb = Pares de bases, N/A. no aplica

VIII. RESULTADOS

VIII.1. PRESENCIA DE CÁPSULA

La producción de exopolisacáridos se evidenció por medio de la morfología colonial de las cepas en agar rojo Congo, en donde se encontró la siguiente morfología en todas las cepas de la colección: colonias de color rojo o rosa debido a la incorporación el colorante a la colonia, circulares, con borde entero, convexas, lisas de aspecto húmedo, que reflejan la luz pero no la transmiten es decir son colonias opacas, fenotipo que concuerda con uno de los 3 fenotipos reportados para esta metodología,(, y translúcidas que no producen exopolisacáridos) como se observa en la figura 6. En la figura 6A observamos colonias rugosas que son hiperproductoras de exopolisacáridos y corresponden a nuestro testigo de *V. cholerae*, en la figura 6C observamos colonias opacas lisas que producen exopolisacáridos que es nuestro testigo de producción de cápsula (*V. parahaemolyticus*) y cuya descripción de morfología colonial concuerda con la presentada por las cepas de *V. mimicus* como se observa en la figura 6B y 6D. Lo que sugiere que dichas cepas, pueden producir polisacáridos extracelulares, como una cápsula o una biopelícula.

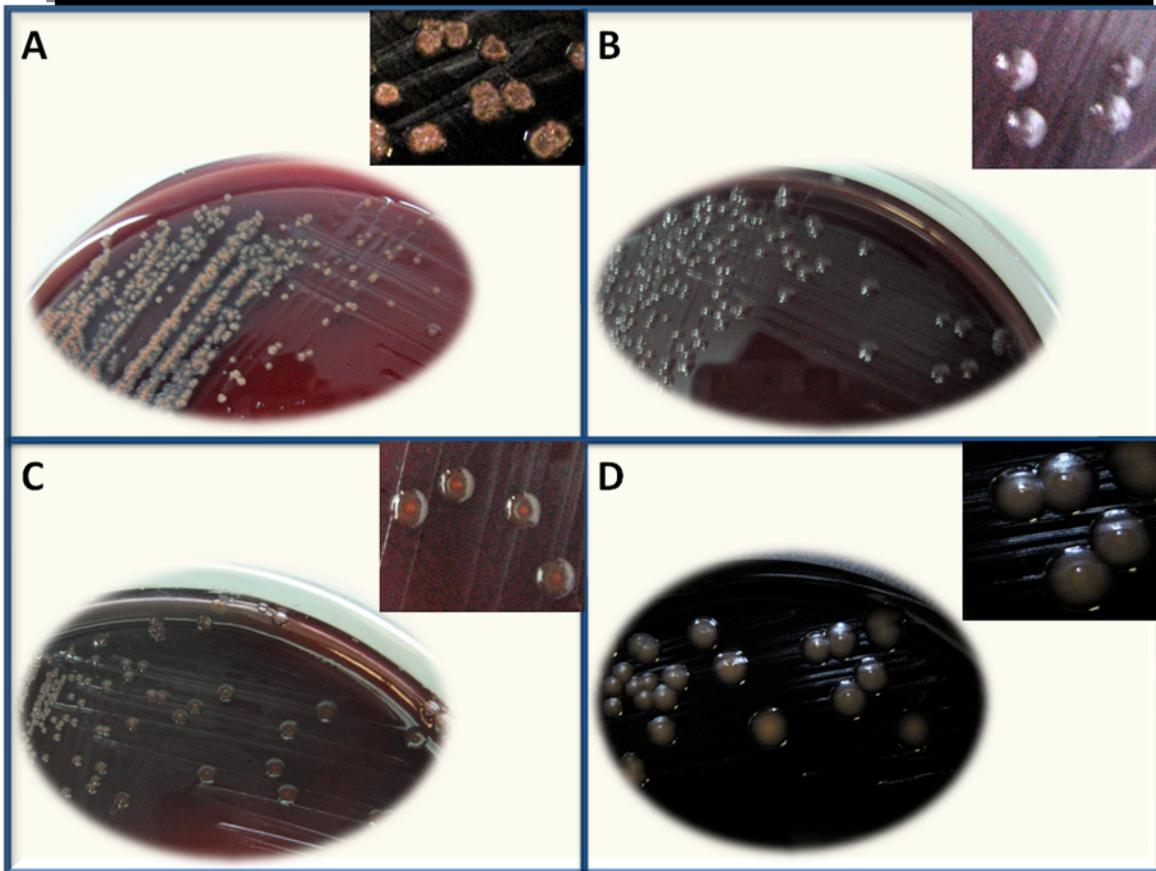


Figura 6. Morfología colonial observada en agar rojo Congo.
A. *Vibrio cholerae* O1 Inaba (testigo positivo colonia rugosa) B. *V. mimicus* ATCC 33653 C. *V. parahaemolyticus* CAIM 727 (testigo positivo colonias opacas), D. Aislamientos de *V. mimicus* (morfología opaca).

Al desarrollar la prueba genotípica, se esperaba un amplificado de PCR de aproximadamente 421 pb, correspondiente a parte del gen *wzb*, el cual amplificó en nuestro testigo de *V. cholerae* Ogawa y posteriormente todas las cepas de la colección, como se observa en la Figura 7. Lo que indica que en las cepas de *V. mimicus* existe un gen homólogo al *wzb* de *V. cholerae*.

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*"

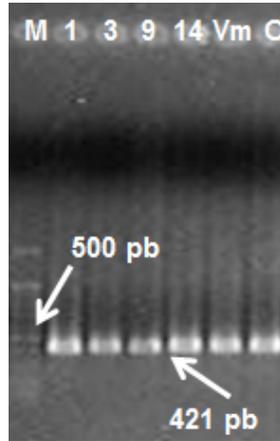


Figura 7. Electroferograma del producto amplificado de los genes *wzb*. M= marcador de talla molecular 100pb, 1,3,9,14 *V. mimicus*; Vm *V. mimicus* ATCC; O *Vibrio cholerae* serotipo Ogwa

Posteriormente se purificó dicho producto de PCR y se mandó secuenciar y cuando fue obtenida dicha información, se hizo el análisis BLAST, el cual indicó que el fragmento amplificado tiene 97% de identidad con una región que se encarga de síntesis de la cápsula en *V. cholerae* (figura 8), lo que confirma nuestros resultados. Posteriormente se mandó la secuencia para su análisis y validación al GenBank en donde se le asignó el número de secuencia KJ916244.

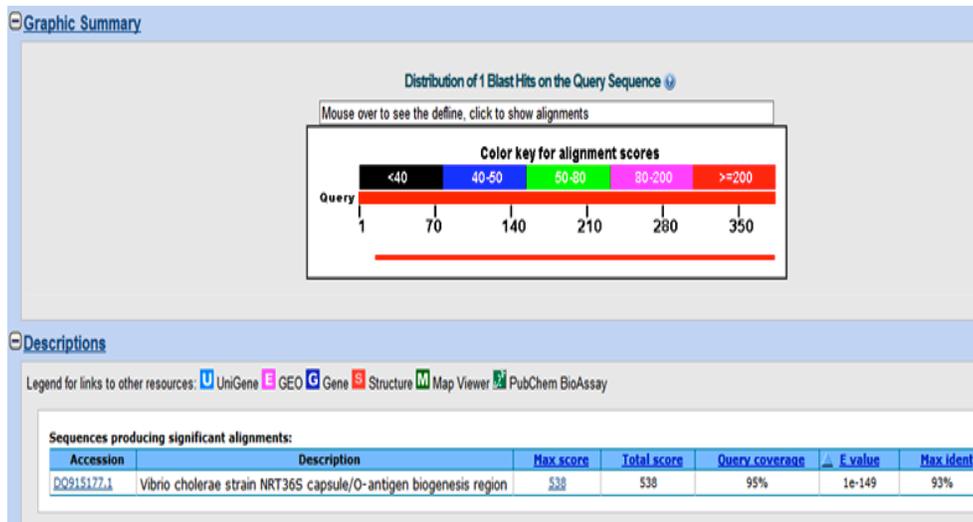


Figura 8. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen *wzb* de *V. mimicus*

Finalmente, se obtuvo la microfotografía de la cápsula por medio de la microscopía de transmisión utilizando el rojo de rutenio como medio de contraste ya que éste tiene afinidad por los carbohidratos, como se observa en la figura 9, se puede apreciar el cuerpo de la bacteria con la forma de bacilo curvo característica del género, rodeada de una zona electrodensa de color más oscuro que corresponde al polisacárido capsular.

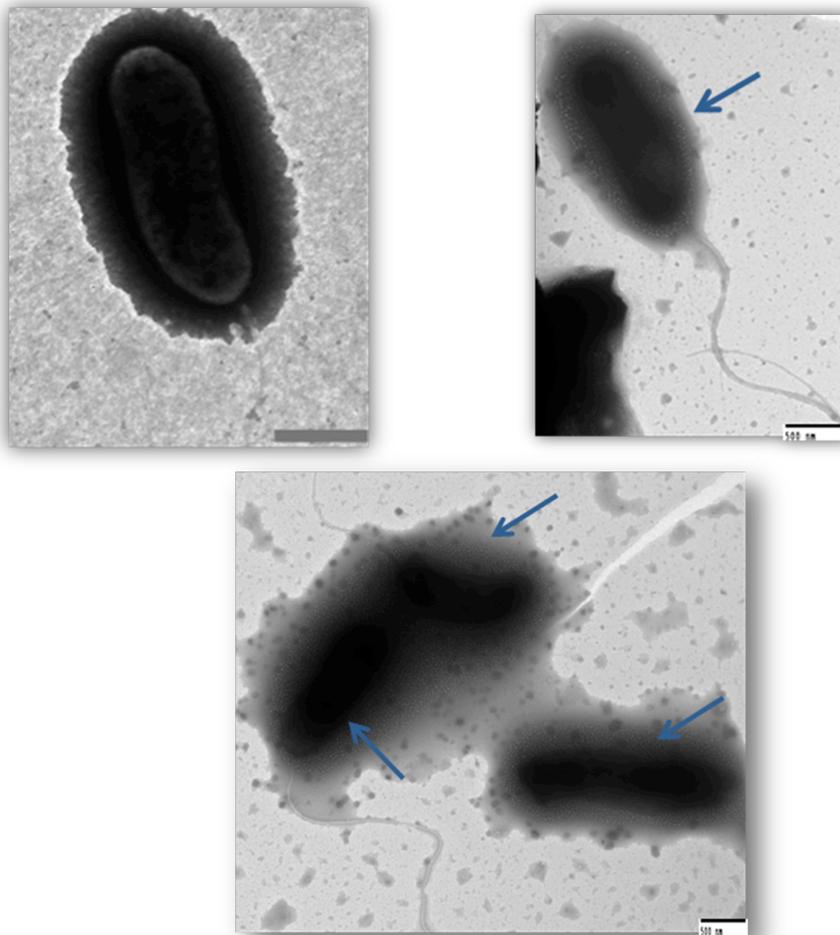


Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión, donde se observa la cápsula de *V. mimicus* contrastada con rojo de rutenio. Barra= 500nm. Aumento 20,000 y 25,000 X respectivamente.

VIII.2. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Al hacer el ensayo cualitativo para la formación de biopelículas, se encontró que el 100% (20/20) de las cepas de *V. mimicus* fueron capaces de formar una biopelícula sobre la superficie del líquido de cultivo, misma que se puede apreciar en color violeta en la figura 10, también dicha película aparece en los testigos de *V. cholerae* Ogawa y *V. parahaemolyticus* situación que no se aprecia en el testigo negativo que era *Shigella flexneri*.

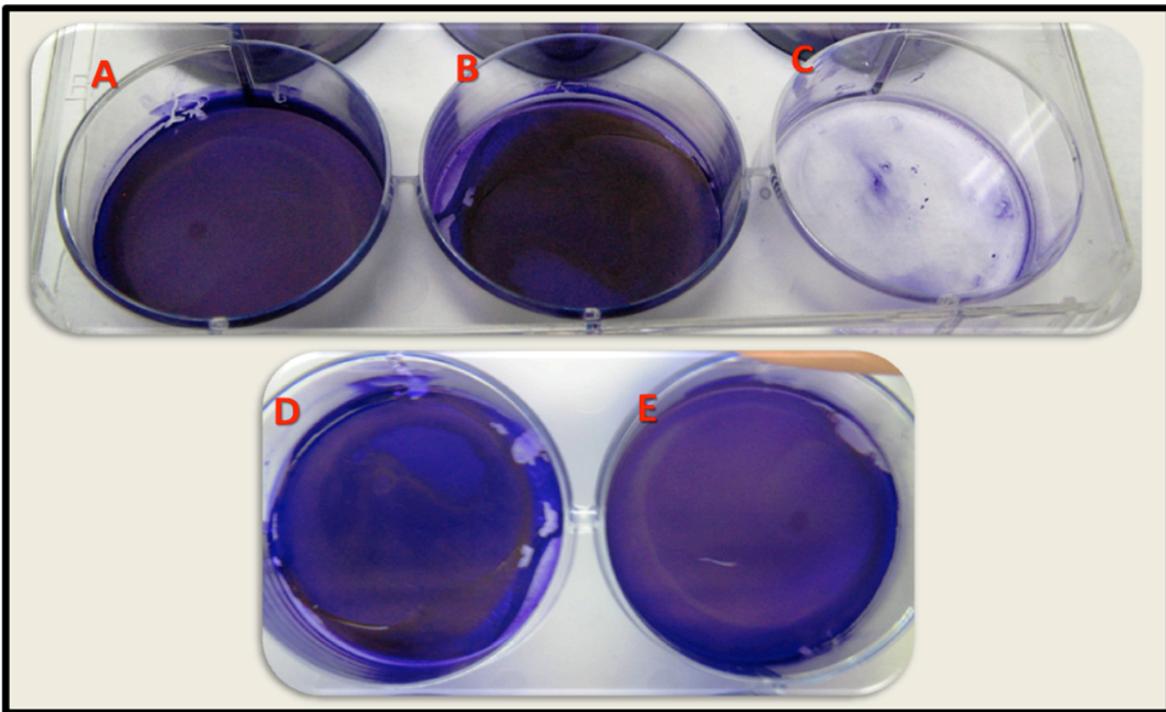


Figura 10. Producción de biopelículas. **A.** *Vibrio cholerae* O1 Ogawa (testigo positivo) **B.** *V. parahaemolyticus* CAIM 727 (testigo positivo) **C** *Shigella flexneri* CLBM-ENCB (testigo negativo) **D.** *V. mimicus* ATCC 33653. **E.** Aislamientos de *V. mimicus*.

De manera paralela, se tomaron fotografías de la biopelícula formada por *V. mimicus* en el microscopio de contraste de fases y de contraste diferencial de interferencia sin teñir ,con la intención de apreciar las estructuras tridimensionales de la biopelícula como se aprecia en la figura 11, en donde podemos apreciar de fondo, las bacterias que están embebidas en una matriz extracelular, misma que presenta relieve al observarla, dicho relieve corresponde a las estructuras tridimensionales que forma esta estructura.

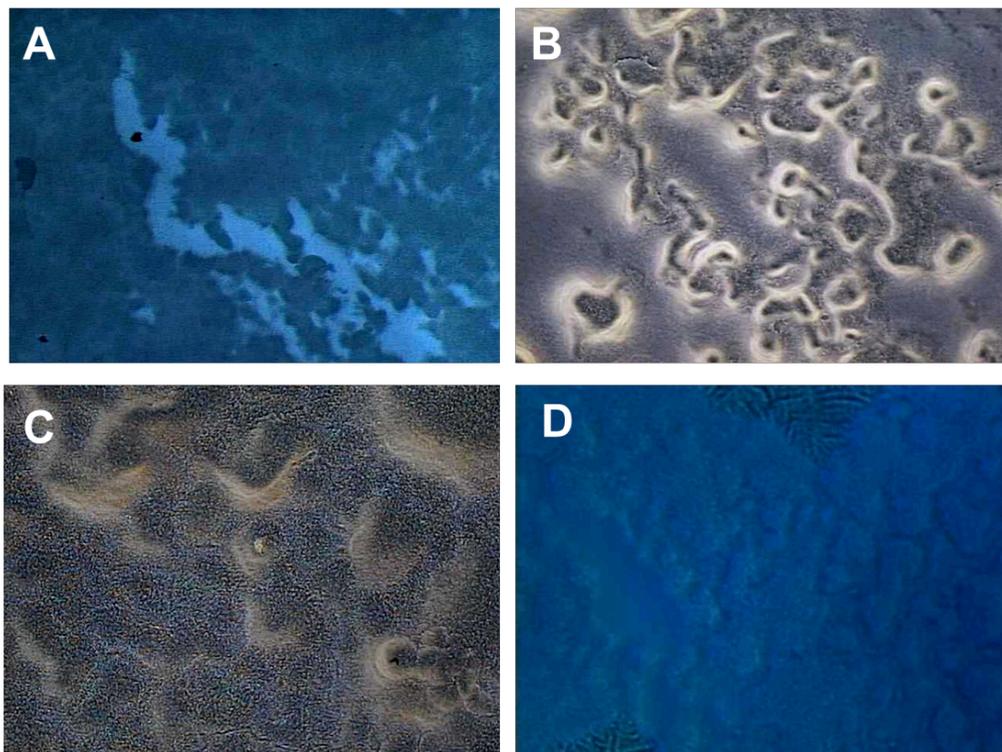


Figura 11. Biopelícula de *V. mimicus*. A. Microscopía estereoscópica 66X. B y C. Microscopía de contraste de fases 100X. D Microscopía de contraste diferencial de interferencia 100X.

Posteriormente, se hizo la prueba genotípica en donde la reacción de PCR amplificó un fragmento de aproximadamente 662 pb, correspondientes a un fragmento del gen *rbmA*, que es fundamental para la correcta construcción de esta estructura, el fragmento fue amplificado en primera instancia por *V. cholerae* Ogawa que fue usado como testigo positivo y posteriormente se observó un amplificado similar en todas las cepas de la colección lo que indica que *V. mimicus* tiene un gen homólogo al de *V. cholerae* encontrando el amplificado en todas las cepas de *V. mimicus* probadas.

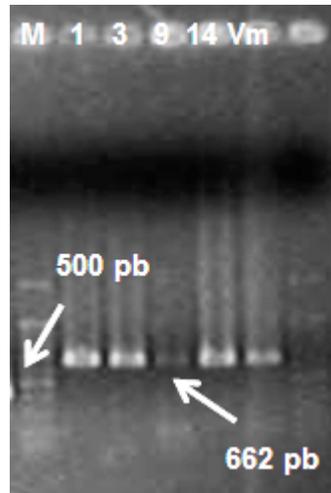
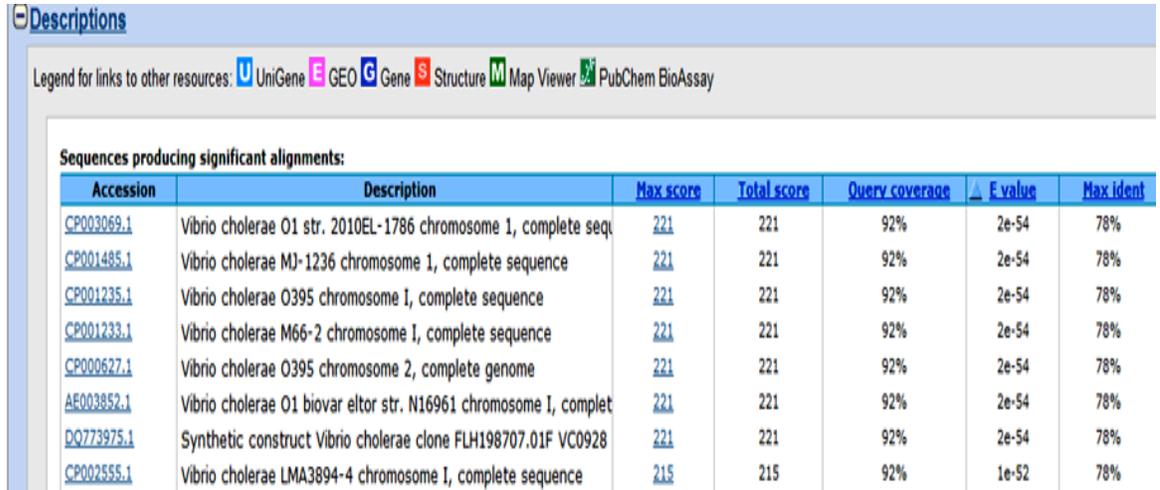


Figura 12. Electroferograma del producto amplificado del gen *rbmA*. M= marcador de talla molecular 100pb, 1,3,9,14 *V. mimicus*; Vm *V. mimicus* ATCC.

Posteriormente, se purificó dicho producto de PCR y se mandó secuenciar; el resultado del análisis BLAST reveló que las secuencias de *V. mimicus*, tienen una identidad del 78% contra una secuencia señalada como genoma de *V. cholerae*, pero no indica a qué región o gen en particular, esto se debe a que dicho genoma no se encuentra anotado, al buscar más a detalle sobre la secuencia del genoma de *V. cholerae* encontramos que la región con la cual tuvo homología tiene relación con la

producción de biopelícula en este organismo lo que indica que efectivamente nuestro amplificado corresponde a un gen homólogo al *rbmA* de *V. cholerae*.



Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP003069.1	Vibrio cholerae O1 str. 2010EL-1786 chromosome 1, complete seq	221	221	92%	2e-54	78%
CP001485.1	Vibrio cholerae MJ-1236 chromosome 1, complete sequence	221	221	92%	2e-54	78%
CP001235.1	Vibrio cholerae O395 chromosome I, complete sequence	221	221	92%	2e-54	78%
CP001233.1	Vibrio cholerae M66-2 chromosome I, complete sequence	221	221	92%	2e-54	78%
CP000627.1	Vibrio cholerae O395 chromosome 2, complete genome	221	221	92%	2e-54	78%
AE003852.1	Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961 chromosome I, complet	221	221	92%	2e-54	78%
DQ773975.1	Synthetic construct Vibrio cholerae clone FLH198707.01F VC0928	221	221	92%	2e-54	78%
CP002555.1	Vibrio cholerae LMA3894-4 chromosome I, complete sequence	215	215	92%	1e-52	78%

Figura 13. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen *rbmA* de *V. mimicus*

Posteriormente la secuencia de *V. mimicus* fue enviada al GenBank para su análisis y validación, en donde quedó depositada con el número de secuencia KJ916243.

Finalmente, se obtuvieron microfotografías de microscopía electrónica de barrido de las diferentes etapas en la formación de la biopelícula en *V. mimicus*, haciendo preparaciones en diferentes tiempos de incubación, dichas etapas corresponden a las mencionadas en la figura 2 (Figura 14 y15). Adicionalmente, en la figura 16, podemos apreciar algunas estructuras con mayor detalle incluyendo las formas tridimensionales que puede presentar la biopelícula.

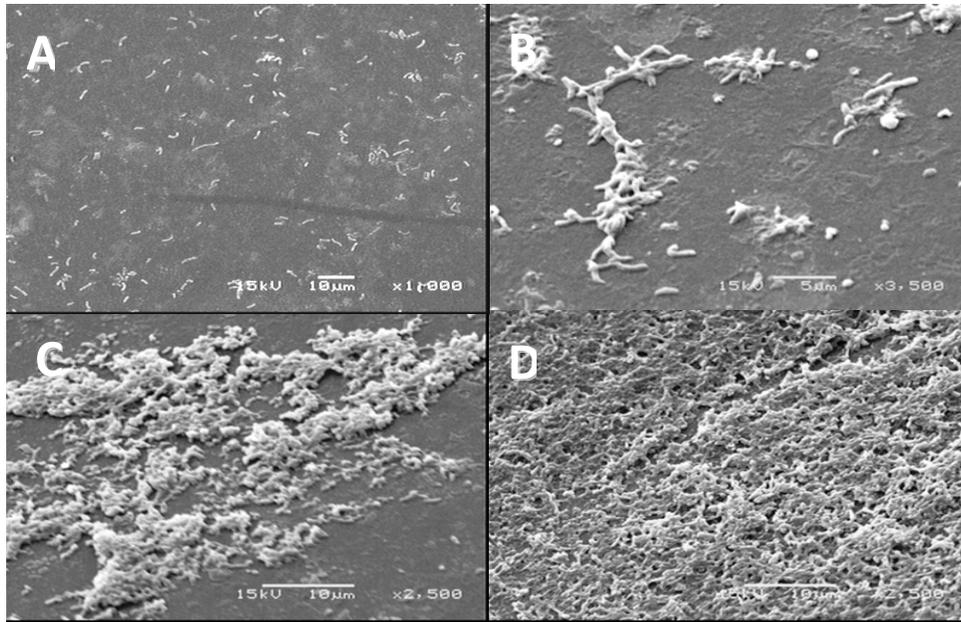


Figura 14. Etapas en la formación de una biopelícula de *V. mimicus*.
A. Adherencia a la superficie B. Formación de microcolonias C. Producción de exopolisacáridos D. Maduración.

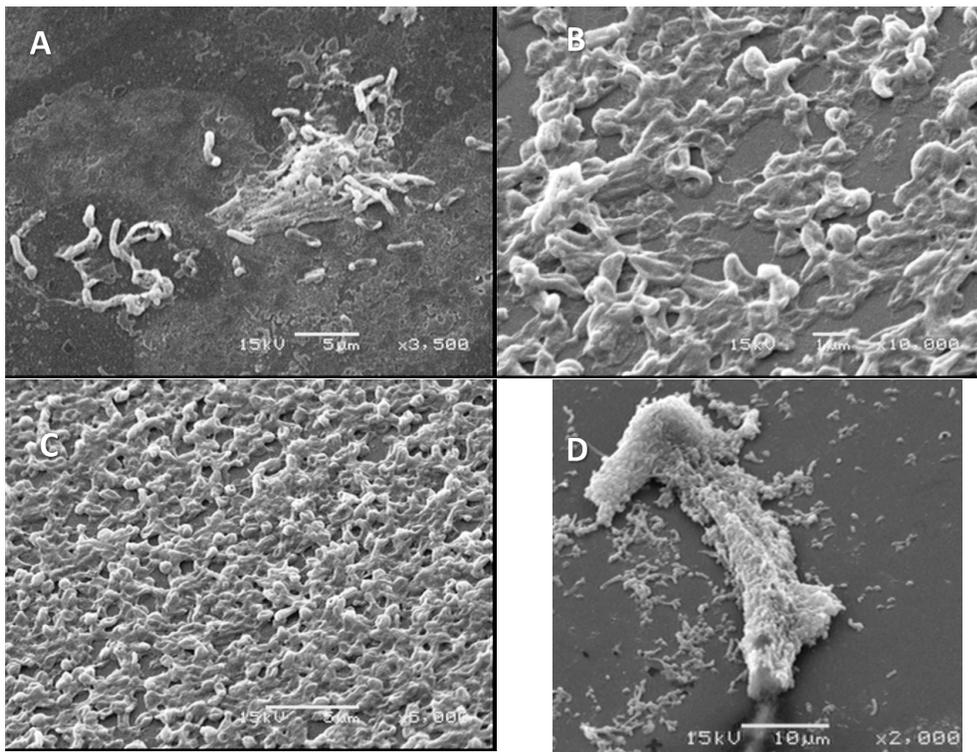


Figura 15. Biopelícula de *V. mimicus*. A. Detalle de la microcolonia. B y C. Detalles de una biopelícula madura D. Estructuras tridimensionales de la biopelícula.

VIII.3. PRESENCIA DEL FLAGELO LATERAL

VIII.3.1. Ensayo de movilidad *Swimming*

Para verificar la funcionalidad del flagelo polar de las cepas aisladas de *V. mimicus*, se hizo el ensayo de movilidad tipo swimming, en donde se encontró que el 100% (20/20) presentaron movilidad tipo *swimming* a las 24 horas de incubación, que se aprecia cómo crecimiento masivo a partir de un centro de inoculación como se aprecia en la figura 16.

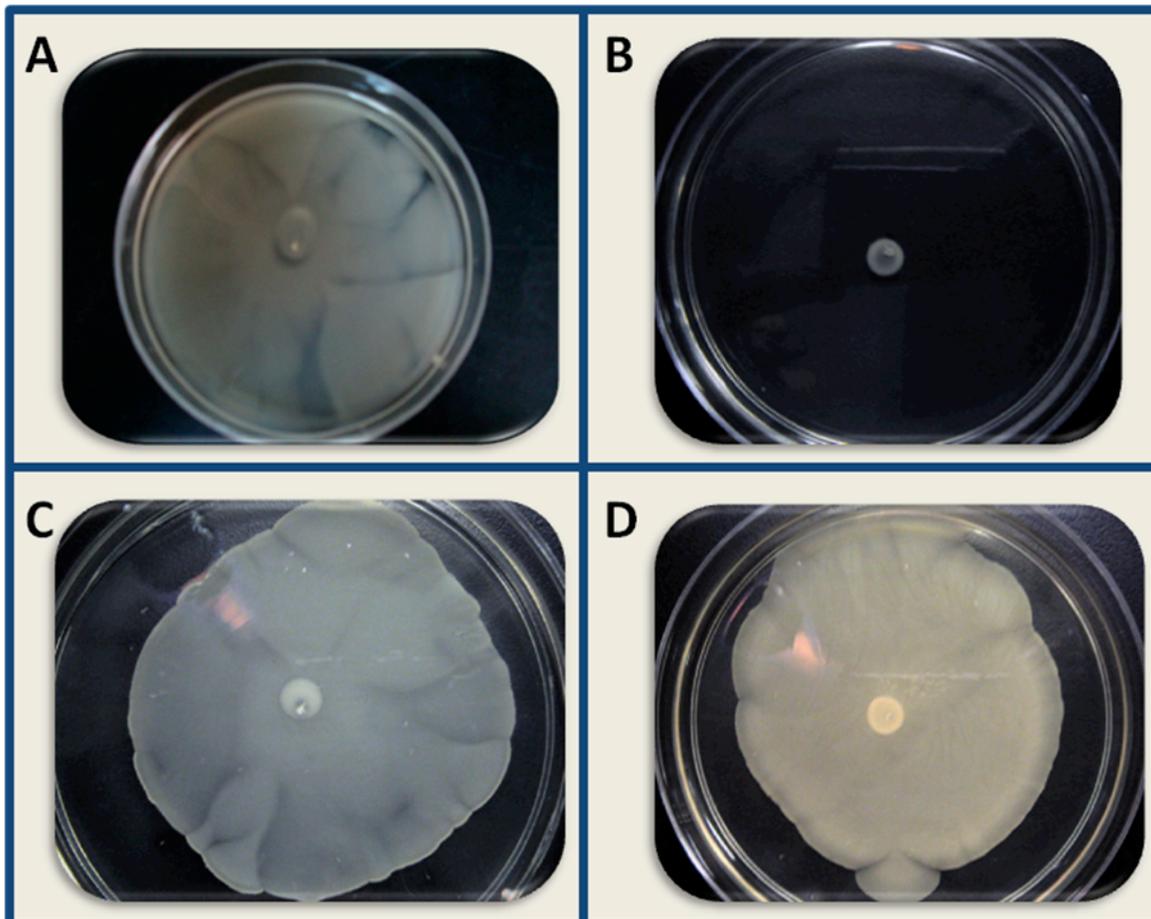


Figura 16. Movilidad tipo *Swimming*. **A.** *V. parahaemolyticus* CAIM 727(testigo positivo) **B.** *Shigella flexneri* CLBM-ENC (testigo negativo). **C.** *V. mimicus* ATCC 33653. **D.** Aislamientos de *V. mimicus*.

VIII.3.2. Ensayo de movilidad *Swarming*

En cuanto a la observación de un movimiento tipo *Swarming*, se encontró que el total de las cepas de *V. mimicus* (20/20) presentaron esta característica a las 72 horas de incubación, caracterizado por anillos de crecimiento concéntricos a partir del punto de inoculación como se puede observar en la figura 17, siendo el movimiento de las cepas de *V. mimicus*, de menor intensidad que el mostrado por la cepa de *V. parahaemolyticus*, pues este tiene una mayor superficie de extensión.

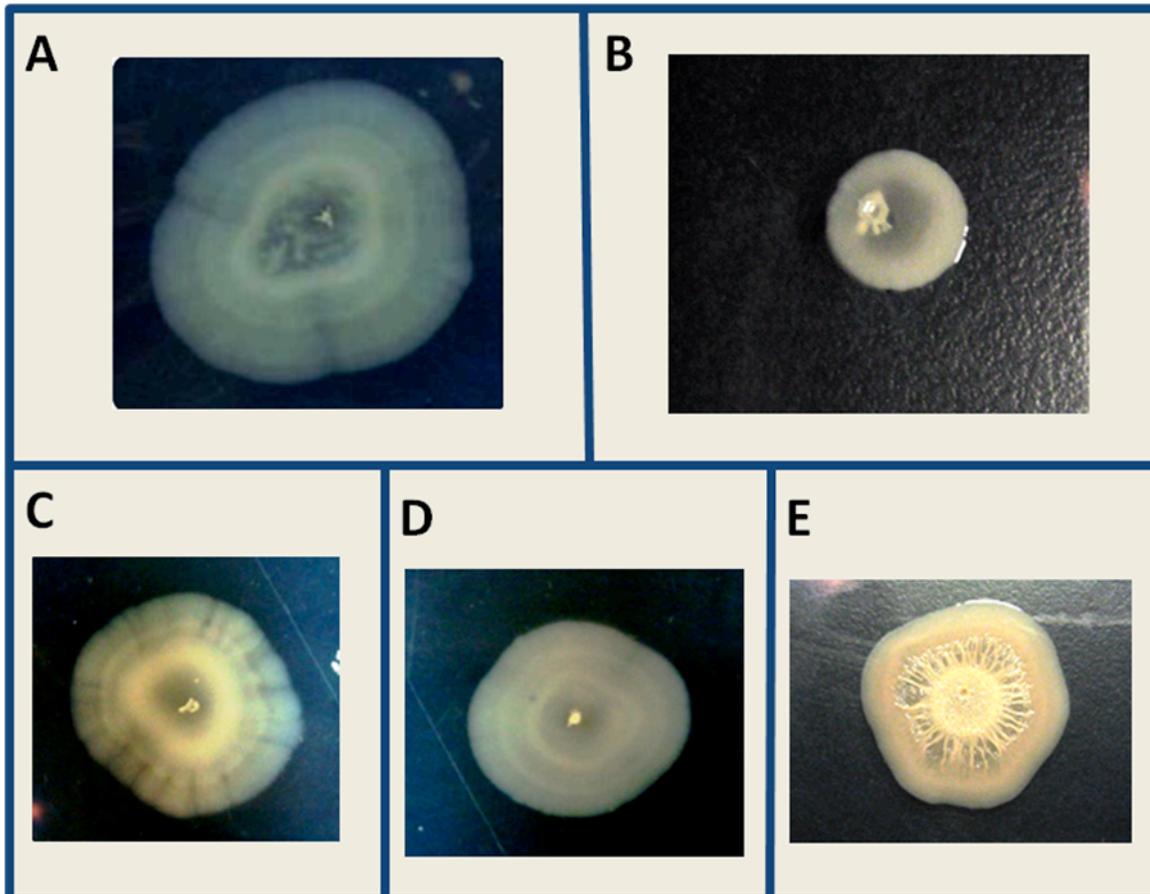


Figura 17. Movilidad tipo *Swarming*. **A.** *V. parahaemolyticus* CAIM 727(testigo positivo) **B.** *Shigella flexneri* CLBM-ENCB (testigo negativo) **C.** *V. mimicus* ATCC 33653. **D.** Aislamientos de *V. mimicus*. **E.** *Vibrio cholerae* O1 Inaba. (testigo negativo)

El movimiento tipo *swarming*, se debe a la presencia de flagelos laterales, por lo que para corroborar la presencia de un segundo sistema flagelar en *V. mimicus*, se diseñaron iniciadores y se desarrolló la posterior reacción de PCR para el gen que codifica para la flagelina lateral, *lafA* (proteína que forma los flagelos laterales) esperando un amplificado de 599 pb, el cual se observó en el 100% (20/20) de las cepas, mismo que se purificó y se mandó secuenciar (Figura 18).

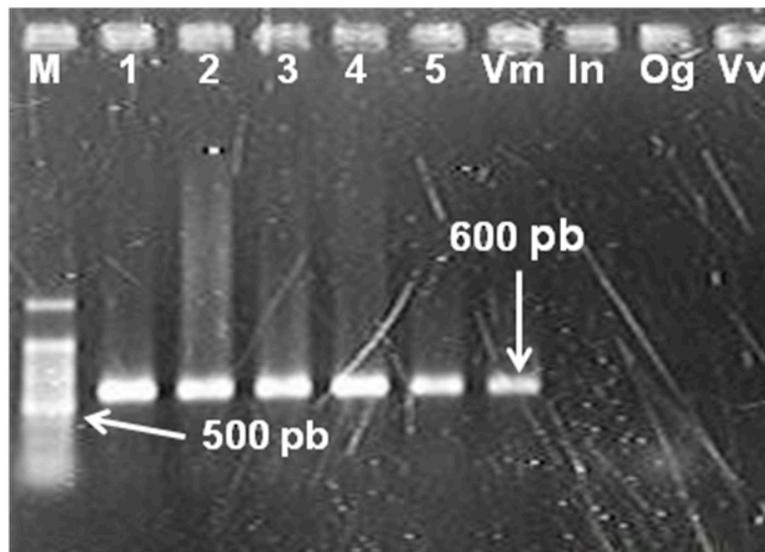


Figura 18. Electroferograma del producto amplificado del gen *lafA*. M= marcador de talla molecular 100pb, 1-5 *V. mimicus*; Vm *V. mimicus* ATCC 33653; In *Vibrio cholerae* serotipo Inaba, Og *Vibrio cholerae* serotipo Ogawa, Vv, *Vibrio vulnificus* ATCC 29307.

Después de purificar y mandar secuenciar dicho amplificado, por medio de un análisis BLAST, se encontró que tiene similitud del 85% y 80% con la secuencia del gen *lafA* de *V. harveyi* y de *V. alginolyticus* respectivamente, como se aprecia en la Figura 19, lo que nos indica que *V. mimicus* presenta un doble sistema flagelar (figura 19).

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*”

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000790.1	Vibrio harveyi ATCC BAA-1116 chromosome II, complete sequence	230	230	39%	1e-56	85%
EF634326.1	Vibrio alginolyticus LafA (lafA) gene, complete cds	172	172	40%	2e-39	80%

Figura 19. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen *lafA* de *V. mimicus*

Posteriormente la secuencia fue depositada en el GenBank en donde se le asignó el número de secuencia KJ916241.

Adicionalmente, se hicieron preparaciones en fresco a partir del crecimiento tipo *swarming*, que fueron observadas por medio de un microscopio de contraste de fases a 1000X, en donde se observó la presencia de dos morfologías microscópicas, una de ellas corresponde a los bacilos curvos móviles y la otra eran células muy grandes que presentaban un patrón de movimiento distinto al resto de las células pequeñas. (Figura 20), lo que indicó que al igual que como ocurre en *V. parahaemolyticus* para expresar el flagelo lateral *V. mimicus* se puede diferenciar a una célula gigante poliflagelada llamada *swarmer*, que correspondería con las observaciones hechas.

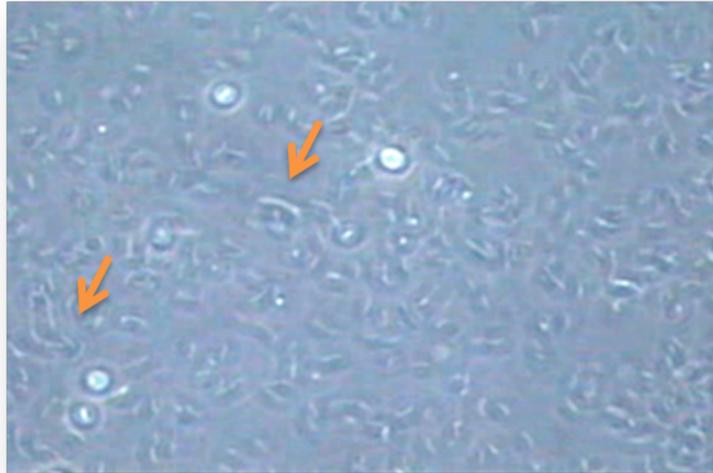


Figura 20. Preparación en fresco del crecimiento tipo *swarming* de *V. mimicus*, las flechas indican las células gigantes.

Para corroborar dicho fenómeno, se hicieron observaciones al microscopio electrónico de transmisión, donde se pudieron observar células de *V. mimicus* que presentan múltiples patrones de flagelación en las 20 cepas de estudio así como en la cepa ATCC, como se ve en la figura 21, se lograron observar células con el flagelo polar característico, células que presentaban un mayor tamaño que el promedio, células de hasta 9 micras de largo y poliflageladas “*swarmer*” (figura 21) además de células poliflageladas de tamaño normal que presentan un mechón o penacho de flagelos (flagelo lofótrico) como se ve claramente en la figura 22.

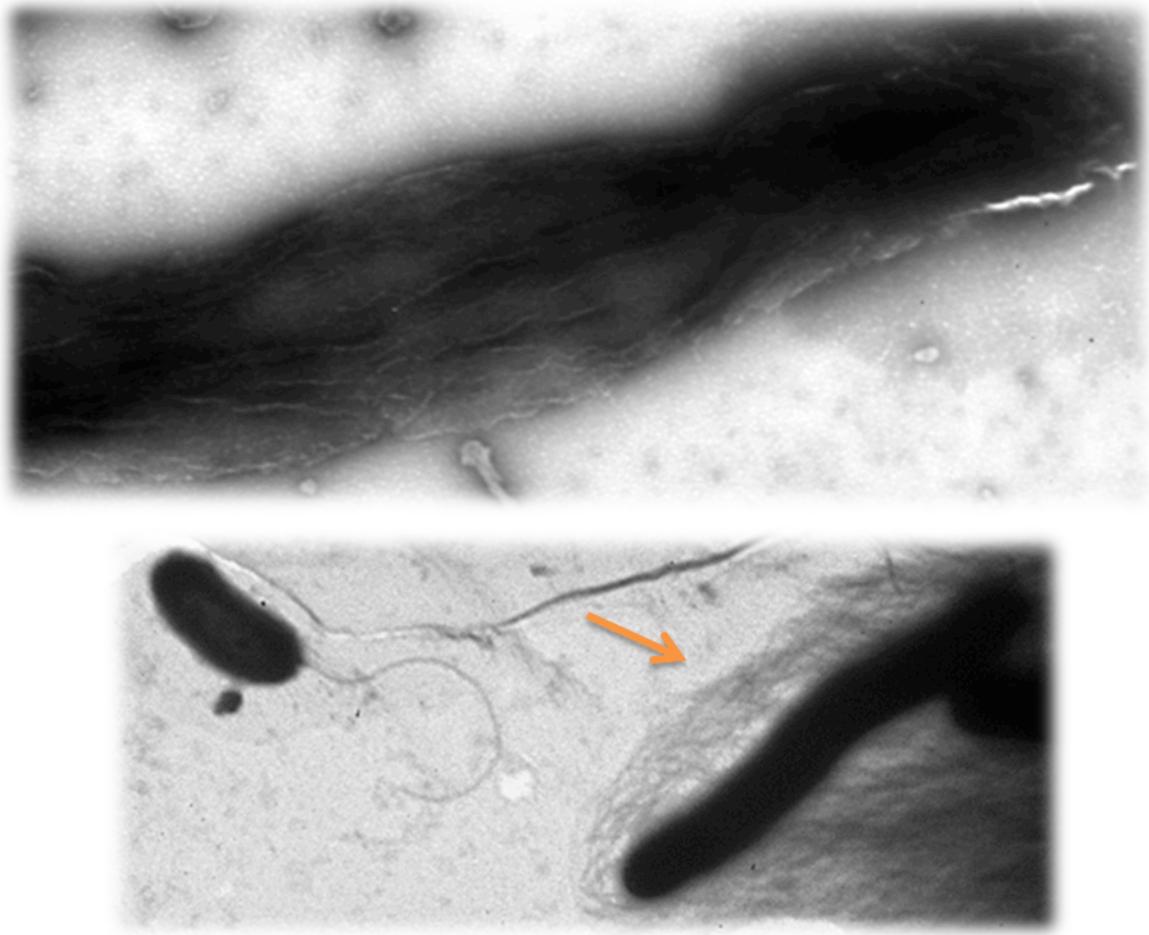


Figura 21. Microscopía electrónica de transmisión, donde se observan el flagelo lateral de *V. mimicus* Aumento 15,000 y 25,000 X respectivamente.

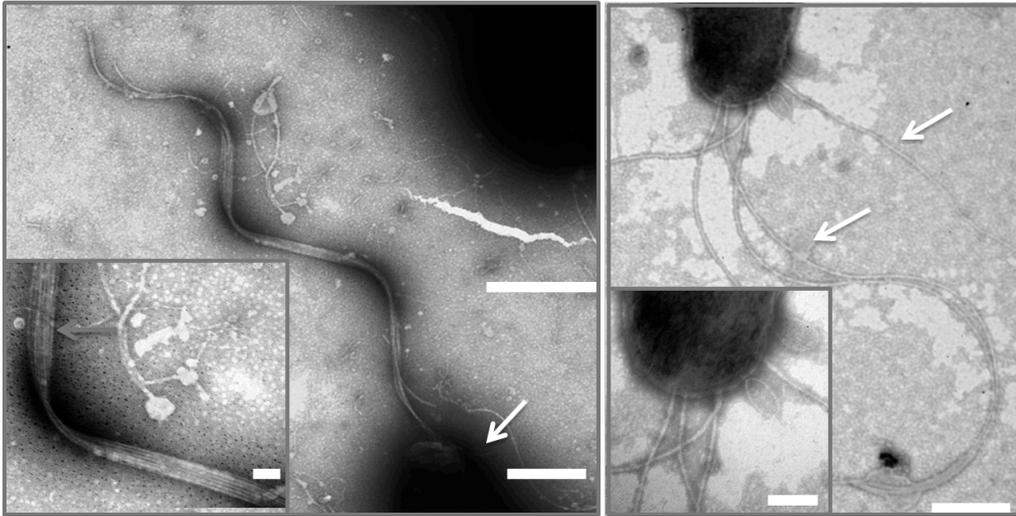


Figura 22. Distintos patrones de flagelación de *V. mimicus*. Izquierda *V. mimicus* ambiental poliflagelado no diferenciado Bar= 500 nm . Detalle del mechón de flagelos Bar= 100 nm. Derecha. Flagelos laterales de *V. mimicus* ambiental diferenciado tipo "swarmer" Bar=500 nm. Detalle de los flagelos laterales Bar=100 nm

VIII.4. PRESENCIA DEL PILI TIPO IV

Para poner en evidencia la presencia de un pili tipo IV, se observó el fenómeno de autoagregación, mismo que se ha correlacionado con la presencia de este tipo de estructuras en las bacterias del género *Vibrio*, donde se encontró que las 20 cepas de la colección lo presentaron ya que se observan grumos formados por bacterias en el seno del líquido, con excepción de la cepa de referencia de *V. mimicus* ATCC como se observa en la figura 23. Se utilizó la cepa de *Listera inocua* como testigo negativo ya que está reportado que esta cepa no tiene ningún pili de tipo IV:

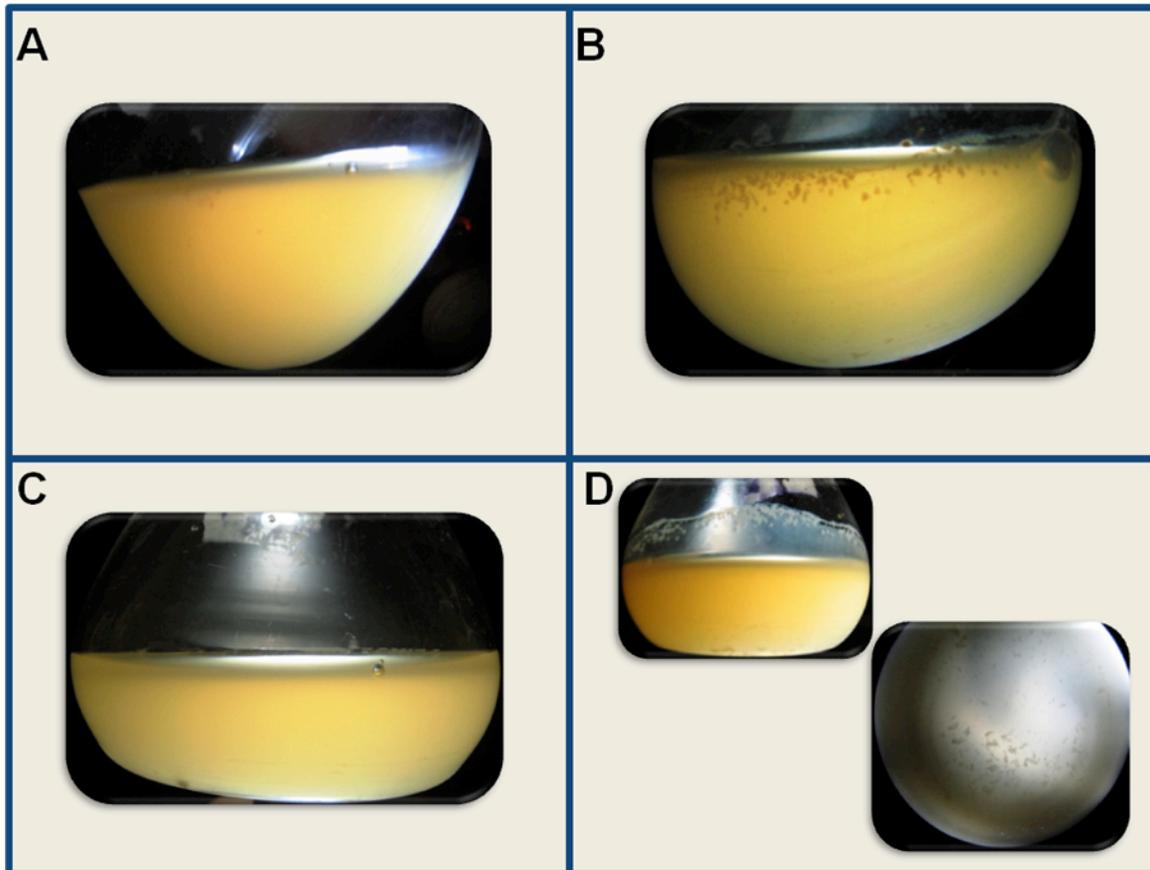


Figura 23. Ensayo de Autoagregación. **A.** *Listeria innocua* ATCC 33090 (testigo negativo) **B.** *V. cholerae* Ogawa. (testigo positivo) **C.** *Vibrio mimicus* ATCC 33653. **D.** Aislamientos de *V. mimicus*

En cuanto a la prueba genotípica, con los iniciadores que se diseñaron se esperaba un amplificado de 900 pb, el cual se observó en todas las cepas aisladas, excepto en la cepa de *V. mimicus* ATCC, lo que confirma que el fenotipo observado corresponde con el genotipo esperado, lo que quiere decir que las cepas aisladas de *V. mimicus* presentan un gen homólogo al gen *pilA* que presentan la mayoría de los *Vibrios* patógenos, mientras que la cepa de referencia ATCC carece de él, como se observa en la figura 24.

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*”

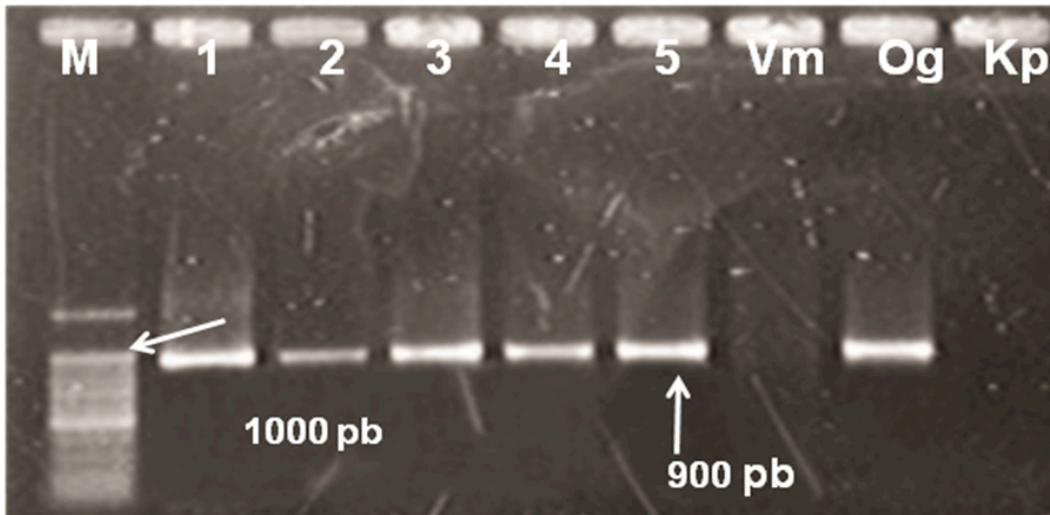


Figura 24. Electroferograma del producto amplificado de los genes *pilA-B*. M= marcador de talla molecular 100pb, Vm *V. mimicus* ATCC 1-5 *V. mimicus*, Og *Vibrio cholerae* serotipo Ogawa, Kp, *Klebsiella pneumoniae*

Para confirmar la identidad del amplificado se envió a secuenciar, después del análisis BLAST se encontró que dicha secuencia corresponde a una región del cromosoma de *V. cholerae* y *V. vulnificus* relacionadas al pili tipo VI, como se ve en la figura 25.

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP003330.1	<i>Vibrio cholerae</i> IEC224 chromosome I, complete sequence	356	356	96%	7e-95	81%	
CP003069.1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 str. 2010EL-1786 chromosome 1, complete seq	356	356	96%	7e-95	81%	
CP001485.1	<i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236 chromosome 1, complete sequence	356	356	96%	7e-95	81%	
CP001235.1	<i>Vibrio cholerae</i> O395 chromosome I, complete sequence	356	356	96%	7e-95	81%	
CP001233.1	<i>Vibrio cholerae</i> M66-2 chromosome I, complete sequence	356	356	96%	7e-95	81%	
CP000627.1	<i>Vibrio cholerae</i> O395 chromosome 2, complete genome	356	356	96%	7e-95	81%	
AE003852.1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar eltor str. N16961 chromosome I, complet	356	356	96%	7e-95	81%	
DQ775140.1	Synthetic construct <i>Vibrio cholerae</i> clone FLH197666.01F <i>pilB</i> gen	356	356	96%	7e-95	81%	
AF109904.1	<i>Vibrio cholerae</i> probable nicotinate-nucleotide pyrophorylase <i>NadC</i>	356	356	96%	7e-95	81%	
CP002555.1	<i>Vibrio cholerae</i> LMA3894-4 chromosome I, complete sequence	354	354	96%	2e-94	81%	
CP002284.1	<i>Vibrio anguillarum</i> 775 chromosome I, complete sequence	199	199	81%	1e-47	74%	
CP002377.1	<i>Vibrio furnissii</i> NCTC 11218 chromosome 1, complete sequence	141	141	82%	3e-30	71%	
AE016795.3	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6 chromosome I, complete sequence	86.0	86.0	90%	2e-13	67%	
CP002469.1	<i>Vibrio vulnificus</i> MO6-24/O chromosome I, complete sequence	86.0	86.0	70%	2e-13	68%	
BA000037.2	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016 DNA, chromosome I, complete sequence	86.0	86.0	70%	2e-13	68%	
AF439854.1	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>NadC</i> (<i>nadC</i>), type IV pilin <i>PilA</i> (<i>pilA</i>), and type IV	86.0	86.0	90%	2e-13	67%	
FJ47723.1	<i>Vibrio vulnificus</i> strain 98-640 DP-E9 nicotinate-nucleotide pyroph	78.8	78.8	64%	3e-11	68%	
FJ465422.1	<i>Vibrio vulnificus</i> strain FDAoyster2 <i>NadC</i> (<i>nadC</i>), <i>PilA</i> (<i>pilA</i>), <i>PilB</i> (p	78.8	78.8	64%	3e-11	68%	
BA000031.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633 DNA, chromosome 1, comp	75.2	75.2	44%	3e-10	71%	
CP001805.1	<i>Vibrio</i> sp. Ex25 chromosome 1, complete sequence	71.6	71.6	26%	4e-09	75%	
FJ465423.1	<i>Vibrio vulnificus</i> strain 99-581 DP-C7 <i>NadC</i> (<i>nadC</i>), <i>PilA</i> (<i>pilA</i>), <i>PilB</i>	71.6	71.6	70%	4e-09	66%	

Figura 25. Resultado del análisis BLAST para la secuencia del gen *pilA* de *V. mimicus*

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*”

Posteriormente se mandó la secuencia para su análisis y validación al GenBank en donde quedó depositado con el número de secuencia KJ916242.

Por otra parte, se hizo una microscopía electrónica de transmisión, para identificar este tipo de estructuras, así, se identificaron como se ve en la figura, estructuras tipo pili en todas las cepas de la colección (incluida la ATCC), mas no podemos especificar si se trata del producto del gen *pilA*.

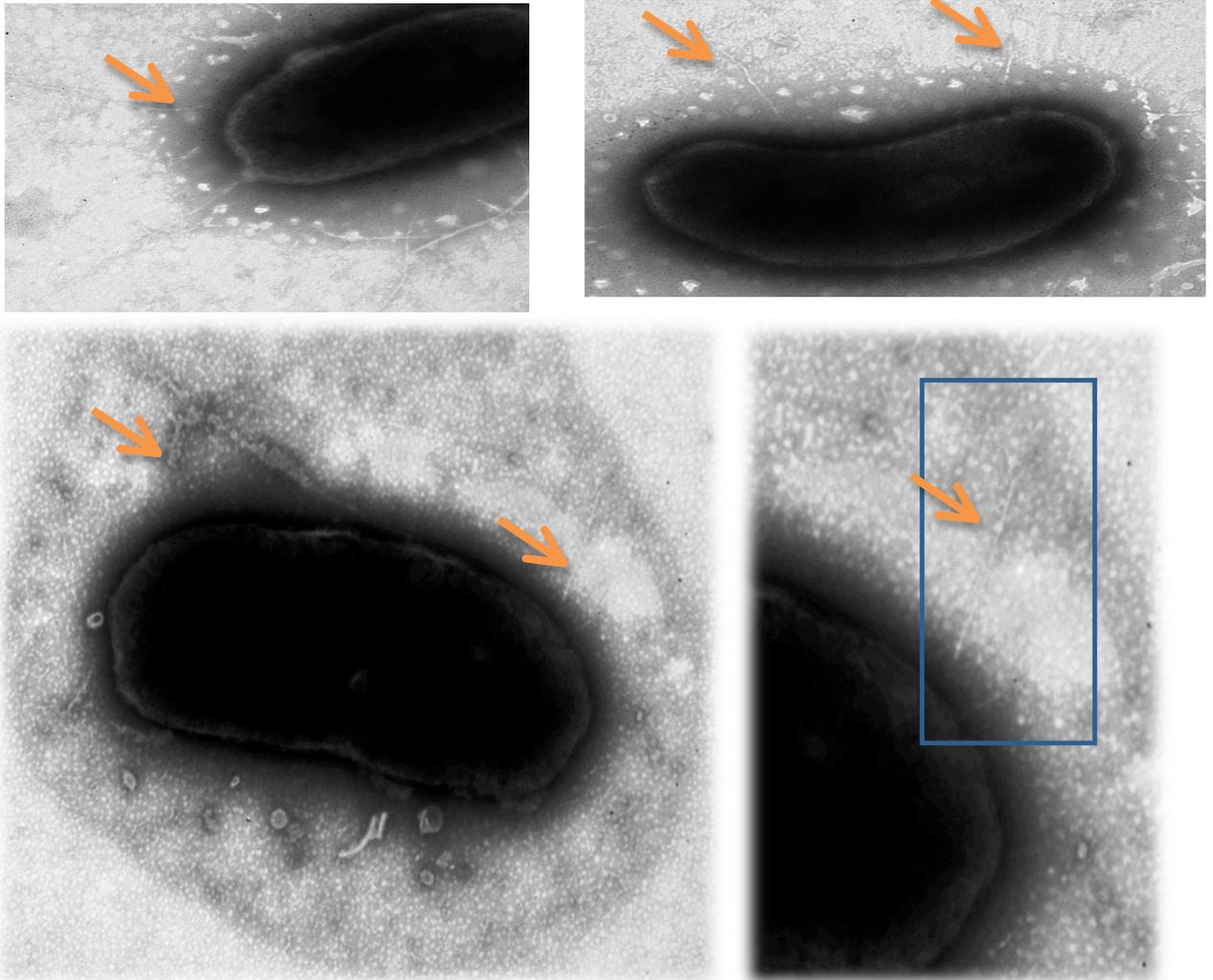


Figura 26. Microscopía electrónica de transmisión donde se observan estructuras tipo pili de *Vibrio mimicus*, Aumento 40,000 X .Cuadro Detalle de un pili.

VIII.5. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (SSTIII)

Una vez que se obtuvieron los iniciadores, se procedió a estandarizar cada una de las reacciones utilizando datos conocidos con las cepas de referencia de *V. parahaemolyticus* (Cuadro 1).

En la figura 27, se observa en el carril 4 una banda de 400 pb, ésta corresponde al gen *vcrβ*, el cual codifica para una proteína estructural del inyectosoma, solo amplificó en una cepa de la colección de *V. mimicus*.

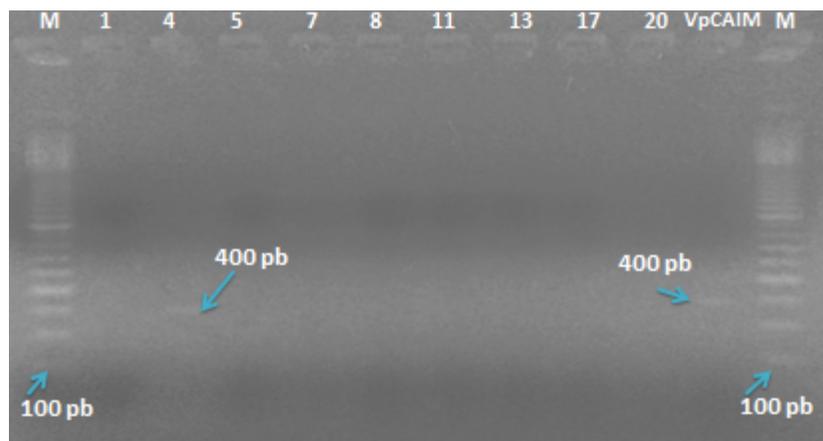


Figura 27. Electroferograma del producto amplificado de los genes *vcrβ*. M= marcador de talla molecular 100pb, 1, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 17 y 20 cepas de *V. mimicus*; VpCAIM= *V. parahaemolyticus* cepa clínica.

Para el gen *vscβ* que codifica para una ATPasa que da energía al sistema de SSTIII, tenemos que no amplificó en ninguna cepa de *V. mimicus*, solo en la cepa testigo

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*"

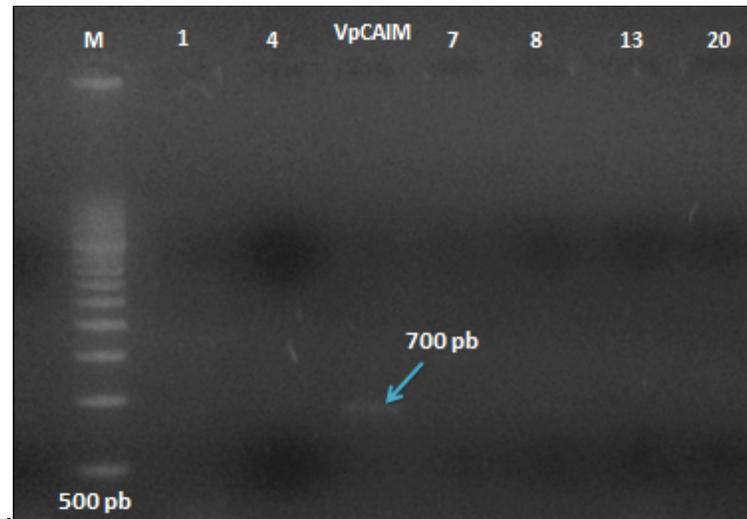


Figura 28. Electroferograma del producto amplificado de los genes *vscβ*. M= marcador de talla molecular 500pb, 1, 4, 7, 8, 13 y 20 cepas de *V. mimicus*; VpCAIM= *V. parahaemolyticus*.

El gen *vscα* codifica para una ATPasa del SSTIII2α y tiene 1500 pb, en la figura 29 se muestra que ninguna de las cepas de origen ambiental amplificó para este gen, en el testigo si se precia la banda correspondiente en el carril AC.

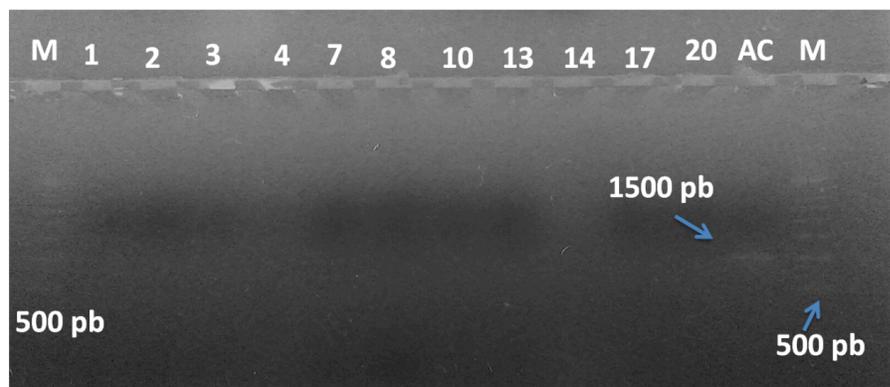


Figura 29. Electroferograma del producto amplificado de los genes *vscα*. M= marcador de talla molecular 500pb, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 13, 14, 17 y 20 cepas de *V. mimicus*; AC= *V. parahaemolyticus* cepa clínica.

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*"

El gen *vcra* codifica para una proteína del inyectosoma del SSTIII2 α y tiene 1500 pb, en la figura 30 se muestra que ninguna de las cepas de origen ambiental amplificó para éste gen, en el testigo sí se precia la banda correspondiente en el carril AC.

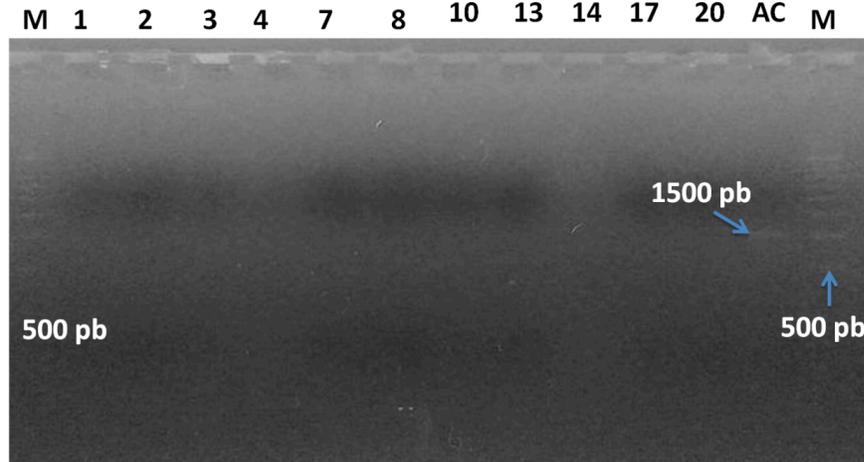


Figura 30. Electroferograma del producto amplificado de los genes *vcra*. M= marcador de talla molecular 500pb, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 13, 14, 17 y 20 cepas de *V. mimicus*; AC= *V. parahaemolyticus* cepa clínica.

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*”

CUADRO 3 RESUMEN DE RESULTADOS

Cepa	Origen	*Fenotipo en Agar rojo Congo	wzb	*Biopelícula	rbmA	*Swimming	*Swarming	lafA	*Autoagregación	pilA-B	SST:
Vm	ATCC	LOP+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1	A	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2	A	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	vcrf
5	P	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6	P	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	P	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	A	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	A	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	A	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11	A	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	P	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
17	P	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	O	LOP+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

A=agua, O=ostión, P=pescado, += positivo, -=negativo, O = opaca L=morfología colonial lisa P+=productora de polisacáridos, * Microscopía electrónica

IX. DISCUSIÓN

En este trabajo, se demostró fenotípica y genotípicamente que las cepas ambientales de *V. mimicus* producen cápsula, biopelículas, flagelos laterales, pili de tipo IV así como la presencia de un gen relacionado con el sistema de secreción tipo 3. Recientemente, algunos estudios han analizado los genomas bacterias del género *Vibrio*, señalando la presencia de genes comunes entre los principales patógenos (Chapman *et al.*, 2015; Loyola *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2015), analizando *loci* que tiene que ver con la producción de exopolisacáridos (capsular y exopolisacárido relacionado con la producción de biopelículas) (Bilecen *et al.*, 2015; Hay y Zhu, 2015); proteínas relacionadas con el sistema de secreción tipo 3 (Calder *et al.*, 2014); varios tipos de pili (Aagesen y Hase, 2012); hemolisinas, como la *rtx* o la *tdh* (Bisharat *et al.*, 2013; Dolores y Satchell, 2013; Guardiola-Avila *et al.*, 2013), entre otros, lo que indica que aún se desconocen muchas de las características y capacidades de estos organismos.

La presencia de estas estructuras puede ser explicadas por la plasticidad genómica, que presentan las bacterias del género, así como los eventos de transferencia horizontal (Shinoda *et al.*, 2004) que son las fuerzas motrices, que propician la aparición y propagación de nuevos fenotipos; como es el caso de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* con respectivas islas de patogenicidad, transposones y fagos (Thompson *et al.*, 2004c).

Vibrio mimicus es un microorganismo que comparte muchas características con otras bacterias del género, sin embargo, es *V. cholerae*, el organismo filogenéticamente más emparentado, ya que evolucionaron a partir de un ancestro común (Hasan *et al.*, 2010) de ahí que presente muchas características en común y quizá compartan algunas estrategias de patogenicidad.

IX.1. CÁPSULA

La cápsula, es una estructura que está presente en la mayoría de los patógenos del género, en *V. cholerae* O139, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* se ha demostrado es un factor de virulencia (Gode-Potratz y McCarter, 2011; Lee *et al.*, 2013; Phippen y Oliver, 2015), algunos autores, mencionan que la morfología colonial de las cepas está relacionada con la producción de esta estructura y puede presentar diversos fenotipos: colonias opacas (capsuladas) o translúcidas (no capsuladas) (Srivastava *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 1999), el fenotipo opaco se relaciona directamente con la producción de exopolisacáridos, tanto capsulares como de biopelícula (Chen *et al.*, 2010; Hilton *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 1992), este es el caso de las cepas de este estudio (Figura 6) donde se observa que se presenta el fenotipo opaco lo que indica que la colección de cepas de *V. mimicus* son capaces de producir este tipo de estructuras; sin embargo, no existe antecedente que describa la presencia de cápsula, ni la morfología colonial que presenta *V. mimicus*.

En un trabajo anterior (datos no publicados), se hizo la tinción negativa por el método de rojo Congo (Liberto *et al.*, 2009) para visualizar la presencia de una cápsula en las cepas de la colección, sin embargo los datos no son concluyentes, por lo que se

decidió hacer la microscopía electrónica de transmisión para observar con más claridad dicha estructura, por medio de una técnica de contraste específica para carbohidratos (Stukalov *et al.*, 2008) (Figura 9), donde se observa con claramente detalle la presencia de una cápsula.

En cuanto a los genes que están relacionados con la construcción de esta estructura, se identificó de un gen homólogo al *wzb* de *V. cholerae* y *V. vulnificus* confirmando su identidad mediante la secuenciación y depositando la secuencia en el GenBank (figura 8), este gen codifica para una ATPasa que brinda energía al sistema de exportación y ensamble de la cápsula (Hilton *et al.*, 2006), lo que indica que *V. mimicus* presenta un mecanismo genético similar al de los patógenos del género y probablemente se trate de homólogo al de *Escherichia coli* del grupo 1 (Chatzidakis-Livanis *et al.*, 2006), lo que puede implicar que esta cápsula presente funciones muy similares a las de *V. cholerae* O139 y *V. vulnificus*.

Al estar presente en todas las cepas de la colección, nos indica que probablemente la cápsula se encuentre distribuida ampliamente en la especie y tenga implicaciones importantes para la supervivencia del microorganismo, como se ha descrito para *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* O139, en donde se ha observado que la presencia de esta estructura, favorece la sobrevivencia de las bacterias tanto en el medio ambiente como en la vida parásita, ya que participa en la evasión de la respuesta inmune del hospedero, favorece la colonización de superficies bióticas y abióticas (Nesper *et al.*, 2002), también se ha visto que la cápsula puede ser un blanco molecular importante para el diseño de vacunas (Paulovicova *et al.*, 2012) y

también tiene un papel importante en la ecología de estas bacterias pues se ha observado que favorece la supervivencia en diversos ambientes con diferentes factores de estrés, facilitando la formación de biopelícula (Reidl y Klose, 2002).

IX.2. BIOPELÍCULA

La producción de exopolisacáridos no se limita a la cápsula, la morfología colonial en el agar rojo Congo, también se relaciona con la producción de biopelículas (Liberto *et al.*, 2009; Yildiz y Visick, 2009), capacidad que se demostró en este trabajo tanto en la colección de cepas de *V. mimicus* como en la cepa de referencia, utilizando un modelo *in vitro* (Figura 10), al observar dicha biopelícula al microscopio de contraste de fases, (Figura 11), se pueden observar claramente que la biopelícula, presenta estructuras tridimensionales, lo que indica que la misma es completamente funcional. En cuanto a la formación de la misma, fue observada en diferentes tiempos por microscopía electrónica de barrido (Figura 14 y 15), en donde podemos apreciar cada una de las fases de formación de la biopelícula, así como detallas a mayor aumento de cada una de ellas.

Posteriormente, se identificó un gen homólogo al *rbmA* de *V. cholerae*, que corresponde a una proteína encargada de la formación de las estructuras tridimensionales de la biopelícula (Fong y Yildiz, 2007) y que probablemente, tenga las mismas funciones en *V. mimicus*.

Este trabajo, el primer reporte, que se tiene sobre la capacidad de *V. mimicus* para producir una biopelícula, pero se desconocen las implicaciones que esto tiene para la biología del microorganismo, se puede especular que tiene implicaciones semejantes

a los de *V. cholerae* para sobrevivir en el ambiente; probablemente también *V. mimicus* puede producir biopelícula sobre superficies bióticas y abióticas (copépodos, raíces de plantas acuáticas) y así mantener las poblaciones de este microorganismo en el ambiente, como lo hace *V. cholerae* (Reidl y Klose, 2002), pudiendo incluso formar una biopelícula mixta, favoreciendo la transmisión horizontal de factores de virulencia (Boyd *et al.*, 2000), lo cual explicaría la capacidad de *V. mimicus* de presentar factores de virulencia que se encuentran presentes en otros patógenos del género, por ejemplo hemolisinas, (TDH, RTX) toxina colérica, sideróforo etc. (Boyd *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2004; Shinoda *et al.*, 2004; Vora *et al.*, 2005).

IX.3. FLAGELO LATERAL

La capacidad de producir flagelos laterales es otro factor de virulencia que no había sido descrito ni en *V. mimicus* ni en *V. cholerae*, pero que se ha visto que es particularmente importante en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Kawagishi *et al.*, 1995; Shinoda *et al.*, 1992).

Al observar el tipo de crecimiento que presenta *V. mimicus* para las pruebas de *swimming* y *swarming*, podemos corroborar que todas las cepas de la colección tienen integro su flagelo polar y que además tienen la capacidad de presentar crecimientos característico tipo *swarming* (Figura 16 y 17) lo que de manera indirecta establece la presencia de flagelos laterales (Canals *et al.*, 2006).

Nuestros resultados de la microscopía electrónica de transmisión (Figura 21 y 22), demuestran por primera vez, la capacidad de *V. mimicus* de no solo presentar flagelos laterales, sino que también presentar una diferenciación celular conocida

como células tipo “*swarmer*” (células gigantes poliflageladas) como lo hace *V. parahaemolyticus* (Boles y McCarter, 2002; McCarter y Silverman, 1990), adicionalmente, también presenta otros patrones de flagelación reportados en el género, como una célula de tamaño normal que presenta múltiples flagelos en un extremo de la célula (lofótricos), lo que indicaría que *V. mimicus* tiene diferentes adaptaciones al medio ambiente.

V. mimicus, probablemente cuenta con un doble sistema flagelar, en vista de que se identificó en todas las cepas un gen homólogo a la flagelina lateral de *V. alginolyticus*, (Figura 19) que es característico de un segundo sistema flagelar, en vista de que los flagelos polares reportados para el género *Vibrio* son completamente diferentes de los flagelos laterales tanto en estructura, función y organización genética (Minamino y Imada, 2015) es probable que en *V. mimicus*, al igual que en otros miembros del género, exista un segundo juego de genes encargado de la producción de flagelos laterales, el cual es independiente de los genes encargados de la constitución y funcionamiento del flagelo polar como se mencionó anteriormente y que, al igual que ocurre en *V. parahaemolyticus*, estos genes solo se expresan bajo circunstancias particulares (Gode-Potratz *et al.*, 2011).

En vista, de que los genes del segundo sistema flagelar ascienden a más de 60 (al menos para *V. parahaemolyticus*) (McCarter y Wright, 1993), representan un parte considerable dentro del genoma y al no estar descritos un juego de genes similar en *V. cholerae*, podría representar una de las principales diferencias en la biología entre *V. cholerae* y *V. mimicus*.

Se desconocen las funciones que pudiera desempeñar este segundo sistema flagelar en *V. mimicus*; sin embargo, se reconoce que forma parte integral del mecanismo de patogenicidad en *V. parahaemolyticus* y en *V. alginolyticus* (Chao *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2008; Gode-Potratz *et al.*, 2011; Jaques y McCarter, 2006) ya que les permite colonizar más fácilmente tanto superficies bióticas como abióticas (Kirov, 2003).

IX.4. PILI TIPO IV

Varios son los estudios que indican la correlación entre el fenotipo de autoagregación con la presencia de pili tipo IV (Chiang *et al.*, 2008), como se ha reportado en *V. cholerae*, este pili favorece las interacciones bacteria-bacteria para la formación de la microcolonia en superficies bióticas (Reidl y Klose, 2002) y en *V. vulnificus* (Fullner y Mekalanos, 1999; Paranjpye *et al.*, 1998).

Todas las cepas de *V. mimicus* de la colección, fueron capaces de formar grumos en medio de cultivo líquido, a excepción de la cepa de referencia (Figura 23), lo que se ha relacionado con la existencia de pili de tipo IV (Chiang *et al.*, 2008), la distribución de este tipo de estructuras, se cree que es prácticamente en todo el género, pero no existe antecedente se tiene reporte alguno en *V. mimicus* (Aagesen y Hase, 2012).

Por medio de microscopia electrónica de transmisión, se observaron estructuras tipo pili en todas las cepas de la colección incluida la ATCC, que pueden corresponder en un momento dado al pili tipo IV "PIL A" , pero no se puede identificar como tal en la microfotografía ya que este microorganismo presenta otro tipo de pili además del mencionado anteriormente (Figura 23 y 24) en *V. mimicus*, se ha reportado la

presencia de pili tipo IV como los “MSHA” (Chiang *et al.*, 1995) que se reconocen como factores de adherencia, distribuidos en todo el género, en *V. cholerae* existen varios tipos de pili tipo IV como los MSHA, el pili “PIL A”, el pili TCP y los pili ChiRP (pili regulados por quitina) e incluso un pili sexual (Bhaskaran *et al.*, 1969; Meibom *et al.*, 2004; Shime-Hattori *et al.*, 2006), mismos que se asocian con la colonización de superficies y tejidos; estos múltiples pilis distribuidos entre las bacterias del género, son los que probablemente visualizamos en las fotografías de microscopia, pero no se tienen elementos para discriminarlos.

Resultados de los análisis genotípicos, logramos identificar a un homólogo al gen *pilA*, que codifica para el pili PILA, que no solo participa en la adherencia a superficies bióticas, sino que también está involucrado en procesos como la formación de biopelículas y en el establecimiento de una infección, trascendentales para la patogenicidad en *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* (Aagesen y Hase, 2012), también se ha reportado, que ese pili es imprescindible en especies patógenas del género *Vibrio*, como factor de colonización (Alam *et al.*, 2006).

Recientemente en el genoma de *V. mimicus* se anotó un gen homólogo al *pilA* (Guardiola-Avila *et al.*, 2013), sin embargo no se da más información al respecto, en este trabajo se identificó dicho gen pero además se observó la correlación que tiene con la prueba de autoaglutinación, pues como ya se mencionó anteriormente la cepa ATCC presenta un genotipo y fenotipo consistente ya que no presenta el gen *pilA*, ni el fenotipo de autoagregación, contrario al resto de las cepas de la colección que si lo tienen, pero no se sabe las implicaciones que tiene para el microorganismo.

IX.5. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III

En lo que se refiere a la presencia del SSTIII, ésta se ha estudiado ampliamente en otras especies patógenas del género *Vibrio*, pero en *V. mimicus* el papel que tiene es relativamente desconocido (Octavia *et al.*, 2013). En *V. parahaemolyticus* el loci del SSTIII está formado por 42 genes, de los cuales 30 son similares a SSTIII de otros géneros bacterianos (Makino *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004b), lo que sugiere que el SSTIII está muy conservado, inclusive de un género bacteriano a otro.

Dentro de los genes más importantes con los que cuenta el SSTIII, se encuentran *vsc* y *vcr*, que son esenciales para el funcionamiento correcto del sistema, por lo que se eligieron como blancos moleculares para tratar de visualizar si se encontraba presentes en las cepas ambientales de *V. mimicus* (Chen *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2009).

Se esperaría encontrar genes relacionados con SSTIII2 en *V. mimicus* por tres motivos, el primero es que estos genes no son constitutivos, como lo son los del SSTIII1 para *V. parahaemolyticus* ya que se encuentran en un elemento genético móvil que puede adquirirse por transferencia horizontal por otros microorganismos del mismo género o relacionados filogenéticamente (Okada *et al.*, 2010); el segundo, es que se ha descrito que *V. mimicus* tiene una tasa de adquisición de material genético alta debido a la presencia de un megaintegrón en su cromosoma pequeño lo que habla de su plasticidad genómica (Chowdhury *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2015), 1997) y el tercero, es la estrecha relación entre *V. cholerae* y *V. mimicus* ya que se

ha observado la presencia de genes homólogos al SSTIII2 en cepas de *V. cholerae* serogrupo no O1 y no O139 (Chatterjee *et al.*, 2009a; Park *et al.*, 2004b).

El único gen que se pudo demostrar y tipificar en las cepas de la colección fue el *vsc β* , lo que indica que una cepa de *V. mimicus* presenta el SSTIII tipo 2 tipo β , Okada y colaboradores (2010) reportan una baja distribución de éstos mismos genes en cepas de *V. mimicus*, con una incidencia mayor en aislamientos clínicos que en ambientales, lo que concuerda con nuestros resultados que las cepas de la colección tienen un origen ambiental. También indican que existen cepas ambientales que no cuentan con el operón completo, sino solo con algunos genes independientes (Okada *et al.*, 2010), lo que explica el comportamiento observado en las cepas de nuestra colección (Figura 27). Nuestros resultados no descartan la posibilidad de que las cepas de la colección alberguen el SSTIII, se recomienda ampliamente un análisis donde se involucre un número mayor de genes conservados del SSTIII.

En el Cuadro 3 se observan los resultados globales, en donde se observa que se han encontrado características que no habían sido descritas para *V. mimicus* y que el origen de las cepas es independiente de la distribución de los marcadores. Esto coincide con la propuesta de Chowdhury y colaboradores (1986), quienes afirman que *V. mimicus* es un grupo heterogéneo, en donde cada cepa tiene capacidades patogénicas diferentes y que éstas están relacionadas con la presencia o ausencia de factores de virulencia (Bi *et al.*, 2000; Faruque *et al.*, 2003; Faruque y Mekalanos, 2003; Li *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 1998; Shinoda *et al.*, 2004), en donde el ejemplo más

Búsqueda fenotípica y genotípica de factores de virulencia no descritos en *Vibrio mimicus*

claro lo tenemos al comparar las cepas silvestres con la cepa de referencia que no presenta el fenotipo ni el genotipo del pili.

X. CONCLUSIONES

El demostrar fenotípica y genotípicamente la presencia de nuevas estructuras que se relacionan con la virulencia como cápsula, pili, flagelo lateral, producción de biopelículas, así como la presencia del sistema de secreción tipo III en *Vibrio mimicus*, contribuye a definir la biología de este organismo y así poder tener más elementos en cuanto a su patogenicidad y sobrevivencia en el medio ambiente.

XI. PERSPECTIVAS

La presente investigación, demostró la presencia de factores de virulencia no descritos para *V. mimicus*, sin embargo el trabajo no aborda áreas específicas al respecto como su papel en la patogenicidad, su composición exacta, ni los mecanismos de control por medio de los cuales las estructuras se expresan, ni la relación que tienen las mismas con otras bacterias del género.

Por lo que cada una de estas facetas podría derivar en una línea de investigación específica, en donde se ubicaría claramente a cada una de la estructuras en un contexto biológico más global para la bacteria y así poder generar un panorama más concreto respecto a un mecanismo de patogenicidad.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aagesen, A.M., Hase, C.C., 2012. Sequence analyses of type IV pili from *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Microbial ecology* 64, 509-524.
2. Aagesen, A.M., Phuvasate, S., Su, Y.C., Hase, C.C., 2013. Persistence of *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is a multifactorial process involving pili and flagella but not type III secretion systems or phase variation. *Applied and environmental microbiology* 79, 3303-3305.
3. Abd, H., Valeru, S.P., Sami, S.M., Saeed, A., Raychaudhuri, S., Sandstrom, G., 2010. Interaction between *Vibrio mimicus* and *Acanthamoeba castellanii*. *Environmental microbiology reports* 2, 166-171.
4. Ahn, J.Y., Chung, J.W., Chang, K.J., You, M.H., Chai, J.S., Kang, Y.A., Kim, S.H., Jeoung, H., Cheon, D., Jeoung, A., Choi, E.S., 2011. Clinical characteristics and etiology of travelers' diarrhea among Korean travelers visiting South-East Asia. *Journal of Korean medical science* 26, 196-200.
5. Ai, Y., Meng, F., 2001. *Vibrio cholerae* VPI phi/CTX phi/TCP: interactions of phage-phage-bacterium. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 41, 510-512.
6. Akeda, Y., Kimura, T., Yamasaki, A., Kodama, T., Iida, T., Honda, T., Oishi, K., 2012. Functional cloning of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 in

Escherichia coli K-12 strain as a molecular syringe. Biochemical and biophysical research communications 427, 242-247.

7. Alam, M., Hasan, N.A., Sadique, A., Bhuiyan, N.A., Ahmed, K.U., Nusrin, S., Nair, G.B., Siddique, A.K., Sack, R.B., Sack, D.A., Huq, A., Colwell, R.R., 2006. Seasonal cholera caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 in the coastal aquatic environment of Bangladesh. Applied and environmental microbiology 72, 4096-4104.
8. Albert, M.J., Kabir, I., Neogi, P.K., Kibriya, A.K., 1992. *Vibrio mimicus* bacteraemia in a child. Journal of diarrhoeal diseases research 10, 39-40.
9. Albert, M.J., Neira, M., Motarjemi, Y., 1997. The role of food in the epidemiology of cholera. World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales 50, 111-118.
10. Altindis, E., Dong, T., Catalano, C., Mekalanos, J., 2015. Secretome Analysis of *Vibrio cholerae* Type VI Secretion System Reveals a New Effector-Immunity Pair. mBio 6.
11. Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E., Citterio, B., 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. International journal of food microbiology 54, 9-18.
12. Bag, P.K., Bhowmik, P., Hajra, T.K., Ramamurthy, T., Sarkar, P., Majumder, M., Chowdhury, G., Das, S.C., 2008. Putative virulence traits and pathogenicity of

Vibrio cholerae Non-O1, Non-O139 isolates from surface waters in Kolkata, India. Applied and environmental microbiology 74, 5635-5644.

13. Beis, K., Collins, R.F., Ford, R.C., Kamis, A.B., Whitfield, C., Naismith, J.H., 2004. Three-dimensional structure of Wza, the protein required for translocation of group 1 capsular polysaccharide across the outer membrane of *Escherichia coli*. J Biol Chem 279, 28227-28232.

14. Bhaskaran, K., Dyer, P.Y., Rogers, G.E., 1969. Sex pili in *Vibrio cholerae*. The Australian journal of experimental biology and medical science 47, 647-650.

15. Bi, K., Miyoshi, S.I., Tomochika, K.I., Shinoda, S., 2001. Detection of virulence associated genes in clinical strains of *Vibrio mimicus*. Microbiology and immunology 45, 613-616.

16. Bi, K., Shi, L., Maehara, Y., Miyoshi, S., Tomochika, K., Shinoda, S., 2000. Analysis of *Vibrio mimicus* clinical strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Microbiology and immunology 44, 149-153.

17. Bilecen, K., Fong, J.C., Cheng, A., Jones, C.J., Zamorano-Sanchez, D., Yildiz, F.H., 2015. Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. Infection and immunity 83, 1199-1209.

18. Bisharat, N., Bronstein, M., Korner, M., Schnitzer, T., Koton, Y., 2013. Transcriptome profiling analysis of *Vibrio vulnificus* during human infection. Microbiology 159, 1878-1887.

19. Boles, B.R., McCarter, L.L., 2002. *Vibrio parahaemolyticus* scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *Journal of bacteriology* 184, 5946-5954.
20. Boyd, E.F., Moyer, K.E., Shi, L., Waldor, M.K., 2000. Infectious CTXPhi and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infection and immunity* 68, 1507-1513.
21. Calder, T., Kinch, L.N., Fernandez, J., Salomon, D., Grishin, N.V., Orth, K., 2014. *Vibrio* type III effector VPA1380 is related to the cysteine protease domain of large bacterial toxins. *PloS one* 9, e104387.
22. Campos, E., Bolanos, H., Acuna, M.T., Diaz, G., Matamoros, M.C., Raventos, H., Sanchez, L.M., Sanchez, O., Barquero, C., 1996. *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. *Applied and environmental microbiology* 62, 1141-1144.
23. Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J.G., Tomas, J.M., Merino, S., 2006. Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *Journal of bacteriology* 188, 852-862.
24. Coburn, B., Sekirov, I., Finlay, B.B., 2007. Type III secretion systems and disease. *Clinical microbiology reviews* 20, 535-549.
25. Collins, R.F., Derrick, J.P., 2007. Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins? *Trends Microbiol* 15, 96-100.

26. Chao, G., Wang, F., Zhou, X., Jiao, X., Huang, J., Pan, Z., Zhou, L., Qian, X., 2011. Origin of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clone. International journal of food microbiology 145, 459-463.
27. Chapman, C., Henry, M., Bishop-Lilly, K.A., Awosika, J., Briska, A., Ptashkin, R.N., Wagner, T., Rajanna, C., Tsang, H., Johnson, S.L., Mokashi, V.P., Chain, P.S., Sozhamannan, S., 2015. Scanning the Landscape of Genome Architecture of Non-O1 and Non-O139 *Vibrio cholerae* by Whole Genome Mapping Reveals Extensive Population Genetic Diversity. PloS one 10, e0120311.
28. Chatterjee, S., Ghosh, K., Raychoudhuri, A., Chowdhury, G., Bhattacharya, M.K., Mukhopadhyay, A.K., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Klose, K.E., Nandy, R.K., 2009a. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. Journal of clinical microbiology 47, 1087-1095.
29. Chatterjee, S., Patra, T., Ghosh, K., Raychoudhuri, A., Pazhani, G.P., Das, M., Sarkar, B., Bhadra, R.K., Mukhopadhyay, A.K., Takeda, Y., Nair, G.B., Ramamurthy, T., Nandy, R.K., 2009b. *Vibrio cholerae* O1 clinical strains isolated in 1992 in Kolkata with progenitor traits of the 2004 Mozambique variant. Journal of medical microbiology 58, 239-247.
30. Chatzidaki-Livanis, M., Jones, M.K., Wright, A.C., 2006. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. Journal of bacteriology 188, 1987-1998.

31. Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., Liu, Y.M., Chen, H.J., Shen, A.B., Li, J.C., Su, T.L., Shao, C.P., Lee, C.T., Hor, L.I., Tsai, S.F., 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome research* 13, 2577-2587.
32. Chen, Y., Dai, J., Morris, J.G., Jr., Johnson, J.A., 2010. Genetic analysis of the capsule polysaccharide (K antigen) and exopolysaccharide genes in pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6. *BMC microbiology* 10, 274.
33. Chen, Y., Stine, O.C., Badger, J.H., Gil, A.I., Nair, G.B., Nishibuchi, M., Fouts, D.E., 2011. Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence. *BMC genomics* 12, 294.
34. Chiang, P., Sampaleanu, L.M., Ayers, M., Pahuta, M., Howell, P.L., Burrows, L.L., 2008. Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology* 154, 114-126.
35. Chiang, S.L., Taylor, R.K., Koomey, M., Mekalanos, J.J., 1995. Single amino acid substitutions in the N-terminus of *Vibrio cholerae* TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance. *Molecular microbiology* 17, 1133-1142.
36. Chitov, T., Kirikaew, P., Yungyune, P., Ruengprapan, N., Sontikun, K., 2009. An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 28, 421-424.

37. Chowdhury, F., Rahman, M.A., Begum, Y.A., Khan, A.I., Faruque, A.S., Saha, N.C., Baby, N.I., Malek, M.A., Kumar, A.R., Svennerholm, A.M., Pietroni, M., Cravioto, A., Qadri, F., 2011. Impact of rapid urbanization on the rates of infection by *Vibrio cholerae* O1 and enterotoxigenic *Escherichia coli* in Dhaka, Bangladesh. PLoS neglected tropical diseases 5, e999.
38. Chowdhury, M.A., Yamanaka, H., Miyoshi, S., Aziz, K.M., Shinoda, S., 1989. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. Applied and environmental microbiology 55, 2073-2078.
39. Davis, B.R., Fanning, G.R., Madden, J.M., Steigerwalt, A.G., Bradford, H.B., Jr., Smith, H.L., Jr., Brenner, D.J., 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. Journal of clinical microbiology 14, 631-639.
40. Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N.A., Kudva, R., Koch, H.G., 2014. The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. Mol Membr Biol 31, 58-84.
41. Dolores, J., Satchell, K.J., 2013. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El Tor isolates. mBio 4, e00624.
42. Drummelsmith, J., Whitfield, C., 2000. Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane. EMBO J 19, 57-66.

43. Dziejman, M., Serruto, D., Tam, V.C., Sturtevant, D., Diraphat, P., Faruque, S.M., Rahman, M.H., Heidelberg, J.F., Decker, J., Li, L., Montgomery, K.T., Grills, G., Kucherlapati, R., Mekalanos, J.J., 2005. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 3465-3470.
44. Espineira, M., Atanassova, M., Vieites, J.M., Santaclara, F.J., 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. Food microbiology 27, 122-131.
45. Faruque, S.M., Biswas, K., Udden, S.M., Ahmad, Q.S., Sack, D.A., Nair, G.B., Mekalanos, J.J., 2006. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 6350-6355.
46. Faruque, S.M., Kamruzzaman, M., Meraj, I.M., Chowdhury, N., Nair, G.B., Sack, R.B., Colwell, R.R., Sack, D.A., 2003. Pathogenic potential of environmental *Vibrio cholerae* strains carrying genetic variants of the toxin-coregulated pilus pathogenicity island. Infection and immunity 71, 1020-1025.
47. Faruque, S.M., Mekalanos, J.J., 2003. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. Trends Microbiol 11, 505-510.
48. Faruque, S.M., Nair, G.B., 2002. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and immunology 46, 59-66.

49. Ferreira, R.B., Antunes, L.C., Greenberg, E.P., McCarter, L.L., 2008. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *Journal of bacteriology* 190, 851-860.
50. Fong, J.C., Yildiz, F.H., 2007. The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 189, 2319-2330.
51. Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42, 872-874.
52. Fullner, K.J., Mekalanos, J.J., 1999. Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* 67, 1393-1404.
53. Galan, J.E., 2009. Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* 5, 571-579.
54. Gode-Potratz, C.J., Kustus, R.J., Breheny, P.J., Weiss, D.S., McCarter, L.L., 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Molecular microbiology* 79, 240-263.
55. Gode-Potratz, C.J., McCarter, L.L., 2011. Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 193, 4224-4237.
56. Guardiola-Avila, I., Acedo-Felix, E., Noriega-Orozco, L., Yepiz-Plascencia, G., Sifuentes-Romero, I., Gomez-Gil, B., 2013. Draft Genome Sequence of *Vibrio mimicus* Strain CAIM 602T. *Genome announcements* 1, e0008413.

57. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2, 95-108.
58. Ham, H., Orth, K., 2012. The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *Journal of microbiology* 50, 719-725.
59. Hasan, N.A., Grim, C.J., Haley, B.J., Chun, J., Alam, M., Taviani, E., Hoq, M., Munk, A.C., Saunders, E., Brettin, T.S., Bruce, D.C., Challacombe, J.F., Detter, J.C., Han, C.S., Xie, G., Nair, G.B., Huq, A., Colwell, R.R., 2010. Comparative genomics of clinical and environmental *Vibrio mimicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21134-21139.
60. Hay, A.J., Zhu, J., 2015. Host intestinal signal-promoted biofilm dispersal induces *Vibrio cholerae* colonization. *Infection and immunity* 83, 317-323.
61. Hayes, F., 1998. A family of stability determinants in pathogenic bacteria. *Journal of bacteriology* 180, 6415-6418.
62. Hilton, T., Rosche, T., Froelich, B., Smith, B., Oliver, J., 2006. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology* 72, 6986-6993.
63. Hiyoshi, H., Okada, R., Matsuda, S., Gotoh, K., Akeda, Y., Iida, T., Kodama, T., 2015. Interaction between the Type III Effector VopO and GEF-H1 Activates the RhoA-ROCK Pathway. *PLoS pathogens* 11, e1004694.

64. Hsiao, A., Xu, X., Kan, B., Kulkarni, R.V., Zhu, J., 2009. Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization pilus expression. *Infection and immunity* 77, 1383-1388.
65. Hueck, C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62, 379-433.
66. Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., Iida, T., 2008. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infection and immunity* 76, 1016-1023.
67. Janda, J.M., Powers, C., Bryant, R.G., Abbott, S.L., 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical microbiology reviews* 1, 245-267.
68. Jaques, S., McCarter, L.L., 2006. Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 188, 2625-2635.
69. Johnson, J.A., Panigrahi, P., Morris, J.G., Jr., 1992. Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. *Infection and immunity* 60, 864-869.
70. Josenhans, C., Suerbaum, S., 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International journal of medical microbiology* : IJMM 291, 605-614.

71. Karaolis, D.K., Somara, S., Maneval, D.R., Jr., Johnson, J.A., Kaper, J.B., 1999. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* 399, 375-379.
72. Kawagishi, I., Maekawa, Y., Atsumi, T., Homma, M., Imae, Y., 1995. Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *Journal of bacteriology* 177, 5158-5160.
73. Keymer, D.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2009. Biogeographic patterns in genomic diversity among a large collection of *Vibrio cholerae* isolates. *Applied and environmental microbiology* 75, 1658-1666.
74. Kim, Y.K., McCarter, L.L., 2007. ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 189, 4094-4107.
75. Kirov, S.M., 2003. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS microbiology letters* 224, 151-159.
76. Kirov, S.M., Castrisios, M., Shaw, J.G., 2004. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infection and immunity* 72, 1939-1945.
77. Kirov, S.M., Tassell, B.C., Semmler, A.B.T., O'Donovan, L.A., Rabaan, A.A., Shaw, J.G., 2002. Lateral Flagella and Swarming Motility in *Aeromonas* Species. *Journal of bacteriology* 184, 547-555.

78. Kudryashev, M., Wang, R.Y., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., DiMaio, F., Stahlberg, H., Egelman, E.H., Basler, M., 2015. Structure of the Type VI Secretion System Contractile Sheath. *Cell* 160, 952-962.
79. Lee, J.H., Ahn, S.H., Kim, S.H., Choi, Y.H., Park, K.J., Kong, I.S., 2002. Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhIA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochemical and biophysical research communications* 298, 269-276.
80. Lee, K.J., Kim, J.A., Hwang, W., Park, S.J., Lee, K.H., 2013. Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*. *Molecular microbiology* 90, 841-857.
81. Li, C.C., Crawford, J.A., DiRita, V.J., Kaper, J.B., 2000. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology* 35, 189-203.
82. Li, Y., Okamoto, K., Takahashi, E., Miyoshi, S., Shinoda, S., Tsuji, T., Fujii, Y., 2005. A hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be secretory mediators. *Microbiology and immunology* 49, 73-78.
83. Liberto, M.C., Matera, G., Quirino, A., Lamberti, A.G., Capicotto, R., Puccio, R., Barreca, G.S., Foca, E., Cascio, A., Foca, A., 2009. Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. *Microbiol Res* 164, 522-528.
84. Loyola, D.E., Navarro, C., Uribe, P., Garcia, K., Mella, C., Diaz, D., Valdes, N., Martinez-Urtaza, J., Espejo, R.T., 2015. Genome diversification within a clonal

population of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* seems to depend on the life circumstances of each individual bacteria. BMC genomics 16, 1385.

85. Lu, X., Liang, W., Wang, Y., Xu, J., Zhu, J., Kan, B., 2014. Identification of genetic bases of *Vibrio fluvialis* species-specific biochemical pathways and potential virulence factors by comparative genomic analysis. Applied and environmental microbiology 80, 2029-2037.

86. Machado, H., Sonnenschein, E.C., Melchiorson, J., Gram, L., 2015. Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. BMC genomics 16, 1365.

87. Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., Iida, T., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. Lancet 361, 743-749.

88. Marsh, J.W., Taylor, R.K., 1999. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. Journal of bacteriology 181, 1110-1117.

89. Mathur, J., Waldor, M.K., 2004. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. Infection and immunity 72, 3577-3583.

90. Matsuda, S., Kodama, T., Okada, N., Okayama, K., Honda, T., Iida, T., 2010. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts

is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infection and immunity* 78, 603-610.

91. McCarter, L., Silverman, M., 1990. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular microbiology* 4, 1057-1062.

92. McCarter, L.L., Wright, M.E., 1993. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 175, 3361-3371.

93. Meibom, K.L., Li, X.B., Nielsen, A.T., Wu, C.Y., Roseman, S., Schoolnik, G.K., 2004. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2524-2529.

94. Merino, S., Shaw, J.G., Tomas, J.M., 2006. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS microbiology letters* 263, 127-135.

95. Minamino, T., Imada, K., 2015. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol* 10.1016/j.tim.2014.12.011.

96. Minamino, T., Imada, K., Namba, K., 2008. Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Molecular bioSystems* 4, 1105-1115.

97. Miyoshi, S., Ikehara, H., Kumagai, M., Mizuno, T., Kawase, T., Maehara, Y., 2014. Defensive Effects of Human Intestinal Antimicrobial Peptides against Infectious Diseases Caused by *Vibrio mimicus* and *V. vulnificus*. *Biocontrol science* 19, 199-203.

98. Moon, Y.H., Tanabe, T., Funahashi, T., Shiuchi, K., Nakao, H., Yamamoto, S., 2004. Identification and characterization of two contiguous operons required for aerobactin transport and biosynthesis in *Vibrio mimicus*. *Microbiology and immunology* 48, 389-398.
99. Nesper, J., Hill, C.M., Paiment, A., Harauz, G., Beis, K., Naismith, J.H., Whitfield, C., 2003. Translocation of group 1 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* serotype K30. Structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza. *J Biol Chem* 278, 49763-49772.
100. Nesper, J., Schild, S., Lauriano, C.M., Kraiss, A., Klose, K.E., Reidl, J., 2002. Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. *Infection and immunity* 70, 5990-5996.
101. O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/2437.
102. Octavia, S., Salim, A., Kurniawan, J., Lam, C., Leung, Q., Ahsan, S., Reeves, P.R., Nair, G.B., Lan, R., 2013. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. *PloS one* 8, e65342.
103. Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., Honda, T., 2005. *Vibrios* commonly possess two chromosomes. *Journal of bacteriology* 187, 752-757.
104. Okada, N., Iida, T., Park, K.S., Goto, N., Yasunaga, T., Hiyoshi, H., Matsuda, S., Kodama, T., Honda, T., 2009. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic

lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infection and immunity* 77, 904-913.

105. Okada, N., Matsuda, S., Matsuyama, J., Park, K.S., de los Reyes, C., Kogure, K., Honda, T., Iida, T., 2010. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. *BMC microbiology* 10, 302.

106. Ono, T., Park, K.S., Ueta, M., Iida, T., Honda, T., 2006. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infection and immunity* 74, 1032-1042.

107. Paranjpye, R.N., Lara, J.C., Pepe, J.C., Pepe, C.M., Strom, M.S., 1998. The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEp-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. *Infection and immunity* 66, 5659-5668.

108. Paranjpye, R.N., Strom, M.S., 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infection and immunity* 73, 1411-1422.

109. Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Iida, T., Honda, T., 2004a. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and immunology* 48, 313-318.

110. Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T., Honda, T., 2004b. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and immunity* 72, 6659-6665.

111. Paulovicova, E., Korcova, J., Machova, E., Bystricky, S., 2012. Immunomodulation of T-cell responses with *Vibrio cholerae* O135 capsular polysaccharide and its protein conjugate, novel cholera vaccine study models. *FEMS immunology and medical microbiology* 65, 422-430.
112. Pelicic, V., 2008. Type IV pili: e pluribus unum? *Molecular microbiology* 68, 827-837.
113. Phippen, B.L., Oliver, J.D., 2015. Role of anaerobiosis in capsule production and biofilm formation in *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity* 83, 551-559.
114. Provenzano, D., Klose, K.E., 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10220-10224.
115. Reidl, J., Klose, K.E., 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS microbiology reviews* 26, 125-139.
116. Rivera, I.G., Chowdhury, M.A., Sanchez, P.S., Sato, M.I., Huq, A., Colwell, R.R., Martins, M.T., 1995. Detection of cholera (ctx) and zonula occludens (zot) toxin genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. *World journal of microbiology & biotechnology* 11, 572-577.
117. Sanchez, L.M., Wong, W.R., Riener, R.M., Schulze, C.J., Linington, R.G., 2012. Examining the fish microbiome: vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the discovery of unique marine natural products. *PloS one* 7, e35398.

118. Schraidt, O., Marlovits, T.C., 2011. Three-dimensional model of Salmonella's needle complex at subnanometer resolution. *Science* 331, 1192-1195.
119. Shandera, W.X., Johnston, J.M., Davis, B.R., Blake, P.A., 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. *Annals of internal medicine* 99, 169-171.
120. Shi, L., Fujihara, K., Sato, T., Ito, H., Garg, P., Chakrabarty, R., Ramamurthy, T., Nair, G.B., Takeda, Y., Yamasaki, S., 2006. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *Journal of medical microbiology* 55, 575-583.
121. Shi, L., Miyoshi, S., Hiura, M., Tomochika, K., Shimada, T., Shinoda, S., 1998. Detection of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. *Microbiology and immunology* 42, 823-828.
122. Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K.S., Kodama, T., Honda, T., 2006. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS microbiology letters* 264, 89-97.
123. Shinoda, S., Nakagawa, T., Shi, L., Bi, K., Kanoh, Y., Tomochika, K., Miyoshi, S., Shimada, T., 2004. Distribution of virulence-associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiology and immunology* 48, 547-551.

124. Shinoda, S., Yakiyama, I., Yasui, S., Kim, Y.M., Ono, B., Nakagami, S., 1992. Lateral flagella of *Vibrios*: serological classification and genetical similarity. *Microbiology and immunology* 36, 303-309.
125. Simonson, J.G., Siebeling, R.J., 1988. Coagglutination of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody. *Journal of clinical microbiology* 26, 1962-1966.
126. Singh, D.V., Isac, S.R., Colwell, R.R., 2002. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Journal of clinical microbiology* 40, 4321-4324.
127. Skorupski, K., Taylor, R.K., 1997. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 265-270.
128. Sowa, Y., Berry, R.M., 2008. Bacterial flagellar motor. *Quarterly reviews of biophysics* 41, 103-132.
129. Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T.G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R.A., Deng, W., Yu, A.C., Finlay, B.B., Baker, D., Miller, S.I., Strynadka, N.C., 2009. A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 16, 468-476.
130. Srivastava, M., Tucker, M.S., Gulig, P.A., Wright, A.C., 2009. Phase variation, capsular polysaccharide, pilus and flagella contribute to uptake of *Vibrio vulnificus* by

the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Environmental microbiology 11, 1934-1944.

131. Stewart, B.J., McCarter, L.L., 2003a. Lateral Flagellar Gene System of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of bacteriology 185, 4508-4518.

132. Stewart, B.J., McCarter, L.L., 2003b. Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of bacteriology 185, 4508-4518.

133. Stukalov, O., Korenevsky, A., Beveridge, T.J., Dutcher, J.R., 2008. Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. Applied and environmental microbiology 74, 5457-5465.

134. Takahashi, A., Yamamoto, C., Kodama, T., Yamashita, K., Harada, N., Nakano, M., Honda, T., Nakaya, Y., 2006. Pore formation of thermostable direct hemolysin secreted from *Vibrio parahaemolyticus* in lipid bilayers. International journal of toxicology 25, 409-418.

135. Tanabe, T., Funahashi, T., Moon, Y.H., Tamai, E., Yamamoto, S., 2010. Identification and characterization of a *Vibrio mimicus* gene encoding the heme/hemoglobin receptor. Microbiology and immunology 54, 606-617.

136. Terashima, H., Kojima, S., Homma, M., 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. International review of cell and molecular biology 270, 39-85.

137. Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004a. Biodiversity of *Vibrios*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 68, 403-431, table of contents.

138. Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., Polz, M.F., 2004c. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and environmental microbiology* 70, 4103-4110.
139. Tian, Y., Wang, Q., Liu, Q., Ma, Y., Cao, X., Guan, L., Zhang, Y., 2008. Involvement of LuxS in the regulation of motility and flagella biogenesis in *Vibrio alginolyticus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72, 1063-1071.
140. Tosi, T., Pflug, A., Discola, K.F., Neves, D., Dessen, A., 2013. Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors. *Research in microbiology* 164, 605-619.
141. Troisfontaines, P., Cornelis, G.R., 2005. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 20, 326-339.
142. Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J., 1999. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and environmental microbiology* 65, 2592-2597.
143. Veenendaal, A.K., Hodgkinson, J.L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S.F., Blocker, A.J., 2007. The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Molecular microbiology* 63, 1719-1730.
144. Vieira, V.V., Teixeira, L.F., Vicente, A.C., Momen, H., Salles, C.A., 2001. Differentiation of environmental and clinical isolates of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 67, 2360-2364.

145. Vilches, S., Urgell, C., Merino, S., Chacon, M.R., Soler, L., Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Tomas, J.M., 2004. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Applied and environmental microbiology* 70, 6914-6919.
146. Vora, G.J., Meador, C.E., Bird, M.M., Bopp, C.A., Andreadis, J.D., Stenger, D.A., 2005. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 19109-19114.
147. Wall, D., Kaiser, D., 1999. Type IV pili and cell motility. *Molecular microbiology* 32, 1-10.
148. Wang, R., Zhong, Y., Gu, X., Yuan, J., Saeed, A.F., Wang, S., 2015. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in microbiology* 6, 144.
149. Wei, S.W., Chern, L.L., Wu, Y.C., Wang, Y.L., Lin, C.M., Chiou, C.S., 2008. Foodborne disease outbreaks caused by sucrose-nonfermenting and beta-galactosidase-deficient variants of *Vibrio cholerae*. *International journal of food microbiology* 122, 148-155.
150. Wong, H.C., Chang, C.N., Chen, M.Y., 2004. Effects of heat, acid, and freeze-thaw challenges on survival of starved *Vibrio parahaemolyticus* in minimal salt medium, tryptic soy broth, and filtered oyster homogenate medium. *Journal of food protection* 67, 1243-1246.

151. Wong, H.C., Ting, S.H., Shieh, W.R., 1992. Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. *The Journal of applied bacteriology* 73, 197-202.
152. Wright, A.C., Powell, J.L., Kaper, J.B., Morris, J.G., Jr., 2001. Identification of a group 1-like capsular polysaccharide operon for *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity* 69, 6893-6901.
153. Wright, A.C., Powell, J.L., Tanner, M.K., Ensor, L.A., Karpas, A.B., Morris, J.G., Jr., Sztein, M.B., 1999. Differential expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide. *Infection and immunity* 67, 2250-2257.
154. Wugeditsch, T., Paiment, A., Hocking, J., Drummelsmith, J., Forrester, C., Whitfield, C., 2001. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 2361-2371.
155. Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldana, Z., Ledesma, M.A., Puente, J.L., Giron, J.A., 2009. The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *Journal of bacteriology* 191, 411-421.
156. Yildiz, F., Fong, J., Sadovskaya, I., Grard, T., Vinogradov, E., 2014. Structural characterization of the extracellular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O1 El-Tor. *PloS one* 9, e86751.
157. Yildiz, F.H., 2008. Cyclic dimeric GMP signaling and regulation of surface-associated developmental programs. *Journal of bacteriology* 190, 781-783.

158. Yildiz, F.H., Visick, K.L., 2009. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. Trends Microbiol 17, 109-118.
159. Zhang, X.H., Austin, B., 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. Journal of applied microbiology 98, 1011-1019.

XIII. URL

- URL 1

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=674&lvl=3&yp=mapview&yp=has_linkout&yp=blast_url&yp=genome_blast&lin=fy&keep=1&ysrchmode=1&unlock)

- URL 2

<https://www.biofilm.montana.edu/resources/images>

- URL 3

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>