

María Carmen López Joven

Epidemiología y cinética de  
crecimiento y supervivencia de  
vibrio parahaemolyticus en  
moluscos bivalvos de interés  
comercial

Departamento  
Patología Animal

Director/es

Ruiz Zarzuela, Imanol  
Trigo de Sousa Roque, Ana Margarida  
Blas Giral, Ignacio de

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

EPIDEMIOLOGÍA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y  
SUPERVIVENCIA DE VIBRIO  
PARAHAEMOLYTICUS EN MOLUSCOS BIVALVOS  
DE INTERÉS COMERCIAL

Autor

María Carmen López Joven

Director/es

Ruiz Zarzuela, Imanol  
Trigo de Sousa Roque, Ana Margarida  
Blas Giral, Ignacio de

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Patología Animal

2012



**Universidad de Zaragoza**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Patología Animal**  
**Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología**



**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad Zaragoza**

**Epidemiología y cinética de crecimiento y supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos de interés comercial**

Memoria presentada por **María Carmen López Joven**  
Para optar al grado de Doctor  
con Mención de Doctorado Europeo  
Abril 2012







Universidad  
Zaragoza



Dra. ANA TRIGO DE SOUSA ROQUE, Investigadora del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Sant Carles de la Ràpita; Dr. IGNACIO DE BLAS GIRAL, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y Dr. IMANOL RUIZ ZARZUELA, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, como Directores,

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup>. MARÍA CARMEN LÓPEZ JOVEN ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “Epidemiología y cinética de crecimiento y supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos de interés comercial” que se ajusta con el Proyecto de Tesis presentado y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación como compendio de publicaciones y con la mención “Doctor Europeo” para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado

En Zaragoza, a 03 de abril de 2012

Dra. A. Roque

Dr. I. de Blas

Dr. I. Ruiz Zarzuela



# Agradecimientos/ Acknowledgements

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis por la paciencia, el apoyo y la dedicación que he recibido de cada uno de ellos. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible. Y la verdad que tengo que reconocer que he tenido mucha suerte y que la comunicación entre todos ha sido la base del éxito. Gracias de verdad a cada uno de vosotros por la cercanía, los consejos, los detalles, la ayuda y sobre todo por transmitirme la sensación de que siempre estabais conmigo. Esto ha sido para mí lo más importante.

A la Dra. Ana Roque que durante estos años ha estado preocupándose por mí en todos los sentidos y haciendo que me convierta en lo que soy en estos momentos. Gracias por tu confianza, dedicación, consejos, apoyo y por todo el tiempo, en general, que hemos compartido. Han sido varios años de convivencia, que se han convertido en amistad y eso es precioso. Gracias Ana!

Al Dr. Ignacio de Blas cuya dirección ha sido crucial y sin la cual esta tesis hubiera sido diferente. Ojala pueda llegar a alcanzar la capacidad personal y profesional que tiene él. Gracias por todo lo que me has ayudado y te has preocupado, y por todo eso ya sabes que puede contar conmigo para lo que quiera. Gracias Nacho!

Al Dr. Imanol Ruiz Zarzuela por estar ahí, por comprenderme, ayudarme y alentarme a lo largo de todo el camino. Gracias por estar siempre dispuesto a escucharme, por aconsejarme y por darme ese punto de vista real y tan necesario en la vida. Gracias Imanol!

También quiero agradecer el apoyo y el cariño que he recibido de otras personas a lo largo de todo este proceso:

A Carmen Amaro, que me ha enseñado a que el glamour no está reñido con el estado *intelectualoide* del conocimiento. Eres una mujer admirable por todo lo que sabes, por como lo transmites y por ese espíritu de las “mil y una noches”. Nuestro encuentro fue un “chispazao” y espero que estemos unidas para siempre. Viva el glamour! Viva Paris 2007! Gracias Carmen!

También un fuerte abrazo para todo su equipo que junto con ella me recibió con los brazos abiertos: Paco, Amparo, David, Eva (siempre recordaré el viaje a San Antonio-Texas, gracias por recibirme en tu casa y por portarte tan bien conmigo), entre otros, que hicieron la estancia en su laboratorio agradable y enriquecedora. Y un beso para Belén, por supuesto, una mujer fuerte, inteligente y con un carácter desbordante y huracanado.

I would like to express a sincere gratitude to Dr. James D. Oliver from The University of North Carolina at Charlotte, USA for introducing me to the American Society, accepting me in his lab for 3 month and for his scientific advice and encouragement along the whole process. I would also like to thank James and Penny for making me feel at home with their hospitality. I will always, remember all moments, excursions, meetings at your house, etc..

I would also like to thank all the members of Dr. James D. Oliver research group, particularly Melissa K. Jones (who now is in Florida) and Erica Hye-Young Kim (that I hope all the best in Chicago)... Thanks for trying to understand, although my English was not good and for making me feel less alone on that first trip and especially at the first time.

I really appreciate the friendship and affection of Cricket et Philippe, THANKS, MERCI to invite me to your home, to take care of me and for being my friends. Thanks for changing the sense of loneliness for weekends full of activity.

And a special dedication to my friend Russell, THANK YOU for boating, for music and nightlife. Last months in Charlotte, everything was filled with light and magic!!!

I would like to sincerely thank to Dra. Luciana Croci and Dra. Elisabetta Suffredini (Istituto Superiore di Sanità) for their friendship and advice. They helped me to get here. Also, I really appreciate the friendship and help from my labmate Liliana Maddalena. Also, I am fortunate to have found fantastic people there: Aida, Angie, etc...

I would like to express my gratitude to Dr. Angelo DePaola, from the Food and Drug Administration (FDA) in Dauphin Island, USA, not only for accepting me in his group for 2 month, but also for his scientific advice and encouragement.

I really appreciate the friendship and help from all people who work in the FDA in Dauphin Island. My stage there was fantastic, thanks all of them. I learned and I improved as a professional scientist and as a better person. I would like to sincerely thank to Dra. Jessica L. Jones for her work and motivation and making this stay a great experience. Thanks Jessica for helping me a lot in the laboratory and for making me feel among friends. And, I would like to express special gratitude to the best man, my friend George Doup!!! Ohhhh man... fantastic man!! I am sure that my stage would have different in case that George had not been there. So, I was/am a very fortunate woman to meet with you, George. Always, I will wish you the best and I carry you in my heart! Thanks also to my dear Susan. You are an incredible woman. Thanks for opening your home door and for making me feel part of your family. Thanks George, thanks Susan to love me like a member of your family. I hope see u soon!! Wait for me...

I would like to sincerely thank to Jeff where ever you are I always remember you, your smile and your BIG heart.

I would like to sincerely thank Dra. Carla Pruzzo from the University of Genova, Italy, and Dra. Florbela Soares from IPIMAR, Portugal, for their great help as European experts for this thesis.

Agradecer sinceramente a Maria Dolores Furones, como directora del centro, y a Alicia Estevez, jefe de Unidad de Cultivos experimentales el haberme recibido en el IRTA-SCR con las puertas abiertas y haberme dado todo tipo de facilidades para realizar los experimentos en las instalaciones del IRTA. Agradecer sinceramente a M. Dolores Furones la beca IRTA que me fue concedida desde septiembre a diciembre 2006 para iniciar este proceso doctoral.

Agradecer a todo el equipo directivo, administrativo, con Maite Caballer a la cabeza (una gran mujer y una amiga estupenda...Maite, aquí estoy, para todo), al equipo técnico, y a todos los investigadores que trabajan en el IRTA-SCR todos sus consejos y toda la ayuda prestada. Gracias a Ricard Carbó por ayudarme en cuánto he necesitado algo, a Josep Cid por estar siempre pendiente de las conexiones, a Carmen Revertè por ayudarnos con la bibliografía, a Josu Pérez por las algas y su inestimable ayuda y acertadas sugerencias, a Karl Andreè por estar siempre ahí, por sus ideas, comprensión y cariño, a Chris Rodgers un hombre excepcional, a Nuno por ese gran corazón y esa sonrisa, a Neil por su amistad, a Josep M. Reverte por toda su ayuda en la toma de muestras, a Margarita Fernández por su inestimable ayuda en los datos de calidad del agua, a Isasi siempre tan encantador, a Rosa T. por los buenos tiempos que siempre estarán ahí, a Vanessa, Laura, Cristina, Nuria, Beatriz, y por descontado a Magda, Gloria, Xavi, Rafel, etc... por ayudarme en algún momento con la logística de los moluscos y hacerlo siempre con alegría, a Carles por ayudarme con el entramado mundo de los números cuándo estuve en apuros, a Lydia, a David V., etc... También a

César Gómez de la empresa Deltimussel, por su inestimable ayuda con las piezas de moluscos que nos ofrecía a cambio de hacer “ciencia”. También, cómo no, agradecer sinceramente a Bruno Gómez Gil del CIAD (México) sus consejos, su ayuda y su amistad durante el tiempo que estuvo de estancia con nosotros.

Sinceramente, no tengo suficiente espacio para nombrar a toda la gente que de un modo u otro han compartido todos estos años conmigo, estas personas ya saben quiénes son, y espero que no se ofendan si no ven su nombre escrito, porque intentaré demostrárselo siempre que las vea, con una gran sonrisa y con mi amistad. Siempre formaran parte de una etapa creativa y amistosa que ha enriquecido *mi* vida. De toda esa gente, voy a permitirme nombrar a María D., que ahora comienza una nueva y brillante etapa. A Maite...la vida está llena de sorpresas y las sorpresas son el cimiento de la existencia. A Pablo, un amigo entrañable. A Isolda una bomba llena de dulzura. A Mary Pau q siempre nos envuelve con su vitalidad y no nos dice nada aunque a veces le demos mucho trabajo. A Beatriz Lacuesta (Bea), por compartir laboratorio conmigo y sentirla cada vez más cerca. Ha sido todo un placer descubrir a una amiga. A Mar (por compartir esos veranos con nosotras) y ser tan increíble. A Iñaki (confidencias explosivas, llenas de risas y de “buen hacer”). A Nacho F. con el que fue un placer trabajar en un proyecto común y que espero le vaya muy bien en su nueva etapa portuguesa. A Mireia (gracias por estar siempre dispuesta a echarnos una mano, por tu camaradería, gracias Mireia por ser así). A Carles S. (camarada, sin duda, también). A Silvia (que nunca perdamos la intensidad de vivir el mundo...la vida está llena de arte, y nosotras formamos parte de ella). A Gloria, una niña encantadora con un corazón enorme (poco a poco, todo se ve con otros ojos, a que sí!). A Elvira, para que siga con ese entusiasmo y que piense que al final todo sale bien. A Amandine, David, Fernando, Fon, Anaïs, Rodrigo, Roser, María, etc...y por supuesto, a los estudiantes en prácticas que han pasado los veranos con nosotr@s y nos han ayudado a los muestreos llevados a cabo en esa época. Muestreos que también tengo que agradecer sinceramente a la organización e inestimable ayuda de Beatriz Lacuesta.

A mis *niñas* encontradas a lo largo de mi “viaje tesidiario” y que lo convirtieron en un “viaje de placer” y poco a poco vamos llegando a puerto. Sin ellas, esto tampoco hubiera sido lo mismo, y recordaré toda mi vida esta etapa con una emoción especial! Andrea fue un placer compartir estos años contigo y aunque ahora estemos geográficamente lejos, no lo estaremos en pensamiento y no dejaremos de visitarnos nunca. A Marta, por los años compartidos llenos de magia y de gran complicidad, y por todo lo que nos queda... Me encantan esas llamadas furtivas y espontáneas que de tanto en tanto me haces. Y, a Laia, de manera especial, por su forma de ser, por las confidencias, ayuda, alegrías y por saber que estemos dónde estemos siempre estaremos unidas. Soy afortunada de haberte conocido!

Y en definitiva a todas las personas del IRTA (que podría rellenar hojas y hojas con sus nombres), por tener esa calidez humana tan bonita y necesaria en todo momento. Gracias por recibirme siempre con esa sonrisa al cruzarnos por los pasillos. Gracias!

También agradecer a mi “segunda casa” todo lo que se han preocupado por mí, y recibirme siempre con esa calidez. Agradecer la beca OTRI de la Universidad de Zaragoza de la que ha podido disfrutar para terminar de escribir esta Tesis Doctoral.

Agradecer a mi amigas, especialmente a Mamen, Tania y Raquel por el día a día en la facultad de Veterinaria, por toda la ayuda que me habéis dado en cualquier momento que la he necesitado, por vuestro apoyo y fuerza en este camino. Desde luego, sois unas amigas para toda la vida. Gracais!

Gracias, también a l@s que están empezando con esta etapa “tesidiaria”, por su energía, su sonrisa, y ese gran corazón que tienen tod@s ellos: Ana, Héctor y Marilly. También a los profesores, Dr. Nabil Halaifel por sus comentarios moleculares y por tener siempre una sonrisa en días tormentosos, a la Dr. Olivia Gironés por su dulzura y por sus ánimos, al Dr. José Luis Múzquiz, Director del Laboratorio

de Ictiopatología, por comenzar conmigo esta andadura, al Dr. Jesús García por saber que podría contar con él si fuera necesario. También a D. Jesús Orós y a D. Rafael Claver, que aunque no nos hemos conocido mucho, siempre han tenido una sonrisa y unas palabras para mí.

A mis compañeras de congresos de la Universidad de Santiago de Compostela: Ana, Sabela, Ale, etc. Fue un placer encontraros a lo largo de esos viajes. También a Bry Wilson!!!

A mis amigas y amigos, a cada un@ de ell@s, por ser tan especiales para mí:

A Sara y Silvia...desde México con amor! Recordad que este año es nuestro décimo aniversario juntas... y siempre estaremos conectadas dónde quiera que nos encontremos. Xil que ganas tengo de verte de nuevo, y sobre todo de conocer la nueva faceta existencial que tienes y de hablar y hablar sin parar, que me encanta escucharte. Eres una mujer increíble. Sara...increíble también, siempre entendiéndonos y comprendiéndonos, siempre unidas pase lo que pase...y nunca tendremos horas suficientes para contarnos o para hacer todo lo que queremos, porque somos incandescentes y eso siempre será bueno!! Por todo lo que nos une, por la fuerza que tenemos cuándo estamos juntas, y sobre todo porque sabemos que somos una!! A Cristina, que aunque hace relativamente poco tiempo que nos conocemos, tienes una buena carta de presentación y un corazón enorme. México tb para Sigrid. Un país, y una etapa de mi vida sin igual.

A Vanesa, por todos los momentos que hemos compartido, por todos los sentimientos encontrados, por multitud de risas y lagrimas vividas, por estar ahí todo este tiempo. Siempre te he sentido cerca pasara lo que pasara...e incluso, en momentos difíciles para ti, siempre tenías un momento para mí.

A Cristina, mi Cris, “cancerianas de la vida” y amigas hasta el infinito...entrañables lunáticas, magnéticas y magnificas! Por todo lo que nos une, y por saber que siempre nos tenemos la una a la otra y que nunca estaremos solas...todavía recuerdo el día que teníamos prácticas en el jardín botánico...y tú te ofreciste a llevarme, sin conocernos...desde ese día, inseparables!

A Berta, pq nuestra relación es totalmente sólida, y no importa el tiempo que pasemos separadas. Todavía recuerdo el primer día en Sant Carles, te acuerdas??? Ahora, ya tenemos a una más en la familia!! La preciosa Cloe! A Norma, porque cada vez que hablamos, tengo unas ganas enormes de correr hacia ella, y de abrazarla. Espérame que pronto iré a visitarte a Palma. A Sofía, que a pesar del tiempo que pase sin vernos, seguiremos con esa magia que nos caracteriza.

A mi querida Lorena, por conocerla y compartir aventuras y desventuras, y por estar ahí apoyándome en los momentos clave. A mi querida Alicia por esos mensajes tan llenos de “chispa”, de energía y de fiesta compartida, que me dan ganas de “tirar todo por la borda” y correr a su encuentro. Tb por todas las conversaciones y confidencias que hemos compartido y compartiremos. Desde luego fue un regalo conoceros.

A mis amigas de toda la vida, y por mucho tiempo: A Elena en primer lugar, que siempre tiene las palabras justas y adecuadas a todas mis divagaciones, por ser tan especial conmigo y para mí. A Pili por estar ahí y saber que siempre puedo contar con ella. A Mar que siempre tiene un día para llamarme y preguntarme qué tal va todo y darme ánimo. A Marian que a pesar de no estar en contacto frecuente, sabemos que el cuándo hablemos parecerá que no ha pasado tiempo. A Yolanda por esos cafés y ser siempre tan encantadora conmigo. A Cecilia por estar pendiente de todo el trayecto y a todos mis amigos que forman y han formado parte de mi vida.

Especialmente a Rodrigo Castellanos-Michel...que aunque ya no está aquí, para mí lo sigue estando. Y a veces la vida es sueño...

Y en definitiva, a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis, de una u otra manera. Y que ha estado cerca en algún momento de mi vida y me ha ayudado a ser lo que soy. En especial:

A Izaskun y a Ramón, que sé que siempre han estado y estarán apoyándome.

A mi familia, mis padres, Manuela y Fernando por todo el apoyo que he recibido de ellos y la confianza que me da saber que están ahí, en casa...Ellos son la principal clave del éxito. Gracias por la educación que nos habéis dado, por los valores, la responsabilidad y el apoyo a todos los niveles. **Vuestros sueños se han hecho parte de los nuestros y nuestros logros son parte de vuestras victorias.** GRACIAS!!

A mis hermanos, Fernando, con el que la niñez fue un juego de niños y con el que sé que siempre puedo contar, por su gran corazón y entereza para afrontar todos los problemas, y al pequeño de la casa familiar, a mi niño Luis (Luis Javier), por la confianza y la camaradería que tenemos el uno con el otro y por quererme con esa inocencia y esa madurez entremezclada. Siempre habrá algo especial entre nosotros. OS echo de menos todos los días!!

A Bartolo...por ser parte de la familia en esta etapa, y regalarnos su mundo y estar siempre dispuesto a jugar y a hacer que se nos olviden las preocupaciones!

A todos vosotros, mi familia, por todas las historias que hemos compartido y compartiremos y espero que os sintáis orgullosos de cada uno vuestros hijos y, espero que os sintáis orgullosos de mí por este trabajo finalizado. GRACIAS POR TODO.

A Josu, por todo lo vivido JUNTOS, alegrías, tristezas, sentimientos llenos de carga emocional y frustraciones llenas de esperanza y esperanzas llenas de realidad. Por estar viviendo el presente conmigo y convertir la adversidad en situaciones fáciles de llevar y la cotidianidad en un mundo por descubrir, apasionante y apasionado.

Y... porque en estos momentos no sería capaz de imaginarme otra vida.

Por TODO eso y por TODO lo que nos queda por vivir.

A Josu, SIEMPRE (...)





La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en las instalaciones del IRTA-SCR, excepto uno de los trabajos que fue llevado a cabo en el Istituto Superiore di Sanità.

Los trabajos que constituyen la presente Tesis Doctoral han sido financiados por los proyectos INIA RTA 2005-00079-00-00 y RTA 421 2007-00063-00-00 con fondos Feder.

La Doctoranda ha sido becaria y Contratada INIA para la formación de personal investigador, en el Marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004-2007.



# Índice

Índice .....	I
1. Resumen / Summary .....	V
2. Justificación .....	1
3. Introducción .....	3
4. Revisión bibliográfica .....	5
4.1. Estado actual de la acuicultura .....	5
4.2. Familia <i>Vibrionaceae</i> : Género <i>Vibrio</i> .....	8
4.2.1. Características generales .....	8
4.2.1.1. Características del género <i>Vibrio</i> .....	9
4.2.2. Taxonomía .....	11
4.2.3. Patogenicidad .....	13
4.2.3.1. Infecciones gastrointestinales y extraintestinales en humanos .....	13
4.2.3.2. Vibriosis .....	15
4.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	16
4.3.1. Variabilidad serológica .....	17
4.3.2. Ecología .....	18
4.3.3. Estrategia de supervivencia y estado viable no cultivable (VBNC) .....	20
4.3.4. Factores de virulencia .....	21
4.3.5. Manifestaciones clínicas .....	23
4.3.6. Epidemiología .....	25
4.3.7. Incidencia de infección en humanos .....	26
4.3.8. Métodos de cultivo para el aislamiento e identificación .....	27
4.3.8.1. Agar Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) .....	28
4.3.8.2. Agar CHROMagar <i>Vibrio</i> .....	28
4.3.9. Caracterización fenotípica e identificación bioquímica .....	29
4.3.10. Métodos moleculares para la detección y tipificación .....	30
4.3.10.1. Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR) .....	30
4.3.10.2. rep-PCR ( <i>Repetitive element-based PCR</i> ) .....	30
4.3.10.3. Técnica de electroforesis en gel de campo pulsado ( <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> , PFGE) .....	31
4.3.11. Prevención de la infección .....	32
4.3.11.1. Clasificación microbiológica de zonas de producción .....	34
4.3.11.2. Reinstalación y depuración .....	35
4.3.11.3. Técnicas de conservación para la comercialización de moluscos vivos o frescos .....	38
4.3.11.4. Procesado de moluscos .....	41
4.4. Análisis de riesgo de <i>V. parahaemolyticus</i> en acuicultura .....	43

<b>5. Objetivos</b> .....	<b>45</b>
5.1 Objetivo general .....	45
5.2 Objetivos específicos .....	45
<b>6. Material y Métodos</b> .....	<b>47</b>
6.1. Estudios observacionales .....	47
6.1.1. Ámbito geográfico .....	47
6.1.2. Población estudiada .....	48
6.1.3. Diseño de los muestreos .....	50
6.2. Estudios experimentales .....	52
6.2.1. Animales de experimentación .....	52
6.2.2. Instalaciones .....	53
6.2.3. Cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	55
6.2.4. Diseño experimental .....	56
6.2.4.1. Depuración .....	56
6.2.4.2. Cinética de incorporación en condiciones experimentales de cultivo .....	56
6.2.4.3. Cinéticas de incorporación en condiciones de post-cosecha .....	57
6.3. Técnicas diagnósticas .....	<b>58</b>
6.3.1. Procesado de las muestras .....	59
6.3.2. Recuento bacteriológico .....	59
6.3.3. Identificación bacteriana .....	60
6.3.4. Diagnóstico molecular .....	60
6.3.5. Hibridación de colonias .....	61
6.3.6. Caracterización molecular .....	61
6.3.7. Susceptibilidad a antibióticos .....	62
6.3.8. Variabilidad serológica .....	62
6.4. Análisis estadístico .....	63
<b>7. Publicaciones</b> .....	<b>65</b>
7.1. Detección e identificación de <i>V. parahaemolyticus</i> en el delta del Ebro y su relación intraespecífica con otros aislados de la Unión Europea (Estudios observacionales) .....	65
7.1.1. Applied and Environmental Microbiology, 2009 .....	65
Detection and identification of <i>tdh</i> - and <i>trh</i> -positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast	
7.1.2. ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology (en revisión) .....	71
Spatial distribution and temporal evolution of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in bivalve molluscs from the Spanish Mediterranean Coast	
7.1.3. Applied and Environmental Microbiology, 2011 .....	105
Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR characterization of environmental <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains of different origins	

7.2. Caracterización experimental de la dinámica de infección de <i>V. parahaemolyticus</i> en almejas (Estudios experimentales) .....	111
7.2.1. Food Microbiology, 2011.....	111
Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, <i>Ruditapes philippinarum</i> , depurated in seawater at two different temperatures	
7.2.2. Journal of Applied Microbiology, 2011.....	119
Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in two species of clams: <i>Ruditapes decussatus</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i>	
7.3.2. Aquaculture Research (en revisión).....	133
Evolution of nonpathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in a cohabitating population of <i>Ruditapes decussatus</i> and <i>Ruditapes philippinarum</i> under experimental conditions	
7.2.4. Journal of Food Protection (en revisión).....	155
Effect of different temperatures on the growth and survival of pathogenic and nonpathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in tissues of postharvest Manila clam ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )	
<b>8. Discusión General / Discussion .....</b>	<b>181</b>
<b>9. Conclusiones / Conclusions .....</b>	<b>197</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>199</b>
<b>11. Apéndices .....</b>	<b>227</b>
11.1. Características de las revistas .....	227
11.2. Contribución de la doctoranda y renuncia de coautores no Doctores .....	229
11.3. Trabajos actualmente en elaboración dentro del marco de la presente Tesis Doctoral.....	233
11.3.1. Recovery and Detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio vulnificus</i> in experimental inoculated samples and environmental samples, Using Tangential Flow Filtration Procedure (TFF) following with MPN and Real-Time PCR methods.....	233
11.3.2. Comparison of depuration protocols in seawater for cleaning of natural population sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of two species of clams: <i>Ruditapes philippinarum</i> and <i>Ruditapes decussatus</i> .....	234



## Resumen

---

*Vibrio parahaemolyticus* es una especie bacteriana que puede ser un patógeno importante en humanos, causante principalmente de infecciones gastrointestinales tras el consumo de moluscos crudos o poco cocinados. La especie es heterogénea y comprende variantes no patogénicas, al carecer por ejemplo, de los genes de virulencia *tdh* y/o *trh*, y patogénicas, por poseer los mencionados genes. A diferencia de EE.UU., en Europa se han realizado pocos estudios epidemiológicos sobre este patógeno en moluscos, por ello, la información de la que se dispone es limitada. La presente Tesis Doctoral pretende cubrir parte de este vacío al obtener nuevos datos sobre esta bacteria en Europa, en concreto en la costa mediterránea española. Los resultados que se han obtenido, no sólo son novedosos sino que, además, tienen el valor añadido de que podrán ser utilizados en un modelo de análisis de riesgo y servir para el desarrollo de un nuevo marco normativo de regulación en seguridad alimentaria que controle la amenaza que representa este patógeno emergente en Salud Pública.

A grandes rasgos, esta Tesis Doctoral se divide en dos partes y en cada una de ellas se plantearon una serie de objetivos específicos. En la primera parte se procedió a la detección, aislamiento y caracterización de *V. parahaemolyticus* a partir de bivalvos en la costa mediterránea, y al estudio de su prevalencia y de sus relaciones con otras cepas de origen europeo. Y en la segunda, se procedió al desarrollo de un modelo de experimentación *in vivo* para la exposición de almejas con cepas seleccionadas representativas de las variantes patogénica y no patogénica de *V. parahaemolyticus*, para estudiar el crecimiento y la supervivencia de esta especie en *Ruditapes* spp. tanto en el medio acuático (contaminación *in vivo* de almejas adultas por baño), como en la fase de post-cosecha, por almacenamiento de las almejas tras la exposición experimental, a diferentes temperaturas. Para asegurarnos de que el modelo es repetible se tuvo que conseguir determinadas condiciones como que las almejas utilizadas en las contaminaciones estuvieran libres de vibrios no fermentadores de sacarosa (entre los cuales se encuentra *V. parahaemolyticus*) por lo que se abordó el estudio de la eficacia de un sistema experimental de depuración.

Los moluscos bivalvos estudiados en el presente trabajo doctoral proceden de las dos bahías que componen el delta del Ebro, y que se caracterizan por ser



importantes zonas de producción acuícola a nivel nacional. Para la detección y caracterización de *V. parahaemolyticus* se llevaron a cabo pruebas fenotípicas, que componen la microbiología clásica y diferentes técnicas moleculares que determinaron la presencia de los genes *tlh*, *tdh* y *trh*.

El análisis de la variabilidad genética de las cepas identificadas se realizó usando las técnicas de valor epidemiológico rep-PCR y electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE). Los datos recogidos se analizaron estadísticamente en función del diseño de los diferentes estudios y las características de las variables recogidas.

Los resultados que se han obtenido en la primera parte de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la presencia de *V. parahaemolyticus* potencialmente patógeno para humanos en cuatro especies de moluscos bivalvos cultivados en el delta del Ebro, y la detección por primera vez en Europa de la coexistencia de los genes *tdh* y *trh* en una misma cepa bacteriana. Al analizar estadísticamente los datos de prevalencia en función de diversas variables asociadas con el hospedador y con el medio ambiente, se encontraron diferencias significativas en relación a la especie de molusco, siendo las almejas del género *Ruditapes* las que presentaron un mayor riesgo de estar contaminadas por *V. parahaemolyticus* en comparación con el resto de las especies de bivalvos estudiadas. Además, se detectó una relación directamente proporcional entre la prevalencia de *V. parahaemolyticus* en bivalvos y la salinidad (incrementándose el riesgo 1,27 veces por cada unidad de ppt que aumentara la salinidad) y, lo que es más interesante, una relación inversamente proporcional entre prevalencia de la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* (*trh*+) y la salinidad (disminuyendo el riesgo 1,64 veces por cada unidad de ppt que aumentara la salinidad). Finalmente, se observó una gran diversidad genética al comparar diferentes cepas europeas de *V. parahaemolyticus*.

La segunda parte de esta Tesis se centró en diversos estudios experimentales en laboratorio bajo condiciones controladas de algunas variables. Fundamentalmente se estudió la supervivencia de *V. parahaemolyticus* en *Ruditapes* spp., tanto en el medio acuático por contaminación *in vivo* de *R. decussatus* y *R. philippinarum* por baño, como también en la fase de post-cosecha por almacenamiento de *Ruditapes* spp., tras la contaminación *in vivo* de estas almejas por baño, a diferentes temperaturas del aire.

Para llevar a cabo estos estudios, se validó en primer lugar la eficacia de un protocolo experimental de depuración con el fin de lograr la eliminación hasta niveles casi indetectables de vibrios no fermentadores de sacarosa con el fin de realizar la incorporación bacteriana bajo condiciones ambientales controladas y con dosis inoculadas conocidas.

Posteriormente se estableció el crecimiento y supervivencia de *V. parahaemolyticus* en diferentes especies de almejas en el modelo, llevando a cabo una contaminación

*in vivo* por baño, encontrando que *R. decussatus* incorporó y eliminó ambas variantes de *V. parahaemolyticus* más rápidamente que las almejas de la especie *R. philippinarum*. Por otra parte, en las mismas condiciones se observó que la variante no patogénica podría sobrevivir mejor que la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* en las dos especies de almejas estudiadas. La importancia y, por lo tanto, el impacto de estos resultados es doble, ya que no sólo amplían el conocimiento de esta bacteria, sino que se demuestra que es posible el uso de la variante no patogénica para estudios posteriores de modelización evitando los riesgos para los investigadores. Seguidamente, se llevó a cabo un estudio con las dos especies de almejas cohabitando en el mismo tanque para describir un posible efecto hospedador en la etapa de meseta del estudio anterior (de 20 a 70 h post-inoculación). Los resultados obtenidos en este experimento no fueron lo suficientemente significativos como para confirmar las diferencias en el patrón de incorporación de la variante no patogénica de *V. parahaemolyticus* en el periodo citado; sin embargo se observó una tendencia marginal diferencial que ponía de manifiesto que *R. decussatus* tenía concentraciones ligeramente superiores de la variante no patogénica de *V. parahaemolyticus* que *R. philippinarum*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio anterior en el que las dos especies de almejas se contaminaron y mantuvieron por separado. A su vez, los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la diferencia en los niveles bacterianos adquiridos por cada una de las especies de almejas podrían estar relacionados con la temperatura del tanque (16-18°C), temperatura más próxima a la temperatura óptima de filtración de *R. decussatus* que de *R. philippinarum*.

Finalmente se abordó el estudio del comportamiento de *V. parahaemolyticus* en almejas del género *Ruditapes* que habían sido almacenadas a diferentes temperaturas del aire, tras la exposición experimental por baño a esta bacteria. Las temperaturas elegidas para este estudio fueron las temperaturas típicas del invierno y del verano en el mediterráneo, simulando la situación de manejo comercial (en puerto pesquero, cubierta de barcos, etc.), y, asimismo, temperaturas de refrigeración, simulando el ambiente de restaurantes y hogares. Las densidades de *V. parahaemolyticus* totales y patógenos fueron determinadas en distintos momentos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) de almacenamiento. Tanto la variante patogénica humana como la variante no patogénica de *V. parahaemolyticus* se multiplicaron rápidamente en almejas almacenadas a 28°C, mostrando un incremento de al menos 3 logs ufc/g a 72 h, en ambas variantes. La variante no patogénica de *V. parahaemolyticus* almacenada a 4°C y a 15°C mostró una disminución de 1 log ufc/g y de 2 log ufc/g a 96 h, respectivamente, mientras que no se detectaron diferencias significativas para la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* almacenada a dichas temperaturas. Estos resultados sugieren que la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* podría sobrevivir mejor que la

variante no patogénica en almejas (*R. philippinarum*) almacenadas tras la cosecha a 4 y a 15°C.

En definitiva los estudios que forman parte de esta Tesis Doctoral proporcionan información relevante que podrá utilizarse para cumplimentar las lagunas que existen en las actuales evaluaciones del riesgo relativo a la presencia de *V. parahaemolyticus* en Europa. Estos datos podrán ser utilizados “si se estima adecuado” en futuros modelos de análisis de riesgo de esta bacteria, así como para la elaboración de políticas de gestión de riesgo encaminadas a reducir las enfermedades en humanos asociadas a este patógeno de origen alimentario.

## Summary

---

*Vibrio parahaemolyticus* is a bacterial species that can be an important pathogen in humans, causing gastrointestinal infections after the consumption of raw or undercooked shellfish. The species is heterogeneous and includes non-pathogenic variants, lacking for example, the virulence genes *tdh* and/or *trh*, and pathogenic, which contain the aforementioned genes. Unlike the U.S., in Europe there have been few epidemiological studies of this pathogen in shellfish, therefore, available information is limited. This thesis aims to fill part of this gap by obtaining new data on this bacterium in Europe, particularly in the Spanish Mediterranean coast. The results obtained are not only innovative but also have the added value that can be used in a risk analysis model and used to develop a new regulatory framework for food safety regulation to control the threat posed by this emerging pathogen in Public Health.

Broadly speaking, this PhD thesis is divided into two parts and each addressing a number of specific objectives. In the first part, the detection, isolation and characterization of *V. parahaemolyticus* in shellfish from the Mediterranean coast, and the study of its prevalence and its relationship with other strains of European origin was addressed. And in the second, an *in vivo* experimental model was developed for the exposure of clams with selected strains representing the pathogenic and nonpathogenic variants of *V. parahaemolyticus*, in order to study the growth and survival of this species in *Ruditapes* spp. both in the aquatic environment (*in vivo* inoculation of adult clams by bath challenge), and at the stage of post-harvest, through the storage of clams, after experimental exposure, at different temperatures. To ensure that the model is repeatable certain conditions had to be achieved, such as the clams used in infections were free of non-fermenting vibrios (including *V. parahaemolyticus*) and therefore the effectiveness of an experimental depuration system was studied.

The bivalve molluscs studied in this dissertation come from the two bays that make up the Ebro delta, which are important areas of national aquaculture production. For the detection and characterization of *V. parahaemolyticus* phenotypic tests were performed and molecular techniques that determined the presence of genes *tlh*, *tdh* and *trh*.

The analysis of the genetic variability of the strains identified was performed using techniques of epidemiological value such as rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The collected data were statistically analyzed according to the design of the different studies and the characteristics of the variables collected. The results obtained in the first part of this thesis show the presence of *V. parahaemolyticus* potentially pathogenic to humans in four species of bivalve molluscs grown in the Ebro delta, and detection for the first time in Europe of the

coexistence of the genes *tdh* and *trh* in the same bacterial strain, and also describing its relationship with different variables associated with the host and the environment. Significant differences in relation to the species of mollusc were found, being the clams of the genus *Ruditapes* which had a higher risk of being contaminated with *V. parahaemolyticus* than other bivalve species. In addition, a direct relationship between the prevalence of *V. parahaemolyticus* in shellfish and salinity (increasing the risk 1.27 times for each unit to increase ppt salinity) was detected and, more interestingly, an inverse relationship between prevalence of pathogenic variant *V. parahaemolyticus* (*trh* +) and salinity (decreasing the risk 1.64 times for each unit to increase the salinity ppt). Finally, a high genetic diversity when comparing different European strains of *V. parahaemolyticus* was observed.

The second part of this thesis is focused on experimental studies in laboratory under controlled conditions of some variables. Fundamentally, the survival of *V. parahaemolyticus* in *Ruditapes* spp., both in the aquatic environment through a bath challenge of *R. decussatus* and *R. philippinarum*, and in the phase of post-harvest storage of *Ruditapes* spp., after a bath challenge of these clams, at different air temperatures was studied.

To perform these studies, initially the efficacy of an experimental protocol of depuration was validated in order to achieve almost undetectable levels of sucrose non-fermenting vibrios in order to perform the bacterial challenge under controlled environmental conditions and with known bacterial doses.

Subsequently, the growth and survival of *V. parahaemolyticus* in different species of clams in the model were assessed using a bath challenge and it was found that *R. decussatus* incorporated and discharged both variants of *V. parahaemolyticus* clams faster than *R. philippinarum*. Moreover, under the same conditions it was observed that the non-pathogenic variant could survive better than the pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* in two clam species studied. The importance and, therefore, the impact of these results is double, as it not only extend the knowledge of this bacterium, but it shows that it is possible to use non-pathogenic variant for subsequent modeling studies avoiding the risks for researchers. A study with the two clam species cohabiting in the same tank for describing a host effect on the plateau phase of the previous study (20 to 70 h post-inoculation) was performed. The results obtained in this experiment were not significant enough to confirm the differences in the pattern of incorporation of non-pathogenic variant *V. parahaemolyticus* in the period mentioned, but there was a marginal differential trend which indicated that *R. decussatus* had slightly higher concentrations of non-pathogenic variant *V. parahaemolyticus* than *R. philippinarum*, which is consistent with results obtained in the previous study in which the two species of clams were kept separately. The results of this study on the difference in bacterial levels incorporated by each clam species may be associated with the tank temperature

(16-18°C) which is closer to the optimum temperature filtration of *R. decussatus* than that of *R. philippinarum*.

Finally, the behaviour of *V. parahaemolyticus* in clams of the *Ruditapes* genus that had been stored at different air temperatures, after challenge with this bacterium was studied. Temperatures chosen for this study were typical temperatures of winter and summer in the Mediterranean, simulating commercial conditions (in the fishing port, boat cover, and so on), and also refrigeration temperatures, simulating the environment at restaurants and homes. The densities of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* were determined at various times (0, 24, 48, 72 and 96 h) of storage. Both the human pathogenic variant as non-pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* multiplied rapidly in clams stored at 28°C, an increase of at least 3 logs cfu/g at 72 h, in both variants. Non-pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* stored at 4°C and 15°C showed a decrease of 1 log cfu/g of 2 log cfu/g at 96 h, respectively, whereas no significant differences were detected for the variant pathogenic *V. parahaemolyticus* stored at these temperatures. These results suggest that the pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* could survive better than non-pathogenic variant in clams (*R. philippinarum*) stored after harvest at 4 and 15°C.

In short, the studies that form part of this thesis provide relevant information that may be used to fill gaps in current risk assessments concerning the presence of *V. parahaemolyticus* in Europe. These data may be used if considered appropriate in future risk analysis models for this bacterium and to the development of risk management policies designed to reduce human illness associated with this foodborne pathogen.



## 2 Justificación

La presente Tesis Doctoral se presenta como un compendio de trabajos de investigación ya publicados, o en proceso de publicación, en revistas científicas indexadas en ISI-JCR, tal y como se establece en la normativa de la Universidad de Zaragoza.

A continuación se presentan las referencias bibliográficas de cada uno de los cuatros artículos publicados y de tres manuscritos incluidos, centrados todos ellos en el estudio de *Vibrio parahaemolyticus* en especies de moluscos bivalvos de interés comercial:

1. Roque A, Lopez-Joven C, Lacuesta B, Elandaloussi L, Wagley S, Furones MD, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Rangdale R, Gomez-Gil B. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. ***Applied and Environmental Microbiology***. 2009;75(23):7574-7577.
2. Lopez-Joven C, de Blas I, Roque A. Spatial distribution and temporal evolution of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscs from the Spanish Mediterranean Coast. ***ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology***. (Manuscrito en revisión).
3. Suffredini E\*, Lopez-Joven C\*, Maddalena L, Croci L, Roque A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. ***Applied and Environmental Microbiology***. 2011;77(17):6301-6304.  
  
\*NOTA: Los dos primeros autores contribuyen con la misma importancia en este artículo.
4. Lopez-Joven C, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Furones MD, Roque A. Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures. ***Food Microbiology***. 2011;28(5):951-956.
5. Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Furones MD, Roque A. Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. ***Journal of Applied Microbiology***. 2011;111(1):197-208.



6. Lopez-Joven C, Roque A, Pérez-Larruscain J, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I. Evolution of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in a cohabitating population of *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* under experimental conditions. **Aquaculture Research**. (Manuscrito en revisión).
7. Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Furones MD, Roque A. Effect of different temperatures on the growth and survival of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of postharvest Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). **Journal of Food Protection**. (Manuscrito en revisión).

## 3 Introducción

El género *Vibrio* comprende un grupo numeroso de especies acuáticas algunas de las cuales causan enfermedades a humanos tan importantes como el cólera. Estas infecciones pueden ser gastrointestinales, al ser transmitidas a través de los alimentos; pero también infecciones extraintestinales, como infección de heridas o de tejidos blandos por contacto con agua de mar e, incluso, algunas especies pueden llegar a producir septicemias, que en algunos casos pueden ser mortales (Austin, 2010). *Vibrio parahaemolyticus* pertenece a este grupo de especies y es capaz de causar graves infecciones gastroenteritis en humanos tras el consumo de pescado y marisco crudo o escasamente cocinado (Daniels y Shafaie, 2000). La presencia de esta especie en el medio acuático está favorecida principalmente con la temperatura y la salinidad del agua, lo que condiciona un marcado patrón de estacionalidad en las intoxicaciones alimentarias que producen. Así, hay una mayor incidencia de intoxicaciones causadas por *V. parahaemolyticus* durante los meses de verano (DePaola *et al.*, 2000; Lozano-León *et al.*, 2003), meses en los que, además, el consumo de marisco se incrementa.

La mayoría de estudios sobre prevalencia de *V. parahaemolyticus* en agua y moluscos han sido realizados en EE.UU. y países asiáticos, países en los que este microorganismo causa el mayor número de infecciones en humanos. Hay pocos estudios equivalentes que hayan sido realizados en Europa y, menos aún en España. Esta falta de información se justifica porque en Europa no hay una comisión que se encargue del seguimiento anual de las infecciones gastrointestinales que hayan sido causadas al año por *V. parahaemolyticus*. De hecho, muchos de los casos ni siquiera se investigan, desconociéndose si tales infecciones son de origen vírico o bacteriano. La carencia de datos epidemiológicos fiables es la que determina que no haya una legislación europea que establezca el máximo número de células del género *Vibrio* o, en concreto, de la especie *V. parahaemolyticus* que debe contener el alimento para que sea apto para su consumo.

Además, los vibrios son muy variables genéticamente lo que supone que no todas las cepas de una especie son virulentas. Por ello, los estudios epidemiológicos que habrían de realizarse en Europa, además, deberían tener en cuenta esta variabilidad intraespecífica y diseñarse de forma que pudiera distinguirse el contenido total en *V. parahaemolyticus* de un alimento del peligro real que supone tal alimento determinando, por ejemplo, la cantidad de *V. parahaemolyticus* patógeno que

contiene con respecto al total (Zimmerman *et al.*, 2007). En la presente Tesis, se ha seleccionado el área del delta del Ebro donde se ubica una de las mayores zonas de producción de bivalvos después de Galicia. Además en el contexto de una vigilancia epidemiológica sería sumamente interesante conocer la relación que existe entre distintas cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* procedentes de diferentes orígenes geográficos.

En los estudios de prevalencia del patógeno en su ambiente natural, la modelización se ha convertido en una importante herramienta de evaluación del riesgo. Para proceder a modelizar la interacción de una bacteria patógena con sus hospedadores/reservorios potenciales, es necesario seleccionar las especies animales a estudiar. En el caso de la presente Tesis, se ha seleccionado para el estudio de modelización las siguientes especies de bivalvos de interés comercial: mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), ostión japonés (*Crassostrea gigas*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). Así mismo, estas interacciones deben estudiarse bajo diferentes condiciones de salinidad y temperatura que reproduzcan las variaciones estacionales que se producen en el medio natural.

Por todo ello es necesario estandarizar un protocolo experimental para estudiar la evolución *in vivo* de la contaminación bacteriana en moluscos bivalvos, que precisará en primer lugar de un sistema de depuración eficaz para eliminar o disminuir a valores despreciables la carga de vibrios naturales y, en concreto, la carga de vibrios no fermentativos de la sacarosa (*V. parahaemolyticus*, entre ellos). Esto permitirá garantizar que el recuento posterior de vibrios será debido a la bacteria inoculada experimentalmente y no a bacterias de la microbiota propia del molusco utilizado en la modelización.

Es importante recoger información complementaria sobre la cinética de estas bacterias en los moluscos desde que son cosechados hasta su consumo, así como caracterizar la influencia de la temperatura del aire en toda la fase de post-cosecha, y especialmente durante el proceso de almacenamiento, para minimizar los riesgos asociados con el consumo de marisco (crudo o poco cocinado), ya que puede ser un problema emergente en el ámbito de la Salud Pública europea al aumentar el consumo de este tipo de alimentos y cambiar los hábitos alimenticios de la población humana.

Finalmente, es necesario comentar que la controversia que existe al utilizar los términos ‘aislado bacteriano’ y ‘cepa bacteriana’ a veces es ineludible. Sin embargo, y a pesar de que el término ‘aislado’ sería más procedente en el contexto del presente trabajo, en castellano esta terminología no es demasiado adecuada, por lo que el término ‘aislado’ será sustituido por el término de ‘cepa’ a lo largo de todo el documento.

# 4 Revisión bibliográfica

## 4.1. Estado actual de la acuicultura

---

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), la acuicultura es “el cultivo de organismos acuáticos (peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas) bajo condiciones controladas o semi-controladas principalmente para la alimentación humana, pero también con fines lúdicos”. En la actualidad, la acuicultura representa alrededor del 30% de la producción pesquera mundial (FAO, 2010a).

En el **contexto mundial**, la acuicultura es un sector de producción de alimentos joven que ha ido creciendo rápidamente en los últimos 50 años, y que según la FAO, llegará a aportar el 65% de los alimentos de origen acuático en 2030 (FAO, 2010a citado en APROMAR 2011). En 2009, la producción global para alimentación humana llegó a ser superior al aporte procedente de la pesca extractiva (73 y 65 millones de Tm, respectivamente) (excluyendo de esta última, los 24 millones de Tm que se dedicaron a piensos para ganadería terrestre, acuicultura y otros). De hecho, la pesca extractiva no ha aumentado desde mediados de la década de 1980 y se estima que se está reduciendo de forma paulatina (APROMAR, 2011).

Entre 1950 y 2009, la producción acuícola creció de manera sorprendente desde menos de 0,6 millones de Tm en 1950, a los mencionados 73 millones de Tm en 2009. Esta producción ha mantenido un índice de crecimiento medio anual del 8,3% en todo el mundo (o del 6,5% excluyendo a China) (“*Estado mundial de la acuicultura y la pesca en 2010*”, FAO, 2010a). Sin embargo, es perceptible una reducción gradual en el ritmo de crecimiento de la acuicultura global. Por otro lado, el consumo *per capita* mundial de productos acuáticos también ha ido incrementándose con el paso del tiempo, superando los 17 kg por persona y año en 2009 (APROMAR, 2011).

Si hacemos una clasificación por países productores, China es el principal e indiscutible número uno, con 45,3 millones de Tm anuales de producción en 2009, seguido de Indonesia con 4,7 millones de Tm y de la India con 3,8 millones de Tm. España ocupó la posición 19ª en el ranking mundial con 266.476 Tm (FishStat, 2009; APROMAR, 2011). Y si se tiene en cuenta el valor de la producción anual (en millones de euros) en 2009, la primera posición vuelve a ser para China, país cuya acuicultura genera un valor de 45.676 millones de euros. En segunda posición, muy por debajo, se

encuentra India (4.519 millones de euros), o España la cuál ocupa el puesto 27ª con 413 millones de euros en 2009 (FishStat, 2009; APROMAR, 2011).

En Europa, la acuicultura constituye, igualmente, una fuente cada vez más importante de pescado y marisco, destacando la producción de especies piscícolas de un alto valor comercial (salmón, trucha, dorada, lubina, entre otras) y de moluscos (ostra, mejillón y almeja). En este sentido, la producción de peces supuso el 49,3% en peso y el 69,4% en valor de la producción acuícola europea total, mientras que los moluscos constituyeron el 50,6% y 30,4%, respectivamente. Además, en estos momentos, la acuicultura en algunos países europeos supera en relevancia económica y social a la pesca extractiva (APROMAR, 2011).

En cuanto a las principales especies producidas en la acuicultura a nivel mundial, en 2009, el primer lugar fue para el alga laminaria japonesa o wakame (*Undaria pinnatifida*) con 4,9 millones de Tm, seguido de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) y de la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), con 4,2 y 4,1 millones de Tm, respectivamente, y en el caso de los moluscos bivalvos, el ostión japonés (3,5 millones de Tm) y la almeja japonesa (3,2 millones de Tm) ocupan cuarto y el quinto lugar, respectivamente. Y en relación con el valor de la producción acuícola mundial (ese mismo año) en millones de euros, los datos sitúan al langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) como la principal especie con 7.374 millones de euros, seguido por el salmón atlántico (*Salmo salar*), con un valor de 5.140 millones de euros. Sin embargo, ninguna de las especies de moluscos bivalvos está incluida en el ranking de las diez principales (FishStat, 2009; APROMAR, 2011).

Teniendo en cuenta los datos de 2009, la distribución porcentual de la producción de acuicultura mundial sitúa a los peces en primer lugar (49,4%), seguido de los vegetales (23,7%), los moluscos (18,6%), los crustáceos (7,3%), el grupo de anfibios-reptiles con 0,5% y, por último, el grupo de otros invertebrados con el 0,5% restante. Por otra parte, si se tiene en cuenta el valor en primera venta, hay que destacar que la producción de peces generó más de 52.000 millones de euros, lo que supuso el 59,3% del valor de la producción acuícola global, mientras que la producción de crustáceos representó el 21,9% y la de moluscos el 11,9% (APROMAR, 2011).

Llegados a este punto y centrandolo la revisión bibliográfica en el grupo de moluscos, cabe destacar que la producción (en su conjunto) a nivel mundial aumentó a un ritmo anual del 3,7% en el período 2000-2008 y, que en 2008, las principales especies producidas fueron las ostras (31,8%), las almejas (24,6%), los mejillones (12,4%) y los pectínidos (10,7%) (FAO, 2010a).

El importante crecimiento de la acuicultura desde los años 80 y que continua en la actualidad se ha conseguido gracias al desarrollo, la diversificación y los adelantos tecnológicos, que favorecen el crecimiento económico, la mejora del nivel de vida y el

incremento de la seguridad alimentaria, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Declaración y Estrategia de Bangkok de 2000 (FAO), citado por APROMAR, 2011).

La **acuicultura española** destaca dentro de la Unión Europea y, según datos del 2009, estaba considerada la primera productora acuícola con 268.565 Tm (aunque ocupaba la 5ª posición en cuanto al valor total de la producción debido al bajo precio medio en su comercialización) (Eurostat, 2012; APROMAR, 2011). En la actualidad ocupa la segunda posición en producción según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente (<http://www.magrama.es>) teniendo en cuenta que el crecimiento se ha estancado en algunos sectores. Así, la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR) ha informado recientemente que se produjo una reducción del 9,4% en la producción de peces marinos en España en el 2010.

En cuanto a moluscos bivalvos, España sigue siendo el primer productor de la Unión Europea y el segundo productor a nivel mundial. Estos moluscos se consideran una importante fuente de alimento, especialmente en las poblaciones que viven cerca del mar (60.000 Tm consumidas al año; MAPA, 2001). Según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) y concretamente, la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) los datos de producción en España en 2008, fueron: moluscos (bivalvos y cefalópodos), 199.923,71 Tm (solo los bivalvos, 199.895,29 Tm); peces marinos, 40.262,65 Tm, crustáceos, 112,69 Tm, y algas, 13,67 Tm (Jacumar, 2011).

En España, las principales zonas de cultivo de moluscos bivalvos se encuentran ubicadas en Galicia, Cataluña y Andalucía. Del total de la producción de moluscos bivalvos en España en ese año (2008), Galicia obtuvo una producción total de 195.062,3 Tm, seguida de Cataluña (3.767,41 Tm), y de Andalucía (656,05 Tm). Y según la última actualización de los datos de producción (Tm) (Jacumar, 2011) en el año 2010 Galicia obtuvo una producción total de 215.688,84 Tm, seguida de Cataluña (3.878,24 Tm), y de Andalucía (790,51 Tm).

Ampliando los últimos datos del 2010 (Jacumar, 2011), en Galicia las especies de moluscos bivalvos cultivadas son: almeja babosa (*Venerupis (=Tapes) pullastra*) con 146,84 Tm, almeja fina con 197,02 Tm, almeja japonesa con 1.226,30 Tm, berberecho común (*Cerastoderma edule*) con 895,97 Tm, mejillón con 212.034,51 Tm, ostión japonés (u ostra rizada) con 314,01 Tm, ostra europea (u ostra plana) (*Ostrea edulis*) con 862,14 Tm, y volandeira (*Aequipecten opercularis*) con 4,41 Tm. El cultivo de mejillón es el más representativo y se localiza en las rías gallegas, siendo la ría de Arousa responsable del 60% de la producción española de mejillón, seguida por la ría de Vigo y la ría de Pontevedra.

En Cataluña, el cultivo de bivalvos se concentra en la región del Delta del Ebro. Las especies cultivadas son: almeja fina con 5,79 Tm, almeja japonesa con 5,49 Tm, berberecho común con 7,09 Tm, mejillón con 3.604,84 Tm, navaja (*Ensis arcuatus*) con 3,7 Tm, ostión japonés con 249,92 Tm, y ostra europea con 1,4 Tm.

Y por último, en Andalucía, las especies de moluscos bivalvos cultivadas son: almeja fina con 4,12 Tm, almeja japonesa con 11,93 Tm, mejillón con 756,68 Tm, ostión japonés con 17,66 Tm y zamburiña (*Chlamys varia*) con 0,05 Tm.

En el apartado de metodología se describirá detalladamente el ámbito geográfico del cultivo de moluscos en Cataluña, concretamente la región del Delta del Ebro, por ser ésta la zona de producción más importante en la costa mediterránea, donde se llevaron a cabo los trabajos de la presente Tesis Doctoral.

## 4.2. Familia *Vibrionaceae*: Género *Vibrio*

La familia *Vibrionaceae* (Véron, 1965) pertenece al orden *Vibrionales* y a la clase *Gammaproteobacteria* (Tabla 1). La familia engloba diferentes géneros y un gran número de especies de ambientes acuáticos propias de ecosistemas templados y tropicales.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Vibrio parahaemolyticus*

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Vibrionales
Familia:	Vibrionaceae
Género:	<i>Vibrio</i>
<b>Especie</b>	<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>

La familia *Vibrionaceae* tiene como género tipo, *Vibrio* (Pacini, 1854), como especie tipo, *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854), y como cepa tipo, ATCC 14035 (NCTC 8021) (Baumann y Schubert, 1984; Farmer 3rd, 2006).

### 4.2.1. Características generales

La familia *Vibrionaceae* fue propuesta formalmente por Véron en 1965 como una agrupación de bacterias fermentativas, Gram-negativas, anaerobias facultativas que crecían bien en medios ordinarios de peptona y en general, en medios con sales biliares y que eran oxidasa positiva y móviles, gracias a uno ó más flagelos polares (Baumann y Schubert, 1984).

Muchas vibrionáceas son bacterias halófilas o halotolerantes, lo que significa que para su aislamiento hay que suplementar el medio de cultivo con sal (los medios de cultivo de peptona comerciales contienen entre 0,5 y 0,85% de NaCl).

Las especies pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* son mayoritariamente sensibles al agente vibriostático opteridina O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropil-pteridina) (*V. aerogenes* es resistente), lo que permite utilizar esta prueba como discriminatoria (Farmer 3rd et al., 2005).

Esto es importante teniendo en cuenta que varias especies de esta familia son patógenas para humanos, como es el caso de *V. cholerae* considerada la especie patógena más importante y responsable del cólera (enfermedad endémica en muchas áreas del mundo) (O'Shea et al., 2004) y *V. vulnificus* responsable de distintas patologías dependiendo de la ruta de entrada al hospedador y de la existencia de factores de riesgo relacionados principalmente con el estado inmunológico del paciente (enfermedades preexistentes, diabetes o cirrosis entre otras) (Strom y Paranjpye, 2000; Jones y Oliver, 2009).

En la tabla 2 se resumen las características que diferencian la familia *Vibrionaceae* de otras familias estrechamente relacionadas (Farmer 3rd, 2006).

Tabla 2. Características de las familias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, y *Pseudomonadaceae* (adaptado de Farmer 3rd, 2006)

Características <sup>a</sup>	Propiedades de las familias <sup>b</sup>		
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género Tipo	<i>Escherichia</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Pseudomonas</i>
Metabolismo de la D-glucosa	Fermentativo	Fermentativo	Oxidativo
Morfología celular			
Bacilos rectos	+ <sup>a</sup>	(-)	+
Bacilos curvados	-	(+)	-
Localización del flagelo(s)	Periféricos	Polar <sup>c</sup>	Polar
Crecimiento en aerobiosis	+	+	+
Crecimiento en anaerobiosis	+	+	-
Prueba de la Oxidasa	-	+	+
Bioluminiscencia	-	v	-
Requerimiento de Na <sup>+</sup>	-	(+)	-
Inhibición por vibriostático O129	-	+	-

<sup>a</sup> Las características expuestas son típicas de los géneros y especies de cada familia, pero hay algunas excepciones.

<sup>b</sup> Símbolos: +, la mayoría de especies positivas; (+), muchas especies positivas; v, variación entre especies, algunas de ellas positivas; (-), muchas especies negativas; -, la mayoría de especies negativas.

<sup>c</sup> Algunas especies del género *Vibrio* tienen un único flagelo polar en medio líquido, y sin embargo sintetizan flagelos periféricos cuándo crecen en un medio sólido

#### 4.2.1.1. Características del género *Vibrio*

El género *Vibrio* junto con el género *Photobacterium* (ambos de la familia *Vibrionaceae*) son los géneros más antiguos, descritos en el siglo XIX.



Concretamente, el género *Vibrio* fue acuñado por Pacini en 1854 durante sus estudios sobre el cólera (Farmer 3rd e Hickman-Brenner, 2006).

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* son ubicuas del medio acuático, tanto marino como de agua dulce, y también de zonas de estuario, encontrándose en un amplio rango de nichos ecológicos, libres o asociadas al plancton, a las biopelículas, a las conchas de quitina de los copépodos o a otros hospedadores. De esta forma constituyen la microbiota dominante en el estómago de peces, moluscos, y camarones, jugando un importante papel en la digestión y nutrición (Baumann *et al.* 1984), o en asociaciones simbióticas con órganos y tejidos de determinados hospedadores (Nealson *et al.*, 1970; Fuqua *et al.*, 1994; Nyholm y McFall-Ngai, 2004).

Sin embargo, aunque las especies del género *Vibrio* representan un porcentaje elevado (>10%) de las bacterias cultivables en ambientes marinos y de estuarios (Thompson *et al.*, 2004), corresponden a menos del 1% sobre el total del bacterioplacton (Thompson y Polz, 2006).

En la edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* de 1974 (Buchanan y Gibbons, 1974) la definición del género *Vibrio* incluía el resultado positivo en dos pruebas, oxidasa y reducción de nitrato a nitrito (sales de amonio como fuente de nitrógeno). *Vibrio aerogenes*, *V. gazogenes* y *V. metschnikovii*, descubiertas posteriormente, no cumplen estos requisitos. La primera es oxidasa negativa, mientras que las dos últimas son negativas para las dos pruebas (Farmer 3rd e Hickman-Brenner, 2006; Shieh *et al.*, 2000).

Las especies del género *Vibrio* presentan una morfología bacilar recta o curvada, son Gram-negativas y miden entre 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1,4-2,6  $\mu\text{m}$  de largo (McLaughlin, 1995; Farmer 3rd *et al.*, 2005). Cuando crecen en condiciones de laboratorio, frecuentemente revierten su morfología a bacilos rectos (Atlas, 1997). Los vibrios no forman esporas o microquistes, son aerobios o anaerobios facultativos y crecen óptimamente a temperaturas entre 20-30°C (McLaughlin, 1995). Además, algunos de ellos pueden crecer entre 4-40°C, como es el caso de *V. azureus*, *V. hispanicus*, *V. neonatus*, *V. neptunius*, *V. nereis*, *V. sagamiensis* y *V. rotiferianus* (Gomez-Gil *et al.*, 2003; Yoshizawa *et al.*, 2009, 2010). En general, su requerimiento en  $\text{Na}^+$  está entre el 1 y el 3,5% de NaCl, con un rango entre 0 y 12%, lo que determina que para su aislamiento, todas las especies, excepto *V. cholerae* y *V. mimicus*, requieren un suplemento de NaCl en el medio (Kaysner y DePaola, 2004; Farmer 3rd *et al.*, 2005).

La mayoría de los vibrios están dotadas de un flagelo polar que les permite tener una elevada movilidad en medio acuoso. Sin embargo, existen excepciones de especies inmóviles como *V. breoganii*, *V. comitans*, *V. ezurae*,

*V. gallicus*, *V. halioticoli*, *V. inusitatus*, *V. neonatus*, *V. rarus* y *V. superstes* (Sawabe et al., 2004, 2007; Beaz-Hidalgo et al., 2009), y excepciones de especies con dos flagelos, como es el caso de *V. aerogenes* (Shieh et al., 2000). Además, algunas de las bacterias de este género tienen la capacidad de moverse sobre sustratos sólidos o semisólidos mediante numerosos flagelos laterales con menor longitud que el flagelo polar, movilidad que se conoce como *swarming* (Shinoda y Okamoto, 1977; Baumann y Schubert, 1984).

A lo largo del tiempo se han ido observando otras excepciones, como la producción de gas al fermentar la glucosa (fuente principal de carbono y energía) por *V. aerogenes*, *V. furnissii*, *V. gazogenes* y *V. mytili* (Hickman-Brenner et al., 1984; Pujalte et al., 1993); la utilización del inositol por *V. aerogenes* (Shieh et al., 2000), o la producción de un pigmento anaranjado por *V. gazogenes*, entre otras (Harwood, 1978; Baumann et al., 1984).

Por todo ello, las especies del género *Vibrio* tienen características comunes a nivel de género, pero, también tienen una serie de características que las diferencia las unas de las otras a nivel de especie (Farmer 3rd y Hickman-Brenner, 2006).

#### 4.2.2. Taxonomía

En las últimas décadas, la taxonomía de la familia *Vibrionaceae* ha evolucionado y cambiado en gran medida.

La primera edición del *Bergey's Manual of Systematic bacteriology* (Baumann y Schubert, 1984) incluía cuatro géneros pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*: género *Aeromonas* (descrito por primera vez en 1936), *Photobacterium* (1899), *Plesiomonas* (1962) y *Vibrio* (1954). En la actualidad, según *The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN, 2011) revisada en diciembre de 2011, y el *International Committee on Systematics of Prokaryote* (ICSP, 2010), la familia *Vibrionaceae* incluye ocho géneros: *Aliivibrio* (Urbanczyk et al., 2007), *Catenococcus*, *Enterovibrio* (Thompson et al., 2002), *Grimontia* (Thompson et al., 2003), *Listonella*, *Photobacterium* (Baumann y Baumann, 1984), *Salinivibrio* (Mellado et al., 1996) y *Vibrio* (Baumann y Schubert, 1984).

Además, dentro de estos géneros y, en concreto, en el género *Vibrio*, el incremento en el número de especies ha sido sorprendente, y debido en gran parte al mayor poder discriminatorio de las nuevas técnicas moleculares que incluyen la secuenciación de genes ribosomales (codificación 5S rRNA, 23S y 16S), la hibridación de DNA/DNA y la secuenciación de uno o más genes housekeeping (secuencias multilocus o MLST) (Kita-Tsukamoto et al., 1993; Maiden et al., 1998; Stackebrandt et al., 2002).

Así, el número de especies del citado género aumentó de 20 en 1980, a 47 en 2002 (Euzéby, 1997), a 63 en 2004 (Tabla 3, Thompson et al., 2004) y a más de 100 especies en diciembre de 2011 (LPSN, 2011).

Tabla 3. Listado de especies de vibrios (Thompson et al., 2004).

Species name	Type strain	Place and date of isolation <sup>a</sup>	Source
<i>Enterovibrio coralli</i>	LMG 22228 <sup>T</sup>	Magnetic Island (Australia) 2002	Water extract of bleached coral ( <i>Mesastrea aspera</i> )
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	LMG 19839 <sup>T</sup>	AARS Austevoll (Norway), 1997	Gut of turbot larvae ( <i>Scophthalmus maximus</i> )
<i>Grinomonas holliae</i>	LMG 17710 <sup>T</sup>	Maryland (United States)	Human feces
<i>Photobacterium angustum</i>	LMG 8455 <sup>T</sup>	Hawaii (United States)	Sea water
<i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i>	LMG 7892 <sup>T</sup>	United States	Diseased damselfish ( <i>Chromis punctipinnis</i> )
<i>P. euronibergsi</i>	LMG 22223 <sup>T</sup>	Magnetic Island (Australia), 2003	Tissue extract of bleached coral ( <i>Pachyseris speciosa</i> )
<i>P. altopiscarius</i>	LMG 19543 <sup>T</sup>	Norway	Gut of fish
<i>P. leiognathi</i>	LMG 4228 <sup>T</sup>	Thailand	Leiognathidae fish (Family <i>Leiognathidae</i> )
<i>P. phosphoreum</i>	LMG 4233 <sup>T</sup>	Hawaii (United States)	Seawater
<i>P. profundum</i>	LMG 19446 <sup>T</sup>	Ryukyu Trench (Japan)	Sediment
<i>Selastivibrio corticola</i> subsp. <i>corticola</i>	LMG 11651 <sup>T</sup>	Australia	Bacon-curing brine
<i>Vibrio aerogenus</i>	LMG 19650 <sup>T</sup>	Seagrass bed in Nanwan bay (Taiwan)	Sediment
<i>V. aestuarius</i>	LMG 7909 <sup>T</sup>	Oregon (United States)	Oyster
<i>V. agarrivorus</i>	LMG 21449 <sup>T</sup>	Valencia (Spain)	Seawater
<i>V. alginolyticus</i>	LMG 4400 <sup>T</sup>	Japan	Spoiled horse mackerel ( <i>Trachurus trachurus</i> )
<i>V. anguillarum</i>	LMG 4437 <sup>T</sup>	Norway	Diseased cod ( <i>Gadus morhua</i> )
<i>V. brasiliensis</i>	LMG 20546 <sup>T</sup>	LCMM Florianópolis (Brazil), 1999	Bivalve larvae ( <i>Nodipecten nodosus</i> )
<i>V. caviaris</i>	LMG 21294 <sup>T</sup>	Bay of Calvi (Mediterranean), France	Seawater
<i>V. campbellii</i>	LMG 11216 <sup>T</sup>	Hawaii (United States)	Seawater
<i>V. cholerae</i>	LMG 21353 <sup>T</sup>	AARS Austevoll (Norway), 1997	Gut of turbot larvae ( <i>Scophthalmus maximus</i> )
<i>V. cholerae</i>	LMG 21698 <sup>T</sup>	Asia	Clinical
<i>V. cincinnatiensis</i>	LMG 7891 <sup>T</sup>	Ohio (United States)	Human blood and cerebrospinal fluid
<i>V. coralliilyticus</i>	LMG 20984 <sup>T</sup>	Indian Ocean near Zanzibar, 1999	Diseased <i>Pocillopora damicornis</i>
<i>V. crosostreae</i>	LMG 22240 <sup>T</sup>	IFREMER La tremblade (France)	Hemolymph of diseased reared oysters ( <i>Crosostrea gigas</i> )
<i>V. cyclotrophicus</i>	LMG 21359 <sup>T</sup>	Washington (United States)	Creosote-contaminated sediment
<i>V. diebolicus</i>	LMG 19805 <sup>T</sup>	East Pacific Rise, 1991	Dorsal integument of polychaete ( <i>Alixia pompejana</i> )
<i>V. diazotrophicus</i>	LMG 7893 <sup>T</sup>	Nova Scotia (Canada)	Sea urchin ( <i>Strongylocentrotus</i> )
<i>V. eurus</i>	LMG 19970 <sup>T</sup>	Kanagawa (Japan), 1999	Gut of abalone ( <i>Haliotis diversicolor supertexta</i> )
<i>V. fischeri</i>	LMG 4414 <sup>T</sup>	Massachusetts (United States), 1933	Dead squid
<i>V. fluvialis</i>	LMG 7894 <sup>T</sup>	Bangladesh	Human feces
<i>V. fonsi</i>	LMG 21557 <sup>T</sup>	Ecuador, 1996	<i>Litopenaeus vannamei</i> larvae
<i>V. furnissii</i>	LMG 7910 <sup>T</sup>	Japan	Human feces
<i>V. gallii</i>	LMG 21330 <sup>T</sup>	Brest (France), 2001	French abalone <i>Haliotis tuberculata</i>
<i>V. parogenes</i>	LMG 19540 <sup>T</sup>	Massachusetts (United States)	Mud from saltmarsh
<i>V. halotocoli</i>	LMG 18542 <sup>T</sup>	Komaishi (Japan), 1991	Gut of abalone ( <i>Haliotis discus hawaii</i> )
<i>V. harveyi</i>	LMG 4044 <sup>T</sup>	Massachusetts (United States), 1935	Dead amphipod ( <i>Talorchestia</i> sp.)
<i>V. hepsetus</i>	LMG 20362 <sup>T</sup>	CENAIM (Ecuador), 2000	Digestive gland of white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )
<i>V. hispanicus</i>	LMG 13240 <sup>T</sup>	Barcelona (Spain), 1990	Culture water
<i>V. ichthyocyteri</i>	LMG 19664 <sup>T</sup>	Hiroshima (Japan)	Gut of diseased Japanese flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )
<i>V. kasalotai</i>	LMG 20539 <sup>T</sup>	IFREMER (France), 1998	Diseased oyster larvae ( <i>Ostrea edulis</i> )
<i>V. lenus</i>	LMG 21034 <sup>T</sup>	Mediterranean coast, Valencia (Spain)	Oysters
<i>V. logei</i>	LMG 19806 <sup>T</sup>	United States	Gut of Arctic scallop
<i>V. mediterranei</i>	LMG 11258 <sup>T</sup>	Valencia (Spain)	Coastal seawater
<i>V. metschnikovii</i>	LMG 11664 <sup>T</sup>	Asia	Diseased fowl
<i>V. mimicus</i>	LMG 7896 <sup>T</sup>	North Carolina (United States)	Infected human ear
<i>V. mytili</i>	LMG 19157 <sup>T</sup>	Valencia (Spain)	Bivalve ( <i>Mytilus edulis</i> )
<i>V. natrigens</i>	LMG 10935 <sup>T</sup>	Sapelo Island (United States)	Salt marsh mud
<i>V. neovaresis</i>	LMG 15976 <sup>T</sup>	Villa Franca Navarra (Spain), 1982	Sewage
<i>V. neonans</i>	LMG 19972 <sup>T</sup>	Kanagawa (Japan), 1999	Gut of abalone ( <i>Haliotis discus discus</i> )
<i>V. neposinus</i>	LMG 20536 <sup>T</sup>	LCMM Florianópolis (Brazil), 1998	Bivalve larvae ( <i>Nodipecten nodosus</i> )
<i>V. nereis</i>	LMG 3895 <sup>T</sup>	Hawaii (United States)	Seawater
<i>V. nigripulchritudo</i>	LMG 3896 <sup>T</sup>	Hawaii (United States)	Seawater
<i>V. ordalii</i>	LMG 12544 <sup>T</sup>	Washington (United States), 1973	Diseased coho salmon ( <i>Oncorhynchus rhodurus</i> )
<i>V. orientalis</i>	LMG 7897 <sup>T</sup>	Yellow Sea (China)	Seawater
<i>V. pacifici</i>	LMG 19999 <sup>T</sup>	Dabao (China), 1996	Healthy shrimp larvae ( <i>Penaeus chinensis</i> )
<i>V. parahemolyticus</i>	LMG 2850 <sup>T</sup>	Japan	Diseased human
<i>V. pectenicida</i>	LMG 19642 <sup>T</sup>	Brittany (France), 1991	Diseased bivalve larvae ( <i>Pecten maximus</i> )
<i>V. pelagicus</i>	LMG 3897 <sup>T</sup>	Hawaii (United States)	Seawater
<i>V. penaeicida</i>	LMG 19663 <sup>T</sup>	Kagoshima (Japan)	Diseased kuruma prawn ( <i>Penaeus japonicus</i> )
<i>V. pomaroyi</i>	LMG 20537 <sup>T</sup>	LCMM Florianópolis (Brazil), 1998	Healthy bivalve larvae ( <i>Nodipecten nodosus</i> )
<i>V. proteolyticus</i>	LMG 3772 <sup>T</sup>	United States	Intestine of isopod ( <i>Lamnoria spicincta</i> )
<i>V. rotiferianus</i>	LMG 21460 <sup>T</sup>	ARC Gent (Belgium), 1999	Rotifer in recirculation system ( <i>Brachionus plicatilis</i> )
<i>V. ruber</i>	LMG 21676 <sup>T</sup>	Keelung (Taiwan)	Seawater
<i>V. ranolentis</i>	LMG 20038 <sup>T</sup>	Japan	Drain pool of a fish-processing plant
<i>V. salmonicida</i>	LMG 14010 <sup>T</sup>	Norway	Diseased Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )
<i>V. scophthalmi</i>	LMG 19158 <sup>T</sup>	Spain	Turbot juvenile ( <i>Scophthalmus maximus</i> )
<i>V. splendidus</i>	LMG 19031 <sup>T</sup>	North Sea	Marine fish
<i>V. superstes</i>	LMG 21323 <sup>T</sup>	Australian Coast	Gut of abalone ( <i>Haliotis levigata</i> and <i>H. rubra</i> )
<i>V. tapeti</i>	LMG 19706 <sup>T</sup>	Landeda (France)	Clam ( <i>Tapes philippinarum</i> )
<i>V. tasmanensis</i>	LMG 20012 <sup>T</sup>	MPL (Tasmania)	Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )
<i>V. tubiculi</i>	LMG 10936 <sup>T</sup>	Milford, Conn. (United States)	Hard clam ( <i>Mercesaria mercenaria</i> )
<i>V. vulnificus</i>	LMG 12545 <sup>T</sup>	U.S.A.	Human wound infection
<i>V. wadswarti</i>	LMG 21011 <sup>T</sup>	Norway, 1988	Salmon with winter ulcer ( <i>Salmo salar</i> )
<i>V. xuii</i>	LMG 21346 <sup>T</sup>	Dabao (China), 1995	Shrimp culture water

<sup>a</sup> AARS, Austevoll, Aquaculture Research Station of Austevoll, Austevoll, Norway; LCMM Florianópolis, Laboratory for Culture of Marine and Molluscs, Florianópolis, Brazil; CENAIM, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador; IFREMER, French Institute for Exploration of the Sea, Brittany, France; MPL, Mount Pleasant Laboratories, Tasmania, Australia.

### 4.2.3. Patogenicidad

#### 4.2.3.1. Infecciones gastrointestinales y extraintestinales en humanos

En la actualidad se conocen más de 250 enfermedades que son transmitidas a través del consumo de alimentos y que pueden estar causadas por virus, bacterias, parásitos, toxinas y metales (Mead *et al.*, 1999). Los síntomas pueden variar desde gastroenteritis ligeras a procesos letales, pasando por daños neurológicos, hepáticos y renales. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés) estiman que cada año aproximadamente 1 de cada 6 estadounidenses (es decir, 48 millones de personas) se enferman, 128.000 son hospitalizados y 3.000 mueren de enfermedades transmitidas por los alimentos y que de los 31 patógenos que se conocen, transmitidos por los mismos, *Salmonella spp.* (no tifoidea), *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* y norovirus causan la mayoría de las muertes (CDC, 2011; Scallan *et al.*, 2011a). Además, existen enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por agentes desconocidos (Tauxe, 2002; Scallan *et al.*, 2011b), y brotes de infecciones que aumentan por el incremento del consumo de determinados alimentos (consumo de bivalvos) (Potasman *et al.*, 2002).

No todas las especies pertenecientes al género *Vibrio* se encuentran asociadas con infecciones del tracto gastrointestinal, o en menor medida con patologías extraintestinales. De hecho, en la actualidad, sólo diez son consideradas patógenas para los humanos: *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (serogrupos O1 y non-O1), *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* (Tabla 4) (Hickman-Brenner *et al.*, 1984; Hansen *et al.*, 1993; Howard y Bennett, 1993; Su y Liu, 2007; Turiño-Luque *et al.*, 2007; Wilkins *et al.*, 2008; Reilly *et al.*, 2011; LPSN, 2012).

De ellas, *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* y en menor medida *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, son consideradas las más importantes como agentes etiológicos de procesos patológicos en humanos, como gastroenteritis, infecciones de heridas y septicemia (Daniels *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2010; Baker-Austin *et al.*, 2010). En este contexto, *V. cholerae* (Pollitzer *et al.*, 1959), *V. parahaemolyticus* (Fujino *et al.*, 1974), *V. fluvialis* (Huq *et al.*, 1980) y *V. mimicus* (Davis *et al.*, 1981) están mayoritariamente implicadas en infecciones gastrointestinales (casos de diarrea), mientras que *V. vulnificus* (Blake *et al.*, 1980), *V. alginolyticus* (Blake *et al.*, 1979) y *V. metschnikovii* (Lee *et al.*, 1978) están relacionados con infecciones de heridas y septicemia, siendo *V. vulnificus* la especie halofílica con un potencial virulento mayor (Roig *et al.*, 2010). Además, también se han publicado casos de infecciones de tejidos blandos,

abscesos, peritonitis, otitis y conjuntivitis causadas por vibrios no coléricos (Penland *et al.*, 2000).

Tabla 4. Patologías causadas en humanos por infecciones con vibrios (adaptado de West, 1989; Oliver y Kaper, 1997; Daniels y Shafaine, 2000)

Especie	Patología		
	Gastroenteritis	Infección de heridas	Septicemia primaria
<i>V. alginolyticus</i>	+	++	(+)
<i>V. cholerae</i> non-O1	++	(+)	+
<i>V. cholerae</i> O1/O139	++	+	ND
<i>V. cincinnatiensis</i>	(+)	(+)	(+)
<i>V. fluvialis</i>	++	+	+
<i>V. furnissii</i>	++	(+)	(+)
<i>V. harveyi</i>	ND	(+)	(+)
<i>V. metschnikovii</i>	+	(+)	(+)
<i>V. mimicus</i>	++	(+)	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	(+)	+
<i>V. vulnificus</i>	+	++	++

++: Infección descrita en alto número de casos. +: Infección descrita en un número bajo de casos.

(+): Infección poco habitual. ND: Infección no descrita.

Otras especies del género *Vibrio* que antes estaban dentro de este grupo de especies patógenas para humanos han sido reclasificadas dentro de otros géneros. Por ejemplo, *V. hollisae* ha sido reclasificada dentro del género *Grimontia* (*Grimontia hollisae*) (Thompson *et al.*, 2003; LPSN, 2012), y *V. damsela* como *Photobacterium damsela* *correg.* (Love *et al.*, 1981) Smith *et al.* 1991 *comb. nov.* que hasta el año 2000 no fue formalmente propuesto (fecha de publicación de la norma modificada 61, *Int. J. Syst Evol Microbiol.* 2000, 50, página 2239, columna 2) dando lugar a confusiones (Holmes y Farmer 3rd, 2009). Y *V. carchariae* (Grimes *et al.*, 1985) será el sinónimo posterior de *V. harveyi* (Johnson y Shunk IV, 1936) Baumann *et al.*, 1981, *comb. nov.* (Pedersen *et al.*, 1998).

La gastroenteritis, asociada al consumo de mariscos y pescados crudos o poco cocinados, se describe como un proceso cuyos principales signos clínicos son diarrea, vómitos y calambres abdominales. Normalmente no se requiere tratamiento antibiótico ni hospitalización y, en algunos casos, el período de incubación y las manifestaciones clínicas son similares e indistinguibles de las ocasionadas por otros enteropatógenos. Por otra parte, las infecciones de heridas (cortes, rasguños, etc.) ya preexistentes o las producidas por actividades acuáticas o manejo de animales y/o comida de origen acuático, en ocasiones requieren asistencia sanitaria. Además, en el caso de que las bacterias lleguen a invadir el torrente sanguíneo pueden desencadenar

septicemia primaria, una enfermedad sistémica grave e incluso mortal, cuyos signos clínicos son: fiebre, hipotensión, postración, escalofríos y ocasionalmente dolor, náuseas, vómitos y diarrea. *Vibrio vulnificus* es reconocida como la especie aislada con mayor frecuencia a partir de pacientes con septicemia debida a vibrionáceas (Tantillo et al., 2004).

#### 4.2.3.2. **Vibriosis**

La vibriosis es la forma genérica para denominar las enfermedades causadas por algunas especies del género *Vibrio* en animales acuáticos, tanto silvestres como en cautividad. La vibriosis está presente en todo el mundo y el cultivo intensivo de estos animales en sistemas de acuicultura favorece la aparición de esta enfermedad.

La vibriosis en bivalvos puede afectar a los individuos en casi todos los estados de su desarrollo: larvas, juveniles, y reproductores. Algunas de las especies identificadas como causantes de enfermedad son: *V. aestuarianus* (Garnier et al., 2007), *V. anguillarum* (larvas de ostión), *V. campbellii*, *V. celticus* (patógeno potencial de almejas) (Beaz-Hidalgo et al., 2010), *V. crassostreae* (Faury et al., 2004), *V. gigantis* (Le Roux et al., 2005), *V. harveyi*, *V. kanaloae*, *V. lentus*, *V. metschnikovii*, *V. neptunis* (Prado et al., 2005), *V. ordali*, *V. pectenecida*; *V. splendidus* (Duperthuy et al., 2010), *V. alginolyticus* (larvas y juveniles de *R. decussatus* y *Argopecten purpuratus*) (Riquelme et al., 1996; Gómez-León et al., 2005), *V. parahaemolyticus* (postlarvas de abalón *H. diversicolor supertexta*) (Cai et al., 2007); *V. tapetis* (responsable de la enfermedad del anillo marrón BRD en *R. philippinarum*) (Paillard et al., 2004; Drummond et al., 2007) y *V. tubiashii* (Hada et al., 1984; Elston et al., 2008).

La vibriosis en crustáceos puede ocurrir por un aumento del nivel de bacterias en hemolinfa, bacterias que a bajos niveles son toleradas (Sizemore y Davis, 1985), o por la penetración de bacterias a través de poros o heridas en el exoesqueleto (Alday-Sanz et al., 2002). Las especies de vibrios que están implicadas en esta enfermedad incluyen a *V. harveyi* (Soto-Rodriguez et al., 2012), *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus* (Martin et al., 2004), *V. alginolyticus* (Chen et al., 2000), *V. vulnificus* (Alday-Sanz et al., 2002), *V. campbellii*, *V. ordalii*, *V. mediterrani*, *V. penaeicida* (Goarant et al., 2000), *V. neptunius*, *V. nigripulchritudo* (Goarant et al., 2006a, 2006b).

En relación con los cefalópodos, sólo se tienen evidencias de vibriosis en pulpos y principalmente en animales cultivados aunque también se han encontrado en pulpos salvajes. Las especies relacionadas con esta enfermedad son: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholerae* O1, *V. cholerae* non-O1, *V. fluvialis*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Farto et al., 2003).

En peces, la vibriosis es una de las enfermedades más problemáticas y prevalentes en especies cultivadas y silvestres, que puede causar grandes mortalidades y que implica graves pérdidas para la acuicultura. Es una enfermedad de distribución mundial que está asociada a cuadros de estrés y afecta principalmente a especies marinas y de aguas salobres, pero también a especies de agua dulce (Austin y Austin, 2007). La vibriosis puede denominarse con diferentes nombres según la especie causante y la especie hospedadora. Así, *V. anguillarum* es el agente causal de la Vibriosis Clásica, que cursa con septicémica hemorrágica en variedades de peces tanto de aguas cálidas como frías (Toranzo *et al.*, 2005), *V. salmonicida* (Egidius *et al.*, 1986) es el agente etiológico de la vibriosis de agua fría o Enfermedad de Hitra, enfermedad que afecta al salmón atlántico (*Salmo salar*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y, ocasionalmente, al bacalao (*Gadus morhua*) y, *V. vulnificus* biotipo 2 (serovar E) es el causante de la Vibriosis de aguas Cálidas que afecta a la anguila (*Anguilla anguilla*) (Biosca *et al.*, 1991; Amaro *et al.*, 1992; Amaro y Biosca, 1996; Marco-Noales *et al.*, 2001; Fouz *et al.*, 2010).

La vibriosis en cnidarios puede aparecer por diversos motivos atacando a las colonias de coral en momentos de estrés y dando lugar a diversas patologías. Las especies de vibrios asociadas a enfermedades en cnidarios incluyen *V. aestuarianus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. coralliilyticus*, *V. harveyi*, *V. mediterrani*, *V. proteolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. splendidus*, y *V. shilonii* (Cervino *et al.*, 2008; Vidal-Dupiol *et al.*, 2011).

### 4.3. *Vibrio parahaemolyticus*

---

*Vibrio parahaemolyticus* es un patógeno humano descubierto por primera vez en 1950 por investigadores de la Universidad de Osaka (Japón), al ser identificado como el agente causal de una intoxicación alimentaria asociada al consumo de sardinas crudas en Japón, donde hubo 272 personas afectadas, con 20 fallecidos (Fujino *et al.*, 1953; Sakazaki *et al.*, 1963).

Esta especie bacteriana es ubicua del medio marino y principalmente de estuarios de zonas templadas y tropicales (Joseph *et al.*, 1982). Tiene las características del género *Vibrio* al que pertenece y las propias como especie. *Vibrio parahaemolyticus* es un bacilo recto o curvado, Gram-negativo, que mide entre 1,4-2,6  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su requerimiento en  $\text{Na}^+$  se encuentra entre el 1 y el 8% de  $\text{NaCl}$ , con un óptimo entre 2-4%. Esta especie crece óptimamente a temperaturas entre 10-44°C, con un óptimo de crecimiento entre 35-37°C y un pH que varía de 4,8 a 11,0 con un óptimo de 7,6 a 8,6 (Beuchat, 1973). *Vibrio parahaemolyticus* tiene un tiempo de generación estimado en 8 a 9 min a temperatura óptima (37°C), por lo que puede alcanzar concentraciones muy elevadas en poco tiempo (Oliver y Kaper,

1997; Daniels y Shafaie, 2000; Morris, 2003). Tiene un único flagelo polar envainado y expresa flagelos periféricos desnudos, antigénicamente diferentes del flagelo polar (Belas y Colwell, 1982; Baumann y Schubert, 1984; Belas *et al.*, 1986) lo que hace pensar que esta especie puede moverse en medio líquido mediante el flagelo polar y en sólido mediante *swarming*.

*Vibrio parahaemolyticus* tiene un contenido de G + C que varía del 44% al 49%. Y su genoma consta de dos cromosomas circulares de 3.288.558 pb y 1.877.212 bp, y contiene 4.832 genes (Makino *et al.*, 2003). Filogenéticamente se encuentra próximo a *V. cholerae*, pero la comparación de sus genomas muestra diferencias entre ellos. El genoma de *V. parahaemolyticus* tiene muchos reordenamientos dentro y entre los dos cromosomas. Y aunque el cromosoma 1 no difiere mucho de tamaño entre los dos vibrios (33 frente a 30 Mb), el cromosoma 2 es mucho mayor en *V. parahaemolyticus*.

#### 4.3.1. Variabilidad serológica

*Vibrio parahaemolyticus* presenta varios serotipos, que se diferencian según sus antígenos somático (O), capsular (K) y flagelar (H). El sistema más extendido de serotipado se realiza en base a la variabilidad en los antígenos O y K. Así, se han descrito 13 variantes de antígenos O y 71 de antígenos K, de forma que la determinación de serotipos por combinación O:K ha resultado de gran utilidad para el estudio epidemiológico de la enfermedad causada por este patógeno.

En *V. parahaemolyticus*, a diferencia de lo que sucede con *V. cholerae*, no hay asociación entre serotipo y enfermedad, por lo que cualquiera de ellos puede causar gastroenteritis en humanos (Nair y Hormazábal, 2005). Sin embargo, la cepa *V. parahaemolyticus* O3:K6 aislada por primera vez en Calcuta (India), es una de las más virulentas llegándose a diseminar rápidamente a otros lugares y aumentando la incidencia de esta enfermedad (Daniels *et al.*, 2000; Yeung *et al.*, 2002).

Se ha observado que existen fagos específicos relacionados con determinados serotipos (Nasu *et al.*, 2000; Iida *et al.*, 2001). Por ejemplo, en *V. cholerae* los genes de la toxina del cólera, *ctxA* y *ctxB* están localizados en un fago lisogénico, CTX, que se transmite entre cepas por transducción, lo que determina que las cepas virulentas sean las lisogenizadas por el fago y las no virulentas las no lisogénicas (Waldor y Mekalanos, 1996; Iida *et al.*, 2001). Mientras que Myers y colaboradores (2003) determinaron que el fago filamentoso f237 era específico y estaba exclusivamente relacionado con las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas desde 1996, todas ellas O3:K6. Este fago tiene 10 fragmentos de lectura abiertos (ORFs), incluyendo un fragmento de lectura abierto único, ORF8, el cual no muestra ninguna homología con secuencias conocidas de DNA. La amplificación por PCR del segmento ORF8, en otras cepas virulentas con serotipos O4:K68 y O1:KUT demostró la estrecha relación de éstos dos serotipos con el serotipo O3:K6, del



cual probablemente derivaron (Chiou *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2000; DePaola *et al.*, 2000).

La cepa original O3:K6 recibe el nombre de “cepa pandémica”, y junto con sus clones emergentes O4:K68, O1:K25, O1:K26 y O1:KUT forma el denominado “grupo pandémico” (Okura *et al.*, 2003). Aunque, hay que tener en cuenta que recientes estudios sugieren la inclusión de nuevos clones de la cepa pandémica (Meador *et al.*, 2007).

#### 4.3.2 Ecología

*Vibrio parahaemolyticus* habita las aguas costeras y los estuarios de las regiones tropicales y templadas del planeta (Fujino *et al.*, 1974; Ayres y Barrow, 1978; Kaneko y Colwell, 1978). Es una bacteria que puede vivir libremente o asociada con el fitoplancton, zooplancton, peces, crustáceos o moluscos, que constituyen el reservorio de esta especie en el ecosistema acuático (Baross y Liston, 1968; Thompson y Vanderzant, 1976a; Karunasagar *et al.*, 1987; Colwell y Huq, 1994; Heidelberg *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2009).

**Relación con el zooplancton.** Diversos estudios han demostrado que *Vibrio* spp. constituye una porción significativa de la microbiota natural del zooplancton, especialmente del zooplancton con exoesqueleto de quitina, como los copépodos. Por tanto, la relación que existe entre ellos podría explicar la persistencia durante todo el año de los vibrios (Kaneko y Colwell, 1975a; Sakar *et al.*, 1983; Watkins y Cabelli, 1985). En consecuencia, la densidad de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar podría estar controlada por los mismos parámetros que causan variaciones en las poblaciones de zooplancton (temperatura, luminosidad, corrientes marinas, concentración de nutrientes y concentración del fitoplancton, entre otros).

**Temperatura y salinidad.** La distribución y abundancia de *V. parahaemolyticus* en el medio marino se ve favorecida por las altas temperaturas y concentraciones medias salinas (Joseph *et al.*, 1982; Kelly y Stroh, 1988), y también podrían verse modificadas en función de otros parámetros ambientales tales como el pH y la turbidez. En general, las temperaturas superiores a 19°C, cuándo la salinidad está entre 5 y 30‰, favorecen el crecimiento de *V. parahaemolyticus* en el medio acuícola. Además, se ha observado que incluso fuera de este rango de salinidades, las temperaturas elevadas permiten la proliferación de especies patógenas de vibrios (Tantillo *et al.*, 2004).

Se han publicado diversos estudios en relación a la ecología de *V. parahaemolyticus*, encontrando variaciones de sus concentraciones tanto regionales como espaciales. Así, Kaneko y Colwell estudiaron durante varios años el ciclo anual de *V. parahaemolyticus* en Rhode River, subestuario de Chesapeake en EE.UU., y observaron que *V. parahaemolyticus* tenía un ciclo estacional

(Kaneko y Colwell, 1973, 1975b, 1978). Esta bacteria sobrevivía durante el invierno en el sedimento, para asociarse posteriormente con poblaciones de copépodos cuando la temperatura del agua alcanzaba los 14-15°C (abril) y era liberada a la columna de agua cuando la temperatura se incrementaba a 19-20°C. Además, la absorción de esta bacteria por parte de los copépodos fue más eficiente a bajas salinidades. Estudios llevados a cabo en la costa noroeste del Pacífico de EE.UU. relacionaron la temperatura con la presencia de *V. parahaemolyticus*, aislando esta bacteria en muestras de aguas con temperaturas superiores a 15°C-17°C y salinidades por debajo de 13 ppt (Kelly y Stroh, 1988; Kaysner et al., 1990). DePaola y colaboradores en 1990, estudiaron las distribuciones estacionales y geográficas de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua y de ostras, así como su correlación con la temperatura y salinidad del agua, y con otros parámetros microbiológicos, en la costa del Pacífico, en el Golfo de México y en la costa atlántica de Estados Unidos. En este trabajo encontraron que los niveles de *V. parahaemolyticus* tanto en muestras de agua como en ostras mostraron una fuerte correlación con la temperatura del agua, pero no con la salinidad. Además, encontraron niveles más elevados de esta bacteria en ostras que en agua. Cook y colaboradores (2002) detectaron *V. parahaemolyticus* en el 94,2% del marisco cosechado de aguas cuya temperatura se encontraba por encima de 25°C, y sólo en el 14,9% de las muestras de mariscos cosechadas de aguas con temperaturas inferiores a 10°C. Gooch y colaboradores (2002) encontraron la misma tendencia observando una densidad media de *V. parahaemolyticus* de 130 ufc/g con la temperatura del agua superior a 20°C (de Abril a Diciembre), mientras que esa densidad disminuía aproximadamente un logaritmo a temperaturas menores.

**Ecología de las variantes patogénicas de *V. parahaemolyticus*.** En relación con las variantes patogénicas de *V. parahaemolyticus* que se describirán con mayor detalle en apartados posteriores, Kaufman y colaboradores (2003) examinaron la variabilidad en los niveles de *V. parahaemolyticus* total y patógeno en ostras, individualmente procesadas. Encontraron niveles similares de *V. parahaemolyticus* total en el 90% de las ostras estudiadas, inmediatamente después de ser cosechadas, durante los meses de Junio, Julio y Septiembre, en un rango desde 200 a 2.000 ufc/g. Pero, *V. parahaemolyticus* patógeno solo fue detectado a niveles superiores a 100 ufc/g después de almacenar las ostras a 26°C durante 24 h y en algunas ostras cosechadas en Junio y Julio (nunca en Septiembre). DePaola y colaboradores (2003) publicaron tendencias estacionales similares en *V. parahaemolyticus* totales para dos puntos de muestreo en Alabama: Cedar Point Reef (con salinidades bajas), y Dauphin Island (salinidades altas). Además, encontraron que las cepas de *V. parahaemolyticus* patógeno (*tdh+*) constituían un alto porcentaje de la población de *V. parahaemolyticus* cuando la temperatura del agua y los *V. parahaemolyticus* totales descendían. Los niveles registrados de

*V. parahaemolyticus* patógeno variaron entre 10 y 20 ufc/g en el 40% de las ostras cosechadas durante Junio y Julio y, una vez más, no fueron detectadas en las ostras cosechadas en Septiembre. Zimmerman y colaboradores (2007) demostraron mayores variaciones, tanto temporales como espaciales, en las densidades de las variantes patogénicas de *V. parahaemolyticus*, lo que implicaría que el uso de las densidades totales de *V. parahaemolyticus* para predicciones de riesgo no sería adecuado.

El general el papel que juega la temperatura parece estar claro (DePaola et al., 2003; Parveen et al., 2008), sin embargo existe una cierta controversia al estudiar el papel de la salinidad, que para algunos está correlacionado con la densidad de vibrios en la columna de agua (Kaper et al., 1981; Joseph et al., 1982; Kelly y Stroh, 1988; Deepanjali et al., 2005), mientras que para otros no existe una relación significativa entre ellos (Sobrinho Pde et al., 2010).

En cualquier caso, existen una serie de factores como la temporada del año, la localización en la columna de agua, el tipo de muestra, la contaminación fecal y los métodos analíticos de aislamiento, entre otros, que están relacionados con las variaciones en la densidad de *V. parahaemolyticus* (DePaola et al., 1990; Zimmerman et al., 2007; Baker-Austin et al., 2010; Martinez-Urtaza et al., 2010).

#### **4.3.3. Estrategia de supervivencia y estado viable no cultivable (VBNC)**

El “estado viable pero no cultivable” (VBNC, por sus siglas en inglés), hace referencia a la forma de resistencia a las condiciones ambientales adversas que, se postula, han desarrollado algunas especies bacterianas aisladas en todo tipo de ambientes. Estas bacterias sufren alteraciones de distinta índole que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables (condiciones de estrés), como la falta de nutrientes, pH inadecuado o bajas temperaturas (Xu et al., 1982; Marden et al., 1985; Linder y Oliver, 1989; Gauthier, 2000; Oliver, 2010).

El estado VBNC ha sido descrito en diversas especies del género *Vibrio* incluyendo *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. cholerae*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. shiloi*, *V. tasmaniensis* y *V. vulnificus* (Oliver, 1995; Oliver y Bockian, 1995; Oliver et al., 1995; Jiang y Chai, 1996; Wong y Wang, 2004; Vattakaven et al., 2006).

Las alteraciones que sufren las bacterias en estado VBNC afectan a su morfología (reducción del tamaño), fisiología, bioquímica, composición en lípidos y ácidos grasos de la membrana citoplasmática, entre otras (Nyström y Kjellberg, 1989; Linder y Oliver, 1989; Johnston y Brown, 2002; Day y Oliver, 2004). Las bacterias en estado VBNC no pueden recuperarse del ambiente usando medios convencionales por lo que se han desarrollado métodos alternativos para su detección y estudio (Kogure et al., 1979; Nwoguh et al., 1995; Joux y Lebaron, 1997; Yokomaku et al., 2000), detectando la actividad respiratoria mediante el uso de aceptores de

electrones (Zimmermann *et al.*, 1978; Dufour y Colon, 1992) y mantenimiento de la integridad celular mediante la exclusión de fluorocromos (Boulos *et al.*, 1999). Todos estos métodos demuestran que las células no cultivables son viables y metabólicamente activas (Manafi *et al.*, 1991; Colwell y Huq, 1994).

En consecuencia, estas células podrían reanudar el crecimiento activo (resucitar) cuando las condiciones que han provocado el estado VBNC revierten (Nilsson *et al.*, 1991; Wolf y Oliver, 1992; Oliver *et al.*, 1995; Whitesides y Oliver, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios y hay autores que afirman que esta aparente “resucitación” tras la adición de nutrientes se debe al crecimiento de un pequeño número de células cultivables (presentes en todo momento) y no a la activación real de las células latentes (Ravel *et al.*, 1995; Bogosian *et al.*, 1998; Barer y Harwood, 1999; Oliver, 2005).

En el caso de los vibrios patógenos, se ha evaluado el impacto que la entrada en el estado VBNC en condiciones adversas podría tener en Salud Pública. Baffone y colaboradores (2003) encontraron que las células VBNC de las cepas de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* de origen ambiental y *V. parahaemolyticus* ATCC 43996, inoculadas por vía intragástrica a ratones albinos (cepa BALB/c), conservaban su capacidad para expresar las proteínas asociadas con la patogenicidad, aunque tal expresión podía ser transitoria y/o impredecible.

#### 4.3.4. Factores de virulencia

Antiguamente, las especies de *V. parahaemolyticus* se clasificaban según el serotipo pero, en la actualidad, se clasifican en base a su potencial de patogenicidad por la presencia de diversos factores de virulencia, incluyendo los productos de los genes *tdh* y *trh*, y los sistemas de secreción de tipo III (Nishibuchi *et al.*, 1992; Nishibuchi y Kaper, 1995; Okuda *et al.*, 1997a; Shimohata y Takahashi, 2010; Akeda *et al.*, 2011; Shinoda, 2011). A continuación se describen algunos de los factores de virulencia más estudiados, aunque el número total de mecanismos de patogénesis de *V. parahaemolyticus* sigue sin conocerse.

La **hemolisina directa termoestable (TDH)** es la responsable de producir la beta-hemólisis de los eritrocitos humanos en agar Wagatsuma (7% de NaCl, manitol y sangre humana o de conejo fresca) incubado a 35-37°C durante 24 h. A esta hemólisis se la conoce con el nombre de *fenómeno de Kanagawa (KP)* (Sakazaki *et al.*, 1968; Miyamoto *et al.*, 1969; Takeda, 1982; Nishibuchi *et al.*, 1985). Se ha demostrado que la TDH tiene actividad hemolítica, enterotóxica, cardiotóxica y citotóxica (Shirai *et al.*, 1990; Nishibuchi *et al.*, 1992; Honda e Iida, 1993). Existe una clara asociación entre resultado KP+ y potencial de la cepa para causar gastroenteritis (Shirai *et al.*, 1990). Así, más del 90% de aislados clínicos de individuos con gastroenteritis son KP+ y menos del 1% de los aislados ambientales

son KP+ (Thompson y Vanderzant, 1976c; Joseph *et al.*, 1982). Es más, en un estudio realizado con voluntarios humanos, las cepas KP+ produjeron diarreas, mientras que las KP- no lo hicieron, incluso con dosis de  $10^9$  bacterias/individuo. En la actualidad se sabe que la toxina TDH está codificada por el gen *tdh*, del cual existen variantes de secuencia conocida, con un origen común y un 97,2% de similitud (Nishibuchi y Kaper, 1990; Yoh *et al.*, 1991).

Se ha descrito otra toxina denominada **hemolisina relacionada con la hemolisina directa termoestable (TRH)** que también está asociada con la patogenicidad (Shirai *et al.*, 1990). TRH está codificada por el gen *trh*, del cual también hay descritas dos variantes, *trh1* y *trh2*, genéticamente relacionadas entre sí (84% identidad) y con el gen *tdh*, con el que presentan un 68,6% de similitud (Kishishita *et al.*, 1992). Además, aunque *V. parahaemolyticus* en general no produce ureasa, los aislados clínicos que la producen también poseen el gen *trh* (Abbott *et al.*, 1989; Suthienkul *et al.*, 1995; Osawa *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1997a), lo que implica un vínculo genético entre el gen de la ureasa (*ure*) y el gen *trh* en el cromosoma (Iida *et al.*, 1997).

Todas las cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* asociadas a enfermedades gastrointestinales son TDH+ y/o TRH+ (Honda *et al.*, 1987; Bej *et al.*, 1999). Se postula que la proporción de *V. parahaemolyticus* potencialmente patógeno aislados con respecto al total de la especie en ambientes acuáticos y alimentos de origen marino es muy baja (Wong *et al.*, 2000).

La secuenciación del genoma de la cepa RIMD2210633, que es KP+ y pertenece al serotipo pandémico O3:K6, ha revelado que éste codifica para dos Sistemas de Secreción Tipo III (T3SS) (Makino *et al.*, 2003). El primero se encuentra en el cromosoma 1 (T3SS1) y es similar, tanto en estructura como en organización, al de *Yersinia* sp. Los genes para T3SS1 están presentes en todos los genomas analizados de *V. parahaemolyticus*, independientemente de su origen clínico o ambiental. El segundo conjunto de genes se encuentra en el cromosoma 2 (T3SS2), dentro de una isla de patogenicidad de aproximadamente ~80 kb que, además lleva las dos copias del gen *tdh*. T3SS2 no parece ser similar al de ninguna otra bacteria, excepto *V. cholerae* no-O1/no-O139 T3SS (Dziejman *et al.*, 2005). Ambos sistemas de secreción, T3SS1 y T3SS2 son aparentemente funcionales (Park *et al.*, 2004b), y parece ser que el Sistema T3SS2 sería exclusivo de las cepas KP+ (Makino *et al.*, 2003). En cualquier caso, el papel determinante de TDH y el Sistema T3SS en la patogénesis de *V. parahaemolyticus* (citotoxicidad, enterotoxigenicidad y septicemia) está siendo estudiado. Hiyoshi y colaboradores (2010) demostraron que en Sistema T3SS1 es el principal responsable de la actividad citotóxica en un modelo de infección murina.

Estos sistemas podrían desempeñar un papel relevante en la manifestación clínica de infecciones por *V. parahaemolyticus*, como ocurre con *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enteropatógena, cuyo sistema T3SS está involucrado en la invasión de las células epiteliales intestinales (Makino et al., 2003). En concordancia con esta hipótesis, estos genes no se encuentran en el genoma de otros vibrios no invasivos como *V. cholerae* O1 (Heidelberg et al., 2000), *V. vulnificus* (Chen et al., 2003) y *V. fischeri* (Ruby et al., 2005). Además, los genomas de *V. cholerae* non-O1/non-O139 (Dziejman et al., 2005) y *V. harveyi* (Henke y Bassler, 2004), que son débilmente invasivos, contienen un solo conjunto de genes de T3SS.

Meador y colaboradores (2007) encontraron excepciones a la correlación entre presencia de genes para T3SS2 y KP+ (Makino et al., 2003; Park et al., 2004b) y describieron cepas *tdh*-negativas y *trh*-negativas que eran positivas para los genes que codifican T3SS2+ y, al contrario, cepas KP+, que eran T3SS2-negativas.

La identificación en el estudio de Meador y colaboradores (2007) de dos cepas clínicas humanas T3SS2+, *tdh*- y *trh*- refuerza aún más el argumento de que T3SS2 de *Vibrio* es un factor de virulencia que contribuye a la infección y el desencadenamiento de la enfermedad en humanos (Dziejman et al., 2005, Park et al., 2004a; Park et al., 2004b). Así, aunque el grupo de genes T3SS2 no se limita a los miembros del grupo pandémico, la adquisición de la T3SS2 (y, potencialmente, la isla de patogenicidad de ~80 kb) en lo que respecta a los *V. parahaemolyticus* potencialmente patógenos, es motivo de preocupación y pueden requerir un seguimiento rutinario para relacionar con mayor exactitud la presencia de estos factores de virulencia con el tipo de infección, la gravedad de enfermedad, y la necesidad de hospitalización (Yu et al., 2006).

Finalmente, se han descrito otros factores de virulencia en *V. parahaemolyticus* relacionados con la capacidad de causar la enfermedad, que son: factores de adherencia, colonización y de invasión celular; pili y hemaglutininas (*mannose sensitive hemagglutinin*-MSHA), entre otros (Hackney et al., 1980; Honda et al., 1988; Nakasone e Iwanaga, 1990; Nagayama et al., 1995).

#### 4.3.5. Manifestaciones clínicas

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria capaz de causar gastroenteritis, infecciones de heridas e, incluso, septicemias en humanos (Morris y Black, 1985; Honda e Iida, 1993; Hlady y Klontz, 1996). Las manifestaciones de la enfermedad causada por *V. parahaemolyticus* dependen del vehículo de transmisión de la bacteria. Normalmente, la infección se manifiesta clínicamente como gastroenteritis y, rara vez, como una septicemia primaria. Todo el mundo es susceptible a la gastroenteritis por *V. parahaemolyticus*, mientras que los individuos con enfermedades crónicas subyacentes son más susceptibles a la septicemia, la cual cursa de forma grave y puede llegar a ser mortal.

De hecho, *V. parahaemolyticus* ha sido la causa más frecuentemente notificada asociada a intoxicaciones alimentarias en Asia y EE.UU., donde se estima que 3.600 casos de vibriosis por transmisión alimentaria ocurren anualmente. Los brotes de infecciones alimentarias causados por *V. parahaemolyticus* se han relacionado con el consumo pescado y marisco crudo o escasamente cocinados (Daniels *et al.*, 2000), o que hayan sufrido una contaminación cruzada después de la cocción. También se han notificado brotes en Canadá, África y el sur de Europa, aunque pueden presentarse casos importados en cualquier lugar. La transmisión persona a persona no se ha observado y la tasa de mortalidad por *V. parahaemolyticus* es muy baja.

Experimentos realizados en los años 50 y 70 con voluntarios humanos establecieron que la dosis mínima de infección por *V. parahaemolyticus* estaba entre  $10^5$ - $10^8$  ufc por ml (Takikawa, 1958; Aiso y Fujiwara, 1963; Sanyal y Sen, 1974), aunque la gravedad dependerá tanto de la cepa bacteriana como del hospedador. En este caso, diferentes investigaciones han comprobado que mujeres embarazadas y pacientes con enfermedades hepáticas preexistentes (cirrosis, hepatitis crónica, historial alcohólico, etc.) y enfermedades crónicas (linfomas, tuberculosis pulmonar, artritis reumatoide, úlcera duodenal, y diabetes mellitus, entre otras) tienen mayor riesgo de enfermar y, además, los individuos inmunocomprometidos tienen una mayor probabilidad de verse afectados por una septicemia primaria (Blake *et al.*, 1979).

Como ya se comentó anteriormente no existe asociación entre serotipos y enfermedad, dado que todos ellos pueden causar gastroenteritis (Nair y Hormazábal, 2005). Sin embargo, los brotes infecciosos que se han presentado a nivel mundial en los últimos años se han atribuido a la aparición de tres serotipos con un importante potencial pandémico: O3:K6, O4:K68 y O1:K atípico (KUT). Las cepas O4:K68 y O1:KUT se originaron, muy probablemente, a partir de un clon de la cepa O3:K6 pandémica (Okuda *et al.*, 1997b). Estos serotipos presentan mayor adherencia y citotoxicidad en cultivos de tejidos, lo que contribuiría a incrementar su potencial patogénico. Estos tres serotipos han sido identificados en varias localizaciones, tanto en pacientes como en el medio ambiente, por lo que se considera que su distribución es mundial (Okuda *et al.*, 1997b, Lozano-León *et al.*, 2003).

En los pacientes con gastroenteritis se observa una inflamación de la membrana interna del intestino. La bacteria sólo se aísla de las heces de individuos enfermos (Strom y Paranjpye, 2000). La gastroenteritis puede no ser declarada, ya que la enfermedad no suele ser mortal y los síntomas no son lo suficientemente graves para precisar atención médica.

Esta gastroenteritis es de gravedad media a moderada y es autolimitante. Tiene un periodo de incubación de 4 a 96 h (con una media de 15 h) y una duración media de

3 días (Morris y Black, 1985; Nair y Hormazábal, 2005). Los síntomas más comúnmente experimentados son náuseas, diarrea abundante, vómitos, calambres abdominales, dolor de cabeza y extrema debilidad. La aparición de fiebre y escalofríos es menos frecuente (Blake *et al.*, 1980; Morris y Black, 1985; Bryan, 1986). En las formas graves se presenta tenesmo y las deposiciones son acuosas con moco y sangre. El tratamiento incluye aporte hidroelectrolítico por vía oral (soluciones de rehidratación) o parenteral así como antibiótico (doxiciclina o ciprofloxacina).

En un estudio realizado por Hlady y Klontz (1996) se asociaron diversas especies de *Vibrio* con el síndrome de la enfermedad gastrointestinal, y de todas ellas, *V. parahaemolyticus* fue la bacteria más frecuentemente asociada con la gastroenteritis. De hecho, la gastroenteritis producida por toxoinfección alimentaria por mariscos transmitida por *V. parahaemolyticus* es la causa principal de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en Taiwan y Japón (Pan *et al.*, 1997). Por ejemplo, Chiou y colaboradores (2000) informaron de que 542 de 850 brotes en Taiwan entre 1995 y 1999 fueron causados por *V. parahaemolyticus*, con 40 serotipos diferentes identificados (principalmente, O3:K6). Su y colaboradores (2005a) publicaron que entre 1995 y 2001, hubo 2.057 casos de *V. parahaemolyticus* en el norte de Taiwan, la mayoría (99,4%) de las cepas de *V. parahaemolyticus* pudieron ser identificadas por K serotipos, con un 55,2% que representa el serovar K6. Estos datos nos dan una idea de la importante implicación de esta bacteria en problemas de Salud Pública.

Finalmente, la entrada por vía digestiva no es la única vía de infección, ya que otras presentaciones clínicas, como la infección de heridas u oídos, se producen al entrar en contacto las superficies corporales con el agua de mar o superficies contaminadas por el organismo (Blake *et al.*, 1980).

#### 4.3.6. Epidemiología

*Vibrio parahaemolyticus* tiene distribución mundial presentando múltiples reservorios: sedimentos marinos, plancton, peces, moluscos y crustáceos. La concentración de *V. parahaemolyticus* varía según la temperatura del agua y la salinidad, entre otros factores, de manera que las mayores concentraciones se registran en verano y en aguas de salinidad intermedia. La transmisión se produce fundamentalmente por ingestión de productos marinos contaminados crudos o insuficientemente cocinados, y la susceptibilidad en humanos es universal.

Desde la identificación de *V. parahaemolyticus* en 1953 se han descrito numerosos brotes infecciosos asociados a esta bacteria. Se trata de un patógeno causante de una alta proporción de enfermedades de transmisión alimentaria en países Asiáticos como China (31,1% entre 1991 y 2001), Japón (20-30% entre 1981 y 1993) y Taiwan (63,8% en el período 1996-1999 con las serovariedades O5:K5, O4:K8, O3:K29) (Chiou



et al., 2000; Nair et al., 2007). *Vibrio parahaemolyticus* es reconocido como la mayor causa de gastroenteritis asociada con el consumo de marisco en EE.UU., con más de 40 brotes notificados entre 1973 y 1998 (Barker, 1974; Hlady y Klontz, 1996; CDC, 1998, 1999; Daniels et al., 2000; DePaola et al., 2000). Además, no hay que olvidar el brote asociado con el consumo de ostras crudas en Alaska (McLaughlin et al., 2005).

En **Europa**, se han publicado brotes esporádicos ocasionados por *V. parahaemolyticus* en algunos países como España, Francia (Lemoine et al., 1999; Robert-Pillot et al., 2004; Hervio-Heath et al., 2005) e, incluso, en Dinamarca donde fueron descritos siete casos de infección cutánea en el 2004 (Andersen, 2006). En España este organismo ha sido aislado de pacientes con gastroenteritis en Barcelona (1986, 1987, y 1999) (Molero et al., 1989), Zaragoza (1993), Madrid (1998 y 2000) y en Galicia, donde el sistema sanitario, entre 1997 y 2000, contabilizó 84 casos de infección por *V. parahaemolyticus*, siendo el brote más importante el que se produjo en 1999 con 64 casos y asociado con el consumo de ostras (Lozano-León et al., 2003). Además, en Galicia también se produjo un brote en el 2004, con 80 casos, en un restaurante entre los invitados a una boda (Martinez-Urtaza et al., 2005).

Estos estudios indican que el riesgo de infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* en Europa es bajo comparado con el de América o Asia (Nair et al., 2007). Sin embargo, este riesgo se podría haber subestimado, debido a que *V. parahaemolyticus* no está incluido en los actuales programas europeos de vigilancia, como el European Network for Epidemiological Surveillance and Control of Communicable Diseases (Roque et al., 2009). Además, *V. parahaemolyticus* podría llegar a ser un problema emergente en el ámbito de la Salud Pública europea al aumentar el consumo de alimentos crudos o poco cocinados incluido marisco, sashimi (filete de pescado crudo) y sushi (bola de arroz avinagrado con filete de pescado crudo), entre otros. La FAO (2011) publicó que en Japón el sashimi y el sushi son los responsables del 26% y del 23% de los brotes asociados a *V. parahaemolyticus*.

#### **4.3.7. Incidencia de infección en humanos**

La prevalencia de una enfermedad es la proporción de casos que se dan en una determinada población y la incidencia el número de casos nuevos que aparecen en esa población durante un período de tiempo determinado. Por lo tanto, al ser la gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus* una enfermedad de prevalencia sumamente baja, ya que se presenta como brotes esporádicos, muy localizados y de duración limitada, sólo tiene sentido caracterizar su incidencia.

En la actualidad, no es posible dar cifras reales sobre la incidencia de las enfermedades causadas por especies de *Vibrio* en todo el mundo, ya que incluso cuando existen programas de vigilancia, la recopilación de información es incompleta. En los EE.UU. se estima que se producen 8.000 casos de

enfermedades causadas por vibrios cada año (Mead *et al.*, 1999). Además, concurren circunstancias económicas y sociales que sesgan la declaración de casos de enfermedad de determinadas especies bacterianas, como es el caso de *V. cholerae* (WHO, 2001; Colwell *et al.*, 2003).

Desenclos y colaboradores (1991) utilizaron el diseño de un estudio de cohortes para estimar la incidencia anual de todas las infecciones causadas por *Vibrio*, y estimaron que era de 95,4 por millón para consumidores de ostras crudas con enfermedad hepática, 9,2 por millón para consumidores de ostras crudas sin enfermedad hepática, y 2,2 por millón para los que no consumen ostras crudas.

Otro dato epidemiológico importante es la letalidad que varía, según la presentación clínica de la enfermedad, desde un 1% para la gastroenteritis, un 5% para infección de heridas y un 44% para septicemia. Una elevada proporción de los casos declarados está claramente asociada con el consumo de ostras crudas, el cual fue el origen de la infección por *V. parahaemolyticus* en el 68% de los casos que cursaron como gastroenteritis y en el 83% de los casos que se manifestaron como septicemias primarias (Hlady y Klontz, 1996).

Finalmente, otro factor importante a tener en cuenta es la marcada estacionalidad de los brotes, ya que el 91% de los casos de septicemia primaria y el 86% de las infecciones de heridas aparecieron entre Abril y Octubre (Hlady y Klontz, 1996).

#### 4.3.8. Métodos de cultivo para el aislamiento e identificación

En la actualidad no hay ningún método para la detección y/o el recuento de *V. parahaemolyticus* que sea eficaz al 100%. El método convencional usado en los análisis rutinarios de aislamiento e identificación de los vibrios incluye un enriquecimiento en un medio líquido, seguido de siembra en un medio sólido (Hara-Kudo *et al.*, 2001). Dos de los procedimientos estándar para la detección y aislamiento de *V. parahaemolyticus* en moluscos crudos, recogidos en el Manual para el Análisis Bacteriológico (BAM, por sus siglas en inglés) (Kaysner y DePaola, 2004) son: la técnica del número más probable (NMP) y la siembra directa en medios de cultivo seguida por la hibridación de DNA de las colonias (McCarthy *et al.*, 1999, 2000). Este último, mejorado por Nordstrom y DePaola (2003) mediante un enriquecimiento previo de las muestras.

La siembra directa en medios de cultivo sigue siendo difícil debido a la gran cantidad de microbiota natural que también puede crecer en estos medios. Por ello, se han diseñado distintos medios específicos que nos permiten diferenciar los vibrios presentes de otras bacterias, como es el caso del agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS), o medios selectivos que nos permitan identificar especies de *V. parahaemolyticus* de otras especies del género *Vibrio*, medio

cromogénico CHROMagar vibrio (CHROMagar, Francia), que han resultado ser una herramienta útil y con eficacia validada (Kobayashi *et al.*, 1963; Su *et al.*, 2005b).

A continuación se expondrán con más detalle los medios de cultivo más utilizados en esta Tesis Doctoral.

#### 4.3.8.1. Agar Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS)

El agar TCBS se diseñó para el aislamiento de vibrios patógenos (Kobayashi *et al.*, 1963). Es un medio altamente selectivo, fácil de preparar y de usar y que está disponible comercialmente (McCormack *et al.*, 1974; Nicholls *et al.*, 1976). El agar TCBS se incuba a 37°C, durante 18-24 h. Este medio distingue los vibrios no fermentadores de sacarosa (SNFV) (donde se incluye *V. parahaemolyticus*) de los vibrios fermentadores de sacarosa (SFV) (dónde se incluye *V. cholera*) (Figura 1). Las colonias verdes de 2-5 mm de diámetro se identifican como posibles *V. parahaemolyticus*.

#### 4.3.8.2. Agar CHROMagar Vibrio

El medio de cultivo selectivo CHROMagar Vibrio agar es un medio cromogénico basado en un indicador de cambio de pH debido a la fermentación de la sacarosa. Las colonias malva se identifican como posibles *V. parahaemolyticus*, mientras que las colonias azules corresponden a posibles *V. vulnificus* / *V. cholerae* y las colonias incoloras corresponden a posibles *V. alginolyticus*. Este medio permite diferenciar claramente *V. parahaemolyticus* de *V. vulnificus* (Figura 2) ambas incapaces de fermentar la sacarosa en TCBS (Hara-Kudo *et al.*, 2001; Blanco-Abad *et al.*, 2009).

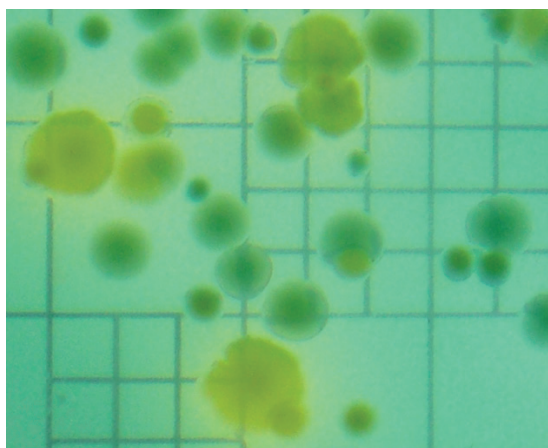


Figura 1. Colonias de vibrios SNFV (verdes) y SFV (amarillas) en TCBS agar

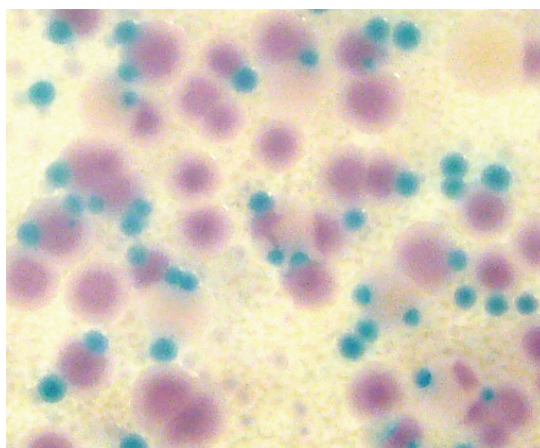


Figura 2. Colonias de *V. parahaemolyticus* (malva) y *V. vulnificus* (azul) CHROMagar Vibrio agar

#### 4.3.9. Caracterización fenotípica e identificación bioquímica

La morfología de la bacteria se observa al microscopio óptico tanto en fresco como tras la tinción de Gram. La observación en fresco permite, además, determinar si la cepa es móvil o inmóvil.

En la actualidad es posible caracterizar bioquímicamente esta especie bacteriana con mucha fiabilidad utilizando la galería multiprueba API 20E que incluye 21 test bioquímicos miniaturizados (el test de la oxidasa se realizará según instrucciones del fabricante y será anotado en la hoja de resultados) y una base de datos (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) (Tabla 5). Además del perfil bioquímico general de *V. parahaemolyticus* por pertenecer al género *Vibrio* y de las pruebas API 20E, *V. parahaemolyticus* se complementa con otras características.

De forma resumida, *V. parahaemolyticus* es anaerobio facultativo, con metabolismo oxidativo y fermentativo, produce catalasa y fermenta la glucosa sin producción de gas. Además tiene resultados positivos para la fermentación de manitol, maltosa, trealosa, D-manosa y D-galactosa, y negativos para la sacarosa, lactosa, inositol, dulcitol, salicina, rafinosa-D-xylosa, celobiosa, alfa-metil-D-glucosido, eritritol, D-arabitol, D-galacturonato. Es ureasa variable y puede utilizar etanol, L-leucina y la putrescina.

Tabla 5. Pruebas de los sistemas de identificación API 20E para la caracterización bioquímica de *V. parahaemolyticus*. Incubación 24 h a 37 ±1°C

Test Bioquímico	% aislados positivos	Test Bioquímico	% aislados positivos
Orto-nitrofenil-bD-galactoprianosidasa	0	Gelatinasa	75
Arginina dihidrolasa (ADH)	0	Fermentación de glucosa	100
Lisina decarboxilasa (LDC)	100	Fermentación de manitol	99
Ornitina decarboxilasa (ODC)	99	Fermentación de inositol	0
Utilización de citrato	50	Fermentación de sobitol	0
Producción de H <sub>2</sub> S	0	Fermentación de ramnosa	1
Ureasa	1	Fermentación de sacarosa	1
Triptofano desaminasa (TDA)	0	Fermentación de melibiosa	0
Producción de indol	100	Amigdalina	12
Voges-Proskauer	1	Fermentación de arabinosa	50

Las condiciones de cultivo de esta bacteria son variables por su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (incluso a 42°C), con diferentes concentraciones de cloruro sódico (1-8%). Algunas de ellas (75-89,9%) son capaces de crecer con concentraciones de NaCl de 0,4 y 0,5%, pero no inferiores.

Según los criterios del BAM (Kaysner y DePaola, 2004), *V. parahaemolyticus* es sensible al agente bacteriostático O/129 cuando la concentración es de 150 µg, mientras que es resistente si la concentración disminuye a 10 µg.

#### **4.3.10. Métodos moleculares para la detección y tipificación**

Las técnicas de detección y tipificación molecular de microorganismos son más resolutivas y útiles en estudios epidemiológicos que las técnicas fenotípicas clásicas. Estas técnicas junto con las tradicionales, basadas en la recopilación de datos (antecedentes históricos de enfermedad en el ámbito geográfico que se desea estudiar, sintomatología clínica, mortalidad, etc.), permiten un estudio más holístico de las enfermedades.

Las técnicas de caracterización molecular permiten analizar la diversidad genética de las diferentes cepas de *V. parahaemolyticus*, lo que permite realizar estudios epidemiológicos moleculares para diferenciar la presencia de cepas de *V. parahaemolyticus* tanto la variante patogénica como la variante no patogénica en una determinada especie de molusco bivalvo o localización geográfica; establecer la existencia de hospedadores-reservorios de *V. parahaemolyticus* en bivalvos, así como en el medio ambiente para determinar el papel que juegan en la enfermedad; y estudiar la relación que existe entre diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* aislados de diferentes orígenes geográficos europeos.

Además, en los últimos años las técnicas moleculares están evolucionando rápidamente y perfeccionándose (PCR multiplex y Quantitative Real-Time PCR, entre otras) para mejorar la fiabilidad diagnóstica, disminuir costes económicos y aumentar capacidad de procesamiento (Blackstone *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005; Raghunath *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009; Rosec *et al.*, 2009; Robert-Pillot *et al.*, 2010). En relación a esto, Nordstrom y colaboradores (2007) desarrollaron un control interno de amplificación (IAC, por sus siglas en inglés) para garantizar la integridad de la PCR y eliminar los falsos negativos).

A continuación se describen brevemente algunas las técnicas moleculares que se han utilizado en la presente Tesis Doctoral.

##### **4.3.10.1. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Esta técnica se emplea en la caracterización e identificación de *V. parahaemolyticus*, utilizando cebadores diseñados para distintos genes diana (Tabla 6). Sin embargo, la PCR clásica muestra algunas limitaciones en su aplicación y, por ello, se han desarrollado técnicas más avanzadas.

##### **4.3.10.2. rep-PCR (Repetitive element-based PCR)**

Las técnicas que generan patrones de fragmentos basados en la amplificación del DNA agrupan diferentes metodologías basadas en la utilización de cebadores, diseñados a partir de secuencias repetidas de regiones de DNA conservadas en bacterias (Tyler *et al.*, 1997). Hay tres grupos principales de elementos repetitivos: los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos,

REP (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence*) (35-40 pb) (Stern et al., 1984), las secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias, ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences*) (124-127 bp) (Hulton et al., 1991) y, el elemento BOX (154 pb) que posee diferentes subunidades conservadas (Staley y Harwood, 2010).

En concreto, la amplificación entre elementos repetitivos de DNA mediante análisis de la PCR o, rep-PCR, permite generar ‘fingerprints’ (patrones de fragmentos) de DNA mediante la amplificación entre las múltiples copias de los elementos repetitivos dispersos en el genoma molde. Esta metodología combina la simplicidad de la técnica del análisis PCR, con el nivel de polimorfismos que puede ser detectado mediante la hibridación del DNA genómico utilizando sondas basadas en secuencias repetitivas (Cabanillas-Beltrán et al., 2006). La naturaleza altamente conservada de estas secuencias ha permitido su utilización para el análisis de numerosos microorganismos. Wong y Lin (2001) demostraron que la técnica de ERIC-PCR para *V. parahaemolyticus* tenía un buen poder discriminatorio, pero una menor reproducibilidad que la técnica de REP-PCR.

Tabla 6. Lista de genes diana utilizados, secuencia de los primers y tamaño del amplicón.

Gen diana	Secuencia de los primers (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño del amplicon (pb)	Referencias
tlh	L-tlh: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	58,63	450	Taniguchi et al., 1985, 1986; Bej et al., 1999;
	R-tlh: GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC	51,11		
tox R	L: GTCTTCTGACGCAATCGTTG	60,00	368	Kim et al., 1999
	R: ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	62,00		
tdh	L-tdh: GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	48,58	269	Nishibuchi y Kaper, 1985; Bej et al., 1999
	R-tdh: TGG AATAGAACCTTCATCTTCACC	53,27		
trh	L-trh: TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	51,37	500	Honda e Iida, 1993; Bej et al., 1999
	R-trh: CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	58,32		
trh	L-trh: GGCTCAAATGGTTAAGCG	56,00	250	Tada et al., 1992
	R-trh: CATTCCGCTCATATGC	56,00		

#### 4.3.10.3. Técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE*)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), descrita por primera vez en 1984 (Schwartz y Cantor, 1984), se basa en la fragmentación del genoma bacteriano, mediante restricción enzimática, y posterior separación de los fragmentos, mediante una electroforesis multidireccional en un campo de dirección de corriente eléctrica cambiante. Esta técnica es más resolutoria que la electroforesis convencional, que es unidireccional y, por lo tanto, limitada en su

capacidad para separar fragmentos de más de 20 kilobases (kb) (Tenover *et al.*, 1995; Kam *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

La técnica de PFGE se ha empleado como una herramienta discriminatoria para evaluar epidemiológicamente la diversidad genética de *V. parahaemolyticus* e identificar la relación existente entre estos aislados ambientales (o aislados de muestras de alimentos) con cepas de referencia que poseen una reconocida patogenicidad en humanos (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2007; Ansaruzzaman *et al.*, 2008; Ellingsen *et al.*, 2008; Martinez-Urtaza *et al.*, 2008; Wagley *et al.*, 2008, 2009; Alam *et al.*, 2009; Ottaviani *et al.*, 2010; Rodriguez-Castro *et al.*, 2010).

#### 4.3.11. Prevención de la infección

La realización de controles de la calidad del agua en el momento de la cosecha de los moluscos bivalvos, así como la educación tanto de los mariscadores, como de los manipuladores de alimentos y los consumidores, son cruciales para prevenir la aparición de la enfermedad causada por vibrios (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* no-O1/no-O139, etc.) que son bacterias autóctonas del medio acuático (Barrow, 1974). *Vibrio parahaemolyticus* tiene un tiempo de generación corto, en torno a 9 min en condiciones optimas, lo que significa que puede alcanzar concentraciones muy altas dentro de los moluscos una vez que éstos han sido cosechados. Esta concentración dependerá de la concentración inicial así como de la temperatura de almacenamiento y transporte (Kato, 1965, citado por Blake *et al.*, 1980; DePaola *et al.*, 2000). Por lo tanto, la enfermedad podría prevenirse evitando el consumo de mariscos crudos o poco cocinados (la temperatura de cocción adecuada es de 70°C durante 15 min), evitando la contaminación cruzada con otros mariscos crudos o utensilios y, en el caso de heridas abiertas, mediante la utilización de vendajes para prevenir la exposición al agua de mar (Thompson y Vanderzant, 1976b; Tamplin *et al.*, 1982).

De forma genérica, los métodos habituales para prevenir infecciones alimentarias asociadas al consumo de moluscos bivalvos están basados en el **establecimiento de niveles de riesgo**. El mejor método para producir moluscos de una manera segura es su cultivo y recolección en aguas limpias, sin contaminación. Sin embargo, la disponibilidad de ese tipo de aguas es muy escasa (Potasman *et al.*, 2002). Al igual que sucede con los agentes patógenos de origen fecal, los controles para los patógenos de origen natural minimizan el riesgo de encontrar estos patógenos en los moluscos, aunque no lo eliminan por completo. Por lo tanto los controles de *Vibrio* spp. serían de aplicación a los moluscos, si éstos se van a consumir crudos (FDA, 2009).

En la actualidad, las **estrategias de conservación de los alimentos** persiguen eliminar o reducir los vibrios a niveles no detectables mediante el desarrollo de tecnologías no térmicas de inactivación de microorganismos que conserven las características primas de los alimentos. Algunas de estas técnicas incluyen: la congelación rápida individual (IQF, *Individual Quick Freezing*), la exposición a radiaciones ionizantes, las altas presiones hidrostáticas, los ultrasonidos, los pulsos eléctricos de alto voltaje y los pulsos de luz, así como, la combinación de varios de ellos. La mayoría de estos procesos requieren una inversión inicial en infraestructuras y en formación del personal muy importante, y el inconveniente de que mueren gran cantidad de moluscos bivalvos durante el procesado (Ruple y Cook, 1992; Hesselman et al., 1999; Schwarz, 2000; Calik et al., 2002; Andrews et al., 2003a).

Los agentes patógenos de origen natural pueden estar presentes en un número relativamente bajo en el momento de la recolección de los moluscos, pero pueden aumentar a niveles peligrosos si los bivalvos son expuestos a temperaturas inadecuadas. Por ello, además de la aplicación de estrategias para el control de los patógenos basadas en el control de las aguas de producción de moluscos bivalvos, también hay que tener en cuenta el tiempo de exposición al aire de los moluscos (tanto en la post-cosecha, como por las mareas) antes de llevarlos a refrigerar. Para minimizar el riesgo de crecimiento de *Vibrio* spp., las autoridades competentes en EE.UU., limitan el tiempo de exposición al aire antes de la refrigeración. La duración del tiempo depende de la temperatura media mensual máxima de aire (AMMAT, por sus siglas en inglés) o la temperatura promedio mensual máxima de agua (AMMWT, por sus siglas en inglés) en el momento de la cosecha, que es determinado por la autoridad de control de mariscos (FDA, 2001, 2011). De hecho, si el valor de la temperatura media mensual del agua costera excede de 15,6°C (60°F), en el caso del Océano Pacífico, ó 27,2°C (81°F), en el caso del Golfo de México y del Océano Atlántico, la autoridad de control de mariscos desarrolla y pone en marcha un plan de control con el objetivo de reducir la incidencia de enfermedades causadas por *V. parahaemolyticus*.

En la normativa estadounidense se regulan múltiples alternativas para minimizar el crecimiento post-cosecha de las poblaciones de bacterias patógenas en moluscos bivalvos: controlar la actividad de agua de la que disponen las bacterias patógenas para su crecimiento en los bivalvos en diferentes situaciones, regular la cantidad de sal o conservantes, como el nitrito de sodio, en el producto elaborado, variar el nivel de acidez (pH) (según el reglamento de alimentos acidificados, 21 CFR 114, para productos acidificados no perecederos y para los productos acidificados frigoríficos), evitar la contaminación después del proceso de pasteurización, minimizar el tiempo de exposición a temperaturas favorables para el crecimiento de bacterias patógenas, gestionar adecuadamente el tiempo necesario para eliminar las bacterias patógenas por cocción o pasteurización o autoclave (según



el reglamento para el procesado térmico de los alimentos poco ácidos envasados en contenedores herméticamente sellados, 21 CFR 113) y eliminar los patógenos bacterianos manteniendo las propiedades del producto crudo (FDA, 2001, 2011). En EE.UU. el control de *V. parahaemolyticus* en los moluscos (especialmente ostras) es un procedimiento rutinario que implica una evaluación del riesgo por las autoridades de control de mariscos. Esta evaluación determina el valor del riesgo de padecer enfermedad por *V. parahaemolyticus* tras el consumo de ostras cosechadas en una determinada zona de cultivo. El nivel permitido según las actuales directrices del Programa de Salubridad de Mariscos para las ostras recolectadas y de la FDA para el consumo de pescados y mariscos es de 5.000 NMP por gramo y de 10.000 NMP por gramo, respectivamente (FDA, 2009).

#### 4.3.11.1. Clasificación microbiológica de zonas de producción

Actualmente las zonas de producción de moluscos bivalvos se clasifican en base a los índices de coliformes totales y de coliformes fecales (Tabla 7 y 8) (Rippey, 1994). La producción de moluscos en zonas con niveles relativamente bajos de contaminación, por ejemplo, zonas autorizadas bajo el sistema de EE.UU. (Tabla 7) y zonas clase A en el sistema de la UE (Tabla 8), seguida de depuración, asegurará un nivel de riesgo de enfermedades por contaminación fecal tan bajo como el que se consigue a través del cocinado.

Sin embargo, estos indicadores bacterianos tradicionales no sirven para predecir la presencia de *V. parahaemolyticus*, aunque se observen ciertas correlaciones entre ellos (Watkins y Cabelli, 1985).

Un sistema similar al de EE.UU. se aplica en Japón, donde las ostras para el consumo en crudo deben recolectarse de las aguas donde el NMP de coliformes no sea superior a 70/100 ml de agua marina, mientras que si se recolectan de otras aguas, las ostras deben ser sometidas a depuración.

Tabla 7. Criterios para la clasificación de zonas de producción y recolección de moluscos en EE.UU. según la Ordenanza Modelo del Programa Sanitario Nacional de Moluscos (NSSP) (FDA, 2006)

Clasificación de zona	Coliformes totales (100 ml agua)*		Coliformes fecales (100 ml agua)*		Tratamiento necesario
	Media geométrica	Cumplimiento al 90%	Media geométrica	Cumplimiento al 90%	
Autorizada	≤70	≤230	≤14	≤43	Ninguno
Restringida	≤700	≤2.300	≤88	≤260	Depuración o reinstalación en zona autorizada
Prohibida	>700**	>2.300**	>88**	>260**	Recolección prohibida

\* Usando como métodos de referencia el número más probable (NMP) basado en la prueba de cinco tubos, tres diluciones y las pruebas por membrana mTEC

\*\* O no establecidas mediante estudio sanitario

Tabla 8. Criterios para la clasificación de zonas de producción de moluscos en UE según el Reglamento 854/2004 (Comisión Europea, 2004b)

Clasificación de zona	Estándar microbiológico para moluscos bivalvos*	Tratamiento necesario
A	≤230 <i>E. coli</i> /100 g de carne de bivalvos y de líquido intravalvar	Ninguno
B	≤4.600 <i>E. coli</i> /100 g de carne de bivalvos y de líquido intravalvar en más del 90% de muestras y ≤46.000 <i>E. coli</i> /100 g de carne de bivalvos y de líquido intravalvar todas las muestras	Depuración, reinstalación en zona clase A o cocinado según método autorizado
C	≤46.000 <i>E. coli</i> /100 g de carne de bivalvos y de líquido intravalvar	Reinstalación durante periodo largo o cocinado según método autorizado
Prohibida	>46.000 <i>E. coli</i> /100 g de carne de bivalvos y de líquido intravalvar	No se permite la recolección

\* Usando como método de referencia el número más probable (NMP) basado en la prueba de cinco tubos, tres diluciones especificado en ISO 16649-3

#### 4.3.11.2. Reinstalación y depuración

La reinstalación y la depuración son procesos que permiten reducir la materia particulada presente en el interior de los moluscos. Los moluscos son un importante alimento en la dieta humana. Estos animales se alimentan filtrando grandes volúmenes de agua proceso durante el que retienen en su interior materia particulada (partículas inorgánicas de arena, limo y arcilla, así como bacterias y virus) (Richards, 1988). A pesar de ello, en algunos países, incluyendo los de la Unión Europea, los moluscos pueden ser legalmente cosechados de aguas medianamente contaminadas si son depurados bajo condiciones controladas antes de ser comercializados y consumidos (Leung y Lui, 2004; Lee *et al.*, 2010). Es importante tener en cuenta que los moluscos que se consumen crudos o poco cocinados son clasificados dentro del grupo de los alimentos de alto riesgo por las autoridades de salud mundial (Jackson y Ogburn, 1999).

En primer lugar se puede optar por la **reinstalación** de los moluscos mediante su traslado desde una zona de cría contaminada microbiológicamente (atendiendo a las clasificaciones previamente descritas en las Tablas 7 y 8) a una zona de cría o de estabulación aceptable bajo la supervisión del organismo competente. A continuación, los moluscos se mantienen en dicha zona durante el tiempo que sea necesario para reducir hasta un nivel aceptable (para el consumo humano) la presencia de los contaminantes (FAO, 2010b).

En el caso de que la reinstalación no sea suficiente, es obligatorio por exigencias de la legislación internacional, nacional y/o local (aunque también se aplica como iniciativa propia de la industria) realizar una **depuración** para

eliminar microorganismos y arena de los tejidos de los bivalvos y proteger a los consumidores. (Leung y Lui, 2004). Históricamente, la depuración o purificación de moluscos se consolidó como técnica a raíz de los brotes de fiebre tifoidea (causada por la *Salmonella Typhi*) que ocasionaron numerosas muertes a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX en EE.UU. y en muchos países de Europa. Estos brotes estaban relacionados con el consumo de moluscos contaminados con salmonellas y la única manera de controlarlos fue el establecimiento de procedimientos de depuración (FAO, 2010b).

La depuración consiste en eliminar los contaminantes microbianos de los moluscos bivalvos al ponerlos en tanques con agua de mar desinfectada (usando cloro, luz ultravioleta, ozono, etc.), en recirculación o en circuito abierto, y en condiciones que permitan maximizar su actividad filtradora, durante un periodo de tiempo adecuado, que puede variar, generalmente, entre 24 y 48 h. Así, este proceso se basa en la capacidad que tienen los moluscos bivalvos de bombear y filtrar grandes cantidades de agua a través de sus branquias.

La depuración es eficaz en la reducción del número de indicadores fecales y otras especies bacterianas en bivalvos, ligera o moderadamente contaminados, aunque no logren eliminar esta carga microbiana en su totalidad (Son y Fleet, 1980). De hecho, la duración y la eficacia de estas técnicas dependerán del tipo de carga bacteriana a eliminar (Richards, 1988; Olafsen *et al.*, 1993). Además, el nivel de contaminación inicial y el estado fisiológico del bivalvo, así como la temperatura, la turbidez y la salinidad del agua de la planta depuradora también serán factores importantes (Rowse y Fleet, 1984).

Por otra parte, la depuración puede no ser suficientemente efectiva para reducir la carga bacteriana de algunas especies de *Vibrio* patógenas para el hombre, sobre todo si la salinidad se encuentra dentro de un rango entre 10 a 30 ppt y la temperatura es suficientemente alta (superior a los 20°C). Respecto a esto, se han publicado algunos trabajos que indican que algunas especies de *Vibrio* pueden persistir tras el proceso de depuración e, incluso, multiplicarse (Jones *et al.*, 1991; Murphree y Tamplin, 1995). El proceso de depuración tampoco elimina las partículas virales, por lo que su efectividad para evitar brotes de enfermedades víricas es reducida. Por este motivo, la depuración no debe considerarse el principal mecanismo de mitigación para estos casos, y será necesario optimizar el diseño y funcionamiento de estos sistemas para la eliminación de otros patógenos diferentes a los indicadores bacterianos actualmente utilizados.

En Europa la práctica de la depuración está muy extendida. En este sentido, la depuración de los moluscos que se comercializan está regulada por la Unión

Europea, que establece los valores aceptables de contaminación fecal en las zonas de cría de moluscos bivalvos, contaminación fecal que es provocada por la gran concentración de población existente en las zonas costeras, y debida también a las prácticas ganaderas extensivas. La depuración también se utiliza en EE.UU., Australia, Japón y, en menor medida, en Nueva Zelanda. En otros países la aplicación de la depuración será voluntaria, o por intereses comerciales con terceros países (Tabla 9).

Tabla 9. Métodos de depuración en distintos países del mundo (FAO, 2010b)

País	Principales especies depuradas	Sistema	Desinfección agua marina
China	Almejas y ostras	Recirculación Sistema abierto	UV, ozono
España	Almejas, berberechos, mejillones y ostras	Recirculación Sistema abierto	Cloro
Filipinas	Mejillones y ostras	Estático Sistema abierto	UV, ozono, cloro, PVP-iodo
Francia	Almejas, berberechos, mejillones y ostras	Estático Recirculación Sistema abierto	UV, ozono, cloro, aireación
Irlanda	Mejillones y ostras	Recirculación	UV, agua de pozo
Italia	Almejas, chirlas y mejillones	Recirculación Sistema abierto	UV, ozono, cloro
Japón	Ostras y vieiras	Estático Recirculación Sistema abierto	UV, ozono, cloro, electrolización
Malasia	Ostras	Recirculación	UV
Marruecos	Almejas, mejillones y ostras	Estático Recirculación	UV, cloro
Países Bajos	Mejillones y ostras	Recirculación Sistema abierto	UV
Portugal	Almejas, mejillones y ostras	Estático Recirculación Sistema abierto	UV, cloro
Reino Unido	Almejas, berberechos, mejillones y ostras	Recirculación Sistema abierto	UV

La normativa de la UE es poco precisa al respecto, siendo el principal requisito el que el sistema de depuración permita que los moluscos reanuden rápidamente y mantengan su alimentación por filtración. El objetivo es que queden limpios de residuos fecales, y no vuelvan a contaminarse y se mantengan con vida en condiciones adecuadas para el envasado, el almacenamiento y el transporte que precedan a su puesta en el mercado. Además, se estipula que los moluscos bivalvos deben depurarse continuamente durante un período suficiente para cumplir con el estándar

microbiológico del producto final (*E. coli*  $\leq 230/100$  g y ausencia de *Salmonella* en 25 g de carne o líquido intervalvar) (Comisión Europea, 2004b).

En consecuencia cada Estado Miembro de la UE ha ido especificando cómo deben realizarse los principios de depuración y estableciendo otros criterios generales a través de la aplicación de la legislación en los procedimientos de autorización e inspección nacionales (concretamente mediante el desarrollo del Reglamento 854/2004 de la Comisión Europea, 2004b).

#### **4.3.11.3. Técnicas de conservación para la comercialización de moluscos vivos o frescos**

El control de la supervivencia de bacterias patógenas a través de procesos destinados a contener las características del producto crudo se lleva a cabo siguiendo unas premisas: establecer científicamente y validar un proceso que reducirá los patógenos a un nivel aceptable; diseñar y operar los equipos de procesamiento para que cada unidad de la producto se someta al menos al proceso mínimo establecido; y llevar a cabo un seguimiento continuo de los parámetros críticos del proceso para verificar la consecución del proceso científicamente establecido.

Estos procesos están diseñados para reducir los microorganismos patógenos específicos a niveles aceptables, manteniendo las cualidades organolépticas (aspecto, sabor y textura) del producto bruto. Son especialmente útiles en el tratamiento de los peligros asociados con un determinado patógeno en las materias primas, tales como moluscos crudos (por ejemplo, ostras, almejas, mejillones y huevas de vieiras) que están destinados para ser consumidos crudos o poco cocinados (DePaola *et al.*, 2009). Algunos de estos procesos son: alta presión hidrostática de procesamiento (HPP), congelación rápida de manera individual (IQF) y la irradiación.

- **Disminución de la temperatura: Refrigeración y Congelación**

El control de la temperatura es uno de los factores clave después de la recolección de los moluscos bivalvos, de forma que temperaturas de 10°C o inferiores, impiden la multiplicación de vibrios patógenos a altos niveles. Por lo tanto la refrigeración es el método más comúnmente utilizado para preservar la calidad y extender la vida útil de los bivalvos (Andrews, 2004).

La congelación reduce los niveles de *Vibrio* spp. en mariscos e impide la multiplicación de los mismos (Schwarz, 2000; Cook y Ruple, 1992). Este proceso combinado con el envasado al vacío es una herramienta muy eficiente usada frecuentemente como tratamiento post-cosecha para el control de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (FDA, 2009).

- *Procesos de alta presión hidrostática (HPP)*

Los procesos de alta presión hidrostática son considerados técnicas de procesado no térmico que logran la inactivación de microorganismos en alimentos sin aparentes cambios de sus características organolépticas (Hite, 1899; Mañas y Pagan, 2005; Chen et al., 2006; Grove et al., 2006; Considine et al., 2008; Corbo et al., 2009).

La HPP se basa en la aplicación de presión hidrostática en el rango de 14.500 a 145.000 libras por pulgada cuadrada (100 a 1.000 MPa). Estas presiones son capaces de inactivar los patógenos sensibles a la presión, especialmente las formas vegetativas. En general, los vibrios son extremadamente sensibles a la presión, por lo que los procesos comerciales utilizan presiones de 275-300 MPa, durante 3 min para desinfectar ostras. Styles y colaboradores (1991) demostraron que presiones por encima de 170 MPa reducían en pocos minutos las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en almeja a niveles no detectables.

Sin embargo, hay diferencias en sensibilidad a la presión hidrostática entre especies e, incluso, entre cepas de una misma especie. Así, *V. vulnificus* es, en general, más sensible que *V. cholerae* a presiones por encima de 210 MPa y, dentro de *V. parahaemolyticus*, las cepas del serotipo pandémico O3:K6 son más resistentes a la presión hidrostática que otros serotipos o, incluso, que otros vibrios (Cook, 2003; Velazquez et al., 2005).

La eficacia del tratamiento con altas presiones depende de la intensidad de la presión, de la temperatura del proceso, del tiempo que dure la exposición y, por supuesto, del microorganismo a tratar (Hoover et al., 1989), sobre todo teniendo en cuenta que existen microorganismos (denominados barodúricos) capaces de sobrevivir a altas presiones (de 50 a 202 MPa). A pesar de que al utilizar esta técnica se han descrito algunos efectos no deseados, en la actualidad las altas presiones son una prometedora técnica emergente, económicamente viable para preservar la calidad e inactivar determinados patógenos como *V. parahaemolyticus* en moluscos manteniendo las propiedades nutritivas y sensoriales (Murchie et al., 2005; Torres y Velázquez, 2005; Ma y Su, 2011).

- *Congelación rápida de manera individual (IQF, Individual Quick Freezing)*

IQF implica el uso de la tecnología de congelación criogénica para bajar rápidamente la temperatura del producto por debajo de 0°C, dependiendo de las características físicas del producto y la capacidad del IQF.

El uso de este procedimiento hace que no sea necesario ningún tipo de químicos o conservantes y va a garantizar que el producto conserve toda la

textura, valor nutritivo y el sabor original una vez que haya sido descongelado, gracias a la cristalización que se produce en su interior (cristales pequeños). Además, tiene la ventaja de que se puede descongelar la cantidad de producto deseada.

Este proceso produce una reducción del número de agentes patógenos sensibles a la congelación, siendo algunos de ellos (como *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) más sensibles que otros (FDA, 2009).

- *Procesos de radiación ionizante*

La aplicación de radiaciones ionizantes (es decir, la irradiación) en los alimentos es un proceso físico no térmico que se utiliza para eliminar o reducir el número de bacterias patógenas, parásitos e insectos en los alimentos, aunque también se puede utilizar para retrasar determinados procesos fisiológicos (por ejemplo, la maduración) de frutas y verduras. Es una técnica que no produce muchas bajas en el procesado.

En EE.UU. se consideran fuentes aceptables de radiaciones ionizantes los rayos gamma de unidades selladas de los radionucleidos de cobalto-60 (Jakabi *et al.*, 2003) y cesio-137, electrones generados por máquinas con energías que no excedan los 10 millones de electrón-voltios, y los rayos X (Mahmoud y Burrage, 2009) generados por máquinas con energías de hasta 5-7,5 millones de electrón-voltios, dependiendo del receptor alimentario.

La FDA ha aprobado el uso de radiaciones ionizantes para el control de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* y otros patógenos en los moluscos frescos o congelados. En estos casos es obligatorio llevar a cabo controles de irradiación en la elaboración y manipulación de los alimentos. Además, la irradiación de moluscos frescos y congelados no podrá exceder de una dosis absorbida de 5,5 kiloGrays (kGy) (Code of Federal Regulations, 21 CFR 179.26).

Algunos patógenos son más sensibles a la radiación ionizante que otros, aunque afortunadamente las bacterias del género *Vibrio* se encuentran entre las más sensibles a la irradiación, mientras que *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* son más resistentes. De hecho, dosis de 1,0-1,5 kGy en moluscos bivalvos son efectivas para eliminar *V. parahaemolyticus* hasta niveles no detectables (Mallett *et al.*, 1991; Andrews *et al.*, 2003a; Jakabi *et al.*, 2003).

En cualquier caso la eficacia del proceso está determinada por la cantidad de radiación ionizante absorbida por el alimento que, a su vez, depende de factores relacionados con el propio irradiador (capacidad energética y geometría de la fuente, distancia fuente-producto y características del haz) y de factores asociados con el proceso específico (duración del tiempo de irradiación, temperatura ambiental y del producto, composición y densidad

del producto, tamaño, forma y composición de los envases y configuración de la carga del producto en el irradiador).

Es importante que todas las partes del producto reciban la dosis prescrita dentro de un rango especificado, por lo que es necesario realizar mapeos de dosimetría para documentar la distribución de la dosis absorbida a través de un proceso de carga para un conjunto particular de parámetros del irradiador.

- **Aditivos alimentarios: Compuestos GRAS**

Las sustancias GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) son aquellas cuyo uso en los alimentos es reconocido por los expertos como seguro (basándose en su uso en los alimentos antes de 1958 o en publicaciones científicas).

La FDA tiene un listado de aditivos permitidos para el consumo humano de tipo GRAS. Algunos de ellos (diacetil (butanediona); lactato sódico; ácido láctico; e hidroxibutilanisol (BHA), entre otros) mejoran la vida útil de los mariscos al controlar la contaminación por *Vibrio* spp. (Sun y Oliver, 1994). Éstos pueden ser añadidos directamente a los alimentos por estar dentro del estatus GRAS. Además, algunos de ellos (por ejemplo, diacetil combinado con romero) son particularmente prometedores para mejorar la calidad de los mariscos gracias a sus propiedades aromatizantes adicionales (Gillman y Skonberg, 2002).

Se ha demostrado que los aditivos químicos de origen natural como el ácido cítrico o, incluso, sustancias naturales como el zumo de limón (*Citrus limon* Beurm. f.), de lima (*Citrus aurantifolia* Swingle) o sudachi (*Citrus sudachi* Hort. ex Shirai) tienen actividad antibacteriana pudiendo controlar las cepas de *Vibrio* spp. en pescado y marisco crudo o poco cocinado (Mata et al., 1994; de Castillo et al., 2000; Rodrigues et al., 2000; Hasegawa et al., 2002). Estos últimos poseen concentraciones de ácido cítrico entre 50,8 y 52,1 mg/ml lo que les permite basar su acción en una reducción del pH (Tomotake et al., 2006), teniendo en cuenta que el pH óptimo de crecimiento de *V. parahaemolyticus* está entre 7,6 y 8,6 (Beuchat, 1973).

#### **4.3.11.4. Procesado de moluscos**

En el caso de que no sea viable la comercialización en vivo de los moluscos bivalvos, o se quiera utilizar otra forma de procesado que elimine todos los patógenos de interés en Salud Pública, se pueden aplicar procesos de cocción o pasteurización, que garanticen la inocuidad de estos alimentos desde el punto de vista microbiológico, aunque no destruyan otros tóxicos y contaminantes (pesticidas, metales pesados...). Y además, algunas



técnicas ayudan en el procesado posterior de las ostras, facilitando el pelado de las mismas, como es el caso del choque térmico comercial que consiste en sumergir ostras refrigeradas en cestas de alambre, dentro de tanques con agua potable a 67°C, durante 5 min (dependiendo del tamaño de la ostra y de la condición) y enfriamiento posterior de las mismas por aspersión durante 1 min con agua potable, antes del pelado y lavado.

- *Cocción*

El cocinado es un tratamiento térmico que generalmente se realiza antes de que el producto se coloque en el envase final y sean distribuidos refrigerados o congelados. Por lo general, después de la cocción, a estos productos se les conoce como cocidos y listos para comer. Como ejemplos de cocidos y listos para consumir nos encontramos productos de la pesca, cangrejo, langosta, carne de cangrejo, camarón cocido, ensaladas de mariscos, sopas de mariscos y salsas, y pescado ahumado en caliente.

El cocinado es una medida sumamente efectiva para eliminar *V. parahaemolyticus* (Johnston y Brown, 2002; FDA, 2009).

- *Pasteurización*

La pasteurización es un tratamiento que se aplica para eliminar bacterias patógenas resistentes implicadas en problemas de Salud Pública y que es razonablemente probable que se presenten en productos alimentarios durante su tiempo de vida útil, cuando se almacena bajo condiciones de abuso normal y moderado. En el caso de productos de la pesca, la pasteurización se realiza generalmente después de que el producto se coloque en el envase final herméticamente sellado. Se aplica a los productos que se distribuyen ya sea refrigerados o congelados.

Además de eliminar las bacterias patógenas, el cocinado y la pasteurización también pueden reducir considerablemente el número de bacterias de descomposición presentes en el producto de la pesca. Estas bacterias normalmente restringen el crecimiento de patógenos a través de la competencia, de forma que la eliminación de las bacterias de descomposición permitiría un rápido crecimiento de las bacterias patógenas de reciente introducción. Eso debe tenerse en cuenta ya que determinadas bacterias patógenas pueden ser introducidas después de la cocción o pasteurización y suponer una preocupación adicional. Esto es especialmente cierto para la pasteurización, debido a que el proceso puede prolongar la vida útil de los productos pesqueros, lo que proporciona más tiempo para el crecimiento de bacterias patógenas y la liberación de toxinas.

Diversos autores han demostrado que las bajas temperaturas de pasteurización (alrededor de 52°C) durante 10 min en ostras inoculadas con *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* reducían los niveles desde 10<sup>5</sup> MPN/g hasta niveles no detectables (Cook y Ruple, 1992; Andrews et al., 2000). En un trabajo posterior, Andrews y colaboradores (2003b) demostraron que ostras contaminadas con *V. parahaemolyticus* O3:K6 (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> ufc/g de ostra) tras un tratamiento pasteurización, con temperaturas entre 50-52°C durante 22 min, reducían los niveles de vibrios hasta niveles no detectables, sin cambios en las propiedades sensoriales del producto.

- **Esterilización**

La esterilización en autoclave es un tratamiento térmico que elimina casi todos los patógenos transmitidos por los alimentos y permite obtener un producto estable en almacenamiento.

A pesar de que este tratamiento es muy eficiente para la destrucción de los vibrios, hay que tener en cuenta que en el caso de alimentos poco ácidos envasados en contenedores herméticamente sellados, deben realizarse controles obligatorios adicionales para evitar el crecimiento de otras bacterias con formas resistentes (esporas termorresistentes) que pueden producir toxinas en condiciones de anaerobiosis (como es el caso del subtipo E de *Clostridium botulinum* predominantemente encontrado en pescados) (Wells y Wilkins, 1996).

#### **4.4. Análisis de riesgo de *V. parahaemolyticus* en acuicultura**

---

En los últimos años, se ha producido un aumento notable en las importaciones y exportaciones de marisco, a escala mundial. Esta actividad comercial ha incrementado las posibilidades de transmisión de las enfermedades asociadas al consumo del marisco desde el punto de producción al punto de venta, lugares que pueden estar situados a miles de kilómetros de distancia. Además, el cambio que el ser humano produce en su entorno ha afectado a las áreas de producción de especies destinadas al consumo, con su correspondiente repercusión en Salud Pública y en la actividad comercial.

Específicamente, en relación con el objeto de este trabajo, en el 2002, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) convocaron una Consulta de Expertos sobre Evaluación de riesgos de *Vibrio* spp. en pescados y mariscos (FAO/OMS, 2003). Por su parte, en el 2005, la FDA llevó a cabo un análisis de riesgo cuantitativo para *V. parahaemolyticus* en ostras crudas en los Estados Unidos, teniendo en cuenta como factor principal la temperatura del agua, así como la

temperatura del aire que afectan a la densidad de *V. parahaemolyticus* en condiciones naturales y en condiciones de post-cosecha, respectivamente. Estimaron la relación dosis-respuesta en humanos con respecto a *V. parahaemolyticus* y sugirieron que había un riesgo bajo (< 0,001%) de sufrir gastroenteritis tras el consumo de  $10^4$  células de *V. parahaemolyticus* (tdh+), y un alto riesgo (50%) tras el consumo de  $10^8$  células de *V. parahaemolyticus* (tdh+) (CFSAN-FDA, 2005). No hay datos de este tipo en Europa. Sin embargo el hallazgo de *V. parahaemolyticus* patógeno en Europa, hace necesario el análisis de riesgo del consumo de marisco en estas zonas por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o la FAO así como la elaboración de recomendaciones para poder llevar a cabo futuras legislaciones, cómo es el caso de EE.UU. o, por ejemplo, Chile dónde las gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* son de notificación obligatoria de acuerdo al Decreto 158 (Octubre 2004).

La Unión Europea regula la producción, el cosechado y la comercialización de moluscos bivalvos en la Unión Europea. Los requisitos que deben cumplir las empresas de la industria alimentaria se presentan en el Reglamento 853/2004 que incluye reglas específicas de higiene para alimentos de origen animal (Comisión Europea, 2004a). Los parámetros que utiliza para establecer la idoneidad de los moluscos están basados en indicadores de contaminación fecal, como *E. coli* o *Salmonella* spp. (Comisión Europea, 2004b, 2006, 2007). Sin embargo, existen estudios que demuestran que la depuración es menos efectiva en la eliminación tanto de los virus entéricos, como de biotoxinas marinas, o en la eliminación de los metales pesados o sustancias químicas orgánicas, y también en la eliminación de los *Vibrios* spp. patógenos que se encuentran de forma natural en medios costeros y estuarios y no están asociados a contaminaciones fecales, resultando todos ellos un riesgo para la salud del consumidor (Franco et al., 1990; Croci et al., 2002; Cozzi et al., 2009).

# 5 Objetivos

## 5.1. Objetivo general

---

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue obtener nuevos datos sobre *V. parahaemolyticus* en Europa, que cubrieran las lagunas de información presentes en los análisis de riesgo europeos. Estos datos permitirán disponer de información actualizada de este agente potencialmente patógeno, ya que la información de la que se dispone actualmente en Europa es limitada y se apoya parcialmente en los modelos de análisis de riesgo desarrollados para los Estados Unidos de América.

## 5.2. Objetivos específicos

---

Para alcanzar el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Detectar e identificar cepas potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos de interés comercial cultivados en las bahías del delta del Ebro.
2. Estudiar la prevalencia y la distribución espacial y temporal de *V. parahaemolyticus* (total y patogénico) en moluscos bivalvos cultivados en cada una de las bahías del delta del Ebro, así como su posible asociación con parámetros ambientales (temperatura y salinidad).
3. Investigar la distribución de los marcadores de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* (genes *tdh* y/o *trh*) en cepas de origen ambiental aisladas en diferentes ecosistemas de Europa, entre ellos el delta del Ebro.
4. Estudiar la eficacia de un sistema experimental de depuración de *Ruditapes philippinarum* con el fin de determinar el tiempo necesario para reducir hasta niveles indetectables las poblaciones naturales tanto de vibrios no fermentadores de sacarosa (SNFV), como de vibrios fermentadores de sacarosa (SFV).

5. Describir y comparar las características de incorporación y supervivencia de cepas, tanto patógenas como no patógenas, de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos de interés comercial (*R. decussatus* y/o *R. philippinarum*), en ambiente acuático.
6. Determinar el crecimiento y la capacidad de supervivencia durante la etapa de post-cosecha y a diferentes temperaturas de cepas de *V. parahaemolyticus* patógenas y no patógenas en una población de *R. philippinarum*.

# 6 Material y Métodos

## 6.1. Estudios observacionales

### 6.1.1. Ámbito geográfico

Los estudios de campo se realizaron en el delta del Ebro, ubicado en la provincia de Tarragona (España). El río Ebro en su desembocadura en el mar Mediterráneo forma un delta en forma de flecha con una superficie territorial de aproximadamente 320 Km<sup>2</sup> (Figura 3).

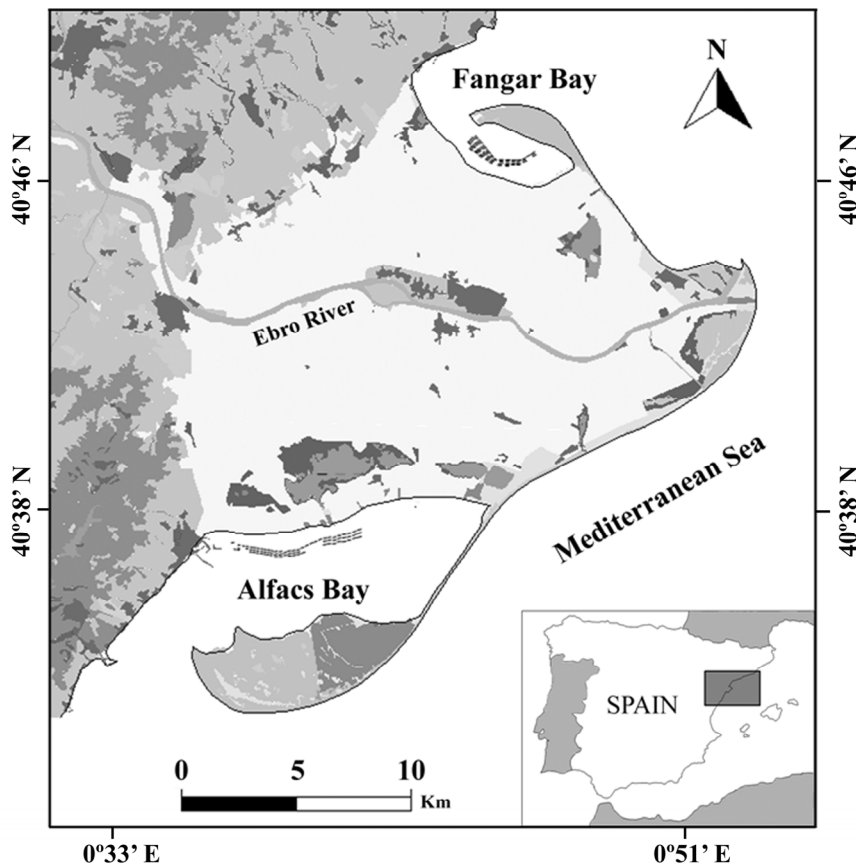


Figura 3. Área geográfica de estudio y localización de las dos bahías del delta del Ebro.

La región del Delta del Ebro es una zona de gran interés biológico, siendo considerada uno de los humedales más importante del Mediterráneo occidental y también del Estado Español, después de Doñana. Está declarada zona de especial protección para las aves (ZEPA) y parte de esta área está clasificada como Parque Natural y está incluida como espacio europeo Natura 2000.

Además, desde 1993 una parte (7.736 ha de 33.000 ha totales) situada entre las coordenadas 40°43'N y 00°44'E y que coincide con la superficie del Parque Natural del Delta del Ebro y de la Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA) (Directiva 79/409/CEE) fue incluida en la Lista de humedales de importancia internacional (Ramsar, 2006).

El delta está dividido por el río Ebro en dos hemideltas, con una bahía en cada uno de ellos: Fangar al norte y Els Alfacs al sur (Figura 3).

Ambas bahías son extensiones de aguas marinas diluidas semiestancadas que están sujetas a aportaciones de agua dulce de los canales de drenaje del cultivo del arroz de campo (abril-septiembre), principal actividad agrícola de estas zonas (Claver *et al.*, 2006; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Se caracterizan por tener un pH moderadamente alcalino y, en general, son de poca profundidad, no superando los 6 metros, aunque cada una de estas bahías presenta diferencias importantes.

La bahía de Fangar tiene una superficie de 952 ha, y una profundidad media de 2 m y máxima de 4 m, con un volumen aproximado de 16 millones de m<sup>3</sup> de agua. La temperatura oscila entre 6 y 30° C y la salinidad de 21 a 38 ‰. El tiempo de renovación total del agua está en 2 días (Camp, 1994).

Mientras que la bahía de Els Alfacs tiene una superficie mayor que la anterior, de 5.894 ha y está conectada con el mar por una entrada de 2 km de ancho (Camp y Delgado, 1987). Tiene una profundidad media de 4 m y máxima de 6 m, y un volumen aproximado de 200 millones de m<sup>3</sup> de agua. La temperatura varía anualmente de 7 a 31° C y la salinidad de 16 a 38 ‰. El tiempo de renovación total del agua es de unos 10 días (Camp, 1994).

Las principales influencias antropogénicas en el delta son las prácticas agrícolas intensivas (65% de la superficie total), los vertidos urbanos e industriales (cementera y químicas, entre otras), la pesca, la acuicultura (siendo una de las áreas más importantes a nivel nacional) y las actividades turísticas (Prat e Ibáñez, 1995; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Dichas actividades junto con las características que definen el ecosistema del delta del Ebro y favorecen la presencia y el crecimiento de vibrios (algunos de ellos zoonóticos) pueden incrementar el riesgo para la Salud Pública (Motilla *et al.*, 1994, 1995).

### 6.1.2. Población estudiada

Los animales estudiados inicialmente fueron el ostión japonés (*Crassostrea gigas*), el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). Estos moluscos bivalvos son las principales especies cultivadas en el delta del Ebro con especial interés

económico, tanto en la citada región, como para España en general, por tratarse de un país productor y consumidor de estos bivalvos a nivel mundial.

Cada una de estas especies (Figura 4) presenta unas características ecológicas determinadas que se resumen a continuación.

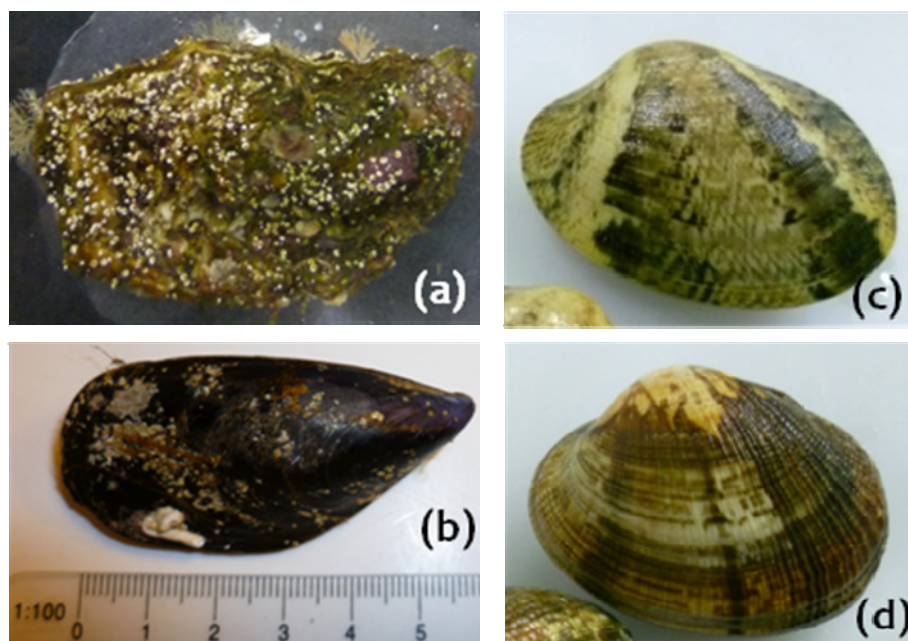


Figura 4. Especies de moluscos bivalvos estudiadas. (a) *C. gigas*, (b) *M. galloprovincialis*, (c) *R. decussatus*, (d) *R. philippinarum*. (Imágenes cedidas por Josu Pérez-Larruscain)

El ostión japonés (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) tiene amplio rango de tolerancia a la temperatura, que va desde -1,8 a 35°C, y una gama óptima de salinidad que se encuentra entre el 20 y 25‰, pudiendo sobrevivir en salinidades por debajo del 10‰ y superiores al 35‰, aunque en esas condiciones será poco probable la cría.

El mejillón (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) vive a temperaturas de 10-20°C, con una salinidad óptima del 34‰. Esta especie es la que mayor importancia económica y productiva a nivel nacional y local.

La almeja fina (*Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758) es una de las especies de moluscos bivalvos más apreciada en España y una de las menos abundantes por la escasez de semilla apta para el cultivo, resultando imprescindible mejorar ciertos aspectos de la tecnología de cultivo de semilla en criadero para aumentar la producción y abaratar sus costes. Esta especie es nativa de la bahía de Els Alfacs y su recolección se realiza de camas naturales situadas en dicha bahía. Es relativamente euriterma, pudiendo vivir con temperaturas entre 10 y 30°C, estableciéndose la temperatura óptima de crecimiento entre los 15 y 20 °C. Con respecto a la salinidad, los valores óptimos están comprendidos entre el 25 ‰ y el 35 ‰, aunque puede vivir en zonas con grandes variaciones tolerando salinidades superiores al 40‰, siendo el límite inferior del 20‰ (Pérez Camacho, 2002).



La almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams y Reeve, 1850) representa en la actualidad una de las principales especies cultivadas en el mundo y es un recurso pesquero importante del delta del Ebro, donde fue introducida con fines acuícolas. Comparte con la almeja fina los valores óptimos de temperatura y salinidad, aunque el límite inferior de salinidad para esta especie es del 15‰ y la temperatura ideal de crecimiento se sitúa entre 15 y 28°C (Pérez Camacho, 2002).

Es importante citar que los dos diferentes tipos de cultivo de bivalvos que se utilizan en el delta del Ebro son: cultivo de bivalvos adheridos a un sustrato rugoso que los mantiene sésiles en cuerdas suspendidas en la columna de agua (utilizado para el cultivo de ostión y mejillón), y el cultivo de los bivalvos enterrados en sustratos finos de playas arenosas contactando con el exterior mediante los sifones (en el caso de las almejas). Esta circunstancia hace que al analizar los resultados se tenga en cuenta la posible existencia de una correlación entre el hospedador y el sistema de producción en el medio natural de dicho bivalvo.

Adicionalmente, se trabajó con cepas aisladas procedentes de otras especies: vieiras (*Pecten maximus*), mejillón atlántico (*Mytilus edulis*), buey de mar (*Cancer pagurus*) y otros crustáceos, que no se han tenido en cuenta en este apartado y que se utilizaron para estudiar las relaciones interespecíficas de los aislados de *V. parahaemolyticus* procedentes de diferentes orígenes geográficos.

### 6.1.3. Diseño de los muestreos

Se realizaron un total de tres campañas de recogida de muestras en los meses de Julio y Agosto, cuando es más alta la temperatura del agua en el delta del Ebro.

Las campañas se realizaron en los años 2008, 2009 y 2010 y el objetivo de estos muestreos fue detectar la presencia de *V. parahaemolyticus* patógeno en las distintas especies de bivalvos cultivados en el delta del Ebro, así como establecer su prevalencia. Complementariamente se analizaron los resultados correspondientes a los muestreos realizados durante el verano de 2006.

Los muestreos realizados para las ostras y mejillones cultivadas en los polígonos, se llevaron a cabo en tres puntos diferentes de cada una de las bahías: al comienzo (Fangar: 40°46'723"N, 0°43'943"E; Els Alfacs: 40°37'112"N, 0°37'092"E), en el medio (Fangar: 40°46'666"N, 0°45'855"E; Els Alfacs: 40°37'125"N, 0°38'570"E), y al final (Fangar: 40°46'338"N, 0°44'941"E; Els Alfacs: 40°37'309"N, 0°39'934"E). Mientras que las almejas fueron muestreadas de un único lugar por bahía: *R. philippinarum* en la bahía de Fangar (40°47'3"N, 0°43'8"E), y *R. decussatus* en la bahía de Els Alfacs (40°37'44"N, 0°38'0"E).

Inicialmente se establecieron tres puntos de muestreo por especie, año y bahía (con excepción de las almejas del género *Ruditapes* en los que sólo se estableció uno).

En la Tabla 10 se muestran los puntos de muestreo previstos. Se muestrearon 30 animales por punto de muestreo para detectar una prevalencia mínima esperada del 10% con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, a lo largo del estudio el número de puntos de muestreo así como el tamaño de muestra fueron variando por diversos motivos (fundamentalmente económicos y logísticos).

Tabla 10. Puntos de muestreo utilizados para cada especie y campaña

Especie	2006		2008		2009		2010	
	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar
<i>C. gigas</i>	3	3	3	3	2	3	2	2
<i>M. galloprovincialis</i>	2	2	3	3	3	3	2	2
<i>R. decussatus</i>	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>R. philippinarum</i>	-	1	-	1	-	1	-	1

En la Tabla 11 se muestran los tamaños de muestra finalmente utilizados en el estudio. Un total de 750 y de 709 moluscos bivalvos fueron muestreados de las bahías de Fangar y de Els Alfacs, respectivamente. La distribución de las distintas especies de bivalvos que fueron procesadas de cada una de las bahías es la siguiente: en la bahía de Fangar, 330 fueron ostiones, 300 mejillones y 120 almejas. Mientras que en la bahía de Els Alfacs, 283 fueron ostiones, 306 mejillones y 120 almejas. Las desviaciones observadas son debidas fundamentalmente a la insuficiente disponibilidad de ejemplares adultos en los puntos de muestreo en determinadas campañas.

Tabla 11. Tamaños de muestra recogidos distribuidos por especie, campaña y ubicación

Especie	2006		2008		2009		2010	
	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar
<i>C. gigas</i>	90	90	88	90	60	90	45	60
<i>M. galloprovincialis</i>	67	60	89	90	90	90	60	60
<i>R. decussatus</i>	30	-	30	-	30	-	30	-
<i>R. philippinarum</i>	-	30	-	30	-	30	-	30
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>180</b>	<b>207</b>	<b>210</b>	<b>180</b>	<b>210</b>	<b>135</b>	<b>150</b>

Las muestras de ostras y de mejillones fueron cosechadas de cuerdas suspendidas en el mar y ubicadas en tres diferentes unidades de producción, denominadas *bateas* o *plataformas*. Las muestras fueron recogidas de tres puntos diferentes de la cuerda (próximas al fondo, altura media, y cercana a la superficie), mientras que las almejas fueron muestreadas en una misma área de cultivo, en cada una de las bahías estudiadas.

Todos los moluscos bivalvos seleccionados tenían tamaño comercial y estaban vivos, sin observarse ningún tipo de alteración del comportamiento o anomalía morfológica. Para ello se verificó que las valvas estaban intactas y con coloración normal (es decir, sin roturas ni abrasiones), y que se cerraban al tocarlas o ante cambios en el medio. Estas características suelen asociarse con la ausencia de enfermedad o parasitismo.

Las muestras una vez cosechadas fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico que se situaron en neveras con placas de hielo. El transporte duró menos de 1 h en todas las ocasiones lo que garantizó que las muestras llegaran adecuadamente refrigeradas al laboratorio de bacteriología del IRTA-SCR para ser procesadas.

## 6.2. Estudios experimentales

---

Esta segunda parte se refiere exclusivamente al trabajo experimental que engloba los experimentos diseñados para el estudio de las cinéticas post-infección de incorporación de *V. parahaemolyticus* en almejas. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo exclusivamente en el centro que posee el IRTA a la orilla de la bahía de Els Alfacs, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona (IRTA-SCR).

Antes de comenzar con la infección experimental se evaluó la eficacia de un sistema de depuración que se detallará posteriormente. Esta eficacia se determinó mediante el cálculo del tiempo necesario para reducir las poblaciones naturales tanto de vibrios no fermentadores de sacarosa (SNFV) (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. damsela*), como de vibrios fermentadores de sacarosa (SFV) a niveles prácticamente indetectables mediante cultivo bacteriológico.

### 6.2.1. Animales de experimentación

Los animales de experimentación utilizados fueron la almeja fina (*R. decussatus*) y la almeja japonesa (*R. philippinarum*). Se seleccionaron ambas especies en base a los resultados obtenidos en el estudio observacional previo, en el que se confirmó que albergaban de forma natural densidades de *V. parahaemolyticus* mayores que el resto de bivalvos estudiados, lo que implica que podría existir un efecto hospedador en los individuos del género *Ruditapes*, en relación a la presencia de *V. parahaemolyticus*, y en el caso de llevar a cabo una vigilancia epidemiológica en estas bahías (con el procedimiento de cultivo habitual que se está realizando en la actualidad), estos bivalvos serían los recomendados para el estudio. Además, también se tuvo en cuenta el hecho de que estas dos especies de moluscos bivalvos son especies muy consumidas tanto a nivel nacional como internacional.

Las almejas empleadas fueron recogidas específicamente para cada experimento en los lugares seleccionados para el estudio observacional: *R. philippinarum* en la bahía de Fangar (40°47'3"N, 0°43'8"E), y *R. decussatus* en la bahía de Els Alfacs (40°37'44"N, 0°38'0"E).

En ambos casos, entre los animales recogidos se seleccionaron animales adultos sanos, cuyo tamaño estuviera próximo a la talla mínima de comercialización, establecida en 35 mm para *R. philippinarum*, y 40 mm para *R. decussatus* (Reglamento CE 850/98; Reglamento CE 40/2008; Reglamento CE 43/2009).

### 6.2.2. Instalaciones

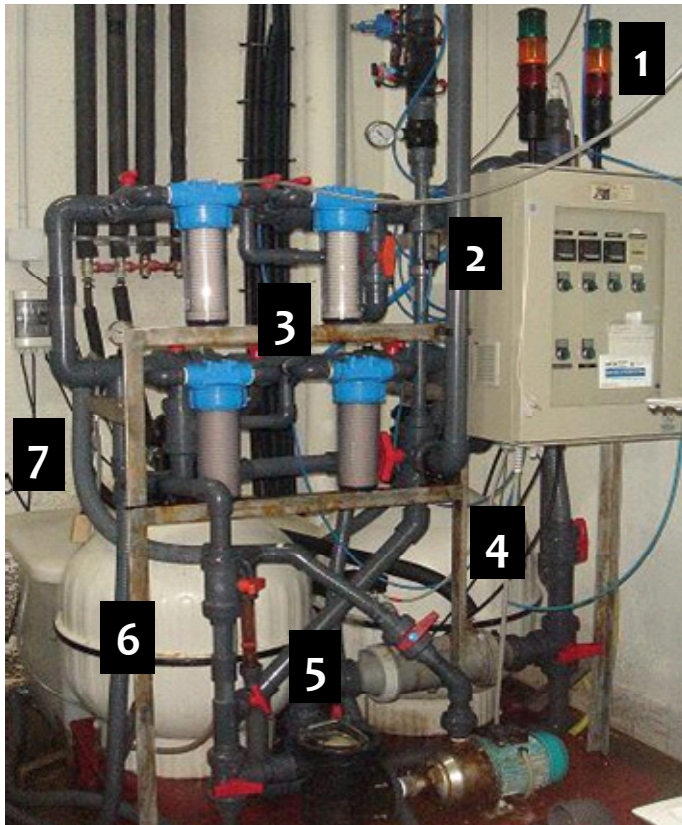
El sistema experimental de depuración fue diseñado en horizontal (Figura 5), y constaba de un total de 12 tanques de fibra de poliuretano reforzada, de 40 litros de capacidad (90 cm de largo, 45 cm de ancho, y 18 cm de profundidad máxima), con el interior de *gel-white coat*, asociados a un módulo IRTAmar™.

El módulo IRTAmar™ (Figura 6) permite controlar por sondas y mecanismos de reacción los parámetros de caudal (l/min), temperatura (°C), y oxígeno disuelto (mg/l), y los registra automáticamente en un ordenador central.

La depuración se llevó a cabo en circuito abierto, por lo que el agua saliente de los tanques era expulsada a unas balsas de tratamiento. La tasa de renovación del agua se estableció alrededor de 1 h (equivalente a 0,7 l/min).



Figura 5. Sistema de depuración experimental a pequeña escala



- Componentes:
- (1) Lámpara UV
  - (2) Sistema de control (caudal, O<sub>2</sub> y temperatura)
  - (3) Filtros de cartuchos
  - (4) Biofiltro
  - (5) Intercambiador de calor
  - (6) Filtro mecánico
  - (7) Tanque de expansión

Figura 6. Módulo automático de tratamiento de aguas (IRTamar™)

Las almejas fueron situadas en placas de plástico perforadas y suspendidas del fondo de los tanques para minimizar la recontaminación con heces y pseudoheces (Figura 7).

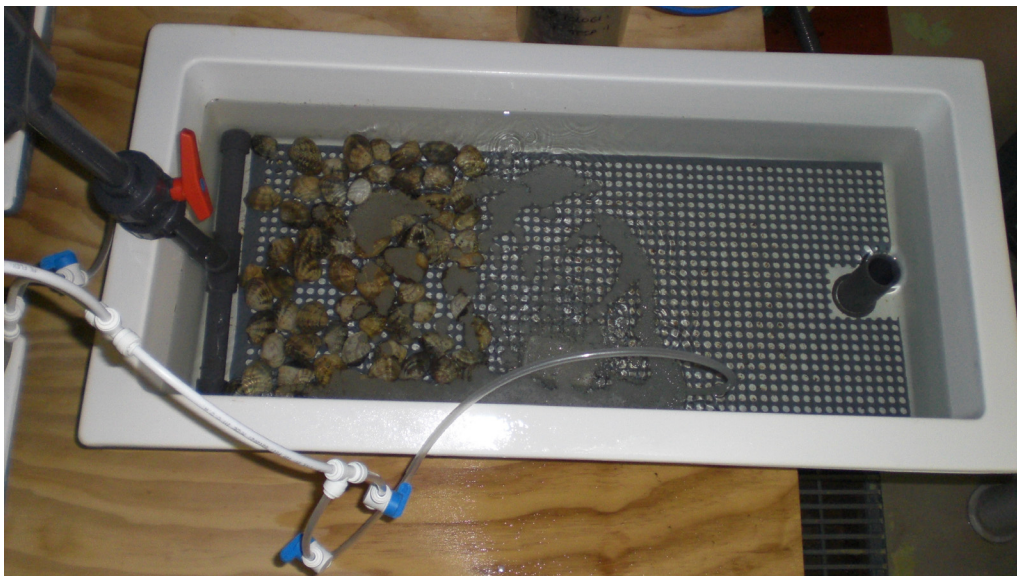


Figura 7. Ubicación de las almejas en las unidades de depuración

Antes de empezar con los experimentos y para comprobar la eficacia del protocolo de desinfección, el agua de mar tratada fue sembrada en placas de



TCBS, no encontrándose crecimiento después de 48 h. Este proceso de evaluación de la calidad del sistema fue llevado a cabo semanalmente para comprobar la eficacia de desinfección del sistema, y evitar de esa forma la entrada de *V. parahaemolyticus* que pudiera distorsionar los resultados de los estudios, ya que hay que tener en cuenta que la fuente de agua del sistema de depuración procedía de la bahía de Els Alfacs, que presenta una concentración variable de *V. parahaemolyticus*.

### 6.2.3. Cepas de *Vibrio parahaemolyticus*

Se utilizaron dos cepas de *V. parahaemolyticus* que procedían del muestreo correspondiente a la campaña de vigilancia epidemiológica llevada a cabo en el verano del 2006 (Roque et al., 2009). La cepa i747 fue aislada de mejillón, carece de potencial patogénico y lleva el gen *tlh* que codifica para la hemolisina termolábil. La cepa i678 fue aislada de almeja *R. decussatus*, es potencialmente patogénica ya que además de llevar el gen *tlh*, lleva el gen *tdh* que codifica para la hemolisina directa termoestable.

La identificación de ambas cepas se realizó mediante la técnica de PCR diseñada por Bej y colaboradores (1999) (con ligeras modificaciones en el protocolo), que permitió la identificación a nivel de especie mediante la amplificación del gen de la hemolisina termolábil (*tlh*) y a nivel de factores de virulencia por la amplificación del gen de la hemolisina directa termoestable (*tdh*) y de la hemolisina relacionada con la hemolisina directa termoestable (*trh*).

Ambas cepas se caracterizaron fenotípicamente como bacilos Gram-negativos, catalasa y oxidasa positivos, anaerobios facultativos y móviles que crecían en agar TCBS (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) formando colonias verdes. Además, ambas cepas fueron capaces de crecer a 42°C, pero no a concentraciones de 8% de NaCl.

Complementariamente se realizaron pruebas bioquímicas de identificación mediante el sistema API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) que dieron un resultado positivo para la identificación de *V. parahaemolyticus* con una probabilidad de 99,9%, en el caso de la cepa i747 (4146107), y 99,5%, en el caso de la cepa i678 (4326106).

Los cultivos puros se mantuvieron criopreservados a -80°C en glicerol al 10%, hasta su posterior utilización. Para preparar los inóculos de cada cepa se inoculó una criobola bacteriana en un Erlenmeyer con 50 ml de caldo de tripticasa soja (TSB) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) adicionado con un 2,0% de NaCl (TSB-2). El Erlenmeyer inoculado fue incubado a 28°C durante 18-20 h en agitación suave (Excella E24 Incubator skaker series, New Brunswick Scientific, New Jersey, EE.UU.). Posteriormente, el caldo de cultivo resultante fue transferido en tubos Falcon estériles (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) que se

centrifugaron a 2000 g y a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue desechado, y el sedimento obtenido se resuspendió en solución salina estéril conteniendo 2,5% de NaCl (SSS) determinándose su OD<sub>620nm</sub> mediante espectrofotometría visible (HITACHI U-2001, Hitachi Instruments, Lnc, EE.UU).

El inóculo se preparó a partir de esta suspensión bacteriana ajustando la cantidad de bacteria a 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> ufc por ml de baño de exposición. Los resultados obtenidos con el espectrofotómetro fueron confirmados mediante siembras de diluciones decimales seriadas de las muestras por duplicado en placas de agar tripticasa soja (TSA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) conteniendo un 2,0% NaCl (TSA-2), agar TCBS y CHROMagar Vibrio (Biomerieux, Paris, Francia). Las placas sembradas fueron incubadas a 28°C (TSA-2 y TCBS) y a 37°C (CHROMagar Vibrio) durante 18–20 h. Posteriormente, se calculó y registro el número de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml).

## 6.2.4. Diseño experimental

### 6.2.4.1. Depuración

Un total de 182 almejas de la especie *R. philippinarum* fueron cosechadas de un área de cultivo en la bahía de Fangar: 120 individuos en primavera y 62 en verano. La talla de los individuos fue de 34,4 ± 2,8 mm en primavera y 39,9 ± 1,0 mm en verano.

Con el fin de determinar si la temperatura del agua tenía alguna influencia en la tasa de depuración en relación al tiempo de eliminación de las poblaciones naturales de vibrios, se llevó a cabo un primer trabajo en el que se realizaron dos experimentos: uno en primavera (temperatura media del agua 19,88 ± 0,40°C) y otro en verano (temperatura media del agua de 25,19 ± 0,94°C).

En cada caso, las almejas fueron divididas en dos bandejas y se analizaron microbiológicamente un total de 12 almejas por día, en el experimento de primavera, a tiempos de muestreo: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, y 216 h, y 9 almejas por día, en el experimento de verano, a tiempos de muestreo: 0, 24, 144, 168, 192, y 216 h (con la excepción de 4 almejas por día a tiempo de muestreo: 48 y 72 h). Las diferencias en el tamaño de los grupos experimentales fueron debidas a problemas de disponibilidad de individuos durante el verano.

La duración de los experimentos, establecida en 9 días, se determinó teniendo en cuenta que los individuos estaban sin comer, y podrían sufrir una pérdida de peso excesiva, con la consiguiente pérdida de económica en el mercado.

### 6.2.4.2. Cinética de incorporación en condiciones experimentales de cultivo

Se llevaron a cabo varios estudios para conocer la incorporación de *V. parahaemolyticus* (patógeno y no patógeno) en condiciones de cultivo en

almejas del género *Ruditapes*. Para ello, se seleccionaron un total de 569 almejas de la especie *R. decussatus* y 564 *R. philippinarum*.

La distribución en los distintos grupos experimentales para *R. decussatus* fue la siguiente: 255 almejas control (almejas no expuestas a *V. parahaemolyticus*), 123 y 191 almejas expuestas a *V. parahaemolyticus* patógeno y no patógeno, respectivamente. Mientras que para *R. philippinarum* fue: 285 almejas control (almejas no expuestas a *V. parahaemolyticus*), 123 y 156 almejas expuestas a *V. parahaemolyticus* patógeno y no patógeno, respectivamente.

Antes de comenzar con el estudio de la evolución de ambas cepas de *V. parahaemolyticus*, las almejas fueron depuradas siguiendo el protocolo previamente evaluado en la presente Tesis Doctoral (Lopez-Joven *et al.*, 2011a).

Una vez comprobado que las almejas estaban libres de SNFV, éstas fueron situadas en los tanques de experimentación, conteniendo 330-350 ml de agua marina depurada por almeja, provistas de aireadores y sin renovación de agua. Estos estudios se realizaron a temperatura ambiente, manteniéndose la temperatura del agua entre 16 y 18°C.

Los experimentos de incorporación de *V. parahaemolyticus* se realizaron por separado para cada especie de almejas y para cada una de las dos cepas de *V. parahaemolyticus*, pero también se llevaron a cabo en condiciones de cohabitación de ambas especies de almejas, utilizando la cepa no patógena de *V. parahaemolyticus*. La inoculación experimental de ambas cepas de *V. parahaemolyticus* (patógena y no patógena) se llevó a cabo con una carga inicial bacteriana alta comprendida en el rango situado entre  $6,50 \pm 0,19$  a  $8,63 \pm 0,90$  log ufc/almeja (excepto en el estudio de cohabitación dónde la carga inicial bacteriana fue menor, de  $3,70 \pm 0,00$  log ufc/ml). El inóculo bacteriano fue administrado junto con  $10^5$  células/ml de fitoplancton axénico (*Isochrysis galbana* variedad tahitiana) (Pérez Camacho *et al.*, 2002), para estimular la incorporación bacteriana en las almejas simulando las condiciones en el medio marino.

Los tiempos de muestreo en cada experimento fueron variables englobando una amplia franja temporal que osciló entre 2 y 168 h.

#### **6.2.4.3. Cinéticas de incorporación en condiciones de post-cosecha**

Un total de 352 almejas de la especie *R. philippinarum* fueron seleccionadas: 144 como almejas control (almejas no expuestas a *V. parahaemolyticus*), 103 y 105 almejas expuestas a *V. parahaemolyticus* patógeno y no patógeno, respectivamente, para ser almacenadas a diferentes temperaturas.

Se evaluaron dos factores: la temperatura de almacenamiento y la variante de *V. parahaemolyticus*. Cada uno de estos factores se dividió en tres categorías,



temperatura (4, 15 y 28°C) y *V. parahaemolyticus* (patógeno, no patógeno, y control negativo), de forma que finalmente nueve grupos experimentales fueron estudiados en un experimento factorial completo.

Antes del almacenamiento, estos bivalvos fueron depurados siguiendo el protocolo de Lopez-Joven *et al.* (2011a), y una vez que se verificó que las almejas estaban libres de SNFV fueron situadas en unidades de experimentación (que contenían 10 l de agua marina depurada) y se procedió a la inoculación experimental de las cepas de *V. parahaemolyticus* (patógena y no patógena) con concentraciones medias de  $6,16 \pm 0,48$  log ufc/ml y de  $6,72 \pm 0,32$  log ufc/ml, respectivamente. La inoculación se realizó por separado (es decir, en distintas unidades de experimentación). Como en los experimentos anteriores el inóculo bacteriano fue administrado a las almejas junto con  $10^5$  células/ml de fitoplancton axénico (*Isochrysis galbana* variedad tahitiana) (Pérez Camacho *et al.*, 2002). Las almejas permanecieron en el tanque durante 24 h, hasta alcanzar los niveles máximos de incorporación bacteriana, según se había establecido en los resultados obtenidos previamente en esta Tesis Doctoral (Lopez-Joven *et al.*, 2011b).

Una vez transcurrido ese tiempo, los animales fueron sacados del agua, y cada lote de almejas que había sido expuesto a cada una de las dos cepas y, junto con las almejas del lote control fueron divididos en tres grupos iguales y situados en diferentes bandejas expuestas al aire. Una bandeja de cada grupo (una con almejas expuestas a *V. parahaemolyticus* patógeno, otra con almejas expuestas a *V. parahaemolyticus* no patógeno y otra bandeja con almejas control) fue situada a cada una de las temperaturas ambientales establecidas: 4, 15 y 28°C.

A partir de ese momento, se tomó una muestra de cada uno de los nueve grupos formados para el almacenamiento: grupo inoculado con *V. parahaemolyticus* patógeno (n=6 almejas), *V. parahaemolyticus* no patógeno (n=8 almejas), y el grupo control (n=11 almejas) fue analizada a tiempo 0, 24, 48, 72 y 96 h. Así, se estimó la concentración de *V. parahaemolyticus* en las almejas cada 24 h durante un almacenaje que duró 4 días. El experimento fue realizado por duplicado, y se complementó con un experimento adicional para el almacenamiento a 4°C con la finalidad de verificar resultados obtenidos previamente (en este caso se analizaron 5 almejas de cada uno de los lotes a tiempo 0 h).

### 6.3. Técnicas diagnósticas

---

Los estudios de caracterización e identificación de *V. parahaemolyticus* se llevaron a cabo en las instalaciones del IRTA-SCR, exceptuando los análisis correspondientes a

la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) que fueron realizados en el Istituto Superior de Sanità de Roma (Italia).

### 6.3.1. Procesado de las muestras

Todos los individuos fueron medidos longitudinalmente (Digital caliper 0-150 mm LLG) antes de ser procesadas y abiertas individualmente en condiciones estériles utilizando un cuchillo previamente esterilizado con alcohol y luego expuesto a una llama. Tanto el líquido intervalvar como la carne, fueron situados conjuntamente en viales estériles que contenían 10 ml de SSS, y fueron pesadas en la balanza de precisión (descontado el peso del vial con SSS), para determinar su peso. Posteriormente los tejidos recogidos fueron macerados y homogeneizados durante 30 s usando ultraturrax (IKA, T25 basic).

### 6.3.2. Recuento bacteriológico

El aislamiento inicial de las cepas de *V. parahaemolyticus* se llevó a cabo a partir de 1 ml del macerado del bivalvo enriquecido en 9 ml de agua de peptona alcalina (APW) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España), durante 6 h a 37°C y sembrado posteriormente por agotamiento utilizando un asa de siembra en placas de CHROMagar vibrio (CHROMagar, Francia), que se incubaron durante 18-20 h a 37°C. Todas las colonias malva fueron purificadas, primero en placas de CHROMagar Vibrio, y después en TSA adicionado con un 2% de NaCl.

El recuento total de bacterias marinas heterotróficas y vibrios se realizó en placas de agar marino (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) y en placas de TCBS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España), respectivamente.

Específicamente para *V. parahaemolyticus* se llevaron a cabo diluciones seriadas de las muestras que fueron sembradas en agar TCBS (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) (Kobayashi *et al.*, 1963), e incubadas a 28°C durante 20-24 h. Una vez transcurrido ese tiempo, las colonias en las placas de TCBS fueron contadas manualmente, para calcular la densidad de las células viables en la muestra (ufc/g), considerando que los vibrios no fermentadores de la sacarosa (SNFV) producen colonias verdes, mientras que los que son capaces de fermentar la sacarosa forman colonias amarillas. Las colonias formadas por SNFV son distinguibles de otras colonias pertenecientes a bacterias de otros géneros, por el tamaño y por el color, lo que permitió la clasificación de las colonias de *V. parahaemolyticus* (Hara-Kudo *et al.*, 2001). Todos los resultados son presentados por gramo de individuo, ya que todas las muestras fueron diluidas en el mismo volumen.

Cada una de las cepas aisladas y purificadas se preservaron a -80°C con el fin de realizar análisis posteriores o utilizarlas como inóculos.

### 6.3.3. Identificación bacteriana

Las cepas bacterianas aisladas que se utilizaron en el estudio experimental fueron sometidas a una batería de pruebas fisiológicas y bioquímicas (Alsina y Blanch, 1994; Farmer 3rd y Hickman-Brenner, 2006).

La movilidad celular se determinó mediante observación en fresco al microscopio a partir de una suspensión en SSS. La morfología se observó tras la realización de una tinción Gram. La prueba de la oxidasa se llevó a cabo siguiendo el método Kovacs (1956).

Para estudiar la tolerancia a la sal en relación al crecimiento de estas cepas bacterianas se utilizó TSA suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (2 y 8%). Las placas se incubaron a una temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 24-48 h.

Para estudiar la tolerancia a la temperatura se estableció un rango de temperaturas (4, 37 y  $42^\circ\text{C}$ ) de crecimiento de las bacterias en placas TSA. También se determinó la sensibilidad al agente vibriostático O/129 a  $150 \mu\text{g}$  empleando el método de difusión en agar Müeller-Hinton (Oxoid) con NaCl al 1%. Se utilizaron discos comerciales (Oxoid) y se determinó la actividad antimicrobiana mediante la lectura de los halos de inhibición después de incubar las placas a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h.

Complementariamente los microorganismos fueron identificados con el sistema comercial API 20E, de acuerdo a la metodología descrita por el fabricante, y con un esquema reducido que incluye: agar TSI y agar MIO (movilidad-indol-ornitina).

### 6.3.4. Diagnóstico molecular

En primer lugar para llevar a cabo el diagnóstico molecular y confirmar la identidad de las cepas empleadas se extrajo el DNA utilizando el kit de purificación Wizard para la purificación del DNA genómico (Promega, Wisconsin, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se ajustó la concentración de DNA a  $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  y se comenzaron a realizar las PCR de un paso.

Se comenzó con el análisis de los genes *tlh* o *toxR* (marcador de especie), y después las cepas positivas aisladas fueron analizadas para los genes *tdh* y *trh*. Para la identificación/confirmación se usaron los cebadores descritos por Bej et al. (1999) con ligeras modificaciones de la técnica según las siguientes condiciones de amplificación en el termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal, Eppendorff AG, Hamburg, Alemania): desnaturalización inicial a  $95^\circ\text{C}$  durante 8 min, seguida por 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a  $94^\circ\text{C}$ , alineamiento a  $55^\circ\text{C}$  durante 1 min, elongación a  $72^\circ\text{C}$  durante 1 min, y extensión final durante 10 min a  $72^\circ\text{C}$ .

Se incluyeron controles negativos y positivos en todas las reacciones. El control negativo fue preparado con agua libre de DNA (Sigma-Aldrich, España).

En los estudios realizados en el IRTA-SCR los dos controles positivos *tlh* fueron *tdh+* CAIM 1400, y *trh+* CAIM 1772 (Collection of Aquatic Important Microorganisms), mientras que en los estudios realizados en el Istituto Superior de Sanità de Roma se utilizaron las cepas *thd+* ATCC 43996 y *trh+* ATCC 17802 (American Type Culture Collection).

Los productos resultantes de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

### 6.3.5. Hibridación de colonias

Con el fin de confirmar la identificación molecular de las cepas por sus características patogénicas se realizó una hibridación de colonias.

Para ello se diseñaron sondas marcadas de digoxigenina basadas en las secuencias de los genes *toxR*, *tdh*, *trh1* y *trh2*. Las cepas bacterianas se sembraron en placas de TSA-2 (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y fueron incubados al menos 12 h a 37°C. La preparación de los filtros a partir de las placas y la detección colorimétrica en NBT-BCIP (nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) se llevó a cabo según el protocolo establecido (Roche Applied Science, 2009).

La hibridación se desarrolló durante 12 h a 54°C en una solución tampón de urea 6M, y se aseguró la especificidad de la reacción realizando dos lavados a 65°C.

### 6.3.6. Caracterización molecular

En primer lugar se purificaron los productos de la PCR positivos para *tdh* y *trh*, con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, California, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, y a continuación se enviaron a secuenciar bidireccionalmente a Macrogen Inc. (Tokio, Japón). Las secuencias fueron alineadas utilizando BioEdit (Hall, 1999) y analizadas utilizando el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information).

A continuación las cepas aisladas fueron caracterizadas (*fingerprint*) utilizando una PCR repetitiva extragénica palindrómica (*rep-PCR*) (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006), y los patrones de bandas electroforéticas fueron analizados con el programa GelCompar II 4.5 (Applied Maths, Bélgica). La matriz de similaridad fue calculada utilizando el coeficiente Jaccard con una tolerancia del 0,8%, y el dendograma se construyó con el algoritmo Ward.

Por último se llevó a cabo una PFGE de acuerdo con el protocolo PulseNet ligeramente modificado (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008), donde

las cepas en estudio fueron cultivadas 12 h en TSA suplementado con 2% de NaCl, y tras el crecimiento se conformaron unos bloques de parafina que fueron resuspendidos en un tampón de lisis con proteinasa K e incubados 1 h a 50°C con agitación constante. Tras la lisis se realizaron dos lavados con agua pentadestilada y cinco lavados de 10 min con 15 ml de tampón Tris-EDTA a 50°C. A continuación se realizó durante 12 h a 37°C una digestión del DNA con la endonucleasa de restricción NotI (Fermentas, Alemania) utilizando 25 U/bloque. Como marcador de peso molecular se utilizó la cepa H9812 del serovar Braenderup de *Salmonella* entérica digerida 12 h a 37°C con la enzima XbaI.

Los bloques obtenidos fueron embebidos en gel de agarosa al 1% y los fragmentos de restricción fueron analizados por PFGE con CHEF II Mapper system (Bio-Rad Laboratories, California, EE.UU.) en 0,5x Tris-borato-EDTA con tiourea 300 µM y las siguientes condiciones: 6 V/cm durante 18 h a 14°C, con pulsos de 2 a 40 s y velocidades de bombeo de 0,7 l/min. Los geles resultantes fueron teñidos con bromuro de etidio durante 25 min, aclarados en agua destilada durante 45 min y fotografiados bajo luz UV.

Los patrones de restricción obtenidos fueron analizados con el programa BioNumerics 4.0 (Applied Maths, Bélgica). El agrupamiento fue realizado utilizando el método UPGMA (*unweighted pair group method using average linkages*) y el coeficiente de correlación de Dice con una tolerancia de posición del 1,5%. Los conglomerados (*clusters*) se definieron asumiendo un valor umbral del 80% de similitud.

### 6.3.7. Susceptibilidad a antibióticos

Complementariamente se caracterizó la diferente susceptibilidad a los antibióticos de las cepas aisladas en las campañas del 2006 y 2008.

Para ello se realizaron pruebas de sensibilidad *in vitro* a los siguientes antibióticos según el test de discos de difusión realizado por duplicado (Roque *et al.*, 2009): gentamicina (10 µg), ácido oxolínico (10 µg), amoxicilina (25 µg), polimixina B (300 UI), vancomicina (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), nitrofurantoína (300 µg), doxiciclina (30 µg), ceftazidima (30 µg), estreptomina (10 µg), neomicina (30 UI), penicilina (6 µg), flumequina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), kanamicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), y sulfonamida (300 µg).

### 6.3.8. Variabilidad serológica

Finalmente las cepas se enviaron al CEFAS (Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, Weymouth, Reino Unido) para la determinación del serotipo mediante el método de aglutinación utilizando antisueros comerciales

frente a *V. parahaemolyticus* (Denka Seiken Ltd., Japón; Cosmos Biomedical Ltd, Reino Unido).

#### 6.4. Análisis estadístico

---

En primer lugar se realizó en todos los estudios una descripción de los datos obtenidos, usando la media y la desviación estándar para variables cuantitativas, como la longitud y el peso, mientras que las variables cualitativas, como el estado de depuración y la especie, fueron descritas usando frecuencias relativas. En los casos que se consideró oportuno se realizaron dichas descripciones de forma estratificada.

Antes de analizar estadísticamente las variables cuantitativas se verificó su homoscedasticidad, y por lo tanto su distribución normal, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables que no fueron homoscedásticas se transformaron logarítmicamente, en los casos que fue posible, para normalizarlas. Así pues, para las variables cuantitativas distribuidas normalmente, la comparación de las medias fue realizada usando la prueba de la t de Student para dos medias, y el ANOVA para más de dos medias, y el test post-hoc de Duncan, para evaluar la diferencia entre las medias. Cuando las variables no fueron normales, se aplicó la prueba de Mann-Whitney para la comparación de dos medias, y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de más de dos medias.

La asociación entre dos variables cuantitativas (por ejemplo, la predicción del tiempo de depuración tanto para SNFV como para SFV) fue evaluada mediante regresión lineal, usando el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para estimar su valor predictivo.

En el caso del análisis de dos variables cualitativas, la comparación de las frecuencias fue llevada a cabo usando la prueba Chi-cuadrado de Pearson (o alternativamente, la prueba Likelihood Ratio o la prueba exacta de Fisher cuando la prueba Chi-cuadrado no fue válida).

En algunos casos se realizó un análisis multivariante mediante regresión logística binaria, específicamente para determinar si la presencia o ausencia de *V. parahaemolyticus* estaba asociada tanto con variables cualitativas (especie de molusco, campaña y localización) como con variables cuantitativas (longitud de las valvas, temperatura del agua y salinidad). Se valoró tanto la significación del modelo como la significación de las variables asociadas, estimando el riesgo de cada factor mediante el odds ratio (OR) que se calculó como exponente de los coeficientes del modelo.

El error alfa deseable fue establecido en 0,05 y los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 15.0 y 17.0 para Windows (Chicago, EE.UU.).



## 7 Publicaciones

### 7.1. Detección e identificación de *V. parahaemolyticus* en el delta del Ebro y su relación intraespecífica con otros aislados de la Unión Europea

---

#### 7.1.1. Applied and Environmental Microbiology, 2009

Roque A, Lopez-Joven C, Lacuesta B, Elandaloussi L, Wagley S, Furones MD, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Rangdale R, Gomez-Gil B. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(23):7574-7577.

#### Resumen del artículo en castellano

**Detección e identificación de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* *tdh* y *trh* positivas en cuatro especies de moluscos bivalvos cultivados en la costa mediterránea española**

En este estudio se presentan los primeros datos publicados que describen la detección de cepas potencialmente patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de bivalvos cultivados en la costa del mediterráneo, y se proporcionan datos sobre la presencia de cepas aisladas *tdh* y *trh* positivas. Se aislaron cepas de *V. parahaemolyticus* potencialmente diarreicas de las cuatro especies de bivalvos recolectadas de ambas bahías del delta del Ebro, España.





## Detection and Identification of *tdh*- and *trh*-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Four Species of Cultured Bivalve Molluscs on the Spanish Mediterranean Coast<sup>∇</sup>

Ana Roque,<sup>1\*</sup> Carmen Lopez-Joven,<sup>1,2</sup> Beatriz Lacuesta,<sup>1</sup> Laurence Elandaloussi,<sup>1</sup>  
Sariqa Wagley,<sup>3</sup> M. Dolores Furones,<sup>1</sup> Imanol Ruiz-Zarzuola,<sup>2</sup> Ignacio de Blas,<sup>2</sup>  
Rachel Rangdalc,<sup>3</sup> and Bruno Gomcz-Gil<sup>4</sup>

IRTA—Sant Carles de la Rápita, Catalonia, Spain<sup>1</sup>; Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain<sup>2</sup>;  
Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science, Dorset, United Kingdom<sup>3</sup>; and CIAD—Mazatlan Unit,  
Mazatlan, Sinaloa, Mexico<sup>4</sup>

Received 6 April 2009/Accepted 28 September 2009

**Presented here is the first report describing the detection of potentially diarrheal *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from cultured bivalves on the Mediterranean coast, providing data on the presence of both *tdh*- and *trh*-positive isolates. Potentially diarrheal *V. parahaemolyticus* strains were isolated from four species of bivalves collected from both bays of the Ebro delta, Spain.**

Gastroenteritis caused by *Vibrio parahaemolyticus* has been reported worldwide, though only sporadic cases have been reported in Europe (7, 14). The bacterium can be naturally present in seafood, but pathogenic isolates capable of inducing gastroenteritis in humans are rare in environmental samples (2 to 3%) (15) and are often not detected (10, 19, 20).

The virulence of *V. parahaemolyticus* is based on the presence of a thermostable direct hemolysin (*tdh*) and/or the thermostable direct hemolysin-related gene (*trh*) (1, 5). Both are associated with gastrointestinal illnesses (2, 9).

Spain is not only the second-largest producer in the world of live bivalve molluscs but also one of the largest consumers of bivalve molluscs, and Catalonia is the second-most important bivalve producer of the Spanish Autonomous Regions. Currently, the cultivation of bivalves in this area is concentrated in the delta region of the Ebro River. The risk of potentially pathogenic *Vibrio* spp. in products placed on the market is not assessed by existing legislative indices of food safety in the European Union, which emphasizes the need for a better knowledge of the prevalence of diarrheal vibrios in seafood products. The aim of this study was to investigate the distribution and pathogenic potential of *V. parahaemolyticus* in bivalve species exploited in the bays of the Ebro delta.

Thirty animals of each species of *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ruditapes decussatus*, and *Ruditapes philippinarum* were collected. They were sampled from six sites of the culture area, three in each bay of the Ebro River delta, at the beginning (40°37'112"N, 0°37'092"E [Alfacs]; 40°46'723"N, 0°43'943"E [Fangar]), middle (40°37'125"N, 0°38'570"E [Alfacs]; 40°46'666"N, 0°45'855"E [Fangar]), and end (40°37'309"N, 0°39'934"E [Alfacs]; 40°46'338"N, 0°44'941"E [Fangar]) of the culture polygon. Clams were sampled from only one site per

bay as follows: in the Alfacs Bay from a natural bed of *R. decussatus* (40°37'44"N, 0°38'0"E) and in the Fangar Bay from an aquaculture bed of *R. philippinarum* (40°47'3"N, 0°43'8"E). In total, 367 samples were analyzed in 2006 (180 oysters, 127 mussels, 30 carpet shell clams, and 30 Manila clams) and 417 samples were analyzed in 2008 (178 oysters, 179 mussels, 30 carpet shell clams, and 30 Manila clams).

All animals were individually processed and homogenized, and 1 ml of the homogenate was inoculated into 9 ml of alkaline peptone water (Scharlau, Spain). Following a 6-h incubation at 37°C, one loopful of the contents of each tube of alkaline peptone water was streaked onto CHROMagar vibrio plates (CHROMagar, France) and incubated for 18 h at 37°C. Mauve-purple colonies were purified, and each purified isolate was cryopreserved at –80°C (135 isolates in 2006 and 96 in 2008). From the initial homogenate portion, 100 µl was inoculated onto marine agar (Scharlau, Spain) and onto thiosulfate citrate-bile salts-sucrose agar (Scharlau, Spain) for total heterotrophic marine bacteria counts and total vibrio counts, respectively (Table 1).

Total DNA was extracted from each purified isolate using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega), following the instructions of the manufacturer. A one-step PCR analysis was performed to identify/confirm which isolates were *tdh* positive (species marker for *V. parahaemolyticus*). Further detection of the *tdh* or *trh* gene was carried out on all positive *tdh* strains. All PCR analyses were carried out using the primers described by Bej et al. (2) with the following amplification conditions on the thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal): an initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of a 1-min denaturation at 94°C, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min, and a final extension of 10 min at 72°C. Positive and negative controls were included in all reaction mixtures: two positive controls, *tdh* and *trh* CAIM 1400 and *trh* CAIM 1772 (Collection of Aquatic Important Microorganisms [http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html]), and negative control DNA-free molecular grade water (Sigma-Aldrich,

\* Corresponding author. Mailing address: IRTA—Sant Carles de la Rápita, Crta. Poble Nou, km 5.5, 43540 Sant Carles de la Rápita, Catalonia, Spain. Phone: 34 977745427. Fax: 34 977744138. E-mail: Ana.Roque@irta.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 2 October 2009.

TABLE 1. *Vibrio parahaemolyticus* isolates, serotypes, and origins and total number of vibrios/heterotrophic bacteria contained in the bivalve<sup>a</sup>

Isolate	Date of collection	Organism and site of origin	Temp (°C)	Salinity (‰)	Gene(s)	Serotype	Bacterial count using indicated medium (CFU ml <sup>-1</sup> )	
							TCBS agar	Marine agar
I745	8 August 2006	Mg-F	24.5	37	<i>tdh</i>	ND	1.5 × 10 <sup>4</sup>	1.2 × 10 <sup>4</sup>
I793	14 August 2006	Cg-A	25	35	<i>tdh</i>	ND	9.2 × 10 <sup>2</sup>	8.5 × 10 <sup>3</sup>
I805	14 August 2006	Cg-A	25	35	<i>tdh</i>	O2:KUT	7.2 × 10 <sup>2</sup>	9 × 10 <sup>3</sup>
I806	14 August 2006	Cg-A	25	35	<i>tdh</i> and <i>trh</i>	O3:K33	1.9 × 10 <sup>3</sup>	4.6 × 10 <sup>3</sup>
I809	14 August 2006	Cg-A	25	35	<i>tdh</i>	O2:K28	8 × 10 <sup>4</sup>	7.3 × 10 <sup>2</sup>
I678	4 July 2006	Rd-A	28.6	36	<i>tdh</i>	O2:K28	3.1 × 10 <sup>5</sup>	2.5 × 10 <sup>5</sup>
I628	4 July 2006	Rd-A	28.6	36	<i>tdh</i>	O4:KUT	2.9 × 10 <sup>4</sup>	8.4 × 10 <sup>4</sup>
I775	8 August 2006	Cg-A	24.5	37	<i>tdh</i>	ND	4.21 × 10 <sup>3</sup>	1.1 × 10 <sup>4</sup>
I691	4 July 2006	Rd-A	28.6	36	<i>trh</i>	O1:K32	2.2 × 10 <sup>5</sup>	2.6 × 10 <sup>5</sup>
I712	27 July 2006	Mg-A	29.4	35.5	<i>trh</i>	O1:KUT	8.6 × 10 <sup>3</sup>	8.4 × 10 <sup>3</sup>
I765	8 August 2006	Cg-F	24.5	37	<i>trh</i>	O4:K34	1 × 10 <sup>4</sup>	Uncountable
I980	22 July 2008	Cg-A	26.7	33.5	<i>tdh</i>	O1:K32	2.7 × 10 <sup>4</sup>	1.3 × 10 <sup>4</sup>
I981	22 July 2008	Cg-A	26.7	33.5	<i>trh</i>	O1:KUT	1 × 10 <sup>4</sup>	2.2 × 10 <sup>4</sup>
I993	22 July 2008	Cg-A	26.7	33.5	<i>tdh</i>	O5:K17	3 × 10 <sup>3</sup>	1.1 × 10 <sup>4</sup>
I994	29 July 2008	Mg-A	27.7	37	<i>trh</i>	O3:KUT	3.4 × 10 <sup>3</sup>	7 × 10 <sup>3</sup>
I1031	5 August 2008	Cg-F	27.7	37	<i>tdh</i>	O5:KUT	5.5 × 10 <sup>4</sup>	3.3 × 10 <sup>4</sup>
I1034	5 August 2008	Cg-F	27.7	37	<i>tdh</i>	O3:KUT	8.7 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
I1040	5 August 2008	Cg-F	27.7	37	<i>tdh</i>	O3:KUT	1.6 × 10 <sup>4</sup>	3.2 × 10 <sup>4</sup>
I1042	5 August 2008	Cg-F	27.7	37	<i>tdh</i> and <i>trh</i>	ND	2.8 × 10 <sup>4</sup>	3 × 10 <sup>4</sup>
I1050	5 August 2008	Cg-F	27.7	37	<i>tdh</i>	O1:KUT	4.7 × 10 <sup>4</sup>	7.3 × 10 <sup>4</sup>
I1063	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O3:KUT	7.9 × 10 <sup>4</sup>	1.4 × 10 <sup>4</sup>
I1065	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O2:KUT	2.2 × 10 <sup>3</sup>	1.2 × 10 <sup>4</sup>
I1068	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O5:KUT	2.6 × 10 <sup>4</sup>	5.2 × 10 <sup>4</sup>
I1069	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O3:KUT	2.4 × 10 <sup>3</sup>	5.3 × 10 <sup>4</sup>
I1073	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O5:KUT	2.3 × 10 <sup>3</sup>	7.5 × 10 <sup>3</sup>
I1074	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O3:KUT	7.6 × 10 <sup>4</sup>	6.9 × 10 <sup>4</sup>
I1077	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	O4:KUT	1.7 × 10 <sup>3</sup>	1.6 × 10 <sup>3</sup>
I1079	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>trh</i>	O3:KUT	2.5 × 10 <sup>3</sup>	1.1 × 10 <sup>4</sup>
I1092	20 August 2008	Mg-F	25.9	36	<i>tdh</i>	ND	1.7 × 10 <sup>3</sup>	1.6 × 10 <sup>3</sup>
I1130	25 August 2008	Rd-A	26.4	35	<i>tdh</i>	ND	1.7 × 10 <sup>4</sup>	3.8 × 10 <sup>4</sup>
I1143	25 August 2008	Rd-A	26.4	35	<i>tdh</i>	ND	1.1 × 10 <sup>4</sup>	1.9 × 10 <sup>4</sup>
I1165	25 August 2008	Rd-A	26.4	35	<i>trh</i>	O2:KUT	4.4 × 10 <sup>4</sup>	6.8 × 10 <sup>4</sup>
I1133	25 August 2008	Rp-F	25.5	36.5	<i>tdh</i>	ND	3.4 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
I1134	25 August 2008	Rp-F	25.5	36.5	<i>tdh</i>	ND	3.9 × 10 <sup>4</sup>	5.8 × 10 <sup>4</sup>
I1158	25 August 2008	Rp-F	25.5	36.5	<i>trh</i>	O4:KUT	6.6 × 10 <sup>4</sup>	4.7 × 10 <sup>4</sup>
I1161	25 August 2008	Rp-F	25.5	36.5	<i>trh</i>	O3:KUT	2.2 × 10 <sup>4</sup>	6.6 × 10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup> Mg, *Mytilus galloprovincialis*; Cg, *Crassostrea gigas*; Rd, *Ruditapes decussatus*; Rp, *R. philippinarum*; A, Alfacs; F, Fangar; ND, not determined; TCBS, thiosulfate citrate-bile salts-sucrose.

Spain). Expected amplicons were visualized in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

Fifty-eight isolates contained the gene *tl* in 2006 and 96 in 2008, which confirmed their identity as *V. parahaemolyticus*. In 2006, the distribution of the 58 isolates was as follows: 7 from 127 mussels, 34 from 180 oysters, and 17 from 30 *R. decussatus* clams. No *tl*-positive isolates were found in *R. philippinarum*. PCR analysis of the *tl*-positive isolates for the presence of the *tdh* or *trh* gene indicated that eight isolates contained the *tdh* gene and four contained the *trh* gene. In 2008, the source of the confirmed *V. parahaemolyticus* isolates was as follows: 31 from 88 oysters, 44 from 89 mussels, 9 from 30 *R. decussatus* clams, and 12 from 30 *R. philippinarum* clams. Of these, 17 were found to contain the *tdh* gene and 7 contained the *trh* gene. Two isolates (I806 and I1042) contained both toxigenic genes, *tdh* and *trh*.

Putative *tdh*- and *trh*-positive PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and were sequenced bidirectionally by Macrogen Inc. Sequences were aligned using BioEdit (8) and analyzed using BLAST (National Center for Biotech-

nology Information). None of the toxigenic isolates was found positive by PCR analysis for the presence of open reading frame 8 of the phage 237 (16), a marker for the pandemic strain O3:K6.

The isolates were fingerprinted by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) as described previously (3), and the resulting electrophoretic band patterns were analyzed with the GelCompar II software (v4.5; Applied Maths). The similarity matrix was calculated with the Jaccard coefficient with a band position tolerance of 0.8%, and the dendrogram was constructed with the Ward algorithm. A high level of genomic diversity was found among the 32 toxigenic isolates characterized by rep-PCR. Three clonal groups were identified (those having identical rep-PCR band patterns) (Fig. 1a to c).

In vitro antibiotic susceptibility tests were performed using the diffusion disc test following a previously described protocol (18). The antibiotics used were gentamicin (10 µg), oxolinic acid (10 µg), amoxicillin (25 µg), polymyxin B (300 UI), vancomycin (30 µg), trimethoprim sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), nitrofurantoin (300 µg), doxycycline (30 µg), ceftazidime (30 µg), streptomycin (10 µg), neomycin (30 UI), penicillin (8

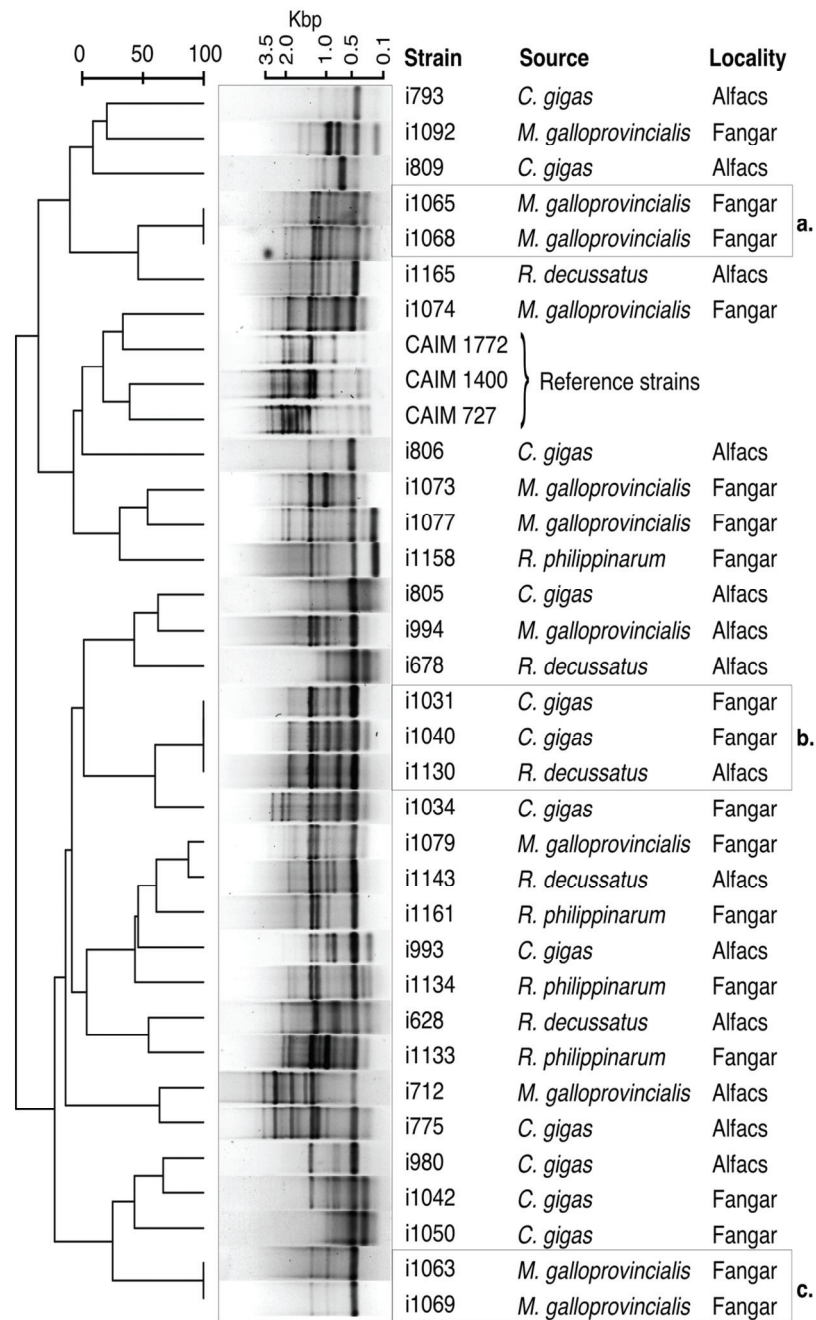


FIG. 1. rep-PCR dendrogram of toxigenic isolates of *V. parahaemolyticus* isolated in the Ebro delta. Letters denote clonal groups of isolates.

$\mu\text{g}$ ), flumequine (30  $\mu\text{g}$ ), tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ), ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ), kanamycin (30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ), and sulfonamide (300  $\mu\text{g}$ ). All tests were performed in duplicate. A Student *t* test for two samples with unequal variance was performed to compare the sensitivity of all 2006 isolates against the sensitivity of 2008 isolates for each antibiotic (Microsoft Office Excel 97-2003). Antibiogram results revealed a lower susceptibility in 2008 than in 2006, indicating a possible shift in overall susceptibility. Results from the *t* test indicated that significantly lower susceptibility in 2008 was detected ( $P \leq 0.05$ ;  $n = 36$ ) for the

following antibiotics: vancomycin, polymyxin B, ampicillin, amoxicillin, gentamicin, neomycin, trimethoprim sulfamethoxazole, nitrofurantoin, doxycycline, ceftazidime, tetracycline, flumequine, and ciprofloxacin.

The serological types for 27 strains were determined by the agglutination method using commercially available *V. parahaemolyticus* antisera (Denka Seiken Ltd.; Cosmos Biomedical Ltd, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. Potentially toxigenic *V. parahaemolyticus* isolates collected in 2006 were serologically heterogeneous (8 out of the



11 isolates) (Table 1). In isolates collected in 2008, results were more homogenous, with seven serotypes found among 19 isolates analyzed. The O3:K6 serotype was not detected in any of the strains analyzed, in agreement with the open reading frame 8 PCR results.

The present study is the first to report the detection of potentially diarrheal *V. parahaemolyticus* strains isolated from cultured bivalves on Spanish Mediterranean coasts, providing data on the presence of both *tdh*- and *trh*-positive isolates. *V. parahaemolyticus* has previously been detected in several European countries (4, 13, 21, 22). A recent study carried out in Spain detected *tdh*-positive *V. parahaemolyticus* strains from patients who had consumed fresh oysters in a market in Galicia on the Atlantic coast of Spain (12) and potentially pathogenic *V. parahaemolyticus* strains have also been reported in France (17). These studies indicate that the risk of infections caused by *V. parahaemolyticus* in Europe is low compared to that in America or Asia (15). However, this risk could have been underestimated, since *V. parahaemolyticus* is not included in the current European surveillance programs, such as the European Network for Epidemiological Surveillance and Control of Communicable Diseases.

Toxigenic *V. parahaemolyticus* strains detected in this study were genomically and serologically heterogeneous. The pandemic serotype O3:K6 was not detected, and although attempts to isolate O3:K6 from the environment and from seafood have not always been successful in previous studies reviewed by Nair and coauthors (15), this finding seems to be in agreement with the fact that no outbreak of diarrhea was observed in the area. Interestingly, isolates I806 and I1042 have been found positive for both *tdh* and *trh* in PCR tests. The coexistence of *tdh* and *trh* genes has already been reported in isolates from Japan, the United States, and Mexico (3, 6, 11, 19, 23). To our knowledge, no occurrence of an environmental isolate positive for both *tdh* and *trh* had previously been reported in Europe. All isolates tested were slightly different in their antibiotic resistance profiles. Typically, a high level of resistance could be determined. The detection of *tdh*- and/or *trh*-positive *V. parahaemolyticus* strains for the first time on the Mediterranean coast emphasizes the need to monitor for the presence of potentially diarrheal vibrios and bacterial gastroenteritis, and these data should be taken into consideration to revise the European legislation on the requirements for shellfish harvested for consumption in order to include the surveillance of these pathogens in Europe.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The following nucleotide sequence accession numbers were deposited in GenBank: EU908021 (*tdh* I628), EU908022 (*tdh* I678), EU908023 (*tdh* I775), EU908024 (*tdh* I793), EU908025 (*tdh* I805), EU908026 (*tdh* I806), EU908027 (*tdh* I809), EU908028 (*tdh* I745), EU982193 (*trh* I712), and EU982194 (*trh* I806).

The present study was financed by INIA (Spanish Ministry of Education and Science) project numbers RTA-2005-00079-00-00 and RTA-2008-00063-00-00, awarded to A.R. C.L.-J. has a doctoral scholarship provided by INIA. B.G.-G. was awarded two visiting grants, one by MEC, Spain (October 2007–February 2008) and one by CONACYT, Mexico (September 2008–August 2009).

We are grateful to Josep Maria Reverte and the staff from the USM at IRTA for the sample collection and to Margarita Fernández and Jorge Diogene for the environmental data.

## REFERENCES

- Abbott, S. L., C. Powers, C. A. Kaysner, Y. Takeda, M. Ishibashi, S. W. Joseph, and J. M. Janda. 1989. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 27:2891–2893.
- Bej, A. K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* 36:215–225.
- Cabanillas-Beltrán, H., E. Llausás-Magaña, R. Romero, A. Espinoza, A. García-Gasca, M. Nishibuchi, M. Ishibashi, and B. Gómez-Gil. 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:76–80.
- Croci, L., P. Serratore, L. Cozzi, A. Stacchini, S. Milandri, E. Suffredine, and L. Toti. 2001. Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:57–61.
- DePaola, A., and C. A. Kaysner. 2001. *Vibrio*, p. 405–428. In F. P. Downes and K. Ito (ed.), *Compendium of methods for microbiological examination of food*. American Public Health Association, Washington, DC.
- DePaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, and D. W. Cook. 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1521–1526.
- Geneste, C., W. Dab, P. A. Cabanes, V. Vaillant, M. L. Quilici, and J. M. Fournier. 2000. Les vibrioses non-cholériques en France: cas identifiés de 1995 à 1998 par le Centre National de Référence. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* 9:38–40.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Honda, S., I. Goto, I. Minematsu, N. Ikeda, N. Asano, M. Ishibashi, Y. Kinoshita, N. Nishibuchi, T. Honda, and T. Miwatani. 1987. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet* i:331–332.
- Honda, T., and T. Iida. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev. Med. Microbiol.* 4:106–113.
- Kaysner, C. A., C. Abeyta, Jr., R. F. Stott, J. L. Lilja, and M. M. Wekell. 1990. Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:904–907.
- Lozano-León, A., J. Torres, C. R. Osorio, and J. Martínez-Urtaza. 2003. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.* 226:281–284.
- Macián, M. C., C. R. Arias, R. Aznar, E. Garay, and M. J. Pujalte. 2000. Identification of *Vibrio* spp. (other than *Vibrio vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *Int. Microbiol.* 3:51–53.
- Martínez-Urtaza, J., A. Lozano-León, A. DePaola, M. Ishibashi, K. Shimada, M. Nishibuchi, and E. Liebana. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42:4672–4678.
- Nair, G. B., T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, and D. A. Sack. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:39–48.
- Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K. S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2156–2161.
- Robert-Pillot, A., A. Guenole, J. Lesne, R. Delesmont, J. M. Fournier, and M. L. Quilici. 2004. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two France coastal areas and from seafood imported into France. *Int. J. Food Microbiol.* 91:319–325.
- Roque, A., A. Molina, C. Bolán, and B. Gómez-Gil. 2001. *In vitro* susceptibility of *Vibrio* isolates isolated from penaeid shrimp in Northwest Mexico to 15 antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:383–387.
- Shirai, H., H. Ito, T. Hirayama, Y. Nakamoto, N. Nakabayashi, K. Kumagai, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect. Immun.* 58:3568–3573.
- Takeda, Y. 1982. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacol. Ther.* 19:123–146.
- Tilburg, J. J. H. C., J. T. M. Zwartkruis-Nahuis, D. van den Berkmortel, J. Rombout, K. M. Jonker, and E. de Boer. 2000. Presence of *Vibrio* species in shellfish. Report of the Inspectorate for Health Protection and Veterinary Public Health, Zutphen, The Netherlands.
- Urdaci, M. C., M. Marchand, and P. A. Grimont. 1988. Espèces du genre *Vibrio* associées aux produits marins du bassin d'Arcachon. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 139:351–362.
- Xu, M., T. Iida, K. Yamamoto, Y. Takarada, T. Miwatani, and T. Honda. 1994. Demonstration and characterization of simultaneous production of a thermostable direct hemolysin (TDH/I) and a TDH-related hemolysin (TRHx) by a clinically isolated *Vibrio parahaemolyticus* strain, TH3766. *Infect. Immun.* 62:166–171.

### 7.1.2. ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology (en revisión)

Lopez-Joven C, de Blas I, Roque A. Spatial distribution and temporal evolution of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscs from the Spanish Mediterranean Coast. ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology (manuscrito en revisión).

#### Resumen del artículo en castellano

##### **Distribución espacial y evolución temporal de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos cultivados en la costa mediterránea española**

*Vibrio parahaemolyticus* es un patógeno reconocido de los seres humanos. En este contexto y para comprender mejor la ecología de la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* en el medio ambiente, se realizó un estudio sobre la prevalencia de esta variante (*tdh+* y/o *trh+*) frente a la variante no patogénica (portadora de *tlh+* como marcador de especie para *V. parahaemolyticus*) en moluscos bivalvos cultivados en dos bahías en Cataluña, España. En general, la prevalencia de *V. parahaemolyticus* en ambas bahías fue más baja (porcentaje de muestras positivas 14,2%) que los datos de prevalencia existentes en otros estudios de hábitats similares y fue significativamente dependiente de la bahía de muestreo, del año, y de las especies de bivalvos. De hecho, *Ruditapes decussatus* fue el hospedador/reservorio principal de este patógeno en los dos ambientes muestreados. La variante patogénica de *V. parahaemolyticus* fue detectada en el 3,8% de las muestras (56/1459), es decir, la proporción de bivalvos contaminados por *V. parahaemolyticus* patogénicos fue de 27,1%. Además, la presencia de la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* se correlacionó significativamente con la salinidad del agua, de forma que el riesgo de encontrar *V. parahaemolyticus* patógeno (*tdh+* y/o *trh+*) disminuyó 1,45 veces por cada unidad que se incrementaba la salinidad (ppt). Este hallazgo sugiere que las cepas portadoras de potenciales genes de virulencia son más sensibles a la salinidad. Sin embargo, esta es una observación, y hasta nuestro conocimiento, ningún estudio publicado ha contrastado este hecho. En cualquier caso, estos resultados podrían explicar el bajo número de casos de enfermedades gastrointestinales en esta área. Además, los resultados del presente estudio aportan datos para el análisis cuantitativo de riesgos.





<b>Manuscript #</b>	ISMEJ-12-002160A
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	29th Mar 12 07:16:21
<b>Current Stage</b>	Under Review
<b>Title</b>	Prevalences of pathogenic and nonpathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in molluscs from the Spanish Mediterranean Coast
<b>Running Title</b>	Prevalence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in bivalves
<b>Manuscript Type</b>	Original Article
<b>Category</b>	Microbe-microbe and microbe-host interactions
<b>Corresponding Author</b>	Dr. Ana Roque (IRTA- SCR)
<b>Contributing Authors</b>	Miss Carmen Lopez-Joven , Dr. Ignacio de Blas
<b>Abstract</b>	<p><i>Vibrio parahaemolyticus</i> is a well recognized pathogen of humans. To better understand the ecology of the human-pathogenic variant of <i>V. parahaemolyticus</i> in the environment, a study on the prevalence of the pathogenic variant (<i>tdh+</i> and/or <i>trh+</i>) versus the nonpathogenic one (only <i>tlh+</i> as species marker for <i>V. parahaemolyticus</i>) in bivalves was performed in two bays in Catalonia, Spain. In general, the prevalence of <i>V. parahaemolyticus</i> in both environments was lower than that reported for similar habitats in other studies (percentage of positive samples 14.2%) and was significantly dependent on the sampling point, on the sampling year, and on the species of the bivalve. In fact, <i>Ruditapes</i> spp. was the main reservoir for this pathogen in all the sampled environments. Pathogenic <i>V. parahaemolyticus</i> could be detected in 3.8% of the samples (56 /1459), meaning the proportion of bivalves infected by <i>V. parahaemolyticus</i> which contained pathogenic strains was 27.1%. Presence of pathogenic <i>V. parahaemolyticus</i> (<i>thr+</i>) was significantly correlated with water salinity, and the probability of finding pathogenic <i>V. parahaemolyticus</i> decreased 1.45 times with every salinity unit (ppt) increased. This finding suggesting that strains carrying potential virulence genes are more sensitive to salinity. However, this is an observation and no study was found in the literature reporting this fact. Nevertheless, these results could explain the low number of cases of gastrointestinal illness in this area. Results of the present study contribute with data for quantitative risk analysis.</p>
<b>Keywords</b>	bivalves, potentially pathogenic environmental <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , Ebro delta, prevalence, human health

### Manuscript Tasks

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Check Status](#)

### Manuscript Items

1. Author Cover Letter [PDF \(36KB\)](#) [Source File \(PDF\) 35KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 3 Figure files. [PDF \(6094KB\)](#)
  - a. Article File [PDF \(205KB\)](#) [Source File \(DOC\) 199KB](#)
  - b. Figure 1 [PDF \(3479KB\)](#) [Source File \(TIF\) 3389KB](#)
  - c. Figure 2 [PDF \(1248KB\)](#) [Source File \(TIF\) 707KB](#)
  - d. Figure 3 [PDF \(1255KB\)](#) [Source File \(TIF\) 695KB](#)



**Prevalences of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in molluscs from the Spanish Mediterranean Coast**

**Running title: Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalves**

Carmen Lopez-Joven <sup>1,2</sup>, Ignacio de Blas <sup>2</sup>, and Ana Roque <sup>1\*</sup>

IRTA-SCR, Ctra. Poble Nou km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain<sup>1</sup>;

Laboratory of Fish Diseases, Veterinary Faculty, Universidad de Zaragoza, c/ Miguel

Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain<sup>2</sup>.

---

\* Corresponding author. Mailing address: IRTA- SCR, Crta. Poble Nou, Km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain. Phone: (+34) 977745427. Fax: (+34) 977744138. E-mail: ana.roque@irta.cat.

## Abstract

*Vibrio parahaemolyticus* is a well recognized pathogen of humans. To better understand the ecology of the human-pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* in the environment, a study on the prevalence of the pathogenic variant (*tdh+* and/or *trh+*) versus the nonpathogenic one (only *tlh+* as species marker for *V. parahaemolyticus*) in bivalves was performed in two bays in Catalonia, Spain.

In general, the prevalence of *V. parahaemolyticus* in both environments was lower than that reported for similar habitats in other studies (percentage of positive samples 14.2%) and was significantly dependent on the sampling point, on the sampling year, and on the species of the bivalve. In fact, *Ruditapes* spp. was the main reservoir for this pathogen in all the sampled environments.

Pathogenic *V. parahaemolyticus* could be detected in 3.8% of the samples (56 /1459), meaning the proportion of bivalves infected by *V. parahaemolyticus* which contained pathogenic strains was 27.1%. Presence of pathogenic *V. parahaemolyticus* (*trh+*) was significantly correlated with water salinity, and the probability of finding pathogenic *V. parahaemolyticus* decreased 1.45 times with every salinity unit (ppt) increased. This finding suggesting that strains carrying potential virulence genes are more sensitive to salinity. However, this is an observation and no study was found in the literature reporting this fact. Nevertheless, these results could explain the low number of cases of gastrointestinal illness in this area. Results of the present study contribute with data for quantitative risk analysis.

Keywords: bivalves/ Ebro delta/ human health/ potentially pathogenic environmental *Vibrio parahaemolyticus*/ prevalence

## Introduction

*Vibrio parahaemolyticus* is a common halophilic bacterium present naturally in marine and estuarine water worldwide (Kaneko and Colwell, 1975; Martinez-Urtaza et al., 2011). This bacterium can be naturally present in seafood, however pathogenic isolates are rare in environmental samples (2 to 3%) and are often not detected (Nair et al., 2007). However, in warm waters (>25°C) proportion of bivalves contaminated by pathogenic *V. parahaemolyticus* could be higher than 10% (DePaola et al., 2003). Its virulence is based on the presence of a thermostable direct haemolysin (TDH, *tdh* gene) and/or a thermostable direct haemolysin related (TRH, *trh* gene) (Honda and Iida, 1993; Oliver and Kaper, 2007; Shirai et al., 1990; Takeda, 1982). Relationship between bivalves and *V. parahaemolyticus* has got a special interest, since bivalves feed directly from the surrounding waters with bacteria that were accumulated in gills and digestive glands, thus making them potential vectors for many pathogens (Potasman and Odeh, 2002). Furthermore, *V. parahaemolyticus* has one of the shortest generation times of any bacteria (<10 min) (Twedt and Novelli, 1971). So the consumption of raw or undercooked contaminated seafood may lead to the transmission of this bacterium to humans (Deter, 2010).

Though, few cases of gastroenteritis by *V. parahaemolyticus* have been reported in Europe, and only two of them has been reported in Spain (Martinez-Urtaza et al., 2004; Sala et al., 2009), there is growing concern that non-cholera vibrios may represent an important and increasing clinical problem within European context (Baker-Austin et al., 2010). In fact, in Europe probably diarrhoea cases are underreported because no severe problems occur. However, diarrhoea is not a healthy status, and preventive microbiology contributes to informed decision making, protecting people from infections.

Spain is the second-largest producer in the world of live bivalves and also one of the largest consumers of bivalves. Catalonia is the second-most important bivalve producer of the Spanish Autonomous Regions, and production is concentrated in two bays (Alfacs and Fangar) in the delta of the Ebro river, where it represents one of the most important economic activities. Salinity, temperature and pH moderately alkaline of the two bays support the growth of vibrios; annual temperature varies between 7 and 31°C and salinity from 16 to 38 ‰ in Alfacs Bay and temperature varies from 6 to 30°C and salinity from 21 to 38 ‰ in Fangar Bay. The four main species harvested are Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and two species of clam: grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*) and Manila clam (*R. philippinarum*). The risk of potentially pathogenic *Vibrio* spp. in products placed on the market is not assessed by existing legislative framework related to food safety in the European Union, which emphasizes the need for a better knowledge of the prevalence of diarrheal vibrios in seafood products (European Commission, 2001).

Present study seeks to examine the spatial distribution and temporal changes of the total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in Ebro delta, Spain. The aims of this study were to investigate the prevalence and distribution of *V. parahaemolyticus* in bivalves in the two bays of Ebro delta, and to determine its relationship with environmental parameters (temperature and salinity) from the surrounding waters during the months of July and August (when temperature is higher).

## **Materials and Methods**

### *Sampling sites and collection samples*

From 2006 to 2010, four surveillance campaigns, designed as cross-sectional studies, for pathogenic *V. parahaemolyticus* detection in commercial bivalves from the Ebro delta bays (Fig. 1) were carried out.

Thirty bivalve molluscs were harvested per sampling point in order to detect a minimum expected prevalence of 10% with a confidence level of 95%. However, number of sampling points was changing sometimes along the study attending to different reasons (basically economic and logistic reasons) (Table 1).

Unfortunately, during the year 2007 the surveillance program did not carry out due to lack of budget. For oysters and mussels, samples were collected in production units (*bateas* or floating platforms with subtidal ropes) from ropes, while clams were sampled in one point in one culture area in each bay.

Furthermore, some deviations in sample sizes from surveillance scheme were originated as consequence of low number of adult specimens for collection, and a total of 709 and 750 bivalves were sampled from Alfacs and Fangar bays, respectively. From Alfacs bay, 283 were oysters (*C. gigas*), 306 were mussels (*M. galloprovincialis*) and 120 clams (*Ruditapes* spp.) were processed. And, from Fangar, 330 oysters, 300 were mussels and 120 clams were processed. Similar batches for each species (*M. galloprovincialis*, *C. gigas* and *Ruditapes* spp.) were harvested for each year of study. Sampled oysters were 180, 178, 180, and 120 in 2006, 2008, 2009 and 2010, respectively. Samples of mussels were 127, 179, 180 and 120 in 2006, 2008, 2009 and 2010, respectively, and for clams were 60 for each campaign.

Mussel and oysters were sampled from six sites of the culture area, three on each bay, at the beginning (N 40°37'112"E0°37'092"-Alfacs; N40°46'723"E0°43'943"-Fangar), middle (N 40°37'125"E0°38'570"-Alfacs; N40°46'666"E0°45'855"-Fangar) and end (N 40°37'309"E0°39'934"-Alfacs; N40°46'338"E0°44'941"-Fangar) of the culture

polygons. Clams were sampled from only one site per bay, in the Alfacs bay from a natural bed of *R. decussatus* (N40°37'44"E0°38'0") and in the Fangar bay from an aquaculture bed of *R. philippinarum* (N40°47'3"E0°43'8"). All bivalves were collected in July and August of each sampling year. Bivalves were transported in cool conditions. Transport lasted less than 1 hour in all occasions.

Temperature and salinity data were recorded using a CTD datalogger (Seabird, USA) located in the centre of each bay at a depth of 2 m and recording data every 60 minutes.

### *Microbiological analysis*

Microbiological analysis was carried out as is described by Roque et al. (2009). All animals were individually processed and homogenized, and 1 ml of the homogenate was inoculated into 9 ml of alkaline peptone water (Scharlau, Spain). Following a 6-h incubation at 37°C, one loopful of the contents of each tube of alkaline peptone water was streaked onto CHROMagar vibrio plates (CHROMagar, France) and incubated for 18 h at 37°C. Mauve-purple colonies were purified, and each purified isolate was cryopreserved at -80°C. DNA extraction, test conditions and controls are also described in Roque et al. (2009). Total DNA was extracted from each purified isolate using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA), following the instructions of the manufacturer. A one-step PCR analysis was performed to identify/confirm which isolates were *tlh* positive (species marker for *V. parahaemolyticus*). Further detection of the *tdh* or *trh* gene was carried out on all positive *tlh* strains. All PCR analyses were carried out using the primers described by Bej et al. (1999) with the following amplification conditions on the thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal): an initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of a 1-min denaturation at 94°C, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72° for 1 min, and a final extension of

10 min at 72°C. Positive and negative controls were included in all reaction mixtures: two positive controls, *tlh* and *tdh* CAIM 1400 and *trh* CAIM 1772 (Collection of Aquatic Important Microorganisms [<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>]), and negative control DNA-free molecular grade water (Sigma-Aldrich, Spain). Expected amplicons were visualized in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

### *Statistical analysis*

Influence of species of mollusc, location (Alfacs or Fangar) and year of study on prevalences (proportion of molluscs infected by *V. parahaemolyticus*) was assessed by Pearson's Chi-Square test.

A logistic regression analysis was performed using *V. parahaemolyticus* contamination as dependent variable and year, location, mollusc species, salinity and temperature as independent variables. Forward stepwise method was applied, and significance of the model was evaluated with omnibus test. Using coefficients of the model (Bx) Odds Ratio ( $OR=e^{Bx}$ ) were calculated to identify significant risk factors.

Desired alpha error was established at 0.05. Statistic analysis was performed using SPSS 17.0 software (Chicago, IL, USA).

All data collected represents data points and not a continuous variable.

## **Results**

A thousand four hundred and fifty nine bivalve molluscs were processed during four surveillance campaigns in the Alfacs and Fangar bays. Temperature and salinity conditions of the water in sampling sites during each campaign are show in Table 2.

### *Prevalence of total V. parahaemolyticus*

Different trends in pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* prevalences and their relationship with water temperature and salinity from sampling sites, are shown in Fig. 2. Overall, in the two bays, *V. parahaemolyticus* was detected in 207 (14.2%) of the 1459 samples identified by targeting thermolabile hemolytin encoded by *tlh* gene. The number of total of bivalves harvested in Alfacs (n= 709) and in Fangar (n= 750) was similar, and the differences were produced because some individuals were far from commercial size, and therefore were discarded. As shown in Table 3a, when statistical analysis was performed in order to determine whether prevalences between sampling sites, Alfacs and Fangar bays, were different, globally they were found to be significantly different ( $P = 0.005$ ) with prevalence at Alfacs 11.6%, (82/709) lower than prevalence at Fangar 16.7%, (125/750), and when this analysis was stratified by year, significant differences were observed in 2008 ( $P < 0.001$ ), where the proportion of bivalves molluscs from Fangar that contained *V. parahaemolyticus* (31.0%) was higher than in Alfacs (13.5%). However, no effect of sampling site was detected in 2006 ( $P = 0.679$ ), either in 2009 ( $P = 0.779$ ), or in 2010 ( $P = 0.090$ ) though prevalences of total *V. parahaemolyticus* in Fangar (10.7%) was twice higher than Alfacs (5.2%). *V. parahaemolyticus* was present in all sampled batches from the Alfacs bay. Prevalence of total *V. parahaemolyticus* in this bay was significantly different ( $P = 0.007$ ), and decreasing along time: 2006 (16.6%), 2008 (13.5%), 2009 (8.9%), 2010 (5.2%). (Fig. 2A).

On the other hand, prevalence of total *V. parahaemolyticus* in Fangar bay was significantly different ( $P < 0.001$ ), but fluctuating along time: 2006 (15.0%), 2008 (31.0%), 2009 (8.1%), 2010 (10.7%) (Fig. 2B).

When statistical analysis was performed in order to determine if global prevalences among species of bivalve were significantly different along the study, results (see Table



4a) indicate that significant differences were found among them ( $P = 0.007$ ) along the time: oysters (*C. gigas*) 14.4% (88/613), mussels (*M. galloprovincialis*) 12% (73/606), *R. decussatus* 24.2% (29/120), and *R. philippinarum* 14.2% (17/120).

When the prevalences of total *V. parahaemolyticus* were stratified by year and by species, significant differences were detected within mussels ( $P < 0.001$ ), and within both species of clams ( $P < 0.001$ ) along the time. Although results within oysters did not show any significant differences ( $P = 0.064$ ). In detail, higher prevalences of infection by *V. parahaemolyticus* were found in *M. galloprovincialis* in 2008 (24.6%), in *R. decussatus* in 2006 (56.7%) and 2008 (30.0%), and in *R. philippinarum* in 2008 (40.0%). In the yearly stratified analysis, significant differences among prevalences were found in 2006 ( $P < 0.001$ ) and in 2008 ( $P = 0.010$ ), where higher prevalences of *V. parahaemolyticus* were registered in *R. decussatus* and in *R. philippinarum*, which indicated a potential host effect.

Prevalences of total *V. parahaemolyticus*, stratified by years, by bays, and by species of bivalves are shown in Table 5. Prevalences among species of bivalves in Alfacs bay, were different in 2006 ( $P < 0.001$ ), and in 2008 ( $P = 0.017$ ), where prevalence in *R. decussatus* was 56.7% and 30.0%, respectively, higher than in *C. gigas* or *M. galloprovincialis*, but not in 2009 ( $P = 0.424$ ) and 2010 ( $P = 0.914$ ).

Prevalences among species of bivalves in Fangar bay, were different in 2006 ( $P < 0.001$ ), where higher prevalence was found in *C. gigas* (25.6%). In 2008 ( $P = 0.027$ ), prevalences were higher in *R. philippinarum* (40.0%) and in *M. galloprovincialis* (37.8%), and in 2009 ( $P = 0.016$ ), they were higher in *R. philippinarum* (16.7%). No significant differences ( $P = 0.089$ ) were found in prevalences of total *V. parahaemolyticus* in molluscs in 2010. *V. parahaemolyticus* was not present in all

samples mollusc in Fangar bay, e.g. *V. parahaemolyticus* was not detected in *R. philippinarum* neither in 2006 nor in 2010.

In summary, in both bays, the years 2006 and 2008 were found to have higher prevalences of *V. parahaemolyticus* than the other years of the study. In particular, a proportion of 16.6% and 15.0% in 2006, and 13.5% and 31.0% in 2008 of bivalves harvested in Alfacs and Fangar, respectively, contained *V. parahaemolyticus*. And higher prevalences of total *V. parahaemolyticus* were registered (as is shown above) in *R. decussatus* and in *R. philippinarum*.

*Multivariate analysis of influence of different factors on the presence of total V. parahaemolyticus.*

The relationship between the prevalence of total *V. parahaemolyticus* with species of bivalves, shell length (mm), year of harvest, location (sampling bay), water temperature, and salinity was analyzed using a logistic regression model focused to summer season. Two multivariate analysis were carried out, one including sampling bay and the other without sampling bay. A significant logistic regression model that included bay to explain the presence/absence (P/A) of total *V. parahaemolyticus* in bivalves was generated ( $P < 0.001$ ) (see Table 6 for details), and it established that the presence of *V. parahaemolyticus* depends on location of the samples (Alfacs or Fangar), species of molluscs, and year of harvest. Effect of sampling bay was significant ( $P < 0.001$ ), and the probability of finding *V. parahaemolyticus* in molluscs from Fangar bay was 2.21 times higher than from Alfacs bay. Moreover, results showed that year of sampling was significant using as reference year 2006. So, the risk (expressed as Odds Ratio) to find total *V. parahaemolyticus* varied along time. Results obtained in 2008 respect to 2006 indicated that the probability to find total *V. parahaemolyticus* in bivalves was 1.57

times higher in 2008 than 2006 ( $P = 0.017$ ), and these results indicated that there was 57% more probable to find bivalves containing *V. parahaemolyticus* in 2008 than in 2006. However in 2009 and 2010, the probability decreased significantly and the probability to find total *V. parahaemolyticus* was 2.09 and 2.26 times less than in 2006, respectively ( $P = 0.002$ , in both cases). Results also showed that the probability of finding *R. decussatus* containing *V. parahaemolyticus* was higher than for other species of bivalves. The probability of finding total *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* was 3.39 times higher than in *C. gigas* ( $P < 0.001$ ). On the other hand, results showed that shell length of molluscs ( $P = 0.063$ ), temperature ( $P = 0.102$ ), and salinity ( $P = 0.691$ ) had no significant effect in this logistic regression model.

A second significant model which did not include sampling bay to explain P/A of total *V. parahaemolyticus* in bivalves was generated ( $P < 0.001$ ) (see Table 7 for details). This model established that the presence of *V. parahaemolyticus* depends on species of molluscs, year of harvest, temperature, and salinity. Results showed that the probability to find *R. decussatus* containing *V. parahaemolyticus* was higher than for the other species of bivalves, as in the first model (above). The probability of finding total *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* was 3.023 times higher than in *C. gigas* ( $P < 0.001$ ). Similar trends (as the first model), in total *V. parahaemolyticus* prevalence respect to the year of sampling was demonstrated using as reference year 2006. Results obtained in 2008 respect to 2006 indicated that the probability to find total *V. parahaemolyticus* in bivalves was 2.19 times higher in 2008 than 2006 ( $P < 0.001$ ). In 2009, the probability was not significant respect to 2006. However in 2010, the risk decreased significantly and the probability to find total *V. parahaemolyticus* was 2.03 times less than in 2006 ( $P = 0.009$ ).

Presence of total *V. parahaemolyticus* was significantly associated with water temperature ( $P = 0.001$ ) and salinity ( $P = 0.005$ ). The probability to find bivalves containing *V. parahaemolyticus* decreased 1.27 times with each unit ( $^{\circ}\text{C}$ ) that temperature increased. Moreover, presence of total *V. parahaemolyticus* was directly correlated with salinity, where the probability to find bivalves containing *V. parahaemolyticus* increased 1.27 times with each unit (ppt) that salinity increased. Shell length ( $P = 0.135$ ) had no significant effect in this logistic regression model.

#### *Prevalence and relative frequency of pathogenic V. parahaemolyticus*

Different trends in virulence factors of *V. parahaemolyticus* prevalences and their relationship with water temperature and salinity from sampling sites are shown in Fig. 3.

The global prevalence of molluscs infected by pathogenic *V. parahaemolyticus* (with virulence genes *tdh*, *trh* or both) was estimated, and 3.8% (56/1459) of total molluscs contained pathogenic *V. parahaemolyticus*. When stratified analysis of prevalence of pathogenic *V. parahaemolyticus* by bays (see Table 3b) was performed, no significant differences ( $P = 0.251$ ) were observed between Alfacs (3.2%) and Fangar (4.4%). In both cases, proportion of bivalves infected by *V. parahaemolyticus* that carried pathogenic *V. parahaemolyticus* was quite similar, and overall prevalence was 27.1%, with the following distribution: *tdh* (17.9%), *tdh/trh* (1.4%) and *trh* (7.7%), meaning that from 212 molluscs which contained *V. parahaemolyticus* (*tlh+*), a total of 57 also presented a virulence factor (*tdh*, *trh* or both). When stratified analysis by year and by bays was performed for virulence factors, no significant differences were observed in Alfacs ( $P = 0.747$ ) (Fig. 3A), in contrast to Fangar where significant differences were

observed ( $P = 0.004$ ), where maximum prevalence of pathogenic *V. parahaemolyticus* was registered in this bay (8.6%, of which 6.7% were *tdh*-positive) in 2008 (Fig. 3B). In global, significant differences were observed ( $P = 0.053$ ) when the presence of virulence factors was studied along the time. Results showed that a higher proportion of the bivalves were infected with pathogenic *V. parahaemolyticus* in 2008 (6.0% (25/417)) than in other years.

When frequency of presence of virulence genes by years in bivalves infected with *V. parahaemolyticus* (*tlh*+) was analysed, no significant differences were observed ( $P = 0.203$ ) among the four campaigns. When prevalence of infection with pathogenic *V. parahaemolyticus* (*tdh*+ and/or *trh*+), stratified by species of bivalves along the time was investigated (see Table 4b for details), no significant differences were found ( $P = 0.506$ ): 4.2% of oysters (26/613), 3.1% of mussels (19/606) and 5.8% of *R. decussatus* (7/120), and 3.3% of *R. philippinarum* (4/120), even when only infected bivalves were taken into account ( $P = 0.908$ ). When frequency of presence of virulence genes by bay and by species of molluscs was analysed, no significant differences were observed in Alfacs bay ( $P = 0.065$ ), or in Fangar bay ( $P = 0.822$ ) among the four campaigns. Nevertheless, Alfacs' result may be due to a type II error, failing to find differences where they exist. This result could mean more samples per bay are needed, or more years of surveillance, in order to clarify this matter.

#### *Multivariate analysis of influence of different factors on the presence of pathogenic V. parahaemolyticus.*

In all cases, no significant model was generated when the whole population of bivalves samples was studied. However, a significant model to explain the P/A of pathogenic *V. parahaemolyticus* in bivalves infected with *V. parahaemolyticus* (*tlh*+) during summer

season was generated ( $P < 0.001$ ), and it showed that isolation of pathogenic *V. parahaemolyticus* (*tdh* and/or *trh* gene) is significantly associated with water salinity ( $P = 0.028$ ). And, the probability of finding pathogenic *V. parahaemolyticus* decreased 1.45 times with every salinity unit (ppt) that increased. When logistic regression model to explain the P/A of pathogenic *V. parahaemolyticus* (*tdh* gene) was performed, no effect of variables was established. However, when pathogenic *V. parahaemolyticus* (*trh* gene) was studied ( $P = 0.035$ ), the probability of finding pathogenic *V. parahaemolyticus* (*trh*+) in molluscs infected with *V. parahaemolyticus* decreased 1.64 times with every ppt increased. Other factors, as bivalve species, length, year, and water temperature were not significantly associated with the presence of potentially pathogenic *V. parahaemolyticus*.

## Discussion

The present study examined intraseasonal relationships between selected environmental parameters (temperature and salinity) and the prevalences of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in four different species of bivalves cultured in the Ebro delta in four different years. The abundance of total *V. parahaemolyticus* in bivalves is seasonal (Baker-Austin, 2010; DePaola et al., 2003; Deter et al., 2010; Kaneko and Colwell, 1975). In the present work temperature and salinity conditions of the bays during each campaign did not suffer big fluctuations because all campaigns took place during the summer, where *V. parahaemolyticus* is more frequently present and in higher numbers. Nevertheless, differences were found between the two bays. Examination of data indicated that Alfacs presented higher temperatures than Fangar (1 or 2°C higher), due to the basin volume in Alfacs is about ten times larger than in Fangar, needing more time to renew its water. Alfacs bay presented lower salinities than Fangar bay (around 1

or 2 ppt lower), probably because the latter is smaller and has higher seawater evaporation. Salinities in both bays were far from the optimum of 20-25 ppt for *C. gigas*, but were closer to the optimum of 34 ppt in *M. galloprovincialis*, and 16-36 ppt in *Ruditapes* spp. (Anonymous, 2005b). Different trends in total and pathogenic *V. parahaemolyticus* prevalences and their relationship with water temperature and salinity from Alfacs and Fangar bays, were obtained. Total and pathogenic *V. parahaemolyticus* prevalences decreased along the study in Alfacs bay, from 16.6% in 2006 to 5.2% in 2010. While, prevalences of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in Fangar presented a higher prevalence in 2008 (31.0%), and lower prevalence in 2009 (8.1%). According to other study (DePaola et al., 2003), on some occasions, *V. parahaemolyticus* levels appeared to fluctuate independently from temperature and salinity.

When we compared both locations, prevalences of total *V. parahaemolyticus* between Alfacs and Fangar bays along the study were significantly different ( $P = 0.005$ ). Fangar registered higher prevalences (16.7%) than Alfacs (11.6%) bay, although its temperature was lower than Alfacs in almost all occasions of sampling. Logistic regression showed that salinity increases the probability of finding total *V. parahaemolyticus*. And these results were corroborated in 2008 ( $P < 0.001$ ) and 2010 ( $P = 0.090$ ), where salinity registered high values between 36.00 to 37.00 ppt in 2008, and 36.45 to 37.42 ppt in 2010, and temperature data fluctuated between 25.50 to 27.70 in 2008 and between 25.37 to 26.22 in 2010 in the sampling sites during the months of July and August.

Current results indicate that the temperature of seawater has not a significant correlation with the prevalence of total *V. parahaemolyticus* in molluscs. These results agree with results reported by Deepanjali et al. (2005), who observed no statistically significant

correlation with seawater temperature. However other authors, DePaola et al. (2003), Phillips et al. (2007), Zimmerman et al. (2007), and Sobrinho Pde et al. (2010), indicate that densities of *V. parahaemolyticus* in molluscs are significantly correlated with seawater temperature. Our results must be interpreted with caution because all samples were collected in the summer season since previous work had shown zero detection of pathogenic *V. parahaemolyticus* during the other seasons of the year (data not shown), so it could be suggested that temperature influences *V. parahaemolyticus* levels.

Current results show that salinity in these two semi-enclosed estuarine bays is more important than temperature (taking into account that temperature was summer values in all cases). Salinities at both sample sites were generally 35.17 to 37.03 ppt during warm season, which is well above the reported optimum salinity of 23 ppt for *V.*

*parahaemolyticus* growth (Anonymous, 2005b). The correlation between water salinity and total *V. parahaemolyticus* densities in bivalves suggests that salinity *per se* is an important factor for growth of this bacterium. These results agree with those obtained by Zimmerman et al. (2007), who found that when salinity increased, densities of total *V. parahaemolyticus* increase. However, previous studies indicated that *V.*

*parahaemolyticus* densities decreased as salinity increased (DePaola et al., 2000; DePaola et al., 2003). On the other hand, other authors as Deepanjali et al. (2005), Martinez-Urtaza et al. (2008), and Sobrinho Pde et al. (2010), did not find correlation between these two parameters.

In any case, influence of temperature and salinity in our study should be interpreted taking into account that environmental conditions correspond to narrow ranges of high temperatures and salinities, so results could not be extrapolated to cooler waters and/or with lower salinity. Previous studies indicated that only 1 to 3% of the environmental strains produce TDH or contain the *tdh* gene (DePaola et al., 1990; Kelly and Stroh,



1988; Nair et al., 2007) and they are often not detected (Honda and Iida, 1993; Shirai et al., 1990). However, DePaola et al. (2003) indicated a higher prevalence (12.8%) of *tdh*-positive *V. parahaemolyticus* in Alabama oysters as determined by direct plating.

Deepanjali et al. (2005), found similar prevalences (10.2%). Prevalences observed here and analysed by years show that higher prevalence were registered in 2008 (6.0%), and significant variations were obtained along the time. Maximum prevalence of pathogenic *V. parahaemolyticus* was registered in Fangar bay (8.6%, of which 6.7% were *tdh*-positive) in 2008. The greater prevalence of pathogenic *V. parahaemolyticus* in Fangar bay in 2008 may be due to an increased prevalence of total *V. parahaemolyticus* that year.

In the present study, the prevalence of pathogenic *V. parahaemolyticus* organisms were generally associated with increasing salinity. And in the logistic regression model to explain the presence/absence of each gene, only *trh*-positive *V. parahaemolyticus* correlates (negatively) with water salinity, suggesting that strains carrying this gene are more sensitive to salinity. However, this is an observation and no study was found in the literature reporting this fact. Nevertheless, these results could explain the low number of cases of gastrointestinal illness in this area.

In conclusion, present results indicate that yearly monitoring of prevalence and spatial distribution are not constant, and significant variations have been observed. Results show greater temporal and spatial variations in the prevalences of total *V. parahaemolyticus* in both bays and in the bivalves than those observed for pathogenic *V. parahaemolyticus*. Therefore, it seems *V. parahaemolyticus* populations in bivalves are controlled quantitatively and qualitatively by different factors. It is unlikely that selective filtration of nonpathogenic to pathogenic *V. parahaemolyticus* can account for the magnitude of different concentrations in bivalves at the two sites (Anonymous,

2005a; Genthner et al., 1999). Both total and pathogenic *V. parahaemolyticus* (*trh+*) densities were correlated with salinity, positively and negatively respectively. The logistic regression analyses indicated no significant association between pathogenic *V. parahaemolyticus* prevalences and water temperature at either site. This finding is consistent with the relatively narrow range of temperature variations during the time frame of the study. Also, higher prevalences of *V. parahaemolyticus* were registered in *R. decussatus* and in *R. philippinarum*, which indicated a potential host effect. Also, the presence, in strains isolated from the marine environment of virulence genes normally associated with clinical strains indicates that these *V. parahaemolyticus* strains might constitute a reservoir of virulence genes that could spread in the marine ecosystem (Carbulotto et al., 2010). And, they should be seen as a public health concern and as a possible risk for human health.

This study provides novel information on the abundance, ecology and characteristics of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in Spanish Mediterranean Coast. The determination of predictive intraseasonal associations contributes to identify the environmental conditions under which *V. parahaemolyticus* is most likely to persist at high densities, therefore environmental parameters, such as temperature and salinity, should be taken in consideration when designing risk based surveillance programs.

### **Acknowledgments**

The present study was financed by INIA project Nos. RTA 2005-00079-00-00 and RTA 2007-00063-00-00 with Feder funds, awarded to AR. CLJ has a doctoral scholarship provided by INIA (Spain). Our sincere thanks go to Beatriz Lacuesta and the staff at the USMM -IRTA for assistance in the field and help during sample processing. We also

greatly acknowledge Margarita Fernández and Jorge Diogenes for the environmental data.

## References

- Anonymous (2005a). Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.
- Anonymous (2005b). Cultured Aquatic Species Information Programme. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Helm, M.M. Rome. Available at: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies> (Updated 13 April 2005).
- Baker-Austin C, Stockey L, Rangdale R, Martinez-Urtaza J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environ Microbiol Rep* 2:7-18.
- Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD, Kaysner CA (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* 36:215-225.
- Caburlotto G, Gennari M, Ghidini V, Tafi M, Lleo MM (2010). Serological and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* marine strains carrying pandemic genetic markers. *ISME J* 4:1071-1074.
- Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Appl Environ Microbiol* 71:3575-3580.
- DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM (1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol* 56:2299-2302.

DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, Cook DW. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol* 66:4649-4654.

DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. (2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol* 69:1521-1526.

Deter J, Lozach S, Véron A, Chollet J, Derrien A, Hervio-Heath D. (2010). Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. *Environ Microbiol* 12:929-937.

European Commission (2001). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in Raw and Undercooked Seafood). Brussels, Belgium, pp. 1-64.

Genthner FJ, Volety AK, Oliver LM, Fisher WS. (1999). Factors influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* 65:3015-3020.

Honda T, Iida T. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 4:106-113.

Kaneko T, Colwell RR. (1975). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Appl Microbiol* 30:251-257.

Kelly MT, Stroh EM. (1988). Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *J Clin Microbiol* 26:1754-1756.

Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M et al. (2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from

clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol* 42: 4672-4678.

Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Varela-Pet J, Trinanes J, Pazos Y, Garcia-Martin O. (2008). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl Environ Microbiol* 74:265-274.

Martinez-Urtaza J, Blanco-Abad V, Rodriguez-Castro A, Ansedo-Bermejo J, Miranda A, Rodriguez-Alvarez MX. Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *ISME J* 2011; e-pub ahead of print 17 November 2011, doi:10.1038/ismej.2011.156

Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* 20:39-48.

Oliver JD, Kaper JB. (2007). *Vibrio* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (ed). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC, pp 343-379

Phillips AM, Depaola A, Bowers J, Ladner S, Grimes DJ. (2007). An evaluation of the use of remotely sensed parameters for prediction of incidence and risk associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *J Food Prot* 70:879-884.

Potasman I, Paz A, Odeh M. (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin Infect Dis* 35:921-928.

Roque A, Lopez-Joven C, Lacuesta B, Elandaloussi L, Wagley S, Furones MD et al. (2009). Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Appl Environ Microbiol* 75:7574-7577.

- Sala MR, Arias C, Dominguez A, Bartolome R, Muntada JM. (2009). Foodborne outbreak of gastroenteritis due to Norovirus and *Vibrio parahaemolyticus*. *Epidemiol Infect* 137:626-629.
- Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K et al. (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect Immun* 58:3568-3573.
- Sobrinho Pde S, Destro MT, Franco BD, Landgraf M. (2010). Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of Sao Paulo State, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 76:1290-1293.
- Takeda Y. (1982). Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacol Ther* 19:123-146.
- Twedt RM, Novelli RM. (1971). Modified selective and differential isolation medium for *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Microbiol* 22:593-599.
- Zimmerman AM, DePaola A, Bowers JC, Krantz JA, Nordstrom JL, Johnson CN et al. (2007). Variability of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in northern Gulf of Mexico water and oysters. *Appl Environ Microbiol* 73:7589-7596.

### **Figure legends**

Figure 1. Area of study and location of the sampling sites in the Ebro Delta, Spain.

Figure 2. Prevalence of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in (A) Alfacs bay, and (B) Fangar bay, mean water temperature and salinity on the days of sampling. The study campaign (2006 to 2010) covered one sampling session per bivalve species and per year.

Figure 3. Prevalence of virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* in (A) Alfacs bay, and (B) Fangar bay, mean water temperature and salinity on the days of sampling.

## Tables

TABLE 1. Samples points used for each mollusc species and campaign

Specie	2006		2008		2009		2010	
	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar
<i>Crassostrea gigas</i>	3	3	3	3	2	3	2	2
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	2	2	3	3	3	3	2	2
<i>Ruditapes decussatus</i>	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>Ruditapes philippinarum</i>	-	1	-	1	-	1	-	1

TABLE 2. Temperature and salinity conditions of locations during each campaign (n=3, each value (measurement of a specific day) is the product of 24 measurements) (expressed as average  $\pm$  standard deviation)

Campaign	Temperature (°C)		Salinity (‰)	
	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar
2006	27.67 $\pm$ 2.34	25.41 $\pm$ 1.57	35.50 $\pm$ 0.50	36.62 $\pm$ 0.66
2008	26.93 $\pm$ 0.68	26.37 $\pm$ 1.17	35.17 $\pm$ 1.76	36.50 $\pm$ 0.50
2009	27.54 $\pm$ 0.85	26.02 $\pm$ 0.17	36.01 $\pm$ 0.27	35.74 $\pm$ 0.90
2010	27.05 $\pm$ 1.07	25.74 $\pm$ 0.44	35.78 $\pm$ 0.42	37.04 $\pm$ 0.52



TABLE 3. Prevalence of total *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*<sup>+</sup>), stratified by years and by bays (a). Prevalence and relative frequency of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*<sup>+</sup> and/or *trh*<sup>+</sup>), stratified by bays (b)

	2006		2008		2009		2010		molluscs	Prevalence total <i>Vp</i>	Prevalence pathogenic <i>Vp</i>	%				
	n	%	n	%	n	%	n	%								
Allfacs	187	16.6%	207	13.5%	180	8.9%	135	5.2%	709	82	11.6%	<b>0.007</b>	23	3.2%	<b>0.747</b>	28.0%
Fangar	180	15.0%	210	31.0%	210	8.1%	150	10.7%	750	125	16.7%	< <b>0.001</b>	33	4.4%	<b>0.004</b>	26.4%
<b>Total</b>	<b>367</b>	<b>15.8%</b>	<b>417</b>	<b>22.3%</b>	<b>390</b>	<b>8.5%</b>	<b>285</b>	<b>8.1%</b>	1459	207	14.2%	< <b>0.001</b>	56	3.8%	<b>0.053</b>	27.1%
<i>P</i> -value <sup>1</sup>	<b>0.679</b>		< <b>0.001</b>		<b>0.779</b>		<b>0.090</b>			<b>0.005</b>			<b>0.251</b>			<b>0.794</b>

<sup>1</sup> *P*-value: Prevalence of total *V. parahaemolyticus* (*tlh*<sup>+</sup>) stratified by years. <sup>2</sup> Prevalence of total *V. parahaemolyticus* (*tlh*<sup>+</sup>), stratified by bays. <sup>3</sup> *P*-value: Prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*<sup>+</sup> and/or *trh*<sup>+</sup>), stratified by bays.

TABLE 4. Prevalence of total *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*<sup>+</sup>) stratified by years and by species of bivalves molluscs (a). Prevalence and relative frequency of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*<sup>+</sup> and/or *trh*<sup>+</sup>), stratified by species of bivalves molluscs (b)

	a)												b)						
	2006			2008			2009			2010			Sampled molluscs		Prevalence total <i>Vp</i>		Prevalence pathogenic <i>Vp</i>		Pathogenic <i>Vp</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	<i>P</i> -value <sup>3</sup>		
<i>Crassostrea gigas</i>	180	18.9%	178	15.7%	150	11.3%	105	8.6%	613	88	14.4%	0.064	4.2%	0.081	29.5%				
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	127	5.5%	179	24.6%	180	5.6%	120	10.0%	606	73	12.0%	<0.001	3.1%	0.052	26.0%				
<i>Ruditapes decussatus</i>	30	56.7%	30	30.0%	30	3.3%	30	6.7%	120	29	24.2%	<0.001	5.8%	0.134	24.1%				
<i>Ruditapes philippinarum</i>	30	0.0%	30	40.0%	30	16.7%	30	0.0%	120	17	14.2%	<0.001	3.3%	0.009	23.5%				
<b>Total</b>	<b>367</b>	<b>15.8%</b>	<b>417</b>	<b>22.3%</b>	<b>390</b>	<b>8.5%</b>	<b>285</b>	<b>8.1%</b>	<b>1459</b>	<b>207</b>	<b>14.2%</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.8%</b>	<b>0.053</b>	<b>27.1%</b>				
<i>P</i> -value <sup>1</sup>	<0.001		0.010		0.070		0.125		0.007		0.506		0.908						

<sup>1</sup> *P*-value: Prevalence of total *Vibrio parahaemolyticus*, stratified by years. <sup>2</sup> *P*-value: Prevalence of total *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*<sup>+</sup>), stratified by species of molluscs. <sup>3</sup> *P*-

value: Prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh*<sup>+</sup> and/or *trh*<sup>+</sup>), stratified by species of molluscs.

TABLE 5. Prevalence of total *Vibrio parahaemolyticus*, stratified by years, by bays, and by species of bivalve

	2006		2008		2009		2010									
	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar	Alfacs	Fangar								
<i>Crassostrea gigas</i>	n 12.2%	n 9.0%	n 25.6%	n 88	n 10.2%	n 90	n 21.1%	n 60	n 11.7%	n 45	n 4.4%	n 60	n 11.7%			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	n 4.5%	n 60	n 6.7%	n 89	n 11.2%	n 90	n 37.8%	n 90	n 8.9%	n 90	n 2.2%	n 60	n 5.0%	n 60	n 15%	
<i>Ruditapes decussatus</i>	n 56.7%	-	n -	n 30	n 30.0%	n -	n -	n 30	n 3.3%	n -	n -	n 30	n 6.7%	n -	n -	
<i>Ruditapes philippinarum</i>	-	-	n 30	n 0.0%	-	n -	n 30	n 40.0%	-	n -	n -	n 30	n 16.7%	n -	n 30	n 0.0%
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>16.6%</b>	<b>180</b>	<b>15.0%</b>	<b>207</b>	<b>13.5%</b>	<b>210</b>	<b>31.0%</b>	<b>180</b>	<b>8.9%</b>	<b>210</b>	<b>8.1%</b>	<b>135</b>	<b>5.2%</b>	<b>150</b>	<b>10.7%</b>
P-value <sup>†</sup>	< 0.001		< 0.001		0.017		0.027		0.424		0.016		0.914		0.089	

<sup>†</sup> P-value: Prevalences of total *V. parahaemolyticus* (Ih<sup>+</sup>) stratified by years and by bays.

TABLE 6. Description of the logistic regression model selected to explain the presence/absence (P/A) of total (presence of *tlh* gene) *Vibrio parahaemolyticus* including location.

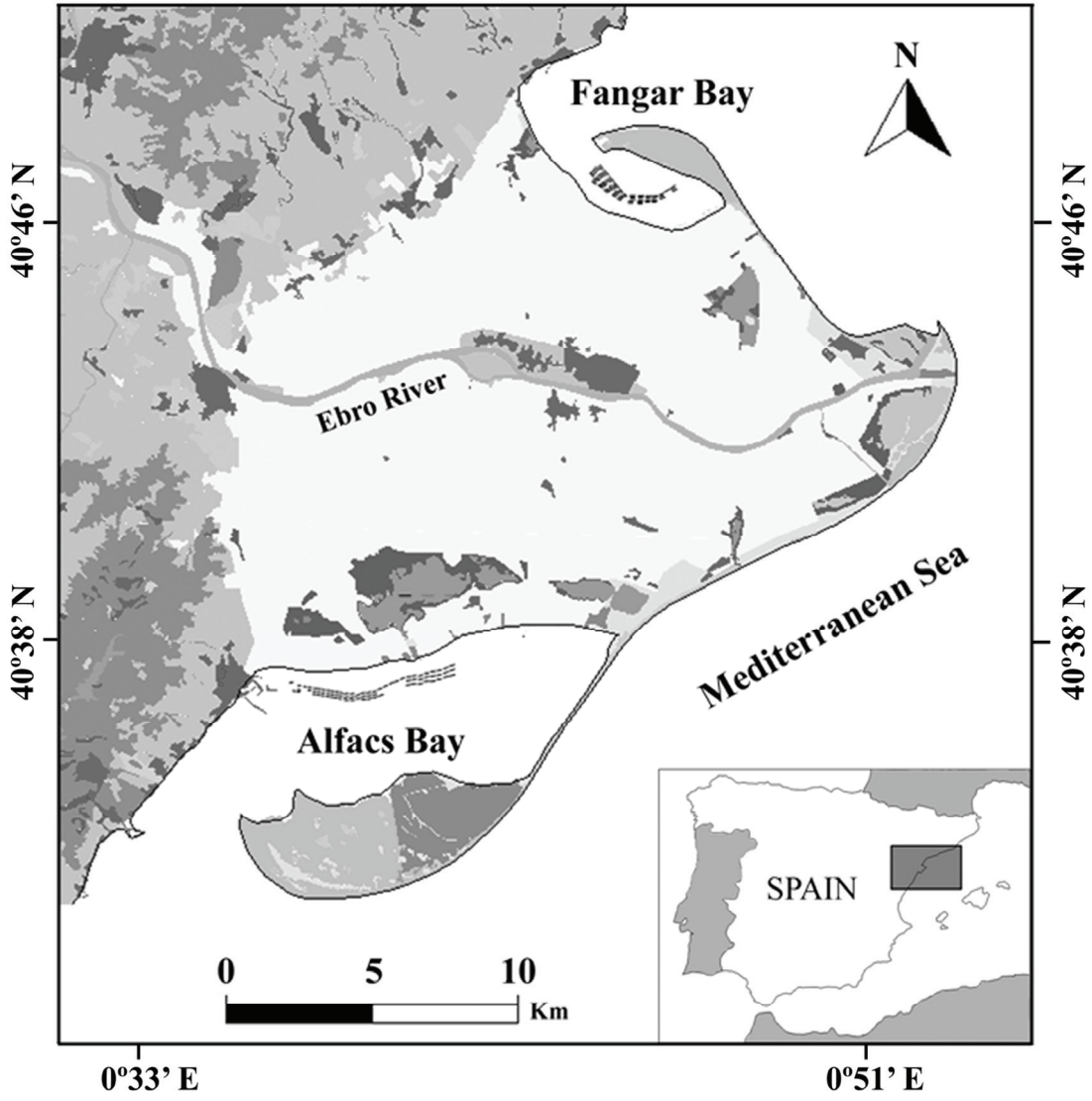
<b>Variables included in the selected model</b>	<b>B</b>	<b>OR (e<sup>B</sup>)</b>	<b>P-value</b>
Fangar vs Alfacs	0.793	2.211	< 0.001
<i>R. decussatus</i> vs <i>C. gigas</i>	1.221	3.391	< 0.001
2008 vs 2006	0.449	1.567	0.017
2009 vs 2006	- 0.738	0.478	0.002
2010 vs 2006	- 0.817	0.442	0.002
Constant	- 2.159	0.115	< 0.001

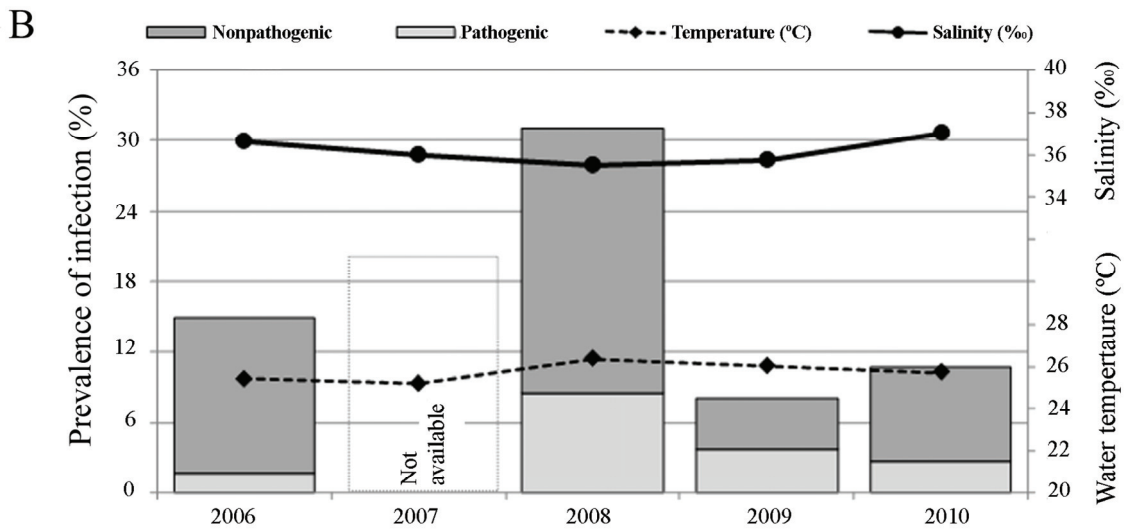
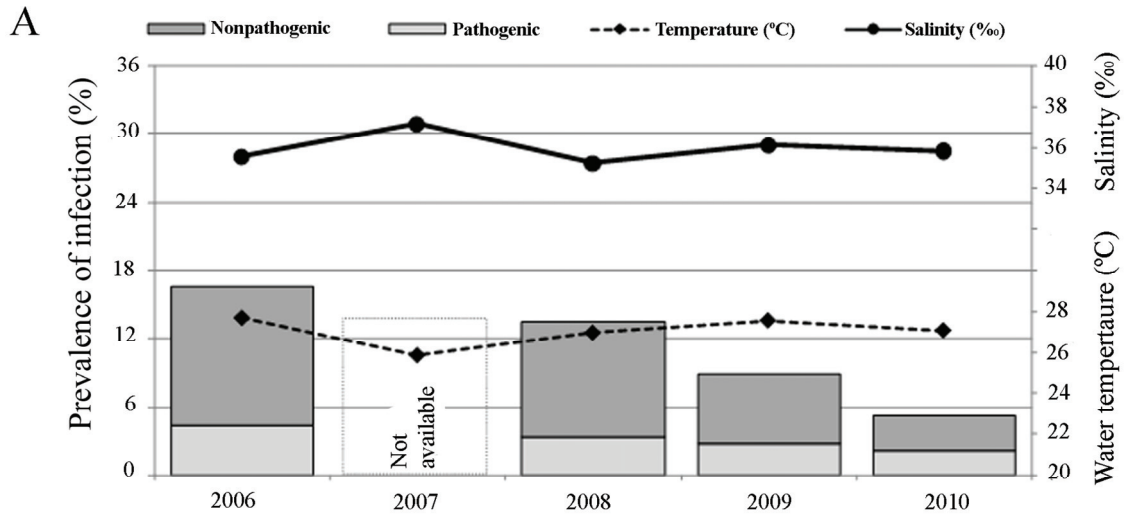
Model summary: -2 Log likelihood= 1116.814; Nagalkerke R Square= 0.090; Omnibus tests of model coefficients,  $P < 0.001$ .

TABLE 7. Description of the logistic regression model selected to explain the presence/absence (P/A) of total (presence of *tlh* gene) *Vibrio parahaemolyticus* excluding location.

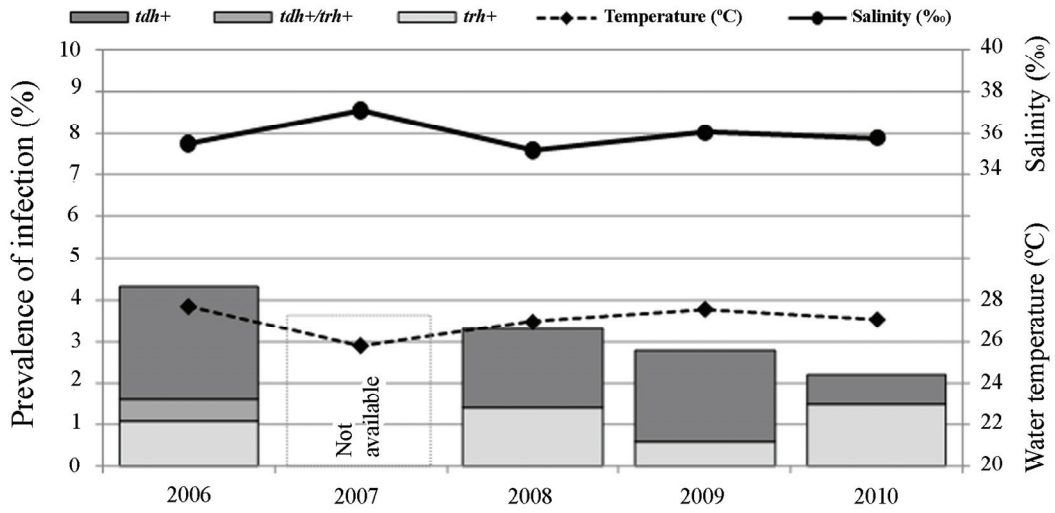
<b>Variables included in the selected model</b>	<b>B</b>	<b>OR (e<sup>B</sup>)</b>	<b>P-value</b>
<i>R. decussatus</i> vs <i>C. gigas</i>	1.106	3.023	< 0.001
2008 vs 2006	0.782	2.185	< 0.001
2010 vs 2006	- 0.707	0.493	0.009
Temperature (°C)	- 0.241	0.786	0.001
Salinity (ppm)	0.238	1.269	0.005
Constant	- 4.085	0.017	0.232

Model summary: -2 Log likelihood= 1117.862; Nagalkerke R Square= 0.088; Omnibus tests of model coefficients,  $P < 0.001$ .

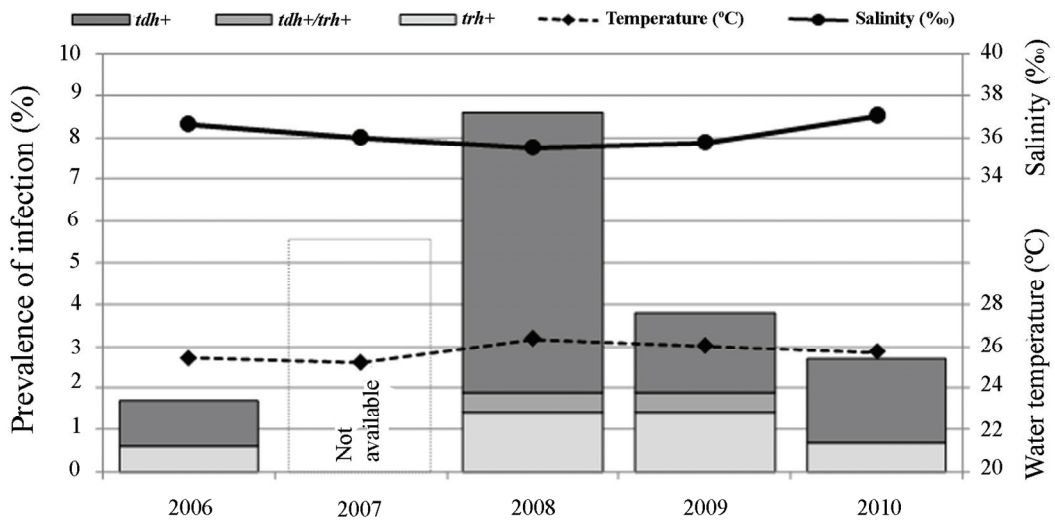




A



B



### 7.1.3. Applied and Environmental Microbiology, 2011

Suffredini E, Lopez-Joven C, Maddalena L, Croci L, Roque A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77:6301-6304.

#### Resumen del artículo en castellano

**Caracterización con PCR y con Electroforesis de campo pulsante de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con diferentes orígenes**

El presente estudio utiliza la caracterización por gel de electroforesis en campo pulsante para examinar la variabilidad intraespecífica y las relaciones genéticas entre cepas aisladas de *Vibrio parahaemolyticus* de diferentes países Europeos. Es el primer estudio realizado sobre *Vibrio parahaemolyticus* ambientales que incluye más de un país Europeo.





## Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR Characterization of Environmental *Vibrio parahaemolyticus* Strains of Different Origins<sup>∇</sup>

E. Suffredini,<sup>1†\*</sup> C. Lopez-Joven,<sup>2,3†</sup> L. Maddalena,<sup>1</sup> L. Croci,<sup>1</sup> and A. Roque<sup>2</sup>

Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy<sup>1</sup>; IRTA-SCR, Ctra. Poble Nou km 7.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain<sup>2</sup>; and Laboratory of Fish Disease, Veterinary Faculty, Universidad de Zaragoza, c/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain<sup>3</sup>

Received 15 February 2011/Accepted 12 June 2011

**The present study used pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) characterization to examine the intraspecies variability and genetic relationships among environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from different European countries. This is first study performed on environmental *V. parahaemolyticus* that included more than one European country.**

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is a discriminative molecular typing technique, which was used to evaluate the genetic diversity among *Vibrio parahaemolyticus* strains and to identify the relatedness of environmental and food strains with reference strains of known human-pathogenic significance (8, 12, 14, 18, 23, 24). Studies focusing on environmental isolates are scarce and limited to specific geographic areas (8).

The present study was conducted to investigate the distribution of pathogenicity markers of *V. parahaemolyticus* (*tdh* or *trh* genes) in isolates of environmental origin collected in Europe. PFGE was used to examine the intraspecies variability, genetic relationships among the isolates, and relationship between pathogenic and nonpathogenic strains.

The study was performed on 96 *V. parahaemolyticus* isolates from Spain, Italy, Portugal, and the United Kingdom (Fig. 1) collected from food matrices, environmental samples, and clinical cases between 1994 and 2009, including two reference strains (508 [CCUG 43364] and 578 [CNRVC010089]). Strain identification and characterization were performed by PCR and colony hybridization.

Total DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Italy) by following the instructions of the manufacturer or a published protocol (15). A one-step PCR for the detection of the *toxR* gene was performed to confirm species identity (6), using strain ATCC 43996 (American Type Culture Collection) and molecular-grade water as positive and negative controls, respectively. Detection of the *tdh* and *trh* genes was performed on all *toxR*-positive strains, according to the work of Bej et al. (4) (*tdh* gene detection) and Tada et al. (21) (*trh* gene detection). Strains ATCC 43996 and ATCC 17802 were used as positive controls for *tdh* and *trh*, respectively, and molecular-grade water was used as a negative

control. Strain identification and pathogenicity characters were confirmed by means of colony hybridization (20). Briefly, digoxigenin-labeled probes were designed based on the sequences of the *toxR*, *tdh*, *trh1*, and *trh2* genes. Isolates were plated on Tryptone soy agar (Oxoid) with 2% sodium chloride (TSA-S) and incubated overnight at 37°C. Filter preparation from plates and colorimetric detection (nitroblue tetrazolium [NBT]-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate [BCIP]) were performed by following a previously published protocol (17). Hybridization was performed overnight at 54°C in 6 M urea hybridization buffer, and specificity was ensured by two stringency washes at 65°C. All 96 strains were confirmed to be *V. parahaemolyticus* by PCR and colony hybridization. Five strains were positive for the *tdh* gene and 26 for the *trh* gene (Fig. 2); among these strains, the 24 isolates collected from food and the environment possessed the *trh2* variant and the 2 reference strains possessed *trh1*, as determined by colony hybridization.

PFGE was performed according to the PulseNet protocol with the following minor modifications (11, 25). Strains were cultivated overnight on TSA-S, and after preparation, plugs were placed in lysis buffer with proteinase K and incubated for 1 h at 50°C with constant shaking. Lysis was followed by two washes in pentadistilled water and five 10-min washes with 15 ml of Tris-EDTA (TE) buffer at 50°C. DNA digestion with the restriction endonuclease NotI (25 U/plug; Fermentas, Germany) was performed at 37°C overnight. *Salmonella enterica* serovar Braenderup strain H9812, digested overnight at 37°C with XbaI, was used as a molecular weight marker. Plugs were embedded into 1% agarose gel, and restriction fragments were resolved by PFGE on a contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) II Mapper system (Bio-Rad Laboratories) in 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) with 300 μM thiourea and the following running conditions: 6 V/cm for 18 h at 14°C, with a 2- to 40-s switch time and pump speed of 0.7 l/min. Gels were stained in ethidium bromide (25 min), destained in distilled water (45 min), and photographed under UV light. Restriction patterns were analyzed using BioNumerics software v.4.0 (Applied Maths, Belgium). Clustering was performed using the unweighted pair group method using average linkages

\* Corresponding author. Mailing address: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy. Phone: 39 (0)6 49903656. Fax: 39 (0)6 49902045. E-mail: elisabetta.suffredini@iss.it.

† These authors contributed equally to this work.

∇ Published ahead of print on 8 July 2011.



FIG. 1. Strain geographic origins. (The template for the map was obtained from [http://d-maps.com/carte.php?num\\_car=6027&lang=en](http://d-maps.com/carte.php?num_car=6027&lang=en).)

(UPGMA) and the Dice correlation coefficient with a position tolerance of 1.5%. Clusters were defined on the basis of the 80% similarity cutoff (8).

Ninety-two of the 96 strains were typeable by PFGE, while four isolates were untypeable, indicating a high intraspecies genetic diversity for *V. parahaemolyticus*. This agrees with current knowledge of this species, with which 115 pulsotypes (PTs) previously were obtained from 535 isolates (26) and 104 PTs were obtained from 132 typeable isolates (8). Furthermore, the present results show a high genetic diversity even among the isolates obtained from a single region (Ebro Delta), with 44 strains distributed among 10 of the 11 clusters, a phenomenon probably explained by horizontal transfer of genetic material (7).

The 78 detected PTs presented from 11 to 26 bands, with a median of 16. The minimum genetic similarity among strains was 63.4% (Fig. 2), and 85 of them were distributed into 11 clusters, with 7 isolates not associated with any cluster. All clinical strains (associated with disease outbreaks) grouped in cluster V, confirming the results by Wagley et al. (24), who used the same clinical strains as references.

The finding of similar strains in distant geographic locations has been reported (8, 22). This is the case for clusters IV and V, with isolates coming from four and five different geographic origins, respectively, and including both toxigenic and nontoxigenic strains. In previous studies, using the present methodology, toxigenic strains of environmental origin gathered in the

same cluster (8, 22). This is not the case in the present study, where *trh*-positive strains appear in more than one cluster. Some Spanish strains were isolated in different, nonconsecutive years (clonal couples 889-910 and 896-913), demonstrating the stable presence of *V. parahaemolyticus* strains in certain habitats (13). Persistence in the environment could also be a feature of toxigenic strains (i.e., those containing the *trh* gene), as cluster III connects *trh*-positive Ebro Delta strains isolated over the course of 4 years, which are characterized by little genetic diversity. Pulsotypes of *trh*-positive isolates were also found to be stable over time in Norway (8) and Italy (14), and this is also a common feature for other vibrios, such as *V. cholerae* (10).

Previous studies (2) showed, on the basis of published data, a distinct geographic distribution of *trh*-positive and *tdh*-positive populations across the coast of Europe, with the *trh*-positive population dominating in Northern Europe (English Channel, Atlantic coast of France) (9, 16) and Norway (3) and *tdh*-positive strains reported in higher frequency from environmental sources in countries surrounding the Mediterranean Sea (1, 5). The present study, however, supports results of Roque et al. (19), highlighting the presence of *trh*-positive strains in food and environmental samples collected from different areas of the Mediterranean Sea (Adriatic and Tyrrhenian Seas, Ebro Delta) and showing that the genetic variant most frequently detected is *trh2*.

In conclusion, this is first study performed on environmental

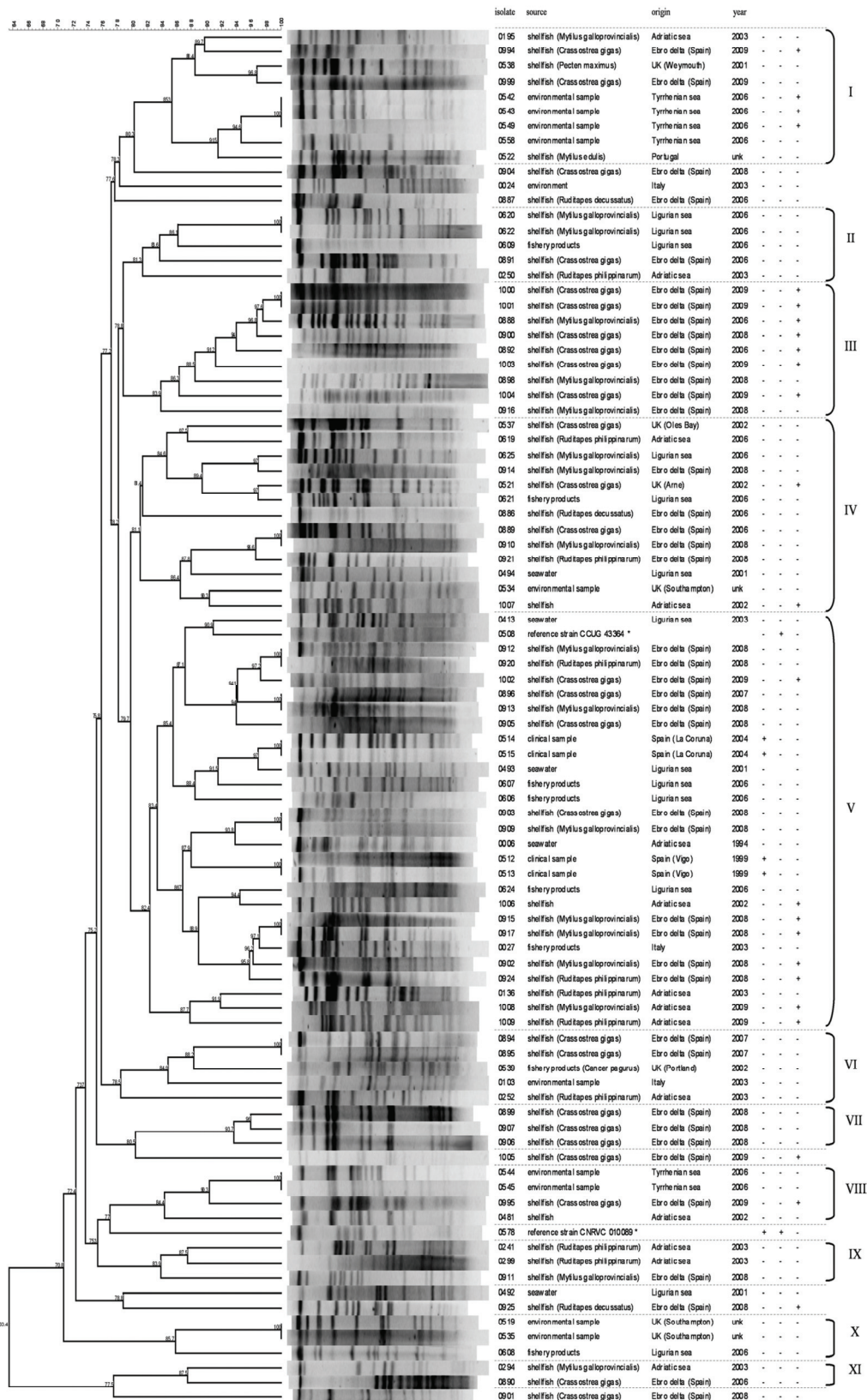


FIG. 2. PFGE dendrogram generated by BioNumerics software, showing the relationship of fingerprints for 92 *V. parahaemolyticus* isolates. All the isolates were *toxR* positive. The four untypeable strains had the following sources, countries of origin, years of isolation, and genetic traits: isolate 11, fishery products, Italy, 2001, *tdh* negative, *trh1* negative, *trh2* negative; isolate 484, shellfish, Adriatic sea, 2002, *tdh* negative, *trh1* negative, *trh2* negative; isolate 893, shellfish (*Crassostrea gigas*), Ebro Delta (Spain), 2006, *tdh* negative, *trh1* negative, *trh2* negative; and isolate 908, shellfish (*Mytilus galloprovincialis*), Ebro Delta (Spain), 2008, *tdh* negative, *trh1* negative, *trh2* negative.



*V. parahaemolyticus* isolates from more than one European country, reconfirming that PFGE is a good tool for molecular characterization, showing the higher frequency of the *trh2* variant than of the *trh1* variant, and emphasizing the importance of appropriate molecular methods in public health and surveillance programs.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The probes used for this study were deposited in the NCBI database under accession numbers 10616115 to 10616118.

This study was supported by INIA project grant RTA 2007-00063-00 (with FEDER funds) awarded to A.R. C.L.-J. has a scholarship from INIA (Spain) and had extra funding from INIA to work at ISS (Italy).

We acknowledge Beatriz Lacuesta, Josep M. Reverte, and Fabrizio Annibaldi for technical support and Rachel Rangdale (CEFAS), Jaime Martinez-Urtaza (University of Santiago de Compostela), and Donatella Ottaviani (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche) for supplying some of the strains of the study.

#### REFERENCES

- Baffone, W., et al. 2006. Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. *Environ. Microbiol.* **8**:1299–1305.
- Baker-Austin, C., L. Stockley, R. Rangdale, and J. Martinez-Urtaza. 2010. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**:7–18.
- Bauer, A., Y. Ostensvik, M. Florvag, O. Ormen, and L. M. Rorvik. 2006. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*). *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3058–3061.
- Bej, A. K., et al. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* **36**:215–225.
- Caburlotto, G., V. Ghidini, M. Gennari, M. Tafi, and M. M. Lleo. 2008. Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. *Euro Surveill.* **13**:8068.
- Croci, L., et al. 2007. Evaluation of different PCR methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated by cultural methods. *J. AOAC Int.* **90**:1588–1597.
- Dryselius, R., K. Kurokawa, and T. Iida. 2007. Vibrionaceae, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Res. Microbiol.* **158**:479–486.
- Ellingsen, A. B., H. Jorgensen, S. Wagley, M. Monshaugen, and L. M. Rorvik. 2008. Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* **105**:2195–2202.
- Hervio-Heath, D., et al. 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.* **92**:1123–1135.
- Lizarraga-Partida, M. L., and M. L. Quilici. 2009. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1 clinical strains, including new nontoxic variants isolated in Mexico during the cholera epidemic years between 1991 and 2000. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1364–1371.
- Martinez-Urtaza, J., et al. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4672–4678.
- Martinez-Urtaza, J., et al. 2008. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:265–274.
- Montilla, R., J. Palomar, M. Santmarti, C. Fuste, and M. Vinas. 1994. Isolation and characterization of halophilic *Vibrio* from bivalves bred in nurseries at the Ebre delta. *J. Invertebr. Pathol.* **63**:178–181.
- Ottaviani, D., et al. 2010. *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**:452–455.
- Ripabelli, G., G. M. Grasso, M. L. Sammarco, and I. Luzzi. 1997. Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica. *Rapporti ISTISAN.* **31**:1–55.
- Robert-Pillot, A., et al. 2004. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int. J. Food Microbiol.* **91**:319–325.
- Roche Applied Science. 25 November 2009, posting date. DIG application manual for filter hybridization. Roche Applied Science, Indianapolis, IN. [http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/DIG\\_MAN/dig\\_toc.htm](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/DIG_MAN/dig_toc.htm).
- Rodriguez-Castro, A., et al. 2010. Prevalence and genetic diversity of pathogenic populations of *Vibrio parahaemolyticus* in coastal waters of Galicia, Spain. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**:58–66.
- Roque, A., et al. 2009. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:7574–7577.
- Suffredini, E., L. Cozzi, and L. Croci. 2009. Colony hybridization method for the simultaneous enumeration of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in shellfish, p. 206. In *Abstr. 7th Int. Conf. Molluscan Shellfish Safety (IC-MSS09)*, Nantes, France.
- Tada, J., et al. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. *Mol. Cell. Probes* **6**:477–487.
- Tanil, G. B., et al. 2005. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **36**:940–945.
- Wagley, S., K. Koofhethile, and R. Rangdale. 2009. Prevalence and potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) harvested from the River Thames estuary, England. *J. Food Prot.* **72**:60–66.
- Wagley, S., K. Koofhethile, J. B. Wing, and R. Rangdale. 2008. Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK. *Int. J. Environ. Health Res.* **18**:283–293.
- Wang, Y. W., L. L. Chern, P. D. Cam, and C. S. Chiou. 2008. Evaluation of restriction enzymes for standardizing pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**:251–255.
- Wong, H. C., et al. 2007. A pulsed-field gel electrophoresis typing scheme for *Vibrio parahaemolyticus* isolates from fifteen countries. *Int. J. Food Microbiol.* **114**:280–287.

## 7.2. Caracterización experimental de la dinámica de infección de *V. parahaemolyticus* en almejas

---

### 7.2.1. Food Microbiology, 2011

Lopez-Joven C, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Furones MD, Roque A. Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures. *Food Microbiology*. 2011;28:951-956.

#### Resumen del artículo en castellano

**Persistencia de vibrios fermentadores y no fermentadores de sacarosa en tejidos de almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum*, depurada con agua de mar a dos temperaturas diferentes**

Los tratamientos efectivos en la fase de post-cosecha que permitan eliminar vibrios patogénicos son una medida importante para reducir el riesgo asociado con el consumo de pescados y mariscos. En el presente estudio se examinó si las poblaciones naturales de vibrios no fermentadores de la sacarosa (SNFV) y de vibrios fermentadores de este azúcar (SFV) persistían en *Ruditapes philippinarum* después de la depuración a dos temperaturas diferentes.

Se llevaron a cabo dos experimentos (uno en primavera y otro en verano). Las almejas fueron colocadas en tanques y depuradas utilizando un sistema de depuración en circuito abierto y con agua de mar provisto de filtros de cartucho y de luz ultravioleta. Las almejas se muestrearon diariamente (durante 9 días) y se procesaron de forma individual, sembrándolas en placas de agar de Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa (TCBS) para estimar la densidad de SNFV y de SFV por individuo.

Los resultados para SNFV y SFV mostraron que la depuración fue menos efectiva en verano que en primavera, a pesar de que el nivel inicial de SNFV fue más bajo en el experimento de verano, lo que implica que la tasa de eliminación de los SNFV fue menos eficaz con un 22,2% de las almejas contaminadas por SNFV el día 8 y sin cambios significativos en el día 9. Cuando se comparó la proporción diaria de SNFV y SFV en la primavera, se observó que los SFV fueron más frecuentes que los SNFV en los días 8 y 9. Y en verano estas diferencias fueron significativas entre los días 7 y 9. El presente estudio demostró que los SNFV (implicados en intoxicaciones alimentarias) se eliminan, a cualquier temperatura, más rápido que los SFV.





## Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures

C. Lopez-Joven<sup>a,b</sup>, I. Ruiz-Zarzuela<sup>b</sup>, I. de Blas<sup>b</sup>, M.D. Furones<sup>a</sup>, A. Roque<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>IRTA-SCR, Ctra. Poble Nou Km 7.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

<sup>b</sup>Laboratory of Fish Disease, Veterinary Faculty, Universidad de Zaragoza, c/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 July 2010

Received in revised form

22 December 2010

Accepted 23 December 2010

Available online 27 January 2011

#### Keywords:

Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)

Depuration process

Seafood safety

Sucrose nonfermenting vibrios

Sucrose fermenting vibrios

Predictive model

### ABSTRACT

Effective post-harvest treatment to eliminate toxigenic vibrios is an important measure to reduce risk associated with seafood consumption. In the present study, we examined whether natural populations of sucrose nonfermenting (SNFV) and sucrose fermenting vibrios (SFV) persisted in *Ruditapes philippinarum*, after depuration at two different temperatures.

Two experiments (one in Spring and one in Summer) were performed. Clams were depurated in duplicate tanks in an open-circuit seawater system using filtration and ultraviolet treatment. Clams were sampled daily (9 days), individually processed and inoculated on thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar plates to estimate the density of SNFV and SFV.

Results showed that depuration was less effective in Summer than in Spring, for SNFV and SFV. Despite an initial lower presence in the Summer experiment, clearance of SNFV was less efficient than in Spring, with 22.2% of clams presenting SNFV on day 8 and without significant changes on day 9. When compared, daily proportion of presence of SNFV and SFV in Spring, it was observed that SFV were more frequent than SNFV on days 8 and 9. In Summer these differences were significant on days 7–9. Present study demonstrated that SNFV (involved in food poisoning) are purged, at any temperature, faster than SFV.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Currently, there are over 250 food-borne diseases, which can be caused by virus, bacteria, parasites, toxins, metals and prions. Their symptoms vary from mild gastroenteritis to neurological, hepatic or renal damage (Mead et al., 1999). Sucrose nonfermenting Vibrionaceae such as *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* are an important cause of food-borne disease and they can affect not only food safety but also import-export trade (Smith and König, 2010).

Bivalve molluscs can accumulate microorganisms, including pathogens, from seawater. They are filter feeding organisms and they can concentrate bacteria (Cook, 1991). The number and type of microorganisms present in the water depend on several seasonal, climatic, and anthropogenic factors. Improvement of bacteriological quality of seafood is essential for consumers (Feldhusen, 2000; Huss et al., 2000).

Spain is not only the second-largest producer in the world of live bivalve molluscs but also one of the largest consumers of bivalve

molluscs, and Catalonia is the second-most important bivalve producer of the Spanish regions. Currently, the cultivation of bivalves in this area is concentrated in the delta region of the Ebro River (Roque et al., 2009), mainly mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas*), Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) and carpet clam (*Ruditapes decussatus*). Production, harvesting and commercialization of bivalve molluscs are regulated by the European Community (EC).

Parameters of EC regulations for establishing the suitability of molluscs for consumption are according with different indicators for instance fecal pollution as *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. (European Community, 2004a,b, 2006). However, previous studies showed that microbials, such as enteric virus and vibrios, are not depurated within the same period of time as *E. coli* (Richards, 1988; Franco et al., 1990; Croci et al., 2002; Cozzi et al., 2009).

The ubiquitous nature of *Vibrio* species in marine and estuarine environments makes it impossible to obtain seafood free of these bacteria. There are at least twelve pathogenic *Vibrio* species recognized to cause human illnesses (Janda et al., 1988; Sumner et al., 2001; Oliver and Kaper, 2001; Farmer and Hickman-Brenner, 2006). *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. mimicus* are the *Vibrio* species of most medical significance (Austin, 2010) of which

\* Corresponding author.

E-mail address: [ana.roque@irta.es](mailto:ana.roque@irta.es) (A. Roque).



the last three are sucrose nonfermenting vibrios (Tantillo et al., 2004). Although, it is known that a small percentage (3–15%) of *V. vulnificus* strains can ferment sucrose and form yellow colonies on TCBS agar (Abbott et al., 2007).

The literature contains numerous reports which describe shellfish purification methods (e.g., depuration) in which physicochemical parameters of seawater are controlled to reduce bacterial pollutants in shellfish meat (Greenberg et al., 1982; Eyles and Davey, 1984; Richards, 1988; Wang et al., 2010). Depuration is a controlled process that relies on the ability of shellfish to purge their gastrointestinal contents by filtering clean seawater. It is a very effective process for the elimination of fecal bacteria, such as *E. coli* (Ekanem and Adegoke, 1995), and *Salmonella* spp. (de Abreu Corrêa et al., 2007), but is less effective for naturally occurring *Vibrio* spp. (Eyles and Davey, 1984; Tamplin and Capers, 1992; Martínez et al., 2009). Purification processes of bivalves depend on variables such as the level of initial contamination and the physiological state of the bivalve, turbidity and salinity of the water treatment plant (Rowse and Fleet, 1984; Lee and Younger, 2002).

The development of effective post-harvest treatments to eliminate toxigenic vibrios contamination is an important measure to reduce risk of infection associated with seafood consumption. Several processes, including freezing (Johnston and Brown, 2002), low-temperature pasteurization (Andrews et al., 2003), high pressure processing (He et al., 2002), and irradiation (Andrews et al., 2003), have been reported to be capable of reducing toxigenic vibrios in oysters. However, most of these treatments require specific equipment or facilities and the oysters are often killed during processing. To increase the efficacy of these treatments, it should be possible to combine them with various forms of biological control, however, the use of some of them, as probiotics, in molluscan aquaculture has been fairly limited (Teplitski et al., 2009). Cost-effective post-harvest processing for reducing toxigenic vibrios in raw seafood without adverse effects on seafood remains to be developed. Unfortunately, several studies have reported that depuration, normally carried out at ambient temperatures, was not effective in reducing *Vibrio* contamination in seafood (Colwell and Liston, 1960; Vasconcelos and Lee, 1972; Eyles and Davey, 1984). Nevertheless, it is necessary to assess the effectiveness of depuration methods in order to minimize load of sucrose nonfermenting vibrios that cause most food poisoning.

In the present study, we examined whether natural populations of sucrose nonfermenting and sucrose fermenting vibrios persisted in *Ruditapes philippinarum*, cultured at Ebro Delta, after exposure to UV light-disinfected seawater at two different temperatures. We studied the efficacy of depuration and compared the time required for both, sucrose nonfermenting and sucrose fermenting vibrios to become undetectable. Knowing the point in time when clams are free from SNFV not only contributes to the general knowledge of food safety and provides data for risk analysis but it also can be used when developing challenge models to study the kinetics of zoonotic or pathogenic vibrios in clams.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

The two batches of adult Manila clams used in the present study were collected from an aquaculture bed in the bay of Fangar (40°47'3"N 0°43'8"E) of the delta of the Ebro river in two different moments (Spring and Summer season). Once collected they were transported to the laboratory in plastic bags placed in cool boxes containing ice. Transport lasted less than 1 h in both occasions. On arrival (day 0) each batch of Manila clams was sampled for the detection and quantification of sucrose nonfermenting (SNFV) and

sucrose fermenting vibrios (SFV), and the remaining were placed inside the experimental system for depuration. Depuration trials were carried out in Spring and Summer 2007.

### 2.2. Experimental design

Two experiments were carried out (one in Spring and one in Summer) in order to get to different temperatures during the trials. As source of seawater (bay of Alfacs) presented variable concentrations of *V. parahaemolyticus*, a depuration process was conducted in 40 L raceways polyester fibre glass-reinforced (length, 90 cm; width, 45 cm; maximum depth of water 18 cm) with an internal gel-white coat and with an open-circuit seawater-disinfection system that uses both filtration (cartridge filters of 5 and 1 µm) and ultraviolet treatment (PHILIPS TUV 36 T5 4P-SE). In order to check efficacy of disinfection protocol, treated seawater was inoculated in TCBS plates and no growth was observed after 48 h. This procedure was performed weekly in the facilities. Seawater renewal rate was around 1 h (0.7 L/min). Inside the facility, water temperature is recorded continuously into a central computer and the values recorded for each experiment were retrieved and analyzed (Table 1). The clams were placed on a perforated plastic grid, which was raised from the bottom of the tank to minimize recontamination with feces and pseudofeces.

For each experiment clams were divided in two raceways and were sampled daily for microbiological analyses: a total of 12 clams per day in the Spring experiment (at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 and 216 h) and 9 clams per day in the Summer experiment (at 0, 24, 144, 168, 192 and 216 h). In the Summer experiment, at 48 and 72 h only 4 clams per day were collected. Changes in Summer experiment were due to problems in availability of animals. Length of experiments was established in 9 days since it was felt that to extend the trials more than 9 would probably induce a significant weight loss in the clams and with it, qualities which are prized by the consumer.

Each sampled clam was measured (Digital caliper (0–150 mm) LLG) and flesh was weighed. Table 1 shows the temperatures of seawater, weight (g) and length (mm) of clams used in the study, expressed as mean ± standard deviation (SD) and range (minimum, maximum). During the experiments no food was offered to the clams.

### 2.3. Microbiological analyses

Clams were individually processed and opened with an alcohol-flamed clam knife. Tissue and shell liquor samples were aseptically removed, weighed and placed into 10 ml of sterile 2.5% NaCl solution (SSS). The resulting mixture was homogenized for 30 s using an ultraturrax (IKA, T25 basic). Decimal dilutions were made in SSS and spread onto thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) plates (Kobayashi et al., 1963) and incubated at 28 °C for 20–24 h. The colonies on the TCBS plates were counted manually to calculate the density of viable cells in the sample (CFU/g), considering that SNFV produce green colonies and SFV appear as yellow colonies. The SNFV colonies are visually

**Table 1**  
Water temperature and clam biometry corresponding to both experimental conditions.

	Spring		Summer	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Temperature (°C)	19.88 ± 0.40	(19.1, 20.5)	25.19 ± 0.94	(23.9, 26.5)
Weight (g)	2.81 ± 0.67	(1.6, 4.6)	3.01 ± 0.62	(1.6, 4.3)
Length (mm)	34.396 ± 2.820	(22.63, 39.86)	36.913 ± 1.036	(35.01, 38.09)

distinguished from colonies formed by bacteria belonging to other genus by size and color of the colony (Hara-Kudo et al., 2001). All calculations are presented per gram of individual in order to overcome the fact that all were diluted in the same volume.

#### 2.4. Statistical analyses

Descriptive statistics was carried out using mean and standard deviation for quantitative variables, as length and weight, stratified by experiments. Homocedasticity was tested using Kolmogorov–Smirnov test to check normal distribution and Levene test for variance homogeneity. Non-homocedastic variables, as cfu/g, were log-transformed to improve homocedasticity. Mean comparison was performed using Student's *t* test for two means and ANOVA for more than two means and Duncan's post-hoc test to assess differences between means.

Qualitative variables, as depuration status, were described using relative frequencies and comparison of frequencies was carried out using Chi-square test (or alternatively Likelihood Ratio test or Fisher's exact test when Chi-square was not valid).

Predicted depuration time for SNFV and SFV were estimated by linear regression, using determination coefficient ( $R^2$ ) to assess its predictive value. Desired alpha error was established at 0.05. Statistic analysis was performed using SPSS 15.0 software (Chicago, IL, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Daily evolution of depuration

A total of 120 clams in Spring experiment and 62 clams in Summer experiment were analyzed. Depuration of SNFV and SFV was expressed as proportion (%) of clams with absence of *Vibrio* spp. First of all, proportions of clams with vibrios at day 0 and day 9 were compared. In Spring experiment, both groups of vibrios were initially present in 100% of analyzed clams in day 0, and at day 9 of the experiment we observed a significant reduction for SNFV (83.3%,  $P < 0.001$ ), but not for SFV (25%,  $P = 0.335$ ) (Fig. 1a). Nevertheless, the initial percentage of both types of vibrios in Summer experiment was not equal, since only 55.6% of clams presented SNFV at detectable levels at day 0, but SFV were initially present in 100% of clams. Results of depuration process did not show significative reductions at day 9, since SNFV were not detected in 77.8% of clams ( $P = 0.217$ ), and 0% of clams were free of SFV ( $P > 0.999$ ) (Fig. 1b). However, significant reduction for SNFV (55.56%,  $P = 0.018$ ), were found when was compared day 1 with day 9.

Results showed that depuration process was less effective in Summer than in Spring, in both groups of vibrios. Disinfection rates for SNFV showed despite an initial lower presence in the

experiment carried out in Summer, for unknown reasons and possibly due to random, the clearance in SNFV in Summer is less efficient than in Spring, with 22.2% of clams containing SNFV on day 8 of depuration and without significant changes on day 9.

When compared daily proportions of presence of SNFV and SFV in Spring experiment it was observed that SFV were proportionally more frequent than SNFV on day 8 ( $P = 0.039$ ) and day 9 ( $P = 0.012$ ). In Summer these differences were significant on day 7 ( $P = 0.029$ ), day 8 ( $P = 0.002$ ) and day 9 ( $P = 0.002$ ).

#### 3.2. Evolution of *Vibrio* load

Fig. 2 shows effect of depuration on *Vibrio* loads along time, expressed as log (cfu/g). Discontinuous lines correspond to mean *Vibrio* loads calculated from clams with presence of vibrios, and continuous lines considered all the clams to estimate mean load. In Spring experiment mean of residual *Vibrio* loads (12 clams/day) from day 0 to day 9 (in clams containing vibrios) varied from 990 cfu/g to 76 cfu/g for SNFV and from 6343 cfu/g to 565 cfu/g for SFV, while in Summer experiment (9 clams/day) loads varied from 137 cfu/g to 49 cfu/g for SNFV and from 39111 cfu/g to 1073 cfu/g for SFV. Therefore, Spring experiment results showed a progressive reduction of SNFV loads (total  $P < 0.001$  and residual  $P < 0.001$ ) and SFV load (total  $P = 0.001$  and residual  $P < 0.001$ ), and Duncan test evidenced that all these reductions were generally significant from day 2 (Fig. 2a). Significant reductions of *Vibrio* loads were also detected during Summer experiment for loads of SNFV (total  $P = 0.026$  and residual  $P = 0.064$ ) and SFV vibrios (total  $P = 0.014$  and residual  $P = 0.002$ ), however Duncan test indicated that reductions were significant after 6–8 days of depuration (Fig. 2b).

#### 3.3. Predictive models for clam depuration

From the present experimental data regression functions were built for kinetics of SNFV and SFV in Spring and Summer (Fig. 3). In all cases a very significant linear regression model was formulated, however predictive performance ( $R^2$ ) was poor. Extrapolating equations from models it could be estimated that complete depuration for SNFV would be at day 10 in Spring and day 12 in Summer, and longer for SFV (day 20 in Spring and day 33 in Summer).

### 4. Discussion

In the present study, a strong relationship among temperature, SNFV and SFV loads, depuration status and period of time was observed. It is obvious that a lower residual *Vibrio* load implies a higher proportion of depurated clams (with undetectable levels of *Vibrio*).

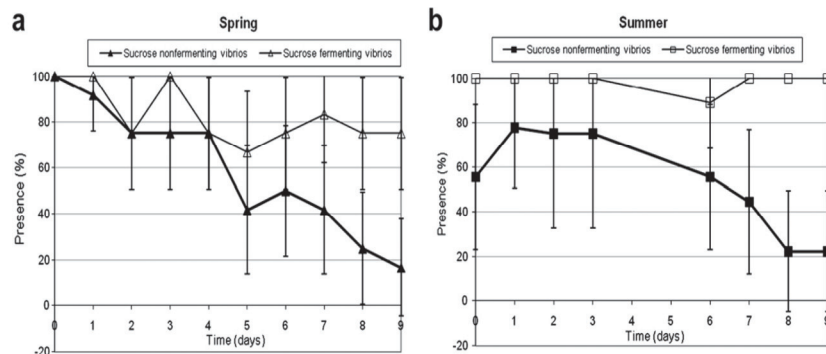


Fig. 1. Effect of seawater temperatures in depuration on sucrose nonfermenting and sucrose fermenting vibrios levels in clams harvested in (a) Spring and (b) Summer.

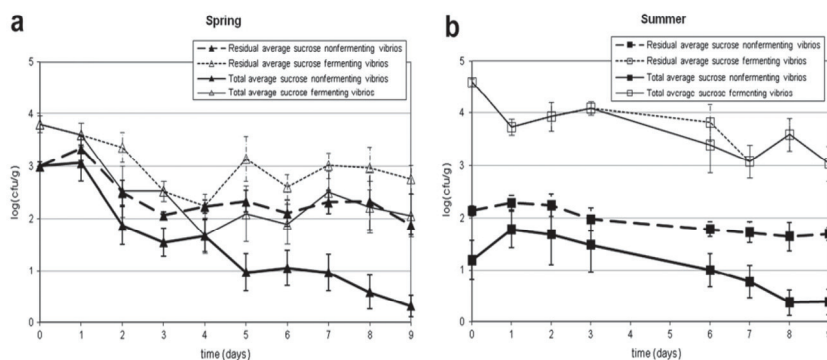


Fig. 2. Effect of seawater temperatures in the depuration process on total and residual sucrose nonfermenting and sucrose fermenting vibrio levels (mean ± standard error of the mean) in clams harvested in Ebro delta in (a) Spring and (b) Summer.

Several studies indicated that temperature is a key factor in ecology of *Vibrio*, and seawater temperature and density of vibrios were positively correlated (Kaneko and Colwell, 1973; DePaola et al., 2003; Duan and Su, 2005). Croci et al. (2002) did not find differences between densities of an SNFV (*V. parahaemolyticus*) and an SFV (*V. cholerae*) during a depuration process using ozone-treated water at 16–18 °C during 44 h.

However present results indicate that temperature also plays an important role in the ratio between SNFV and SFV. When temperature is around 20 °C (Spring experiment, duplicate raceways) initial SFV load was 6.4 greater than SNFV load, while at higher temperatures (25 °C in Summer experiment duplicate raceways) this ratio was incremented until 285.5. It can be supposed that competition phenomenon exists between both groups of vibrios. This effect is relatively attenuated through depuration time, especially at higher temperatures; since at day 9 ratio SFV: SNFV was similar in Spring experiment (7.4), but it decreased to 21.9 in Summer experiment.

Currently, clams spend 48 h for depuration with UV light-treated seawater (or alternatively treated with ozone or chloride) at ambient temperature, and this time is enough to reduce fecal coliforms to under 300 cfu/100 g and *E. coli* to under 230 cfu/100 g (European Community, 2007). However this protocol is considered

to be insufficient for disinfecting live bivalves from other food-borne pathogens. Eyles and Davey (1984) showed that depuration with UV light-treated seawater had no significant effect on levels of naturally occurring *V. parahaemolyticus*, but significantly reduced the aerobic plate counts of coliforms and *E. coli*. Likewise, Greenberg et al. (1982) demonstrated that *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* counts remained elevated in clams exposed to UV light-treated seawater, while *E. coli* counts were reduced 100-fold in 24 h. On the other hand, it is possible to reduce *V. vulnificus* to low concentrations after 7 days, using laboratory-contaminated oysters and no bactericidal treatments of seawater (Kelly and Dinuzzo, 1985). This contradicting information is possibly related to inoculum levels, differences in bacteriological isolation and identification procedures, and/or use of laboratory versus environmentally-contaminated specimens. In this regard, Richards (1988) suggested that natural populations of vibrios may be more resistant to the effects of depuration than vibrios grown in the laboratory. They observed that laboratory and natural strains of *V. vulnificus* show different survival patterns under depuration and dry-storage conditions. Unlike environmental strains, laboratory strain counts are easily reduced, apparently by rapidly growing endogenous bacterial flora of molluscs, including natural populations of *V. vulnificus* (Kaspar and Tamplin, 1990).

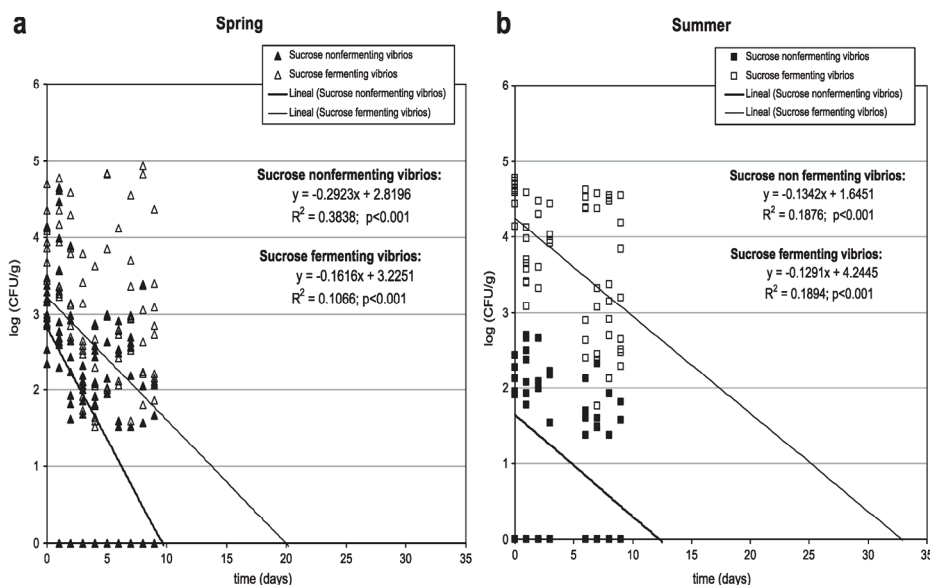


Fig. 3. Predicted death-time of sucrose nonfermenting and sucrose fermenting vibrios in (a) Spring and (b) Summer.



There is a general consensus that depuration at ambient temperature is not a good method to reduce *Vibrio* load in seafood (Colwell and Liston, 1960; Eyles and Davey, 1984). Furthermore, some studies indicated that at elevated seawater temperatures (e.g., >21 °C), *V. vulnificus* multiplies markedly in oyster tissues and large numbers are released into surrounding seawater at rates exceeding the bactericidal activities of UV light. *V. vulnificus* (SNFV) did not depurate from oyster shell stock when UV light and/or 0.2- $\mu$ m-pore-size filtration treatments of seawater were used (Tamplin and Capers, 1992).

Present results explain that at least 10 days are required to depurate vibrios (19.88  $\pm$  0.40 °C), and longer depuration times are required at higher temperatures (25.19  $\pm$  0.94 °C). Moreover, depuration times for SNFV were always lower than SFV, even if initial bacterial load was higher for the latter.

In the present study, no significant reduction was found for SNFV between time 0 and 9 days, in Summer experiment due to SNFV load was not 100% as it was waiting at time 0. This result may be due to a type II error, failing to find differences where they exist, standard deviations of the mean are high, indicating variability in the results, which is common when analyzing invertebrates. This result could mean that Summer experiment needed more samples per day (9 clams/day were used in the Summer, instead of 12 clam/day that were used in Spring, this was due to lack of individuals) in order to find significant reduction. On the other hand, this result could be due to random and not all of the clams had SNFV, instead all of them had SFV at time 0. Although an explanation would be green colonies formed by SNFV on TCBS plates were masked by yellow colonies produced by large numbers of SFV on the plates, this is not the case because adequate dilutions were performed to avoid that SNFV colonies on TCBS agar were difficult to distinguish visually from SFV colonies.

Though no explanation was found for this it may be due to the fact for at least commercial aquaculture invertebrates the SNFV are most commonly associated with vibriosis (Daniels and Shafaie, 2000; Paillard, 2004) and therefore the ones that the organism will try to get rid of.

Another key factor to take into account is water temperature which can be associated with food-borne outbreaks, and for example, consumption of raw fish or shellfish, particularly oyster, harvested from water with a temperature higher than 14 °C can result in development of gastroenteritis caused by *V. parahaemolyticus* infection (SNFV) (Yang, 2008). In Spain, there are few cases of food-borne outbreaks related with vibrios (and most of them were SNFV), despite the fact that water temperature is high in Mediterranean Sea, this is perhaps due to the fact that *Vibrio* testing is not compulsory in the medical system. In the present study it is observed that differences in ratio SNFV:SFV are related to seawater temperature, and results showed a greater efficacy in depuration of SNFV (most important pathogenic vibrios belong to this group).

Generation times of some SNFV are very fast, such as *V. parahaemolyticus* (Natarajan et al., 1980), so that low levels of SNFV in raw seafood could be a potential public health hazard if the storage temperature is inadequately controlled (Feldhusen, 2000).

Two variables should be considered to improve depuration of vibrios: seawater temperature and depuration time. Related with first variable, Yang (2008) affirmed low-temperature depuration is a simple and economical measure to reduce the risk of *V. parahaemolyticus* infection associated with raw oyster (*Crassostrea gigas*) consumption and can easily be adopted by the industry to provide safe oysters for consumption. *C. gigas* was cultured in Pacific Northwest (lower water temperature). He observed that oysters were able to filter seawater at a low temperature (4 °C) and survive in the refrigerated seawater (4 °C) for at least 96 h without noticeable fatality and demonstrated that oysters harvested in the

winter time (7–9 °C) exhibited very high levels of metabolism when they were depurated in refrigerated (5 °C) seawater, because they needed a shorter time to acclimate to the environment of a different temperature for normal activity. However, Chae et al. (2009) found little or no reductions of *V. parahaemolyticus* or *V. vulnificus* in oyster (*C. virginica*) cultures in the Gulf Coast (higher water temperature), when oysters were depurated at 10 °C or lower. And they found that the low-temperature effect on reducing *V. parahaemolyticus* or *V. vulnificus* in oyster was limited to depuration at 15 °C. These results agree with studies that have reported that each shellfish species pumps water over a certain temperature range and water-pumping activity can be affected by water temperature (Richards, 1991; Roderick and Schneider, 1994). So, shellfish normally grown in cold water tend to have an optimal depuration temperature lower than those grown in warm water. Therefore, it will be necessary establish an optimal temperature of depuration according to the shellfish, to aid their acclimation, avoiding drastic temperature decrease that could imply a stress for molluscs. In the Mediterranean area water cooling would be an important additional expense for depuration process derived from energetic costs.

A longer depuration period at ambient temperature is effective to reduce *Vibrio* load, as shown by results presented here, unfortunately mollusc quality will progressively reduce with time, and economic cost is also increased due to longer use of depuration facilities.

## 5. Conclusion

Depuration efficacy depends mainly on seawater temperature and depuration time (though type of *Vibrio* and initial bacterial load are also relevant). In the present study it was shown that SNFV (involved in food poisoning) are purged at 20 and 25 °C more effectively than SFV, but more than 10 days at 20 °C are necessary to depurate clams and to avoid health risk for consumers. However, depuration times could be reduced using lower temperatures, and further studies would be necessary in order to formulate a predictive model that integrates both variables and which allows minimizing costs ensuring organoleptic quality of molluscs and food safety.

## Acknowledgments

The present study was financed by INIA project Nos. RTA 2005 00079 00 00 and RTA 2007 00063 00 00 with Feder funds awarded to AR. CLJ has a doctoral scholarship provided by INIA. We are grateful to Josep Maria Reverte and the staff from the USM at IRTA for the sample collection and to Josu Pérez for the help and advice.

## References

- de Abreu Corrêa, A., Albarnaz, J.D., Moresco, V., Poli, C.R., Teixeira, A.L., Oliveira Simoes, C.M., Monte Barardi, C.R., 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research* 63, 479–489.
- Abbott, S.L., Janda, J.M., Johnson, J.A., Farmer III, J.J., 2007. *Vibrio* and related organisms. In: Murray, P.R., Baron, E.J., et al. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, ninth ed. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 723–733.
- Andrews, L.S., DeBlanc, S., Veal, C.D., Park, D.L., 2003. Response of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to a hot water/cold shock pasteurization process. *Food Additives and Contaminants* 20, 331–334.
- Austin, B., 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140, 310–317.
- Chae, M.J., Cheney, D., Su, Y.-C., 2009. Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science* 74, 62–66.

- Colwell, R.R., Liston, J., 1960. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology* 8, 104–109.
- Cook, D.W., 1991. Indicators and alternate indicators of growing waters. In: Ward, D.R., Ackney, C.H. (Eds.), *Microbiology of Marine Food Products*. AVI Book, New York, pp. 19–39.
- Cozzi, L., Suffredini, E., Gianni, C., Croci, L., 2009. Depuration treatment of mussels experimentally contaminated with *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. ICMS09. In: *Proceedings of the Seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, pp. 116–120. [www.symposcience.org](http://www.symposcience.org), Nantes, France.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., 2002. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 460–465.
- Daniels, N.A., Shafaie, A., 2000. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infections in Medicine* 17, 665–685.
- DePaola, A., Nordstrom, J.L., Bowers, J.C., Wells, J.G., Cook, D.W., 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1521–1526.
- Duan, J., Su, Y.-C., 2005. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. *Journal of Food Science* 70, 58–63.
- Ekanem, E.O., Adegoke, G.O., 1995. Bacteriological study of West African clam (*Egeria radiata* Lamarch) and their overlying waters. *Food Microbiology* 12, 381–385.
- European Community, 2004a. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union L* 139, 55–205.
- European Community, 2004b. Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union L* 139, 206–320.
- European Community, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L* 364, 5–24.
- European Community, 2007. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union L* 322, 12–29.
- Eyles, M.J., Davey, G.R., 1984. Microbiology of commercial depuration of the Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. *Journal of Food Protection* 47, 703–706.
- Farmer III, J.J., Hickman-Brenner, F.W., 2006. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *Prokaryotes* 6, 508–563.
- Feldhusen, F., 2000. The role of seafood in bacterial food-borne diseases. *Microbes and Infection* 2, 1651–1660.
- Franco, E., Toti, L., Gabrieli, R., Croci, L., De Medici, D., Panà, A., 1990. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* contaminated with hepatitis A virus. *International Journal of Food Microbiology* 11, 321–328.
- Greenberg, E.P., Dubois, M., Palhof, B., 1982. The survival of marine vibrios in *Merceneria merceneria*, the hardshell clam. *Journal of Food Safety* 4, 113–123.
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S., 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5819–5823.
- He, H., Adams, R.M., Farkas, D.F., Morrissey, M.T., 2002. Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. *Journal of Food Science* 67, 640–645.
- Huss, H.H., Reilly, A., Embarek, P.K.B., 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11, 149–156.
- 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.
- Johnston, M.D., Brown, M.H., 2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1066–1077.
- Kaneko, T., Colwell, R.R., 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology* 113, 24–32.
- Kaspar, C.W., Tamplin, M.L., 1990. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2425–2429.
- Kelly, M.T., Dinuzzo, A., 1985. Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1548–1549.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R., Kuwahara, S., 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). *Japanese Journal of Bacteriology* 18, 387.
- Lee, R.J., Younger, A.D., 2002. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50, 177–183.
- Martínez, O., Rodríguez-Calleja, J.M., Santos, J.A., Otero, A., García-López, M.L., 2009. Foodborne and indicator bacteria in farmed molluscan shellfish before and after depuration. *Journal of Food Protection* 72, 1443–1449.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607–625.
- Natarajan, R., Abraham, M., Nair, G.B., 1980. *Vibrio parahaemolyticus* and the seafood industry. *Fish Technology* 17, 1–6.
- Oliver, J.D., Kaper, J.B., 2001. *Vibrio* species. In: Doyle, M., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, second ed. ASM Press, Washington, D.C, pp. 263–300.
- Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17, 467–475.
- Richards, G.P., 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *Journal of Food Protection* 51, 218–251.
- Richards, G.P., 1991. Shellfish depuration. In: Ward, D.R., Hackney, C.R. (Eds.), *Microbiology of Marine Food Products*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 395–428.
- Roderick, G.E., Schneider, K.R., 1994. Depuration and relaying of molluscan shellfish. In: Hackney, C.R., Person, M.D. (Eds.), *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman & Hall, New York, pp. 331–363.
- Roque, A., Lopez-Joven, C., Lacuesta, B., Elandloussi, L., Wagley, S., Furones, M.D., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Rangdale, R., Gomez-Gil, B., 2009. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7574–7577.
- Rowse, A.J., Fleet, G.H., 1984. Effect of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella* *charity* and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 1061–1063.
- Smith, M.R., König, A., 2010. Environmental risk assessment for food-related substances. *Food Control* 21, 1588–1600.
- Sumner, J., De Paola, A., Osaka, K., Karunasager, I., Walderhaug, M., Bowers, J., 2001. Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Vibrio* spp. in seafood. In: *Joint FAO/WHO Activities on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods*, pp. 1–108.
- Tamplin, M.L., Capers, G.M., 1992. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of gulf coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1506–1510.
- Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., Musti, M., 2004. A review: updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* 39, 117–126.
- Teplitski, M., Wright, A.C., Lorca, G., 2009. Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 185–190.
- Vasconcelos, G.J., Lee, J.S., 1972. Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied Microbiology* 23, 11–16.
- Wang, D., Zhang, D., Chen, W., Yu, S., Shi, X., 2010. Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. *International Journal of Food Microbiology* 137, 76–80.
- Yang, Q., 2008. Refrigerated seawater depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* contamination in raw oysters (*Crassostrea gigas*). MSc thesis. Oregon State University.

### 7.2.2. Journal of Applied Microbiology, 2011

Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Furonos MD, Roque A. Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;111(1):197-208.

#### Resumen del artículo en castellano

##### **Incorporación experimental y retención de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno en dos especies de almejas: *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum***

**Objetivos:** Describir la incorporación y retención de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno en *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*.

**Métodos y Resultados:** *Ruditapes decussatus* acumula concentraciones mayores de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno que *R. philippinarum*. Y además, estas concentraciones disminuyeron antes. *Vibrio parahaemolyticus* no patógeno alcanzó concentraciones más altas (aproximadamente 1 log UFC g<sup>-1</sup> en *R. decussatus* y más de 1 log UFC g<sup>-1</sup> en *R. philippinarum*) que *V. parahaemolyticus* patógeno a los mismos tiempos de muestreo. También se observó que *V. parahaemolyticus* no patógeno persistió durante más tiempo en las dos especies de almejas (72 h en *R. decussatus* y 96 h en *R. philippinarum*), mientras que *V. parahaemolyticus* patógeno persistió 48 h en *R. decussatus* y 72 h en *R. philippinarum*.

**Conclusiones:** *Ruditapes decussatus* incorporó las dos cepas de *V. parahaemolyticus* más rápido que *R. philippinarum* y también, los eliminó antes. En las mismas condiciones, *V. parahaemolyticus* no patógeno podría sobrevivir mejor que *V. parahaemolyticus* patógeno dentro de ambas especies de almeja.

**Importancia e Impacto del estudio:** *Vibrio parahaemolyticus* patógeno es un importante agente causal de intoxicaciones alimentarias. Este estudio demuestra que es posible utilizar *V. parahaemolyticus* no patógeno para llevar a cabo experimentos que evalúen la evolución bacteriana en las almejas, desarrollando un modelo *in vivo* útil para el análisis de riesgos.



ORIGINAL ARTICLE

## Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*

C. Lopez-Joven<sup>1,2</sup>, I. de Blas<sup>2</sup>, I. Ruiz-Zarzuela<sup>2</sup>, M.D. Furones<sup>1</sup> and A. Roque<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRTA-SCR, Sant Carles de la Ràpita, Spain

<sup>2</sup> Laboratory of Fish Diseases, Veterinary Faculty, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

### Keywords

bacterial uptake, Grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*), Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*), *Vibrio parahaemolyticus*.

### Correspondence

Ana Roque, IRTA-SCR, Ctra. Poble Nou km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain.  
E-mail: ana.roque@irta.es

2011/0059: received 12 January 2011, revised 24 March 2011 and accepted 25 March 2011

doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05024.x

### Abstract

**Aims:** To describe uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*.

**Methods and Results:** *Ruditapes decussatus* accumulated greater concentrations of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* than *R. philippinarum*. These concentrations decreased earlier in *R. decussatus*. Nonpathogenic *V. parahaemolyticus* reached higher concentrations (approx. 1 log CFU g<sup>-1</sup> in tissues of *R. decussatus* and more than 1 log CFU g<sup>-1</sup> in *R. philippinarum*) than pathogenic *V. parahaemolyticus* at similar times. It also persisted longer in both species of clams (72 h in *R. decussatus* and 96 h in *R. philippinarum*), while pathogenic *V. parahaemolyticus* persisted 48 h in *R. decussatus* and 72 h in *R. philippinarum*.

**Conclusions:** *Ruditapes decussatus* incorporated both isolates of *V. parahaemolyticus* faster than *R. philippinarum* and it eliminated both isolates earlier than *R. philippinarum*. Under same conditions, nonpathogenic *V. parahaemolyticus* might survive better than pathogenic *V. parahaemolyticus* within both species of clam.

**Significance and Impact of the Study:** Pathogenic *V. parahaemolyticus* is an important cause of foodborne illnesses. This study shows it may be possible to use nonpathogenic *V. parahaemolyticus* to perform experimentation to evaluate bacterial evolution in clams, developing an *in vivo* model useful for risk analysis.

### Introduction

*Vibrio parahaemolyticus* is a human pathogen that is widely distributed in marine environments (Yoon *et al.* 2008). The overall mechanism of pathogenesis of *V. parahaemolyticus* is still not completely understood from the molecular epidemiological perspective. Nevertheless, two hemolysins, the thermostable direct hemolysin (TDH) and/or the tdh-related hemolysin (TRH) encoded by *tdh* and *trh* genes, respectively, are important virulence factors and play a significant role in the disease (Takeda 1983; Kaper *et al.* 1984; Nishibuchi *et al.* 1986). Almost all *V. parahaemolyticus* strains isolated from clinical specimens present this hemolytic activity, which has been

called the Kanagawa phenomenon (KP), whereas only 1–3% of the isolates of environmental origins are KP positive (Lozano-León *et al.* 2003; Robert-Pillot *et al.* 2004).

Because of their filter-feeding activity, bivalves concentrate bacteria in their tissues. Thus, the consumption of raw or undercooked bivalves contaminated with bacteria producing virulence factors may lead to the transmission of the bacteria to humans causing acute gastroenteritis (Nishibuchi and Kaper 1995). *Vibrio parahaemolyticus* has been recognized as an important cause of foodborne illnesses in Asian countries such as Japan (Alam *et al.* 2002), Taiwan (Wong *et al.* 2000) and China (Liu *et al.* 2004); and it is also recognized as the first cause of human gastroenteritis associated to shellfish consumption



in United States (Daniels *et al.* 2000; McLaughlin *et al.* 2005). It has also been reported that *V. parahaemolyticus* is responsible for outbreaks associated with consumption of raw or undercooked shellfish in some European countries such as Spain (Molero *et al.* 1989; Lozano-León *et al.* 2003; Martínez-Urtaza *et al.* 2005). However, although *V. parahaemolyticus* has been detected in several occasions in European countries (Macián *et al.* 2000; Tilburg *et al.* 2000; Croci *et al.* 2001; Hervio-Heath *et al.* 2002; Roque *et al.* 2009), the risk of *V. parahaemolyticus* infections is considered to be low (European Commission 2001; Su and Liu 2007). Consequently, *V. parahaemolyticus* is not included in the European Network for Epidemiologic Surveillance and Control of Communicable Diseases and it is also excluded from the microbiological surveillance system for infectious gastroenteritis (European Commission 2001). Although numerous studies have been conducted to evaluate the prevalence and survival of *V. parahaemolyticus* in a variety of seafood (Vasudevan *et al.* 2002; CDC 2006; Su and Liu 2007), very limited information is available on the kinetics of its growth (Miles *et al.* 1997; Gooch *et al.* 2002; Yoon *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009). Environmental studies have shown the presence of pathogenic strains in Spanish Mediterranean coast (Roque *et al.* 2009) but no information is available about the kinetics of its growth in different species of clams. Spain is the third and second largest producing country in Europe of Grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*) and Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*), with a national production of 129 and 1147 t per year (2008), respectively, and also one of the largest consumers of bivalve molluscs (FAO 2008).

Growth behaviour of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in clams has not yet been compared. Therefore, it is important to better understand the growth or death responses of the *V. parahaemolyticus* inside different species of shellfish and in different situation as this information will help to develop models providing valuable information to producers and consumers (Yang *et al.* 2009).

This study was conducted to describe the growth characteristics of two different isolates of *V. parahaemolyticus*, one potentially pathogenic possessing the *tdh* gene and another classified as nonpathogenic because it contained neither *tdh* nor *trh* genes, in two species of clams (*R. decussatus* and *R. philippinarum*). The rationale behind this study was to compare the behaviour of two isolates with different potential to cause disease in humans. They were both isolated from shellfish cultured in the Ebro river delta; thus, they were fully adapted to the bivalves and their environment and that was why they were preferred to type strains. The objectives of the study were to determine when

would the clams present the maximum bacterial load in their tissues after exposure to *V. parahaemolyticus* isolates and to investigate whether there were differences between pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* and/or between species of clams. Results from such study contribute to the production of data to be used in quantitative risk analysis and to harmonize an *in vivo* model for further research.

## Materials and methods

### Samples collection

The different species of clams used in this study came as adults from the bays of the Delta of the Ebro River. The batches of clams used in the study were all alive, and it was observed that individuals opened and closed their valves without any noticeable abnormality and they presented intact shells with normal coloration, indicating that they were devoid of signs of disease and/or parasitism. Once collected, clams were transported to the laboratory in plastic bags placed in cool boxes containing ice. Transport lasted <1 h in all occasions. On arrival, clams were placed inside the experimental system for depuration and the depuration time being based on previous experiments (Lopez-Joven *et al.* 2011). When clams were free from or with irrelevant level of sucrose nonfermenting vibrios (like *V. parahaemolyticus*), they were placed in experimental units.

### Bacterial isolates and preparation of the inocula

Two *V. parahaemolyticus* isolates with the *tl* gene were used in this study. Both of them were isolated in the summer 2006 from the bivalves, cultured in the Delta of the Ebro River, Spain. Both isolates used in the study are short rods Gram negative, catalase and oxidase positive, anaerobic facultative, motile, produce green colonies in thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) (Oxoid, Basingstoke, UK), grow at 42°C but not in 8% sodium chloride (NaCl). Also, API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) profile in both cases gave out a result for *V. parahaemolyticus* with 99.5% and 99.9% similarity. They were identified/confirmed by one-step PCR analysis using the primers described by Bej *et al.* (1999) with the following amplification conditions on the thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal; Eppendorf AG, Hamburg, Germany): an initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of a 1-min denaturation at 94°C, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72° for 1 min and a final extension of 10 min at 72°C. Positive and negative controls were included in all reaction mixtures: two positive controls, *tl* and *tdh* CAIM 1400 and

*trh* CAIM 1772 (Collection of Aquatic Important Microorganisms [http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html]), and negative control were prepared with DNA-free molecular grade water (Sigma-Aldrich, Ayrshire, UK). Expected amplicons were visualized in 2% agarose gels stained with ethidium bromide (Roque *et al.* 2009). Pathogenic isolate, *V. parahaemolyticus* i678\* (pathogenic *Vp*) that contains *tdh* gene was isolated from a clam. Nonpathogenic isolate used, *V. parahaemolyticus* i747\* (nonpathogenic *Vp*), did not contain the thermostable direct hemolysin (*tdh*) or the TDH-related hemolysin (*trh*) genes, and it was isolated from a mussel. Both isolates were cryopreserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. For each isolate, a bead was inoculated into a 250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of tryptic soy broth (TSB) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) with 2.0% NaCl, which was then sealed with a foam plug and incubated at  $28^{\circ}\text{C}$  for 18–20 h in a rotating shaker (New Brunswick Scientific, Excella E24 Incubator skaker series, Edison, NJ, USA). After this, liquid culture was transferred into a sterile Falcon tube and centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$ , for 10 min at 2019 g. Supernatant was discarded and the pellet was resuspended in sterile saline solution (2.5% NaCl) (SSS), and absorbance was measured in the spectrophotometer at  $\text{OD}_{620\text{nm}}$  to obtain cultures of pathogenic or nonpathogenic *V. parahaemolyticus* able to reach an initial population of  $10^5$ – $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  in the water of the exposure tank.

Results were simultaneously analysed by plating onto tryptic soy agar (TSA) (Scharlau Chemie S.A.) with 2.0% NaCl, TCBS agar and Chromagar Vibrio (Biomérieux) in duplicate and with the appropriate dilution. The samples were incubated aerobically at  $28^{\circ}\text{C}$  (TSA and TCBS) and  $37^{\circ}\text{C}$  (Chromagar Vibrio) for 18–20 h. Colony forming units (CFU) were counted afterwards.

### Experimental design

Each experiment (experiment A with pathogenic and experiment B with nonpathogenic *V. parahaemolyticus*) consisted of two independent challenges and each challenge was performed on four groups: one treatment group and one control group for each of the two species of clam (*R. decussatus* and *R. philippinarum*). In each challenge, clams were analysed at time intervals that ranged from 0 to 168 h after inoculation (Table 1). The number of clams in control groups (uncontaminated clams) was the same as in inoculated groups (with the exceptions that are indicated in Table 1). Experiments were carried out at room temperature, and tank water temperature varied between 16 and  $18^{\circ}\text{C}$ . Prior to the contamination with pathogenic and nonpathogenic

*V. parahaemolyticus*, a batch of *R. decussatus* or *R. philippinarum* was sampled to confirm clams were free from sucrose nonfermenting vibrios (time 0). Once it was established that the clams were free from nonfermenting sucrose vibrios, bacterial suspensions were added to the water. Phytoplankton ( $10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ), axenic *Isochrysis galbana* variety Tahiti (Pérez Camacho *et al.* 2002) were added to the tanks with the bacterial suspensions to stimulate bacterial uptake by the clams. Initial bacterial load (log CFU) inoculated ranged from  $6.50 \pm 0.19$  to  $8.63 \pm 0.90$  log CFU per clam (Table 2). In the first experiment (A), a pathogenic isolate was used and two challenges lasting 24 and 72 h, respectively, were performed to observe global evolution of this vibrio inside the clams. In second experiment (B), a nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was used. Two challenges were also performed, one lasting 72 h and the other lasting 168 h.

### Experiment A: uptake of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from spiked water

**Challenge A1:** Contamination was carried out in different experimental units for different species of clams containing seawater UV-light disinfected. Contamination was conducted with approx. 350 ml of seawater per clam in a static aerated system which was maintained at room temperature. A total of 48 individuals of *R. decussatus* and 48 individuals of *R. philippinarum* (both previously depurated) were analysed. Six clams from each experimental unit were sampled per sampling time. Sampling times were: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h.

**Challenge A2:** The period of study was increased to obtain and assess a complete evolution of pathogenic *V. parahaemolyticus* inside both species of clams and determine when pathogenic *V. parahaemolyticus* start to decrease along time inside the clams. A total of 60 individuals of each species of clam were analysed. Ten *R. decussatus* and 12 *R. philippinarum* were sampled at 0, 2 (only in *R. decussatus*), 12, 24, 48 and 72 h.

### Experiment B: uptake of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from spiked water

**Challenge B1:** A total of 110 *R. decussatus* (ten clams per sampling time) and 66 *R. philippinarum* (six clams per sampling time) were analysed at times 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48 and 72 h, according to results obtained in experiment A. However, at 72 h, the decrease in bacterial numbers was not observed, and it was necessary to increase the duration of the study.

**Challenge B2:** A total of 66 *R. decussatus* and 75 *R. philippinarum* were analysed at time 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 (only in *R. decussatus*), 120 and 168 h. At each test

\*Available from the corresponding author.

**Table 1** Chronogram of analysis for each challenge (number indicates number of sampled clams exposed to vibrio inoculum and the same number of controls)

Experiment	Challenge	Clam specie*	Time postinoculum (h)													Total	
			0	2	4	8	12	16	20	24	36	48	72	96	120		168
A (pathogenic <i>Vp</i> )	A1	<i>R.d.</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	48
		<i>R.ph.</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	48
	A2	<i>R.d.</i>	10†	10†	n.s.	n.s.	10†	n.s.	n.s.	10†	n.s.	10†	10†	n.s.	n.s.	n.s.	60
		<i>R.ph.</i>	12	n.s.	n.s.	n.s.	12	n.s.	n.s.	12	n.s.	12	12	n.s.	n.s.	n.s.	60
B (non-pathogenic <i>Vp</i> )	B1	<i>R.d.</i>	10	10†	10†	10†	10†	10†	10	10†	10	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	110
		<i>R.ph.</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	n.s.	n.s.	n.s.	66
	B2	<i>R.d.</i>	9	n.s.	n.s.	n.s.	6	n.s.	n.s.	9	9	9	9	n.s.	6	9	66
		<i>R.ph.</i>	9	n.s.	n.s.	n.s.	6	n.s.	n.s.	9	9	9	9	9	6	9	75

n.s., No. sampled.

\**R.d.*, *Ruditapes decussatus*; *R.ph.*, *Ruditapes philippinarum*.

†Control is limited to five clams/sampling time.

**Table 2** Biometry characteristics of two species of clams (expressed as mean  $\pm$  standard deviation) used in this study and initial bacterial load of *Vibrio parahaemolyticus* offered per clam

Experiment	Challenge	Clam*	<i>Vp</i> inoculated group			Control group			Initial bacterial load (log CFU per clam)
			<i>n</i>	Length (mm)	Weight (g)	<i>n</i>	Length (mm)	Weight (g)	
A (pathogenic <i>Vp</i> )	A1	<i>R.d.</i>	48	30.65 $\pm$ 2.73	1.90 $\pm$ 0.45	48	31.07 $\pm$ 2.66	1.84 $\pm$ 0.43	7.10 $\pm$ 0.35
		<i>R.ph.</i>	48	41.70 $\pm$ 5.37	3.91 $\pm$ 1.57	48	41.61 $\pm$ 5.65	3.81 $\pm$ 1.49	7.18 $\pm$ 0.68
	A2	<i>R.d.</i>	60	41.83 $\pm$ 4.18	4.68 $\pm$ 1.94	30	42.42 $\pm$ 4.79	5.05 $\pm$ 1.71	8.25 $\pm$ 0.00
		<i>R.ph.</i>	60	37.96 $\pm$ 4.44	2.82 $\pm$ 0.99	60	38.85 $\pm$ 4.17	2.93 $\pm$ 1.08	6.50 $\pm$ 0.19
B (non-pathogenic <i>Vp</i> )	B1	<i>R.d.</i>	110	42.28 $\pm$ 5.31	4.54 $\pm$ 1.69	75	42.93 $\pm$ 5.42	4.68 $\pm$ 1.56	7.27 $\pm$ 0.22
		<i>R.ph.</i>	66	36.27 $\pm$ 3.67	3.13 $\pm$ 0.77	66	35.68 $\pm$ 3.74	2.92 $\pm$ 0.79	7.99 $\pm$ 0.71
	B2	<i>R.d.</i>	66	28.88 $\pm$ 2.84	1.15 $\pm$ 0.40	66	29.02 $\pm$ 3.29	1.10 $\pm$ 0.46	6.72 $\pm$ 0.24
		<i>R.ph.</i>	75	35.61 $\pm$ 3.81	2.37 $\pm$ 0.75	75	35.38 $\pm$ 3.77	2.22 $\pm$ 0.71	8.63 $\pm$ 0.90

\**R.d.*, *Ruditapes decussatus*; *R.ph.*, *Ruditapes philippinarum*.

time, 6–9 clams were randomly picked from the experimental units.

#### Microbiological analyses

Each clam was measured [Digital caliper (0–150 mm) LLG; Mitutoyo CD-15, Tokyo, Japan] and flesh was weighed. Table 2 shows length (mm) and weight (g) of clams used in the study.

Clams were opened with an alcohol-flamed clam knife and were individually homogenized. Tissue and shell liquor samples were aseptically removed, weighed and placed into 10 ml of sterile 2.5% NaCl solution (SSS). The resulting mixture was homogenized for 30 s using an ultraturrax. Decimal dilutions were made in SSS for each isolate and volumes of 0.1 ml from each dilution were spreading onto Chromagar Vibrio plates (CHROMagar, Paris, France) and incubated at 37°C for 18–20 h. The colonies formed (*V. parahaemolyticus* produces mauve-purple colonies onto

Chromagar Vibrio) were counted manually to calculate the density of viable cells in the sample (CFU g<sup>-1</sup>). Populations of *V. parahaemolyticus* were expressed as the mean density of all determinations for each sampling time.

#### Statistical analyses

Descriptive statistics were performed calculating mean and standard deviation for quantitative variables, as length and weight, stratified by experiments. Homoscedasticity was tested using Kolmogorov–Smirnov test to check normal distribution, and Levene test for variance homogeneity. Nonhomoscedastic variables, as CFU g<sup>-1</sup>, were log-transformed to improve homoscedasticity. Mean comparison was performed using Student's *t*-test for two means and ANOVA for more than two means and Duncan *post hoc* test to assess differences between means. Desired alpha error was established at 0.05. Statistic analysis was performed using SPSS 15.0 software (Chicago, IL, USA).



## Results

### Experiment A: uptake of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from spiked water

A total of 192 clams in experiment A1 and 210 clams in experiment A2 were analysed. Bacterial load of *V. parahaemolyticus* was expressed as log CFU g<sup>-1</sup>.

#### Challenge A1

A period of study of 24 h was established. According to their biometrical measurements (Table 2), *R. philippinarum* were bigger than *R. decussatus* (length and weight;  $P < 0.001$ ) in all groups of challenge A1. The populations of pathogenic *V. parahaemolyticus* increased in *R. decussatus* and *R. philippinarum* from nondetectable to  $5.26 \pm 0.30$  log CFU g<sup>-1</sup> or  $1.64 \pm 0.94$  log CFU g<sup>-1</sup>, respectively, after 2 h of exposure to seawater containing pathogenic *V. parahaemolyticus*, at initial concentration, shown in Table 2 at room temperature. Pathogenic *V. parahaemolyticus* concentration in *R. decussatus* remained relatively stable throughout 24 h ( $4.99 \pm 0.31$  log CFU g<sup>-1</sup>). However, pathogenic *V. parahaemolyticus* concentration continued to increase in *R. philippinarum* tissue throughout the 24 h ( $4.45 \pm 2.20$  log CFU g<sup>-1</sup>), reaching levels similar to *R. decussatus*. Results suggested that uptake rate of pathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* was higher than in *R. philippinarum*. Results of this experiment also showed a progressive increase in pathogenic *V. parahaemolyticus* loads ( $P < 0.001$ ) in *R. philippinarum* along time, reaching the same levels reached by pathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus*, and Duncan *post hoc* test evidenced that these increments were significant between 2 and 24 h in *R. philippinarum*. The study showed that remaining *V. parahaemolyticus* in control group was undetectable in *R. decussatus* and *R. philippinarum* over time except in some cases, but concentrations were always lower than 0.5 log CFU g<sup>-1</sup> and these increments were not significant for vibrio loads in *R. decussatus* ( $P = 0.446$ ) neither in *R. philippinarum* ( $P = 0.190$ ).

#### Challenge A2

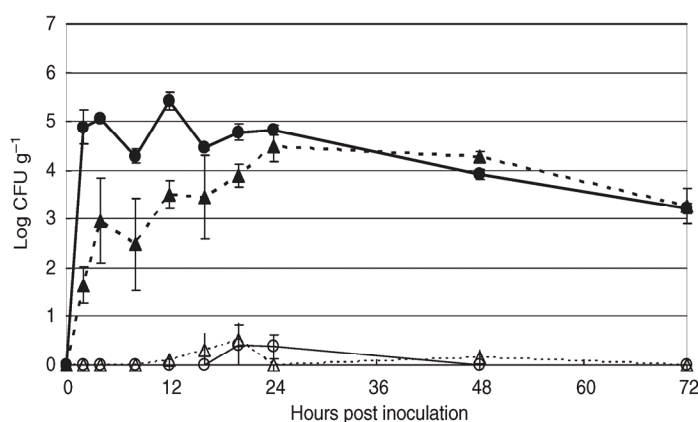
A period of study of 72 h was established, to assess when pathogenic *V. parahaemolyticus* started to decrease in each species of clams. In this case, biometrical measurements (Table 2) showed that *R. decussatus* were bigger than *R. philippinarum* (length and weight;  $P < 0.001$ ) in all groups. These results showed that populations of pathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* increased from nondetectable to  $4.65 \pm 1.76$  log CFU g<sup>-1</sup> after 2 h of exposure to seawater containing pathogenic *V. parahaemolyticus*, at room temperature. And this load remained

relatively stable throughout 24 h to  $4.71 \pm 0.45$  log CFU g<sup>-1</sup> with an increase at 12 h to  $5.86 \pm 0.50$  log CFU g<sup>-1</sup>, and decreased from 48 h onwards ( $P < 0.001$ ), while in *R. philippinarum*, populations of pathogenic *V. parahaemolyticus* increased from nondetectable to  $3.85 \pm 0.70$  log CFU g<sup>-1</sup> at 12 h and to  $4.50 \pm 0.71$  log CFU g<sup>-1</sup> after 24 h, at room temperature remaining constant at 48 h and decreased to  $3.26 \pm 1.24$  log CFU g<sup>-1</sup> after 72 h. In Challenge A2, initial bacteria load that *R. philippinarum* were exposed was lower than for *R. decussatus* (Table 2). However, results showed similar kinetics than Challenge A1 with the same initial bacteria load, where *R. decussatus* presented a maximum bacterial load before *R. philippinarum* and this load remained constant, while *R. philippinarum* load continued to increase until similar levels of bacteria as for *R. decussatus* (time 24 h). Results showed that remaining *V. parahaemolyticus* in control group was undetectable in *R. decussatus* and *R. philippinarum* during the study except at specific times [lower than 1 log CFU g<sup>-1</sup> though these values were not significantly different for vibrio loads in *R. decussatus* ( $P = 0.050$ ) neither in *R. philippinarum* ( $P = 0.562$ )].

To compare the retentions of pathogenic *V. parahaemolyticus* in both challenges (A1 + A2) and for both species of clams (Fig. 1), using the total mean value of length and weight for each species of clam and using the mean of initial bacteria concentration ( $7.67 \pm 0.70$  log CFU per *R. decussatus*, and  $6.84 \pm 0.59$  log CFU per *R. philippinarum*), it was observed that *R. philippinarum* had higher values than *R. decussatus* only in length (not in weight), and results showed faster accumulation of pathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* from nondetectable to  $4.88 \pm 1.41$  log CFU g<sup>-1</sup> after 2 h of exposure to spiked seawater, remaining almost constant (without significant differences) until 48 h ( $P < 0.001$ ) where bacteria load decreased in *R. decussatus* tissues to  $3.91 \pm 0.33$  log CFU g<sup>-1</sup> and continued to decrease at 72 h ( $P < 0.001$ ) to  $3.21 \pm 0.32$  log CFU g<sup>-1</sup>. *Ruditapes philippinarum* reached the maximum accumulation of pathogenic *V. parahaemolyticus* at 24 h ( $4.48 \pm 1.32$  log CFU g<sup>-1</sup>), remaining relatively stable for 48 h, without significant differences and started to decrease at 72 h ( $3.26 \pm 1.24$  log CFU g<sup>-1</sup>) and later than *R. decussatus*. Variations of vibrio loads in control group of clams along time were not significant for *R. decussatus* ( $P = 0.282$ ) or *R. philippinarum* ( $P = 0.085$ ).

### Experiment B: uptake of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from spiked water

A total of 185 *R. decussatus* and 132 *R. philippinarum* in experiment B1 and 132 *R. decussatus* and 150



**Figure 1** Uptake of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* (combined A challenges) (mean  $\pm$  standard error of the mean). (○—) *R. decussatus* control; (●—) *R. decussatus* inoculated with pathogenic Vp; (△—) *R. philippinarum* control and (▲—) *R. philippinarum* inoculated with pathogenic Vp.

*R. philippinarum* in experiment B2 were analysed. As in previous experiment, bacterial load of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was expressed as log CFU g<sup>-1</sup>.

#### Challenge B1

According to experiment A2, a period of study of 72 h to study global kinetic of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was established. *Ruditapes decussatus* were bigger than *R. philippinarum* (length and weight;  $P < 0.001$ ) in all groups of challenge B1 (Table 2). A similar pattern of uptake as for pathogenic *V. parahaemolyticus* (Experiment A) was observed in this case (exposed to similar initial bacteria load); although the quantity accumulated for nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was higher than 1 log CFU g<sup>-1</sup> for both species of clams. Densities of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* increased in *R. decussatus* and *R. philippinarum* from nondetectable to  $5.72 \pm 0.71$  or  $2.81 \pm 1.75$  log CFU g<sup>-1</sup>, respectively, after 2 h of exposure to seawater containing nonpathogenic *V. parahaemolyticus* at an initial concentrations described in Table 2 at room temperature. These results suggested that at 2 h uptake of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* was higher than in *R. philippinarum*, although initial bacteria load inoculated in *R. philippinarum* was higher. Nonpathogenic *V. parahaemolyticus* loads remained fairly constant in *R. decussatus* until 48 h ( $5.03 \pm 0.28$  log CFU g<sup>-1</sup>). Higher nonpathogenic *V. parahaemolyticus* accumulation was recorded at 4 h ( $6.33 \pm 0.31$  log CFU g<sup>-1</sup>). Populations of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* decreased ( $P < 0.001$ ) to  $3.87 \pm 0.84$  log CFU g<sup>-1</sup> at 72 h. However, from 4 to 72 h nonpathogenic *V. parahaemolyticus* concentrations remained relatively stable in *R. philippinarum*, with a maximum accumulation level of this isolate in *R. philippinarum* reached at 24 h ( $5.77 \pm 0.14$  log CFU g<sup>-1</sup>), and Duncan *post hoc* test indicated significant differences ( $P < 0.001$ ) in growth and survival of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in

*R. decussatus* and in *R. philippinarum* along time. No significant differences were found in vibrio load in control groups of *R. decussatus* ( $P = 0.064$ ) but significant differences were found in control groups of *R. philippinarum* ( $P < 0.001$ ) with a maximum accumulation level at 24 h ( $3.65 \pm 0.24$  log CFU g<sup>-1</sup>).

#### Challenge B2

A period of study of 168 h was established, to study the time in which nonpathogenic *V. parahaemolyticus* started to decrease in each species of clams. In this case, according to their biometrical measurements (Table 2) *R. philippinarum* were bigger than *R. decussatus* (length and weight;  $P < 0.001$ ) in all groups of challenge B2.

Results showed that populations of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus* increased from nondetectable to  $5.31 \pm 0.29$  log CFU g<sup>-1</sup> after 12 h of exposure to seawater containing nonpathogenic *V. parahaemolyticus* at room temperature. Bacterial load continued increasing to  $6.69 \pm 0.22$  log CFU g<sup>-1</sup> at 36 h and remained relatively stable until 48 h, starting to decrease at 72 h ( $5.98 \pm 0.44$  log CFU g<sup>-1</sup>) and showing a further decrease ( $P < 0.001$ ) at 168 h ( $4.18 \pm 0.56$  log CFU g<sup>-1</sup>).

Initial bacteria load exposed to *R. philippinarum* was higher than *R. decussatus* (Table 2); however, the quantity accumulated for this isolate was lower than in *R. decussatus*, except at 12 h ( $6.00 \pm 0.19$  log CFU g<sup>-1</sup>), remaining fairly constant from 24 h ( $5.36 \pm 0.41$  log CFU g<sup>-1</sup>) to 72 h ( $5.32 \pm 0.54$  log CFU g<sup>-1</sup>). Populations of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. philippinarum* started to decrease ( $P < 0.001$ ) at 96 h ( $4.56 \pm 0.52$  log CFU g<sup>-1</sup>) and decreased further to  $3.81 \pm 0.91$  log CFU g<sup>-1</sup> after 168 h.

Significant differences were found in vibrio load in control groups of *R. decussatus* ( $P < 0.001$ ) over time but there were no significant differences in bacterial levels between control groups of *R. philippinarum* ( $P < 0.242$ ).

To compare the retentions of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in both challenges (B1 + B2) and for both species of clams (Fig. 2), using the total mean of length and weight for each species of clam and using the mean of initial bacteria concentration ( $7.00 \pm 0.36$  log CFU per *R. decussatus*, and  $8.26 \pm 0.80$  log CFU per *R. philippinarum*), it was observed that *R. decussatus* had similar values than *R. philippinarum* in length and weight, and results showed faster accumulation of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in *R. decussatus*, where load increased from nondetectable to  $5.72 \pm 0.71$  log CFU  $g^{-1}$  after 2 h of exposure to seawater and maintained these values until 48 h ( $5.72 \pm 0.79$  log CFU  $g^{-1}$ ), reaching at maximum level at 4 h ( $6.33 \pm 0.31$  log CFU  $g^{-1}$ ). Populations of this isolate started to decrease ( $P < 0.001$ ) at 72 h to  $4.87 \pm 1.27$  log CFU  $g^{-1}$  and continued to decrease in *R. decussatus* tissue through to 168 h.

Results for *R. philippinarum* showed the density accumulated for this bacterium was lower than in *R. decussatus*, despite high initial load of nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. Density of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* increasing from nondetectable to  $2.81 \pm 1.75$  log CFU  $g^{-1}$  in *R. philippinarum* after 2 h of exposure to seawater and followed increased to  $4.38 \pm 1.15$  log CFU  $g^{-1}$  at 4 h and reached a maximum level at 48 h ( $5.31 \pm 0.48$  log CFU  $g^{-1}$ ). At 96 h was observed a slight decrease to  $4.56 \pm 0.52$  log CFU  $g^{-1}$  that continued at 168 h ( $P < 0.001$ ) ( $3.81 \pm 0.91$  log CFU  $g^{-1}$ ).

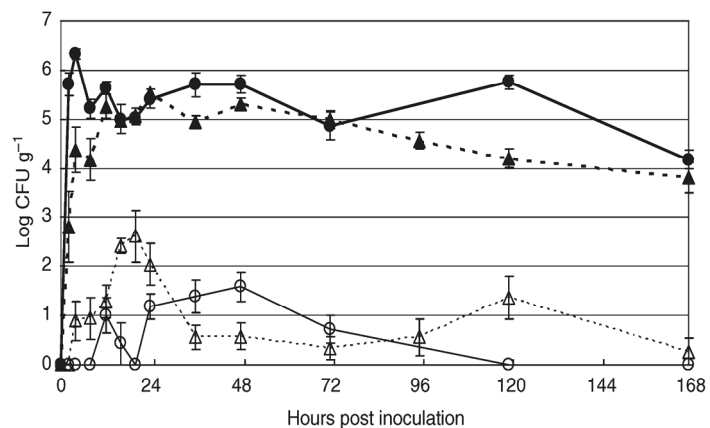
According to Duncan *post hoc* test, significant differences were found in vibrio load in control groups of *R. decussatus* (at 24, 36 and 48 h) and in control groups of *R. philippinarum* (at 12, 16, 20 and 24 h) ( $P < 0.001$ ).

## Discussion

*Vibrio parahaemolyticus* is one of the major seafood-borne gastroenteritis-causing bacteria and is frequently associ-

ated with the consumption of improperly cooked seafood. The prevalence and intensity of vibrios in marine invertebrates are often affected by environmental factors (Motes and DePaola 1996; Reid *et al.* 2003; Paillard *et al.* 2004), as well as by host-related aspects such as inter-population variability and immune status (Cheng *et al.* 2004a,b; Huvet *et al.* 2004; Drummond *et al.* 2007). Present results agree with the previous statement. Results show a big standard deviation, as shown by the error bars in the figures (standard error of the mean is a proportion of the standard deviation), possibly because of interindividual variability which is common in invertebrates. The current study aimed to evaluate the possible different susceptibilities of two species of clams, under the same conditions and similar exposure to pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* and to investigate the kinetic model of these two isolates of *V. parahaemolyticus* in the tissues of clam to investigate whether there were differences between them. Results showed that both species of clams exposed to seawater containing high concentrations of each isolate accumulated the bacterium in as few as 2 h of exposure. These results agree with Murphree and Tamplin (1991) who showed that oysters exposed to seawater containing *Vibrio cholerae* O1 at 4 log CFU  $ml^{-1}$  accumulated high numbers of *V. cholerae* O1 in as few as 4 h of exposure and that levels continued to increase with time. Marino *et al.* (2005) reported bacteria inoculated at 5 log CFU  $ml^{-1}$  in seawater were accumulated rapidly in mussels reaching high concentrations after 1 h. Their study showed that the maximum numbers of *Escherichia coli* in mussels were 6.6 log CFU  $g^{-1}$  at 14°C and 5.4 log CFU  $g^{-1}$  at 21°C and for *V. cholerae* nonO1 and *Enterococcus durans* varied from 6.5 to 7 log CFU  $g^{-1}$  at both temperatures. Shen *et al.* (2009) found similar results with a three-strain cocktail suspension (two strains of *V. parahaemolyticus* possessing *tdh* gene and one non-virulent strain) for inoculation in oysters. Their results

**Figure 2** Uptake of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* (combined B challenges) (mean  $\pm$  standard error of the mean). (—○—) *R. decussatus* control; (—●—) *R. decussatus* inoculated with nonpathogenic Vp; (---△---) *R. philippinarum* control and (---▲---) *R. philippinarum* inoculated with nonpathogenic Vp.





showed that the populations of *V. parahaemolyticus* in oysters increased rapidly from nondetectable [ $<3$  log most probable number (MPN) per g] to 4.04–4.66 log MPN  $g^{-1}$  after first 4 h of exposure to artificial seawater containing *V. parahaemolyticus* (4.38 log CFU  $ml^{-1}$ ) at 16, 20, 26 and 32°C and reached the highest level after 32 h of exposure to contaminated artificial seawater and were observed to decrease in following sample at 64 h. This study showed that *R. decussatus* accumulated high numbers of both isolates at 2 h of exposure and that levels were maintained for 24 h (pathogenic *V. parahaemolyticus*) or 48 h (nonpathogenic *V. parahaemolyticus*) and decreased from 48 h (pathogenic *V. parahaemolyticus*) or 72 h (nonpathogenic *V. parahaemolyticus*), while *R. philippinarum* at 2 h of exposure accumulated lower numbers of both isolates, but these levels continued to increase with time reaching maximum levels at 24 and 48 h (pathogenic *V. parahaemolyticus*) or 72 h (nonpathogenic *V. parahaemolyticus*) and decreased from 72 h (pathogenic *V. parahaemolyticus*) or 96 h (nonpathogenic *V. parahaemolyticus*). At 72–168 h *V. parahaemolyticus* decreased, this is unlikely to be because of an underestimation of the method, rather it seems to be a common event. Lopez-Joven *et al.* (2011) when monitoring the presence of vibrios along time in clam tissues also observed a decrease.

Vibrio levels in *R. decussatus* control clams and *R. philippinarum* control clams in experiment A were undetectable or were observed in low concentrations, which were not statistically significant in the study. However, vibrio levels in experiment B, in both species of control clams were higher than in experiment A and showed significant differences in bacterial levels for control groups of *R. decussatus*, possibly because of an incomplete depuration process. However, these values do not affect present results in the exposure of clams to bacterial concentration, since the clams are exposed to a huge initial concentration of both isolates of vibrios. Although it would have been preferred to run a single experiment with simultaneous exposure to the two bacterial strains, this was not feasible because the method to then quantify the bacteria would have been real-time PCR and this technique may not sufficiently sensitive (Nordstrom *et al.* 2007) since the controls were not artificially contaminated and could give false negatives.

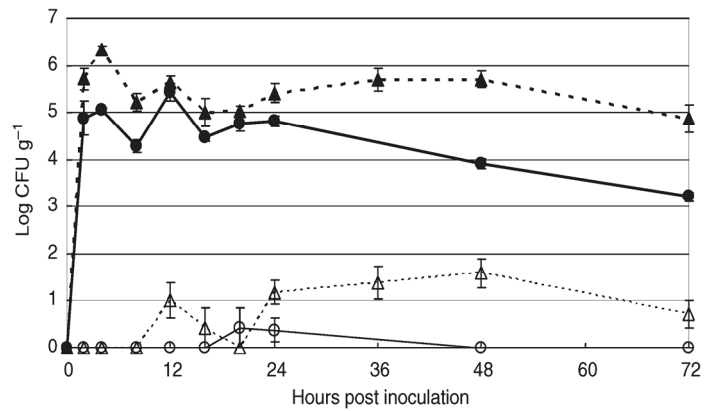
This results show clearly that *R. decussatus* were significantly affected before *R. philippinarum* by the experimental challenge since they accumulated higher levels of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. Differences in composition, size, structure, habitat and biology of each of one species of clams could determine results obtained. The filtration rate of an animal is a parameter of great ecological importance. During years,

much data concerning filtration rates of filter-feeding bivalves has been recorded (Walne 1972; Wilson and Seed 1974). It is well documented in the literature that filtration rate increases with increasing body size. According to our measurements *R. philippinarum* had higher values than *R. decussatus* in length and weight, in A1 and B2 but not in A2 and B1. Also, *R. philippinarum* had higher values than *R. decussatus* only in length (not in weight) when were compared the retentions of pathogenic *V. parahaemolyticus* in both challenges (A1 + A2). However, in all cases *R. decussatus* accumulated greater concentrations of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* earlier than *R. philippinarum*. And these concentrations decreased earlier in *R. decussatus*. These results show that *R. decussatus* had a filtration rate higher than *R. philippinarum* throughout the study. Also, filter-feeding activity is a function of cell concentration which has been well documented by several authors for different species of lamellibranchiate bivalves (Loosanoff and Engle 1947; Epifanio and Ewart 1977; Winter 1978). In general, the filtration rate decreases with increasing cell concentrations. This indicates that bivalves regulate the amount of water filtered clear of particles in relation to food concentration. Nevertheless, in all our experiments, all clams were offered the same amount of axenic *Isochrysis galbana* variety Tahiti (Pérez Camacho *et al.* 2002).

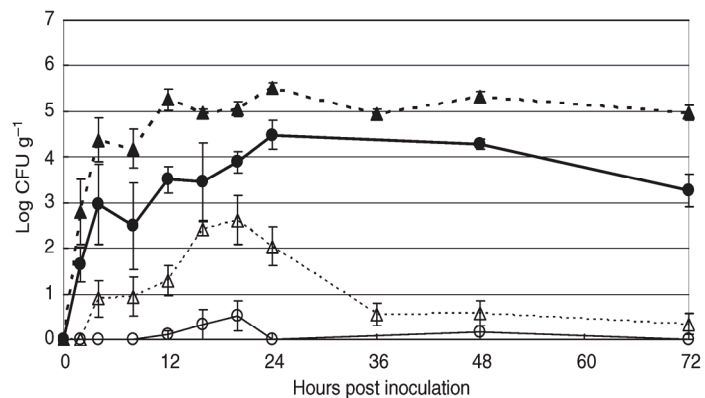
On the other hand, it is well known from literature that filtration rate is greatly influenced by temperature (Widdows 1973; Schulte 1975). Filtration rate increases with increasing temperatures up to an optimum temperature. With any further increase in temperature above this optimum, the filtration rate decreases drastically. In our experiment, the temperature in tank water was probably the most important parameter to host-related aspects, because the range of optimal temperature for *R. decussatus* is between 18 and 20°C and the range of optimal temperature for *R. philippinarum* is between 22 and 26°C (Gutiérrez Gómez 2010). This information indicates that *R. decussatus* in our experiment had more adequate temperatures to perform filtration than *R. philippinarum*.

In addition, levels of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* within both species of clams studied were higher than levels observed of pathogenic *V. parahaemolyticus* (Figs 3 and 4), despite initial density inoculated of pathogenic *V. parahaemolyticus* in case of *R. decussatus* being higher than density of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in this species of clam. On the contrary, in *R. philippinarum*, density of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was higher than density of pathogenic *V. parahaemolyticus*; however, this initial concentration in both isolates of *V. parahaemolyticus* was high enough to obtain results, nonconditioned by load of *V. parahaemolyticus* inoculated.

**Figure 3** Uptake of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by *Ruditapes decussatus* (mean  $\pm$  standard error of the mean). (—○—) *R. decussatus* control; (—●—) *R. decussatus* inoculated with pathogenic Vp; (---○---) *R. decussatus* control and (- - -● - -) *R. decussatus* inoculated with nonpathogenic Vp.



**Figure 4** Uptake of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by *Ruditapes philippinarum* (mean  $\pm$  standard error of the mean). (—○—) *R. philippinarum* control; (—●—) *R. philippinarum* inoculated with pathogenic Vp; (---○---) *R. philippinarum* control and (- - -● - -) *R. philippinarum* inoculated with nonpathogenic Vp.



DePaola *et al.* (2010) showed the results of a yearlong nationwide survey of important bacterial and viral pathogens in the United States and sampled market oysters, primarily from retail establishments, finding that levels of pathogenic *V. parahaemolyticus* were typically several logs lower than total *V. parahaemolyticus* levels regardless of season or region. Results obtained in this study might indicate that the isolate of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* survived better than pathogenic *V. parahaemolyticus* under the same conditions. Therefore, it can be suggested that in future studies nonpathogenic strains can be used to model worst-case scenario cases, since experiments using the nonpathogenic strain will not underpredict the growth rate of the pathogenic strain according to the results' presented here. Furthermore, this evidence is supported by Yoon *et al.* (2008) who found that the nonpathogenic *V. parahaemolyticus* grew faster than the pathogenic *V. parahaemolyticus* and also the concentration of pathogenic *V. parahaemolyticus* decreased more rapidly than that of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in oyster slurry. Warner and Oliver (2008) also found differences between E-genotype (associated with environmental

samples) and C-genotype (clinical samples) of *Vibrio vulnificus* within oysters, where the E-genotype is found in much higher proportion. This probably helps to explain the low number of food-borne infections caused by this pathogen, although the reason why the E-genotype is found in oysters at higher levels than C-genotype is not yet understood.

In conclusion, *R. decussatus* accumulated greater concentrations of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* earlier than *R. philippinarum* and levels of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* decreased earlier in *R. decussatus*. Two possibilities are suggested for these results, one of them is that *R. decussatus* is more susceptible to both isolates of vibrios and the second is that filtration rate in *R. decussatus* is higher than *R. philippinarum*, because temperature in tank water is in the range of optimal temperature for *R. decussatus*. Results also show that nonpathogenic *V. parahaemolyticus* might survive better than pathogenic *V. parahaemolyticus* within the two species of clam studied, under the same conditions.

Further studies are needed with a larger battery of isolates to better understand how the different isolates



perform. It would also be interesting to use in this model, a series of isolates fully characterized to be able to relate their features with their performance.

### Acknowledgements

The present study was financed by INIA project Nos. RTA 2005 00079 00 00 and RTA 2007 00063 00 00 with Feder funds awarded to AR. CLJ has a doctoral scholarship provided by INIA. We are grateful to Josep Maria Reverte and the staff from the USM at IRTA for the sample collection and to Josu Pérez-Larruscain for the help and advice. We are also grateful to Neil Duncan for having read and corrected some parts of the manuscript.

### References

- Alam, M.J., Tomochika, K.I., Miyoshi, S.I. and Shinoda, S. (2002) Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol Lett* **208**, 83–87.
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D. and Kaysner, C.A. (1999) Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* **36**, 215–225.
- Center for Disease Control and Prevention (2006) *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw shellfish—Three states, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **55**, 854–856.
- Cheng, W., Hsiao, I.-S. and Chen, J.-C. (2004a) Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* **17**, 193–202.
- Cheng, W., Hsiao, I.-S., Hsu, C.-H. and Chen, J.-C. (2004b) Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* **17**, 235–243.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredine, E. and Toti, L. (2001) Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. *Lett Appl Microbiol* **32**, 57–61.
- Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S. et al. (2000) *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *J Infect Dis* **181**, 1661–1666.
- DePaola, A., Jones, J.L., Woods, J., Burkhardt, W. III, Calci, K.R., Krantz, J.A., Bowers, J.C., Kasturi, K. et al. (2010) Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States Market Survey. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2754–2768.
- Drummond, L.C., Balboa, S., Beaz, R., Mulcahy, M.F., Barja, J.L., Culloty, S.C. and Romalde, J.L. (2007) The susceptibility of Irish-grown and Galician-grown Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, to *Vibrio tapetis* and Brown Ring Disease. *J Invertebr Pathol* **95**, 1–8.
- Epifanio, C.E. and Ewart, J. (1977) Maximum ration of four diets for the oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **11**, 13–29.
- European Commission (2001) *Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus (in Raw and Undercooked Seafood)*. pp. 1–64. Brussels, Belgium: European Commission Health & Consumer Protection Directorate General. Directorate C—Scientific Opinions.
- FAO (2008) Fisheries statistics – aquaculture. Food and agriculture organization of the United Nations. Available at: [http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb\\_ds=Aquaculture&tb\\_mode=TABLE&tb\\_act=SELECT&tb\\_grp=COUNTRY](http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTRY).
- Gooch, J.A., DePaola, A., Bowers, J. and Marshall, D.L. (2002) Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *J Food Prot* **65**, 970–974.
- Gutiérrez Gómez, F. (2010) Producción de larvas y semillas de moluscos. Una perspectiva industrial. Available at: <http://www.mispecies.com/estudios/2002/moluscos-egg/moluscos-egg.asp>.
- Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M. and Pommepuy, M. (2002) Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J Appl Microbiol* **92**, 1123–1135.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F. and Cunningham, C. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* **343**, 211–220.
- Kaper, J.B., Campen, R.K., Seidler, R.J., Baldini, M.M. and Falkow, S. (1984) Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* **45**, 290–292.
- Liu, X., Chen, Y., Wang, X. and Ji, R. (2004) Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system. *Wei Sheng Yan Jiu* **33**, 725–727.
- Loosanoff, V.L. and Engle, J.B. (1947) Effect of different concentrations of microorganisms on the feeding of oysters. *Fishery Bull Fish Wildl Serv US* **51**, 31–57.
- Lopez-Joven, C., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Furones, M.D. and Roque, A. (2011) Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures. *Food Microbiol* doi:10.1016/j.fm.2010.12.007.
- Lozano-León, A., Torres, J., Osorio, C.R. and Martínez-Urtaza, J. (2003) Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 281–284.

- Macián, M.C., Arias, C.R., Aznar, R., Garay, E. and Pujalte, M.J. (2000) Identification of *Vibrio* spp. (other than *Vibrio vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *Int Microbiol* **3**, 51–53.
- Marino, A., Lombardo, L., Fiorentino, C., Orlandella, B., Monticelli, L., Nostro, A. and Alonzo, V. (2005) Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int J Food Microbiol* **99**, 281–286.
- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D. et al. (2005) Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe [letter]. *Emerg Infect Dis* **11**, 1319–1320.
- McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A. and Napol, N.P. (2005) Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *N Engl J Med* **353**, 1463–1470.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. and McMeekin, T.A. (1997) Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* **38**, 133–142.
- Molero, X., Bartolomé, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F. and García, R. (1989) Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain: presentation of 8 cases. *Med Clin (Barc)* **92**, 1–4.
- Motes, M.L. and DePaola, A. (1996) Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* **62**, 3875–3877.
- Murphree, R.L. and Tamplin, M.L. (1991) Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3656–3660.
- Nishibuchi, M. and Kaper, J.B. (1995) Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun* **63**, 2093–2099.
- Nishibuchi, M., Hill, W.E., Zon, G., Payne, W.L. and Kaper, J.B. (1986) Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol* **23**, 1091–1095.
- Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L. and DePaola, A. (2007) Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5840–5847.
- Paillard, C., Allam, B. and Oubella, R. (2004) Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* **59**, 249–262.
- Pérez Camacho, A., Delgado, M. and Albentosa, M. (2002) Influencia del tamaño y la concentración de alimento sobre las tasas de aclaramiento e ingestión de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Bol Inst Esp Oceanogr* **18**, 315–320.
- Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C. and Birkbeck, T.H. (2003) Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* **56**, 249–258.
- Robert-Pillot, A., Guenole, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M. and Quilici, M.L. (2004) Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two France coastal areas and from seafood imported into France. *Int J Food Microbiol* **91**, 319–325.
- Roque, A., Lopez-Joven, C., Lacuesta, B., Elandaloussi, L., Wagley, S., Furones, M.D., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I. et al. (2009) Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7574–7577.
- Schulte, E.H. (1975) Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar Biol* **30**, 331–341.
- Shen, X., Cai, Y., Liu, C., Liu, W., Hui, Y. and Su, Y.-C. (2009) Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). *Int J Food Microbiol* **136**, 129–132.
- Su, Y.-C. and Liu, C. (2007) *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol* **24**, 549–558.
- Takeda, Y. (1983) Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacol Ther* **19**, 123–146.
- Tilburg, J.J.H.C., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., van den Berkmortel, D., Rombout, J., Jonker, K.M. and de Boer, E. (2000) Presence of *Vibrio* Species in Shellfish. Zutphen, the Netherlands: Report of the Inspectorate for Health Protection and Veterinary Public Health.
- Vasudevan, P., Marek, P., Daigle, S., Hoagland, T. and Venkitanarayanan, K.S. (2002) Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish filets. *J Food Saf* **22**, 209–217.
- Walne, P.R. (1972) The influence of current speed, body size, and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *J Mar Biol Assoc UK* **52**, 345–374.
- Warner, E. and Oliver, J.D. (2008) Population Structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in Oysters (*Crassostrea virginica*) and Seawater. *Appl Environ Microbiol* **74**, 80–85.
- Widdows, J. (1973) The effects of temperature on the metabolism and activity of *Mytilus edulis*. *Neth J Sea Res* **7**, 387–398.
- Wilson, J.H. and Seed, R. (1974) Laboratory experiments on pumping and filtration in *Mytilus edulis* L. using suspensions colloidal graphite. *Ir Fish Invest Ser B (Mar)* **14**, 1–20.
- Winter, J.E. (1978) A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* **13**, 1–33.

- Wong, H.C., Liu, S.H., Ku, L.W., Lee, I.Y., Wang, T.K., Lee, Y.S., Lee, C.L., Kuo, L.P. *et al.* (2000) Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J Food Prot* **63**, 900–906.
- Yang, Z.-Q., Jiao, X.-A., Li, P., Pan, Z.-M., Huang, J.-L., Gu, R.-X., Fang, W.-M. and Chao, G.-X. (2009) Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiol* **26**, 606–614.
- Yoon, K.S., Min, K.J., Jung, Y.J., Kwon, K.Y., Lee, J.K. and Oh, S.W. (2008) A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiol* **25**, 635–641.

### 7.2.3. Aquaculture Research (en revisión).

Lopez-Joven C, Roque A, Pérez-Larruscain J, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I. Evolution of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in a cohabitating population of *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* under experimental conditions. *Aquaculture Research* (manuscrito en revisión).

#### Resumen del artículo en castellano

##### **Evolución de *Vibrio parahaemolyticus* no patógeno en una población de dos especies de almejas *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* cohabitando bajo condiciones experimentales**

La presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en los moluscos bivalvos es una causa importante de enfermedades transmitidas por los alimentos y, sus niveles se ven influenciados por cambios ambientales, como temperatura y salinidad.

Las almejas son especies comunes en los estuarios y se utilizan en programas de vigilancia ambiental. Este estudio fue dirigido para comparar la incorporación y la retención de *V. parahaemolyticus* no patógeno inoculado experimentalmente en dos especies de almejas (*R. decussatus* y *R. philippinarum*), bajo condiciones de convivencia dentro de un sistema cerrado.

Los niveles bacterianos en las dos especies de almejas siguieron una tendencia similar, con valores entre 3,48 y 3,70 log ufc/g para *R. decussatus* y entre 3,15 y 3,49 log ufc/g para *R. philippinarum*. Esto implica que en ausencia de renovación del agua, se observaron niveles altos y estables de *V. parahaemolyticus* en almejas cultivadas después de la exposición. Por ello, los cambios en los parámetros físicos deben ser tenidos en cuenta para diseñar programas de vigilancia en los bivalvos, y el muestreo debería centrarse en las especies que tienen temperaturas óptimas de las tasas de filtración más cerca a las temperaturas del agua en ese momento.





**Evolution of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in a cohabitating population of *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* under experimental conditions**

Journal:	<i>Aquaculture Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	LOPEZ-JOVEN, CARMEN; IRTA - SCR, Roque, Ana; IRTA-SCR, Department of Pathology Pérez-Larruscain, Josu; IRTA-SCR, Ruiz-Zarzuela, Imanol; Universidad de Zaragoza, Department of Veterinary Pathology de Blas, Ignacio; Universidad de Zaragoza, Department of Veterinary Pathology
Keywords:	Manila clam ( <i>Ruditapes philippinarum</i> ), Grooved carpet shell ( <i>Ruditapes decussatus</i> ), Cohabitation, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , Uptake clearance, Feeding

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Only

**Evolution of nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in a cohabitating population of *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* under experimental conditions**

**Running title: Uptake of *V. parahaemolyticus* in clams**

C. Lopez-Joven <sup>a\*</sup>, A. Roque <sup>a</sup>, J. Pérez-Larruscain <sup>a</sup>, I. Ruiz-Zarzuela <sup>b</sup> and I. de Blas <sup>b</sup>

<sup>a</sup> IRTA-SCR, Ctra. Poble Nou km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Fish Diseases, Veterinary Faculty, Universidad de Zaragoza, c/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

\* Corresponding author: C. Lopez-Joven, IRTA - SCR. Ctra. Poble Nou km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Catalonia, Spain. Phone: +34 977 745 427; Fax: +34 977 744 138. E-mail: cljoven@gmail.com

*Keywords:* Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), Grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*), Cohabitation, *Vibrio parahaemolyticus*, Uptake clearance, Feeding

## **Abstract**

Presence of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve mollusc is an important cause of foodborne illnesses, and their levels are influenced by environmental changes, as temperature and salinity. Clams are common species in estuaries and are used in environmental monitoring programmes. This study was addressed to compare uptake and retention of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* experimentally inoculated in two species of clam (*R. decussatus* and *R. philippinarum*), under cohabitation conditions within a closed system.

Bacterial levels in both species of clams following a similar trend with values between 3.48 and 3.70 log CFUg<sup>-1</sup> for *R. decussatus* and between 3.15 and 3.49 log CFUg<sup>-1</sup> for *R. philippinarum*. So, in absence of water renewal, high and stable levels of *V. parahaemolyticus* were observed in cultured clams after exposure. Changes in physical parameters should be taking into account to design surveillance programs in bivalves, and sampling should be focus on species that have clearance rates closer than water temperature.



## Introduction

Filter-feeding molluscs accumulate and concentrate microorganisms, including human pathogenic bacteria and viruses. Understanding the bacterial ecology of these bivalves can help to improve both the management of hatcheries for higher productivity and the safety of bivalves as food. Presence of *V. parahaemolyticus* in bivalve mollusc is an important cause of foodborne illnesses around the world (Daniels, MacKinnon, Bishop, Altekruise, Ray, Hammond, Thompson, Wilson, Bean, Griffin & Slutsker 2000; McLaughlin, DePaola, Bopp, Martinek, Napolilli, Allison, Murray, Thompson, Bird & Middaugh 2005), and outbreaks related with consumption of raw or undercooked shellfish in some European countries has been associated with isolation of this bacteria in food and patients (Molero, Bartolome, Vinuesa, Guarner, Accarino, Casellas & Garcia 1989; Lozano-Leon, Torres, Osorio & Martinez-Urtaza 2003; Martinez-Urtaza, Simental, Velasco, DePaola, Ishibashi, Nakaguchi, Nishibuchi, Carrera-Flores, Rey-Alvarez & Pousa 2005).

Clams, such as *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*, are common species in estuaries and they are used in environmental monitoring programmes. Both, bivalves and vibrios, as *V. parahaemolyticus*, suffer a wide range of environmental conditions at estuaries and seawater, and their presence is dependent on salinity, temperature and organic loads (DePaola, Hopkins, Peeler, Wentz & McPhearson 1990; Hjeltnes & Roberts 2001).

Several scientific surveys have been conducted to assess the prevalence and survival of *V. parahaemolyticus* in a variety of seafood (Miles, Ross, Olley & McMeekin 1997; Yoon, Min, Jung, Kwon, Lee & Oh 2008; Lopez-Joven, de Blas, Ruiz-Zarzuela, Furones & Roque 2011b). A recent study by Lopez-Joven *et al.* (2011b) has shown that nonpathogenic *V. parahaemolyticus* might survive better than pathogenic *V. parahaemolyticus* within *R. decussatus* and *R. philippinarum*, and it seems that *R. decussatus* was more susceptible to both isolates of vibrios

than *R. philippinarum*. However this result was not conclusive during the plateau growth phase (20 to 72 h post-inoculation), that corresponds to period of maximum bacterial incorporation in clams, since experiments were carried out independently for each clam species.

Furthermore no study has been carried out to describe the growth of *V. parahaemolyticus* in two species of clams (*R. decussatus* and *R. philippinarum*) under cohabitation conditions.

Depuration is a commercial procedure established in European countries where bivalves are placed in tanks filled with clean seawater for several hours to purge contaminants from their tissues by filtering (Rodrick & Schneider 2003). Furthermore depuration time depends on initial levels and specie of bacteria (Crocì, Suffredini, Cozzi & Toti 2002; Marino, Lombardo, Fiorentino, Orlandella, Monticelli, Nostro & Alonzo 2005; Lopez-Joven, Ruiz-Zarzuela, de Blas, Furones & Roque 2011a), and could be also correlated with differences in physiological features of each species of molluscs, as optimal temperature for clearance rates. Therefore, the aim of this study was to compare the dynamics of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* during plateau growth phase, in two species of clam.

## **Material and methods**

### *Samples collection*

Two species of clams were used in the present study: *R. decussatus* and *R. philippinarum*.

Healthy adult individuals were collected from the bays of the Delta of the Ebro River, and transported to the laboratory in plastic bags placed in cool boxes containing ice. Transport lasted less than 1 h in adequate conditions. On arrival, clams with homogeneous size were placed inside an experimental system for depuration during at least 9 days based on results of previous experiments (Lopez-Joven *et al.* 2011a). Then six clams of each species were sampled to check growth of *V. parahaemolyticus* in Chromagar Vibrio plates (CHROMagar, Paris, France); and

when results indicated that they were free of these vibrios, the remaining clams were placed in experimental units.

#### *Bacterial biotype and preparation*

A nonpathogenic biotype was used in this study, *V. parahaemolyticus* i747, that did not contain the thermostable direct hemolysin (*tdh*) or the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) genes. This bacteria was isolated from a mussel (*Mytilus galloprovincialis*), in the Delta of the Ebro River, Spain (Roque, Lopez-Joven, Lacuesta, Elandaloussi, Wagley, Furones, Ruiz-Zarzuela, de Blas, Rangdale & Gomez-Gil 2009). It was the same bacteria used in previous experiments (Lopez-Joven *et al.* 2011b): short rods Gram negative, catalase and oxidase positive, anaerobic facultative, motile, produce green colonies in Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose agar (TCBS), grows at 42 °C but not in 8% NaCl. API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) profile gives out a result for *V. parahaemolyticus* with 99.9% similarity and identification was confirmed by one-step PCR analysis (Bej, Patterson, Brasher, Vickery, Jones & Kaysner 1999) with minor modifications (Roque *et al.* 2009). A bacterial inoculum was prepared as described in Lopez-Joven *et al.* (2011b) in order to get an initial concentration of  $10^5$  CFUml<sup>-1</sup> in experimental tanks.

#### *Experimental design*

Four experimental groups were created randomly with clams free from *V. parahaemolyticus*. Each group was formed by 15 *R. decussatus* and 15 *R. philippinarum*. Two of them were maintained as control groups and the other two were selected as inoculated groups. Phytoplankton and *V. parahaemolyticus* were added to the tanks with seawater UV-light disinfected to stimulate bacterial uptake by the clams, resulting a bacterial suspension of  $10^5$

CFUml<sup>-1</sup> and 10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup> of axenic *Isochrysis galbana* variety Tahiti (Pérez Camacho, Delgado & Albentosa 2002). So initial bacterial load inoculated was 3.70 log CFUclam<sup>-1</sup>.

The experiment was performed at room temperature and tank water temperature varied between 16 and 18 °C in a static aerated system with approx. 330 ml of seawater per clam.

Three clams of each species were collected for analysis in each group at times 20, 30, 40, 50 and 70 h after inoculation. Before microbiological analysis, each clam was measured (Digital caliper (0-150 mm) LLG) and flesh was weighed. Table 1 shows the average length (mm) and weight (g) of clams used in the study.

#### *Microbiological analyses*

After depuration process and following experimental contamination, microbiological analyses were carried out as described in Lopez-Joven *et al.* (2011b).

Clams were opened with an alcohol-flamed clam knife and tissue and shell liquor samples were removed. After weight we placed into 10 ml of sterile 2.5% NaCl solution (SSS), and resulting mixture was homogenized for 30 s using an ultraturrax (model T25 basic, IKA Labortechnik). Further, decimal dilutions were made in SSS and volumes of 0.1 ml from each dilution were spreading onto Chromagar Vibrio plates and incubated at 37 °C for 18-20 h. The mauve-purple colonies formed onto Chromagar Vibrio (typical of *V. parahaemolyticus*) were counted to calculate the density of viable cells in the sample (CFUg<sup>-1</sup>). Levels of *V. parahaemolyticus* were calculated as the average density of results for each sampling time. Although, it would have been preferred quantify the bacteria using real-time PCR (Nordstrom, Vickery, Blackstone, Murray & DePaola 2007), molecular analyses, such as PCR, may still react with DNA from dead bacteria, resulting in false positive results (de Abreu Correa, Albarnaz, Moresco, Poli, Teixeira, Oliveira

Simoes & Monte Barardi 2007), for this reason we used classical microbiological method to calculate only the density of viable cells in the sample.

### *Statistical analyses*

Descriptive statistics were carried out calculating mean and standard deviation for quantitative variables, as length and weight, stratified by experimental groups. Homoscedasticity was assessed using Kolmogorov-Smirnov test to check normal distribution, and Levene test for variance homogeneity. Non homoscedastic variables, as CFUg-1, were log-transformed to improve homoscedasticity. Mean comparison was performed using Student's *t*-test for two means and ANOVA for more than two means (in this case, additionally Duncan post-hoc test was used in order to assess differences between means). Desired alpha error was established at 0.05. Statistic analysis was performed using SPSS 17.0 for Windows (Chicago, IL, USA).

### **Results**

According to their biometrical measurements (Table 1), no significant differences were found among *R. decussatus* groups (length  $P = 0.795$ , and weight;  $P = 0.900$ ). Similar results were obtain for *R. philippinarum* (length  $P = 0.785$ , and weight;  $P = 0.747$ ). Also, no significant global differences were found between *R. decussatus* and *R. philippinarum* in relation to weight ( $P = 0.098$ ), but significant differences were found for length ( $P = 0.007$ ), but it is no relevant since it was due to low value of standard deviation as consequence of homogeneity of selected clams. A total of 66 *R. decussatus* and 66 *R. philippinarum* were analysed (including clams collected at time 0 h), and bacterial load of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was expressed as log CFUg-1. Figure 1 shows that remaining *V. parahaemolyticus* in control groups was always lower than 1 log CFUg-1 for *R. decussatus* and *R. philippinarum*. Differences along time were not significant

for vibrio loads in control groups of *R. decussatus* ( $P = 0.527$ ) neither in *R. philippinarum* ( $P = 0.877$ ).

However, in infected groups, densities of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* increased in *R. decussatus* and *R. philippinarum* from non detectable at time 0 h to  $3.69 \pm 1.07$  log CFUg<sup>-1</sup> and  $3.20 \pm 0.95$  log CFUg<sup>-1</sup>, respectively, after 20 h of exposure to seawater inoculated with nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. Results for *R. decussatus* showed nonpathogenic *V. parahaemolyticus* reached a maximum level at 40 h ( $3.70 \pm 0.31$  log CFUg<sup>-1</sup>), while for *R. philippinarum* maximum density was reached at 50 h ( $3.49 \pm 0.58$  log CFUg<sup>-1</sup>). Nonpathogenic *V. parahaemolyticus* loads remained fairly constant in *R. decussatus* and in *R. philippinarum* until 70 h ( $3.47 \pm 0.41$  log CFUg<sup>-1</sup>, and  $3.33 \pm 0.78$  log CFUg<sup>-1</sup>, respectively). Student's t test for equality of means indicated no significant differences in growth and survival of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* between *R. decussatus* and *R. philippinarum* along time. At time 30 h though no differences were detected between the two species, they should be interpreted with caution due to the low P-value ( $P = 0.051$ ) and taking into account that sample size was low.

Furthermore no differences in bacterial densities along time were detected in each infected group comparing means with ANOVA test (*R. decussatus*,  $P = 0.963$  and *R. philippinarum*,  $P = 0.888$ ), so time variable was discarded and average concentrations for studied period 20-70 h of  $3.61 \pm 0.56$  log CFUg<sup>-1</sup> for *R. decussatus* (n=30) and  $3.32 \pm 0.64$  log CFUg<sup>-1</sup> for *R. philippinarum* (n=30) were calculated. Comparison of these means with Student's t test gave a P-value equal to 0.073, indicating there were no significant differences between *R. decussatus* and *R. philippinarum* in global uptake for nonpathogenic *V. parahaemolyticus* during plateau growth phase, under cohabitation conditions.

## Discussion

Current study was carried out only with nonpathogenic *V. parahaemolyticus* (without presence of *tdh* or *trh* genes) because in previous studies this isolate of *V. parahaemolyticus* survived better than pathogenic *V. parahaemolyticus* under the same conditions, so the use of nonpathogenic biotype would not underpredict the growth rate of the pathogenic biotype according to results presented in other studies (Yoon *et al.* 2008; Lopez-Joven *et al.* 2011b).

The prevalence and concentration of vibrios in marine invertebrates are often affected by environmental factors, such as temperature and salinity, as well as by host-related aspects such as size, immune status and biology of each species (Reid, Soudant, Lambert, Paillard & Birkbeck 2003; Cheng, Hsiao & Chen 2004a; Cheng, Hsiao, Hsu & Chen 2004b; Cheng, Juang & Chen 2004c; Paillard, Allam & Oubella 2004; Drummond, Balboa, Beaz, Mulcahy, Barja, Culloty & Romalde 2007). Both of them are directly related with clearance rate (volume of water cleared of particles per unit time by individual bivalves) that is a parameter of great ecological importance (Walne 1972; Schulte 1975).

Lopez-Joven *et al.* (2011b) in a previous study evaluated the different susceptibilities of two species of clams, under different cohabitation conditions (but same experimental protocol), exposed to two different isolates of *V. parahaemolyticus*, and observed during plateau growth phase that *R. decussatus* showed higher levels of both isolates of vibrios than *R. philippinarum*, which suggested that *R. decussatus* is more susceptible to both isolates of vibrios or that filtration rate in *R. decussatus* is higher than *R. philippinarum*. However other factors could influence as inoculum concentration, individual weight and water temperature in tank (closer to range of optimal temperature for *R. decussatus*).

In order to discard these factors, current study was performed with the same design conditions. First, clams were placed inside the same experimental unit so initial bacterial inoculum was

unique. Second, filter-feeding activity is function of cell concentration (Epifanio & Ewart 1977; Winter 1978), and therefore phytoplankton concentration was the same for both species of clams since experiment was carried out in cohabitation conditions. Furthermore, according to our measurements, no significant differences were found between *R. decussatus* and *R. philippinarum* related with weight, so clearance rate do not influenced by this biometrical feature. Under these experimental conditions, current results are in agreement with Lopez-Joven *et al.* (2011b), because both species of clams exposed to seawater containing concentrations of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* accumulated the bacterium at high densities from 20 to 70 h of exposure, and a similar trend was observed during plateau growth phase of nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. However, no significant differences were found between both species of clams, although a slightly preference of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* for *R. decussatus* was observed and bacterial densities of *R. decussatus* are higher than *R. philippinarum* throughout the study.

Consistent higher contamination levels for *R. decussatus* in both studies could be explained by a greater filtration rate of this species, but we should to take into account that this rate increments with increasing temperatures up to an optimum temperature, and with any further increment in temperature above this optimum, the filtration rate decreases drastically. So, filtration rates are poor at lower and higher temperatures out of the optimal range. Walne (1972) demonstrated that *R. decussatus* reduced its filtration rate by more than 45% when temperature decreased from 20 to 10 °C. Sobral & Widdows (1997) showed that optimum temperature for clearance rate in *R. decussatus* was about 20 °C, and declined about 60% of the rate observed at 20 °C when temperature increased until 32°C. However, optimal temperature for *R. philippinarum* is higher (22-26 °C) (Gutiérrez Gómez 2002). Results obtained in both studies showed that optimum clearance temperature of *R. decussatus* is closer to experimental conditions than *R.*



*philippinarum*, because temperature in tank water is between 16-18 °C, which might explain why levels of *V. parahaemolyticus* in this species of clam are slightly higher. In current study no significant differences were observed, but it may be due to a type II error, failing to find differences when they exist, due to high standard deviations and small sample sizes.

In conclusion, high and stable contamination levels of *V. parahaemolyticus* were observed in absence of water renewal after an exposure to contaminated water with this bacterium in cultured clams. Also, these results suggested that an unconfirmed slightly preference of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* for clam specie during this period of time, that could be due to water temperature.

In consequence, monitoring temperature and salinity of the water during the purification cycle is recommended (European Communities 1991; National Shellfish Sanitation Program 2009), but also surveillance programs should be focus on species of bivalves that have clearance rates closer than water temperature.

### **Acknowledgements**

The present study was financed by INIA project Nos. RTA 2005 00079 00 00 and RTA 2007 00063 00 00 with Feder funds awarded to AR. CLJ has a doctoral scholarship provided by INIA.

### **References**

Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D. & Kaysner, C.A. (1999) Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiology Methods* **36**, 215-225.

- Cheng, W., Hsiao, I.S. & Chen, J.C. (2004a) Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Disease of Aquatic Organisms* **60**, 157-164.
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H. & Chen, J.C. (2004b) Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* **17**, 235-243.
- Cheng, W., Juang, F.M. & Chen, J.C. (2004c). The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology* **16**, 295-306.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L. & Toti, L. (2002) Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 460-465.
- Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M. & Slutsker, L. (2000) *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1661-1666.
- de Abreu Correa, A., Albarnaz, J.D., Moresco, V., Poli, C.R., Teixeira, A.L., Oliveira Simoes, C.M. & Monte Barardi, C.R. (2007) Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research* **63**, 479-489.
- DePaola, A., Hopkins, L.H., Peeler, J.T., Wentz, B. & McPhearson, R.M. (1990) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2299-2302.

- Drummond, L.C., Balboa, S., Beaz, R., Mulcahy, M.F., Barja, J.L., Culloty, S.C. & Romalde, J.L. (2007) The susceptibility of Irish-grown and Galician-grown Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, to *Vibrio tapetis* and Brown Ring Disease. *Journal of Invertebrate Pathology* **95**, 1-8.
- Epifanio, C.E. & Ewart, J. (1977) Maximum ration of four diets for the oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **11**, 13-29.
- European Communities (1991) Council Directive of 15th of July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve mollusks (91/492/EEC). *Official Journal of European Communities* **268**, 1-14.
- Gutiérrez Gómez F. (2002) Producción de larvas y semillas de moluscos. Una perspectiva industrial. Available in: <http://www.mispecies.com/estudios/2002/moluscos-fgg/moluscos-fgg.asp> (access on 05/02/2012).
- Hjeltnes, B. & Roberts, R.J. (2001) Vibriosis. In: *Bacterial Diseases of Fish* (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts, N.R. Bromage, pp. 109-121. Blackwell Science Publications Ltd, Oxford.
- Lopez-Joven, C., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Furones, M.D. & Roque, A. (2011a) Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures. *Food Microbiology* **28**, 951-956.
- Lopez-Joven, C., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Furones, M.D. & Roque, A. (2011b) Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Applied Microbiology* **111**, 197-208.

- Lozano-Leon, A., Torres, J., Osorio, C.R. & Martinez-Urtaza, J. (2003) Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters* **226**, 281-284.
- Marino, A., Lombardo, L., Fiorentino, C., Orlandella, B., Monticelli, L., Nostro, A. & Alonzo, V. (2005) Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal of Food Microbiology* **99**, 281-286.
- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C. & Pousa, A. (2005) Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 1319-1320.
- McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A., Napolilli, N.P., Allison, C.G., Murray, S.L., Thompson, E.C., Bird, M.M. & Middaugh, J.P. (2005) Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine* **353**, 1463-1470.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. & McMeekin, T.A. (1997) Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 133-142.
- Molero, X., Bartolome, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F. & Garcia, R. (1989) [Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases]. *Medicina Clínica (Barcelona)* **92**, 1-4.
- National Shellfish Sanitation Program (2009) Guide for the Control of Molluscan Shellfish. Available in: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product->

SpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm053538.htm (access on 05/02/2012).

Nordstrom, J.L., Vickery, M.C., Blackstone, G.M., Murray, S.L. & DePaola, A. (2007) Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5840-5847.

Paillard, C., Allam, B. & Oubella, R. (2004) Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Disease of Aquatic Organisms* **59**, 249-262.

Pérez Camacho, A., Delgado, M. & Albentosa, M. (2002) Influencia del tamaño y la concentración de alimento sobre las tasas de aclaramiento e ingestión de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* **18**, 315-320.

Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C. & Birkbeck, T.H. (2003) Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Disease of Aquatic Organisms* **56**, 249-258.

Rodrick, G.E. & Schneider, K.R. (2003) Molluscan shellfish depuration. In: *Proceedings of the Fourth International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, Santiago de Compostela, Spain, June 4–8, pp. 210-218. Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Roque, A., Lopez-Joven, C., Lacuesta, B., Elandaloussi, L., Wagley, S., Furones, M.D., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Rangdale, R. & Gomez-Gil, B. (2009). Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve

- molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 7574-7577.
- Schulte, E.H. (1975) Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **30**, 331-341.
- Sobral, P. & Widdows, J. (1997) Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from southern Portugal. *Scientia Marina* **61**, 163-171.
- Walne, P.R. (1972) The influence of current speed, body size, and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **52**, 345-374.
- Winter, J.E. (1978) A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* **13**, 1-33.
- Yoon, K.S., Min, K.J., Jung, Y.J., Kwon, K.Y., Lee, J.K. & Oh, S.W. (2008) A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiology* **25**, 635-641.

### Figure legends

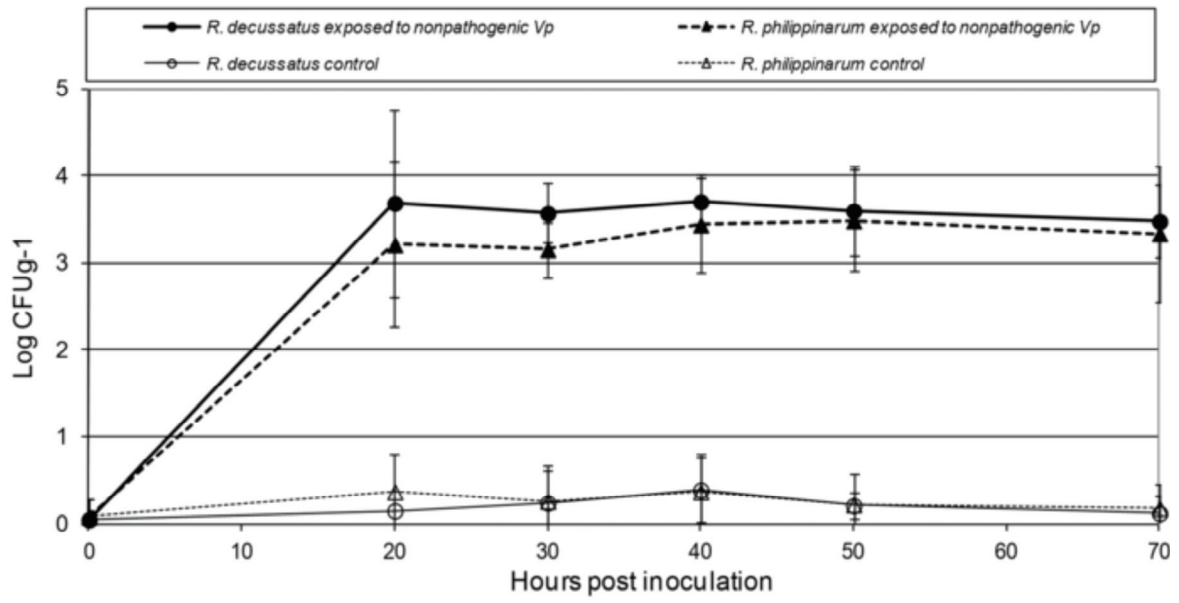
Figure 1. Uptake of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* by *R. decussatus* and *R. philippinarum* under cohabitation conditions (mean  $\pm$  standard error of the mean).

## Tables

Table 1. Biometrical characteristics of two species of clams (expressed as mean  $\pm$  standard deviation)

Group	<i>R. decussatus</i>			<i>R. philippinarum</i>		
	n	Length (mm)	Weight (g)	n	Length (mm)	Weight (g)
Inoculated 1	15	41.17 $\pm$ 2.37	5.20 $\pm$ 0.80	15	40.12 $\pm$ 2.94	4.88 $\pm$ 1.40
Inoculated 2	15	40.87 $\pm$ 2.38	5.17 $\pm$ 1.00	15	39.60 $\pm$ 1.82	4.72 $\pm$ 0.93
Control 1	15	41.50 $\pm$ 2.63	5.36 $\pm$ 0.60	15	40.34 $\pm$ 1.56	5.14 $\pm$ 0.94
Control 2	15	40.72 $\pm$ 1.69	5.18 $\pm$ 0.59	15	39.77 $\pm$ 2.10	5.03 $\pm$ 1.11
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>41.06 <math>\pm</math> 2.26</b>	<b>5.23 <math>\pm</math> 0.75</b>	<b>60</b>	<b>39.96 <math>\pm</math> 2.13</b>	<b>4.94 <math>\pm</math> 1.09</b>





#### 7.2.4. Journal of Food Protection (en revisión)

Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Furones MD, Roque A. Effect of different temperatures on the growth and survival of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of postharvest Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). **Journal of Food Protection** (manuscrito en revisión).

#### Resumen del artículo en castellano

##### **Efecto de diferentes temperaturas en el crecimiento y la supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno en tejidos de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) en la fase de postcosecha**

*Vibrio parahaemolyticus* patógeno es un importante agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos y, los moluscos después de la cosecha mantenidos a temperaturas inadecuadas pueden contener una gran densidad de *Vibrio parahaemolyticus* tanto patogénicos y no patogénicos. El objetivo de este estudio fue determinar si había alguna diferencia en los niveles de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno en almejas japonesas (*Ruditapes philippinarum*) cuando éstas son almacenadas a temperaturas diferentes de post-cosecha. Las almejas fueron depuradas previamente y expuestas a dosis conocidas de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno. Posteriormente, el almacenamiento en la fase de postcosecha se llevó a cabo a 28°C, 15°C y 4°C, temperaturas que se corresponden a temperaturas del verano (28°C) y del invierno (15°C) mediterráneo y, temperaturas de refrigeración (4°C). Las densidades de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno y no patógeno fueron determinadas después de 0, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento en postcosecha. Ambas cepas de *V. parahaemolyticus* se multiplicaron rápidamente en las almejas vivas mantenidas a 28°C, mostrando un incremento de por lo menos 3 logs ufc/g en 72 h, en ambas cepas bacterianas. *Vibrio parahaemolyticus* no patógeno almacenado a 4°C y a 15°C mostró una disminución de 1 log ufc/g y 2 ufc/g a las 96 h, respectivamente, mientras que no se detectaron diferencias significativas para *Vibrio parahaemolyticus* patógeno almacenado a estas temperaturas. Los resultados presentados aquí muestran que *Vibrio parahaemolyticus* patógeno podría sobrevivir mejor que *Vibrio parahaemolyticus* no patógeno en almejas en la fase de postcosecha, a temperaturas de 4 y 15°C.



**Effect of different temperatures on levels of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of postharvest Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)**

**Running title: *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest clams**

C. Lopez-Joven <sup>a</sup>, I. de Blas <sup>b</sup>, I. Ruiz-Zarzuela <sup>b</sup>, MD. Furones <sup>a</sup> and A. Roque <sup>a</sup> \*

<sup>a</sup> Institute for Food and Agricultural Research and Technology (IRTA-SCR), Ctra. Poble Nou Km. 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain.

<sup>b</sup> Laboratory of Fish Diseases, Veterinary Faculty, Universidad de Zaragoza, c/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain.

\* Corresponding author: Tel.: +34 977 745427; fax: +34 977 744138. E-mail address: ana.roque@irta.es (A. Roque).

## Abstract

Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* is an important cause of foodborne illness, and molluscs at inadequate postharvest temperatures can contain greater densities of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. The objective of this study was to determine if there was any difference in levels of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) when these are kept at different postharvest temperatures. Clams were depurated and then exposed to known doses of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. Afterwards, postharvest storage was carried out at temperatures, which correspond with the Mediterranean summer (28°C), winter (15°C) and refrigeration (4°C). Pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* densities were determined after 0, 24, 48, 72 and 96 h of postharvest storage. Both isolates of *V. parahaemolyticus* multiplied rapidly in live clams held at 28°C, showing an increase at least of 3 logs CFU/g at 72 h. Nonpathogenic *V. parahaemolyticus* stored at 4°C and 15°C showed 1 log CFU/g and 2 log CFU/g decrement at 96 h, respectively, while no significant differences were detected for pathogenic *V. parahaemolyticus* stored at these temperatures. Results presented here showed that pathogenic *V. parahaemolyticus* might survive better than nonpathogenic *V. parahaemolyticus* in postharvest Manila clams at 4 and 15°C.

*Keywords:* *Vibrio parahaemolyticus*, Manila clam (*Ruditapes philippinarum*),

Postharvest temperature, Survival time

*Vibrio parahaemolyticus* is a Gram-negative bacterium that occurs naturally in the marine environment and it is a common cause of shellfish-related gastroenteritis in South American countries (Gonzalez-Escalona et al., 2005; Leal et al., 2008; Martinez-Urtaza et al., 2008; Harth et al., 2009), Asian countries (Wong et al., 2000; Alam et al., 2002; Hara-Kudo et al., 2003; Deepanjali et al., 2005); and it is also recognized as the main cause of human gastroenteritis associated to shellfish consumption in USA (Daniels et al., 2000). It has also been reported that *V. parahaemolyticus* is responsible for outbreaks associated with consumption of raw or undercooked shellfish in some European countries such as Spain (Molero et al., 1989; Macián et al., 2000; Croci et al., 2001; Hervio-Heath et al., 2002; Lozano-León et al., 2003; Martinez-Urtaza et al., 2005; Roque et al., 2009). However, the risk of *V. parahaemolyticus* infections is considered to be low (European Commission, 2001; Su and Liu, 2007). Consequently, *V. parahaemolyticus* is not included in the European Network for Epidemiologic Surveillance and Control of Communicable Diseases and it is also excluded from the microbiological surveillance system for infectious gastroenteritis (European Commission, 2001).

Although, the overall mechanism of pathogenesis of *V. parahaemolyticus* is still not completely understood, two hemolysins, namely the thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related hemolysin (TRH), encoded by *tdh* and *trh* genes respectively, are important virulence factors and play a significant role in precipitating the disease (Miyamoto et al., 1969; Takeda, 1983; Honda and Iida, 1993; DePaola et al., 2003; Lozano-León et al., 2003; Robert-Pillot et al., 2004; Yeung and Boor, 2004). Bivalve molluscs can concentrate bacteria in their tissues due to their filter-feeding activity. Thus the consumption of raw or undercooked seafood with pathogenic *V. parahaemolyticus* is one of the major causes of shellfish-related gastroenteritis

outbreaks around the world (McLaughlin et al., 2005). The level of *V. parahaemolyticus* in seawater, and in consequence in molluscs, is known to be related to environmental temperatures (DePaola et al., 2000). Furthermore, *V. parahaemolyticus* can multiply rapidly at 28°C and generation times as short as 10 min has been reported under these optimal conditions (Twedt and Novelli, 1971).

Inadequately controlled storage temperature may easily induce rapid multiplication of *V. parahaemolyticus* and increase the risk of illness associated with shellfish consumption (Beuchat, 1982). The U. S. Department of Health and Human Services (Public Health Service, Food and Drug Administration) revised in 2009 the approved guidelines related to shellfish harvesting and handling, and Control Plans for *V. parahaemolyticus* based on modelling and sampling were improved. These documents included the administrative procedures and necessary resources to limit time from harvest to refrigeration to no more than 5 h (FDA, 2009). Therefore, the development of effective post-harvest treatments to eliminate vibrio contamination is an important measure to reduce risk of infection associated with seafood consumption. Refrigeration is an effective postharvest treatment since *V. parahaemolyticus* is gradually inactivated at low temperatures (Matches et al., 1971; van den Broek and Mossel, 1977). Several studies have been performed using tubes of sterile oyster homogenate inoculated with *V. parahaemolyticus* to study survival at different temperatures (Thomson and Thacker, 1973; Muntada-Garriga et al., 1995). However, few studies have modelled the population dynamics of pathogenic and spoilage bacteria in processed molluscs (Yoon et al., 2008), and to the best of our knowledge no such study has been performed using live clams. Currently, it is assumed that the survival of virulent populations of *V. parahaemolyticus* is similar to that of the total populations during postharvest-process in live molluscs (DePaola et al., 2009). Presence of these bacteria is a latent problem to

public health due to the difficult detection of virulent *V. parahaemolyticus* in seafood or in the environment against a background of numerically greater numbers of avirulent *V. parahaemolyticus* (Gil et al., 2007). These measures are not enough as has been reflected in the outbreaks in the USA, where despite bacteriologic monitoring at harvest sites and despite the number of *V. parahaemolyticus* being lower than the permissible 10 000 most-probable-number, the outbreaks could not be prevented (Daniels et al., 2000).

In other fishery products, models have been developed in order to provide valuable information to producers and consumers (Yang et al., 2009), however additional information is required for clams. Therefore, the current study was conducted to describe and compare in *R. philippinarum* the growth of two different isolates of *V. parahaemolyticus*: one potentially pathogenic possessing the *tdh* gene and one classified as nonpathogenic since it contained neither *tdh* nor *trh* genes, when *R. philippinarum* were stored at three different temperatures corresponding to the Mediterranean summer (28°C), winter (15°C) and refrigeration (4°C) after artificial contamination.

## **Material and methods**

### *Origin of the clams*

Adult clams of *R. philippinarum* were collected from the Delta of the Ebro River. All individuals opened and closed their valves and presented intact shells with normal coloration without any noticeable abnormality at arrival. Once collected they were transported to the laboratory in cool boxes in less than 1 h. On arrival, clams were placed inside an experimental system for depuration for at least 9 days based on results of previous experiments (Lopez-Joven et al., 2011a). When clams were found to have



non detectable levels or to be free from sucrose nonfermenting vibrios (like *V. parahaemolyticus*) they were placed in experimental units.

#### *Bacterial isolates and preparation of the inocula*

Two isolates of *V. parahaemolyticus* with the *tl* gene were used in this study. They were both isolated from shellfish cultured in the Dof the Ebro river (second largest Manila clam production area in Spain) in 2006 summer season (Roque et al., 2009), thus they were fully adapted to the bivalves and their environment, and for this reason they were preferred to type strains.

Pathogenic isolate, *V. parahaemolyticus* i678\* (pathogenic *Vp*) that contains *tdh* gene was isolated from a clam. Nonpathogenic isolate used, *V. parahaemolyticus* i747\* (nonpathogenic *Vp*), did not contain *tdh* or *trh* genes, and it was isolated from a mussel. They were the same bacteria used in previous experiments (Lopez-Joven et al. 2011b), and were previously characterised (Roque et al. 2009).

Exposure tanks with initial populations of  $10^5$  CFU/ml of seawater were prepared as described in Lopez-Joven et al. (2011b), for both variants of *V. parahaemolyticus*: pathogenic and nonpathogenic. Briefly bacteria were grown in Tryptone Soy Broth (Scharlab, Barcelona, Spain) with 2% NaCl and then harvested and washed by centrifugation before they were suspended in sterile saline solution (2.5% NaCl) at the desired density.

#### *Experimental protocol*

---

\* available from the corresponding author

The experiment assessed two factors: temperature and vibrio type. Each factor was divided into three categories: temperature (4, 15 and 28°C) and vibrio (pathogenic or nonpathogenic *V. parahaemolyticus*, and control without experimental inocula of *Vibrio*).

First of all, batches of clams free of sucrose nonfermenting vibrios (like *V. parahaemolyticus*) were placed in experimental tanks with a maximum capacity of 20 L with 300 mL of sterile seawater per clam, where they remained during 24 h in a static aerated system with phytoplankton ( $10^5$  cells/ml of axenic *Isochrysis galbana* variety Tahiti) (Pérez Camacho et al. 2002) to stimulate bacterial uptake by the clams.

Furthermore, for exposed groups an average concentration of pathogenic or nonpathogenic *V. parahaemolyticus* of  $6.16 \pm 0.48$  log CFU/clam or  $6.72 \pm 0.32$  log CFU/clam, was added respectively. This step was performed at room temperature and water temperature varied between 16 and 18°C. Parameters used for bacterial exposure were based on previous experiments (Lopez-Joven et al., 2011b).

At this point (time 0) a sample of 3 or 5 clams was collected from each batch to be analysed in order to determine initial concentration of *V. parahaemolyticus* described later in section on microbiological analyses.

Remaining clams were placed in different moist plastic containers with a wet layer at bottom and they were stored at constant air temperature (4, 15 or 28°C) during 96 h. In each container 12 or 20 clams were used in order to sample 3 or 5 clams at 24, 48, 72 and 96 h.

Four experiments were carried out (Table 1). Experiment A used two groups (control and nonpathogenic *V. parahaemolyticus*) with 5 clams per group sampled at time 0 h and with sets of 12 clams stored at three different temperatures. Experiment B was similar but groups were control and pathogenic *V. parahaemolyticus*, and 3 clams per

group were analysed at time 0 h. Experiment C used three exposure groups (control, nonpathogenic and pathogenic *V. parahaemolyticus*), with 3 clams per group sampled initially and 12 clams stored at 4, 15 and 28°C. Additionally an experiment D was carried out with the same three groups, but 5 clams analysed at time 0 from each group and 20 clams stored only at 4°C.

From this point, concentrations of *V. parahaemolyticus* in clams were estimated every 24 h during storage for 96 h and at each time, 3-5 clams were taken out from each container for the analysis.

A total of 352 clams were used in this study: 144 as control clams (no bacterial exposure), and 103 and 105 clams exposed to pathogenic or nonpathogenic *V. parahaemolyticus*, respectively.

Before microbiological analysis, each clam was measured (Digital caliper (0-150 mm) LLG, Mitutoyo CD-15, Tokyo, Japan) and flesh was weighed. Table 1 shows the average length (mm) and weight (g) of clams used in the study.

#### *Microbiological analyses*

Tissue and shell liquor of individual clams were aseptically removed, weighted and placed into 10 ml of sterile 2.5% NaCl solution (SSS). The resulting mixture was homogenized for 30 s using an ultraturrax. Further decimal dilutions were made in SSS and volumes of 0.1 ml from each dilution were spread onto Chromagar Vibrio plates (CHROMagar, Paris, France) and incubated at 37°C for 18-20 h. The mauve-purple colonies formed onto Chromagar Vibrio (specific for *V. parahaemolyticus*) were counted to calculate the density of viable cells in the sample (CFU/g).

Levels of *V. parahaemolyticus* were calculated as the average density of results for each sampling time. Real-time PCR would be the preferred technique in order to quantify

bacteria (Nordstrom et al., 2007), however it was discarded since it may react with DNA from dead bacteria, resulting in false positive results (de Abreu Correa et al., 2007), for this reason we decided to use classical microbiological method to calculate only the density of viable cells in the sample.

### *Statistical analysis*

Quantitative variables, as length and weight, were described using mean and standard deviation stratified by experimental groups. Homoscedasticity was assessed using Kolmogorov-Smirnov test to check normal distribution, and Levene test for variance homogeneity. Non homoscedastic variables, as CFU/g, were log-transformed to improve homoscedasticity. Differences between means for log<sub>10</sub> (CFU/g) depending on pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus*, temperature and time, were analyzed with Student's t test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan post-hoc test in order to assess differences between means. Desired alpha error was established at 0.05. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 for Windows (Chicago, IL, USA).

### **Results**

According to their biometrical measurements (Table 1), clams were homogeneous and no significant differences were found among the different experimental groups.

At time 0 h, the densities of *V. parahaemolyticus* expressed as log CFU/g of clam were not significantly different between experiments for each exposure group: Control group (0.38 ± 0.82 log CFU/g of clam) ( $P = 0.794$ ), pathogenic *V. parahaemolyticus* (4.09 ± 2.01 log CFU/g of clam) ( $P = 0.440$ ) and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* (5.22 ± 0.28 log CFU/g of clam) ( $P = 0.398$ ).

When the evolution of bacterial concentrations along time at different temperatures was analysed, no variations were found at 4°C (Figure 1) neither in control group ( $P = 0.184$ ) nor in pathogenic *V. parahaemolyticus* group ( $P = 0.350$ ) during experimental period. However, significant decrements of concentrations in nonpathogenic *V. parahaemolyticus* group ( $P < 0.001$ ) at 48 h ( $4.64 \pm 0.84$  log CFU/g of clam) and at 96 h ( $4.15 \pm 0.64$  log CFU/g of clam) were detected. Similar results were obtained at 15°C (Figure 2) where no significant differences were found for control group ( $P = 0.158$ ) and pathogenic *V. parahaemolyticus* group ( $P = 0.194$ ), but bacterial levels in nonpathogenic *V. parahaemolyticus* group ( $P = 0.001$ ) decreased significantly at 72 and 96 h ( $3.86 \pm 2.12$  and  $3.22 \pm 0.68$  log CFU/g of clam, respectively). Finally, significant increments of bacterial levels were found in all groups at 28°C. For control group they were significantly different ( $P < 0.001$ ) at 24 h ( $3.50 \pm 1.59$  log CFU/g of clam) and maintained constant until 96 h. Differences also were found in pathogenic *V. parahaemolyticus* group ( $P < 0.001$ ) at 24 h ( $5.53 \pm 0.52$  log CFU/g of clam) maintained constant at 48 h, and increased again at 72 h ( $7.61 \pm 0.90$  log CFU/g of clam). And increments were found in nonpathogenic *V. parahaemolyticus* group ( $P < 0.001$ ) at 24 h ( $6.84 \pm 0.75$  log CFU/g of clam), and at 72 h ( $8.11 \pm 0.69$  log CFU/g of clam).

Initial levels of the nonpathogenic variant were significantly higher than the pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* ( $P = 0.010$ ). However these differences were not detectable between both variants at different times depending on temperature. At 4°C (Figure 1), differences remained at 24 and 72 h ( $P = 0.027$  and  $P = 0.001$ , respectively), but they were not found at 48 and 96 h ( $P = 0.785$  and  $P = 0.794$ , respectively). At 15°C (Figure 2), differences were not observed at 24, 48 and 72 h ( $P = 0.346$ ,  $P = 0.352$  and  $P = 0.306$ , respectively), and even a significant difference in opposite direction was

observed at 96 h ( $P=0.002$ ) and at this moment level of pathogenic variant was higher than nonpathogenic one. A similar trend was observed at 28°C (Figure 3), and no differences were observed at 24, 48 and 72 h ( $P = 0.414$ ,  $P = 0.140$  and  $P = 0.309$ , respectively), and it was not possible to carry out the comparison at 96 h since mortality was 66% for group exposed to nonpathogenic *V. parahaemolyticus* and for the control group, while it was 100% for group exposed to pathogenic variant.

## Discussion

Many studies have been focused on total levels *V. parahaemolyticus* in molluscs (mainly in oysters) at different temperatures. Most of them concluded that refrigeration is an effective procedure to decrease concentration of *V. parahaemolyticus* in bivalves or to maintain levels of *V. parahaemolyticus* fairly constant and viable for weeks. In general, a very slow decrement in *V. parahaemolyticus* numbers was observed when postharvest oysters were stored at lower temperatures (below 5°C) (Johnson et al., 1973; Thomson and Thacker, 1973; Gooch et al., 2002; Shen et al., 2009), but long periods of time (even 18 weeks) could be necessary to get a complete inactivation of *V. parahaemolyticus* (Muntada-Garriga et al., 1995). Levels of *V. parahaemolyticus* remained constant a long time when storage temperature increased to 8-10°C, since no bacterial multiplication occurred but cells remained viable during several weeks (Thomson and Thacker, 1973; Cook and Ruple, 1989; Shen et al., 2009). Furthermore, a gradual increment of concentrations of *V. parahaemolyticus* was observed when oysters were stored at higher temperatures (10-15°C) due to multiplication of viable cells (Thomson and Thacker, 1973; Shen et al., 2009). Results of current study showed that only nonpathogenic *V. parahaemolyticus* decreased when clams were stored at 4 and 15°C, while levels of pathogenic *V. parahaemolyticus* were maintained constant.

On the other hand, when postharvest molluscs are stored at temperatures higher than 20°C, an active and fast multiplication of *V. parahaemolyticus* was registered in less than 48 h (Johnson et al., 1973; Cook and Ruple, 1989; Gooch et al., 2002), and these studies agree with present results that showed a significant increase of levels of both isolates of *V. parahaemolyticus* at 28°C. Current study showed that concentrations of both variants increased rapidly at 28°C. Furthermore, the low survival rates of clams observed at high temperatures (28°C) may be explained from degradation of physiological status of clams. These results are in agreement with Lorca et al. (2001) that showed that the length of storage had a greater effect on the bacterial counts of the oysters.

Pathogenic *V. parahaemolyticus* showed greater ability to survive at refrigeration temperatures than nonpathogenic variant of *V. parahaemolyticus* in postharvest Manila clam. These results are in contrast to the results obtained for Yoon et al. (2008), who observed that both pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* decreased at 10°C and 15°C, and pathogenic *V. parahaemolyticus* decreased more rapidly than nonpathogenic *V. parahaemolyticus* at both temperatures. The discrepancy in this result may be attributable to the fact that in the study by Yoon et al. (2008), broth and oysters slurry were inoculated and stored with pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* strains, whereas in the current study the clams obtained by filter-feeding both variants of *V. parahaemolyticus* through experimental exposure to bacteria and then they were stored before analysis. Present study represents more accurately what may occur in nature.

According to the U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (FDA, 2009), shellstock storage is a Critical Control Point due to pathogenic bacteria can survive in shellfish for a considerable length of time after harvesting and

that some bacterial pathogens may multiply in the absence of adequate refrigeration. That is why it is necessary to put special attention in postharvest process, specially with vibrios that are among the fastest-growing bacteria in nature, and they can multiply faster in harvested molluscs when they were not promptly refrigerated (Cook, 1997; Gooch et al., 2002). In consequence the presence of these pathogens in live bivalves still is a relevant risk of illness to consumers.

In conclusion, levels of *V. parahaemolyticus* in post-harvest clams depended mainly on storage temperature and multiplication of *V. parahaemolyticus* in clams would be irrelevant with temperatures below 15°C. However it is necessary to take into account other important factors as initial bacterial level inside bivalves, time of storage and bacterial variant.

Nevertheless, results from this study contribute to the availability of new data to be used in quantitative risk analysis and to harmonize an *in vivo* model for further research.

### **Acknowledgments**

The present study was financed by Spanish INIA project Nos. RTA 2005 00079 00 00 and RTA 2007 00063 00 00 with Feder funds awarded to AR. CLJ has a doctoral scholarship provided by INIA.

### **References**

Alam MJ, Tomochika K, Miyoshi S, and Shinoda S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. FEMS Microbiol Lett 2002; 208:83-87.



Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, and Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods 1999; 36:215-225.

Beuchat LR. *Vibrio parahaemolyticus*: public health significance. Food Tech 1982; 36:80-83.

Cook DW. Refrigeration of oyster shellstock: conditions which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. J Food Prot 1997; 60:349-352.

Cook, D and Ruple A. Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in post-harvest shellstock oysters. J Food Prot 1989; 52:343-349.

Croci L, Serratore P, Cozzi L, Stacchini A, Milandri S, Suffredine E, and Toti L. Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. Lett Appl Microbiol 2001; 32:57-61.

Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM, and Slutsker L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. J Infect Dis 2000; 181:1661-1666.

de Abreu Correa A, Albarnaz JD, Moresco V, Poli CR, Teixeira AL, Oliveira Simoes CM, and Monte Barardi CR. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mar Environ Res 2007; 63:479-89.

Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. Appl Environ Microbiol 2005; 71:3575-3580.

- DePaola A, Jones JL, Noe KE, Byars RH, and Bowers JC. Survey of postharvest-processed oysters in the United States for levels of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 2009; 72:2110-2113.
- DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, Tenge BJ, Nordstrom JL, Wells J, Puhr N, and Gendel SM. Molecular, serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. Appl Environ Microbiol 2003; 69:3999-4005.
- DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, and Cook DW. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). Appl Environ Microbiol 2000; 66:4649-4654.
- European Commission, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in Raw and Undercooked Seafood). pp. 1–64. Brussels, Belgium: European Commission Health & Consumer Protection Directorate General. Directorate C-Scientific Opinions.
- Food and Drug Administration, 2009. National shellfish sanitation program guide for the control of molluscan shellfish. U. S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C. Available at URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm046353.htm>
- Gil AI, Miranda H, Lanata CF, Prada A, Hall ER, Barreno CM, Nusrin S, Bhuiyan NA, Sack DA, and Nair GB. O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. Int J Infect Dis 2007; 11:324-328.

Gonzalez-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F, Romero J, and Espejo RT. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:129-131.

Gooch JA, DePaola A, Bowers J, and Marshall DL. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *J Food Prot* 2002; 65:970-974.

Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, Chowdhury A, Yatsuyanagi J, Ohtomo Y, Saito A, Nagano H, Nishina T, Nakagawa H, Konuma H, Miyahara M, and Kumagai S. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:3883-3891.

Harth E, Matsuda L, Hernández C, Rioseco ML, Romero J, González-Escalona N, Martínez-Urtaza J, and Espejo RT. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, Southern Chile. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:163-168.

Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, and Pompey M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J Appl Microbiol* 2002; 92:1123-1135.

Honda T and Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 1993; 4:106-113.

Johnson Jr. WG, Salinger AC, and King WC. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. *Applied Microbiol* 1973; 26:122-123.

Leal NC, da Silva SC, Cavalcanti VO, Figueiroa ÂCT, Nunes VVF, Miralles IS, and Hofer E. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. *J Appl Microbiol* 2008; 105:691-697.

Lopez-Joven C, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Furones MD, and Roque A. Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperatures. Food Microbiol 2011a; 28:951-956.

Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Furones MD, and Roque A. Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. J Appl Microbiol 2011b; 111:197-208.

Lorca TA, Pierson MD, Flick GJ, and Hackney CR. Levels of *Vibrio vulnificus* and organoleptic quality of raw shellstock oysters (*Crassostrea virginica*) maintained at different storage temperatures. J Food Prot 2001; 64:1716-1721.

Lozano-León A, Torres J, Osorio CR, and Martínez-Urtaza J. Identification of *thd*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from and outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS Microbiol Lett 2003; 226:281-284.

Macián MC, Arias CR, Aznar R, Garay E, and Pujalte MJ. Identification of *Vibrio* spp. (other than *Vibrio vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. Int Microbiol 2000; 3:51-53.

Martínez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, DePaola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Carrera-Flores D, Rey-Alvarez C, and Pousa A. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. Emerg Infect Dis 2005; 11:1319-1320.

Martínez-Urtaza J, Huapaya B, Gavilan RG, Blanco-Abad V, Ansedé-Bermejo J, Cadarso-Suarez C, Figueiras A, and Trinanés J. Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. Epidemiology 2008; 19:829-837.

Matches JR, Liston J, and Daneault LP. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in fish homogenate during storage at low temperatures. Appl Microbiol 1971; 21:951-952.

McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, Martinek KA, Napolilli NP, Allison CG, Murray SL, Thompson EC, Bird MM, and Middaugh JP. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. N Engl J Med 2005; 353:1463-1470.

Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K, and Yamai S. *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J Bacteriol 1969; 100:1147-1149.

Molero X, Bartolome RM, Vinuesa T, Guarner L, Accarino A, Casellas F, Garcia R. Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases. Med Clí (Barc) 1989; 92:1-4.

Muntada-Garriga JM, Rodriguez-Jerez JJ, Lopez-Sabater EI, Mora-Ventura MT. 1995. Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. Lett Appl Microbiol 1995; 20:225-227.

Nordstrom J.L., Vickery M.C., Blackstone G.M., Murray S.L. and DePaola A. 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. Appl Environ Microbiol 73:5840-5847.

Pérez Camacho A, Delgado M, and Albentosa M. Influencia del tamaño y la concentración de alimento sobre las tasas de aclaramiento e ingestión de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Bol Inst Esp Oceanogr 2002; 18:315-320.

Robert-Pillot A, Guenole A, Lesne J, Delesmont R, Fournier JM., and Quilici ML. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two France coastal areas and from seafood imported into France. Int J Food Microbiol 2004; 91:319-325.

Roque A, Lopez-Joven C, Lacuesta B, Elandalousi L, Wagley S, Furones MD, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Rangdale R, and Gomez-Gil B. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:7574-7577.

Shen X, Cai Y, Liu C, Liu W, Hui Y, and YC. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). *Int J Food Microbiol* 2009; 136:129-132.

Su Y-C and Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol* 2007; 24:549-558.

Takeda Y. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacol Ther* 1982; 19:123-146.

Thomson WK and Thacker CL. Effect of temperature in *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperature. *Can Inst Food Sci Technol J* 1973; 6:156-158.

Twedt RM and Novelli RM. Modified selective and differential isolation medium for *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiol* 1971; 22:593-599.

van den Broek MJM, and Mossel DAA. Sublethal cold shock in *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 1977; 34:97-98.

Wong HC, Liu SH, Ku LW, Lee IY, Wang TK, Lee YS, Lee CL, Kuo LP, and Shin DYC. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J Food Prot* 2000; 63:900-906.

Yang Z-Q, Jiao X-A, Li P, Pan Z-M, Huang J-L, Gu R-X, Fang W-M, and Chao G-X. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiol* 2009; 26:606-614.

Yoon KS, Min KJ, Jung YJ, Kwon KY, Lee JK, and Oh SW. A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiol* 2008; 25:635-641.

Yeung PS and Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog Dis* 2004; 1:74-88.

### Figure legends

FIGURE 1. Levels of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* during 96 h storage period at 4°C (mean  $\pm$  standard error of the mean).

FIGURE 2. Levels of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* during 96 h storage period at 15°C (mean  $\pm$  standard error of the mean).

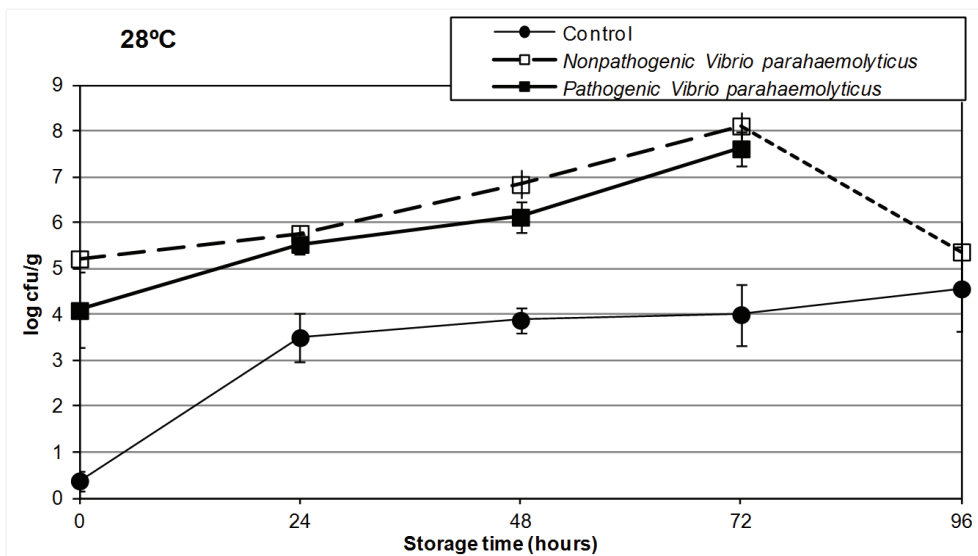
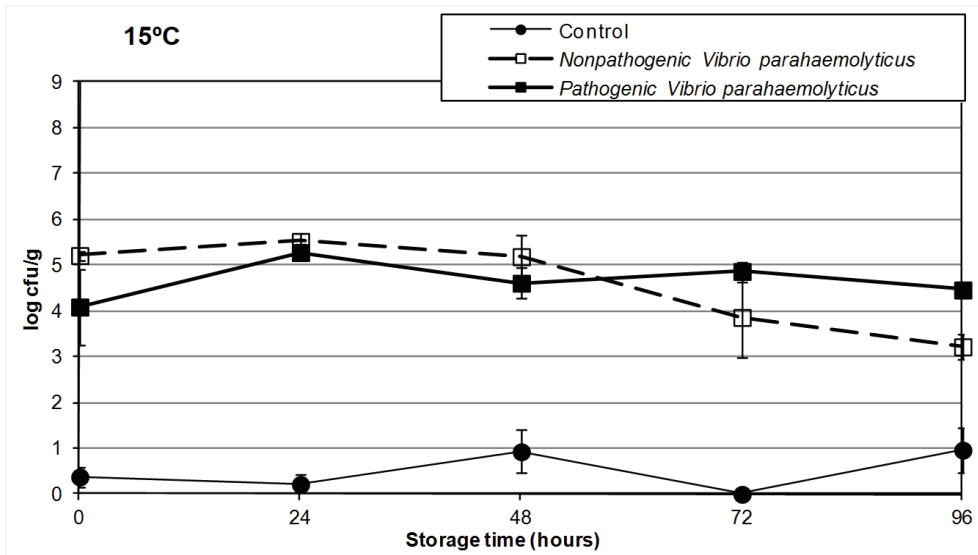
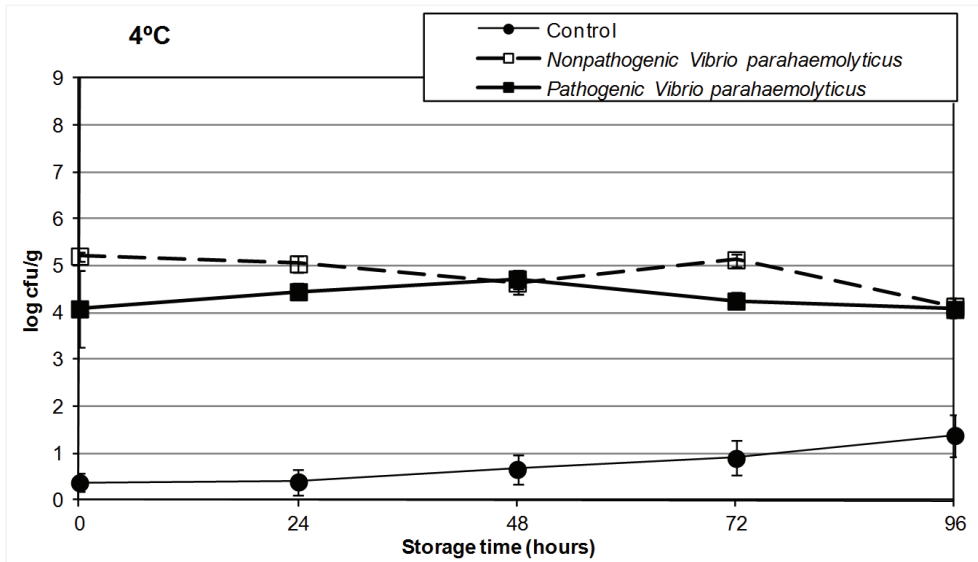
FIGURE 3. Levels of pathogenic and nonpathogenic *V. parahaemolyticus* during 96 h storage period at 28°C (mean  $\pm$  standard error of the mean).



**Tables**

TABLE 1. Biometry characteristics of *Ruditapes philippinarum* clams (expressed as mean  $\pm$  standard deviation) used in the present study with three different storage temperatures ( $^{\circ}$ C) and initial bacterial load of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*) offered per clam.

Experiment	A (nonpathogenic <i>Vp</i> )			B (pathogenic <i>Vp</i> )			Control Group		
	n	Length (mm)	Weight (g)	n	Length (mm)	Weight (g)	n	Length (mm)	Weight (g)
<b>0 h</b>	13	31.52 $\pm$ 2.14	1.79 $\pm$ 0.34	11	32.39 $\pm$ 2.15	1.97 $\pm$ 0.30	16	30.43 $\pm$ 2.98	1.78 $\pm$ 0.46
<b>4<math>^{\circ}</math>C</b>	44	35.75 $\pm$ 7.05	2.38 $\pm$ 1.03	44	34.47 $\pm$ 5.64	2.16 $\pm$ 0.72	56	34.74 $\pm$ 6.78	2.34 $\pm$ 1.09
<b>15<math>^{\circ}</math>C</b>	24	32.31 $\pm$ 2.89	2.00 $\pm$ 0.46	24	31.00 $\pm$ 1.76	2.00 $\pm$ 0.35	36	31.85 $\pm$ 2.63	1.98 $\pm$ 0.53
<b>28<math>^{\circ}</math>C</b>	24	29.94 $\pm$ 2.39	1.58 $\pm$ 0.56	24	31.25 $\pm$ 2.52	1.84 $\pm$ 0.51	36	30.52 $\pm$ 2.90	1.61 $\pm$ 0.59
Initial bacterial load (Log(CFU/clam))	6.72 $\pm$ 0.32			6.16 $\pm$ 0.48			-		





## Discusión general

### 8.1. Detección e identificación de *V. parahaemolyticus* en el delta del Ebro y su relación intraespecífica con otros aislados europeos

---

La aportación de nuevos datos sobre *V. parahaemolyticus* en el delta del Ebro ofrece información actual e importante a nivel europeo, y concretamente en relación con la costa mediterránea. Su detección e identificación, así como el estudio de su prevalencia y su distribución espacial y temporal en moluscos bivalvos cultivados en cada una de las bahías, y la asociación con dos parámetros ambientales (temperatura y salinidad), proporcionan nuevos conocimientos para afrontar la realización de futuros análisis de riesgo que se lleven a cabo en Europa. Esta información podrá usarse en el caso de que sea necesario modificar la legislación vigente en materia de seguridad alimentaria, y más, teniendo en cuenta que hasta el momento y debido a su bajo impacto en Europa no ha sido incluido en los programas europeos de vigilancia epidemiológica (*European Network for Epidemiological Surveillance and Control of Communicable Diseases*) (SANCO/4198/2001, revision 21, *Draft of Commission Regulation on Microbial Criteria for Foodstuffs, European Community*), y que no está incorporado en la Directiva Europea 91/492/CEE, aplicable a las condiciones de producción y comercio de moluscos bivalvos vivos.

En los últimos 60 años se han publicado numerosos estudios sobre *V. parahaemolyticus* por su carácter patogénico y su amplia distribución geográfica (Amirmozafari *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2010; Julie *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2010), con impacto variable, siendo EE.UU., Chile y Japón algunos de los países más castigados. Sin embargo todavía es necesario realizar más estudios en el continente europeo, que permitan evaluar el riesgo de que este patógeno se convierta en un problema sanitario emergente (Hervio-Heath *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2006). Por todo ello, la información ofrecida en esta Tesis Doctoral, junto con los datos publicados en los últimos años y relacionados tanto con la detección como con la prevalencia y distribución de *V. parahaemolyticus* en diferentes muestras ambientales y/o clínicas en Europa (Macián *et al.*, 2000; Croci *et al.*, 2001; Lozano-Leon *et al.*, 2003; Robert-Pillot *et al.*, 2004; Martínez-Urtaza *et al.*, 2008; Julie *et al.*,

2010; Baker-Austin *et al.*, 2010), servirán de ayuda en el caso de que sea necesario establecer una reglamentación adecuada para que los productos de la acuicultura sean convenientemente revisados y no desencadenen un problema de Salud Pública al infravalorar el riesgo de esta enfermedad.

En este contexto, y teniendo en cuenta que la información de la que se disponía sobre la presencia de vibrios, y más concretamente *V. parahaemolyticus* potencialmente patógeno para humanos y asociado a bivalvos en el delta del Ebro había sido prácticamente nula (Montilla *et al.*, 1994), el hallazgo de variantes potencialmente patógenas de *V. parahaemolyticus* (variantes *tdh+* y/o *trh+*) en moluscos cultivados en las bahías del delta del Ebro, en los estudios que forman parte de esta Tesis, es sumamente relevante, ya que confirman la presencia de cepas bacterianas localizadas en el medio ambiente y en los mariscos, por lo que representan un riesgo para la salud humana. Por ello estos datos aportan más información para la realización de un análisis de riesgo en términos de Salud Pública, teniendo en cuenta que estas bahías están englobadas en una región con una actividad acuícola significativa, considerándose la segunda zona productora más importante a nivel nacional después de Galicia, y además teniendo en cuenta que España no sólo es un productor destacado de moluscos bivalvos a nivel mundial, sino que también es uno de los principales consumidores.

La diseminación de la nueva cepa del serotipo O3:K6 (Arakawa *et al.*, 1999) y de otros ribogrupos asociados con el clon pandémico en cuatro continentes: Asia (Okuda *et al.*, 1997b; Matsumoto *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000), América (Cordova *et al.*, 2002; Gonzalez-Escalona *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2005), África (Ansaruzzaman *et al.*, 2005) y Europa (Martinez-Urtaza *et al.*, 2005; Quilici *et al.*, 2005; Caburlotto *et al.*, 2008; Ottaviani *et al.*, 2008), ha sido estudiada y evidencia que estamos frente a una pandemia causada por *V. parahaemolyticus*, que puede haber sido diseminado mediante el agua de lastre de los barcos. Hay que indicar que en las bahías del delta del Ebro no se ha detectado de momento la presencia del serotipo pandémico O3:K6, pero al igual que en otros estudios las cepas de *V. parahaemolyticus* presentaron una alta variabilidad serológica y algunas de ellas no pudieron ser tipificadas totalmente o en parte (Lleo *et al.*, 2010). Sin embargo, sí que se detectó la presencia de una serovariante relacionada (O1:KUT) con el serotipo de la cepa pandémica (O3:K6), incluida dentro del grupo pandémico, lo que amplía la información existente a nivel europeo, y ofrece nuevos argumentos para modificar la legislación europea actual e incluir las especies del género *Vibrio* patógenas para el hombre, como *V. parahaemolyticus*, dentro de los programas de vigilancia, al considerar que son potenciales portadores de genes de virulencia, y podrían convertirse en un problema emergente de Salud Pública (Chowdhury *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2007; Ottaviani *et al.*, 2010). Además, también se encontraron las

serovariantes, O4:KUT y O5:KUT, que según un estudio reciente de Meador y colaboradores (2007) podrían ampliar el grupo pandémico.

Otro aspecto que en los últimos años ha cobrado una gran importancia desde el punto de vista epidemiológico son las relaciones taxonómicas mediante el estudio de marcadores de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* (genes *tdh* y/o *trh*) y de perfiles genéticos en cepas aisladas en diferentes orígenes, ya que pueden aportar datos clave para comprender la procedencia, la diseminación y la evolución de este patógeno en diferentes territorios y/o especies (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004). La comparación de cepas aisladas en las bahías del delta del Ebro, con otras procedentes de diversos países europeos y con diferentes orígenes (agua, peces, moluscos, personas enfermas...) mediante la caracterización de los perfiles PFGE puso de relieve la gran diversidad genética existente y la amplia distribución geográfica, encontrándose dentro de una misma agrupación cepas con diferentes orígenes geográficos, de diversas fuentes y con diferentes genotipos (Tanil *et al.*, 2005; Ellingsen *et al.*, 2008).

En el estudio que se llevo a cabo en la presente Tesis Doctoral (Suffredini *et al.*, 2011) se observó una alta heterogeneidad genética, ya que las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas en el delta del Ebro se ubicaron en diez de los once *clusters* o agrupaciones identificados, así como la persistencia de estas cepas a lo largo del tiempo (ya que se aislaron en distintas campañas estivales). Este hecho podría explicarse por la transferencia horizontal de material genético, como apuntan otros autores (Dryselius *et al.*, 2007).

En concordancia con otros estudios se observó que *V. parahaemolyticus* no se encontraba uniformemente distribuido a lo largo de las dos bahías del delta del Ebro, lo que podría estar condicionado por diversos factores (Hsieh *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2010; Julie *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2010). Existe un acuerdo generalizado en que la temperatura es el factor que más influye tanto en la prevalencia como en los niveles de vibrios encontrados (DePaola *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2002). Sin embargo, hay que tener en cuenta que a temperaturas elevadas, y basándonos en los datos obtenidos de las cuatro campañas llevadas a cabo para el estudio de la distribución espacial de *V. parahaemolyticus* en el delta del Ebro (Lopez-Joven *et al.*, enviado a ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology), la salinidad también puede desempeñar un papel primordial en la probabilidad de detectar tanto las cepas no patogénicas de *V. parahaemolyticus*, como las patogénicas, y concretamente aquellas que portaban el gen *trh*. Concretamente se observó una asociación positiva de la salinidad con la prevalencia de *V. parahaemolyticus* totales (*tlh*+) (incrementándose el riesgo 1,27 veces por cada unidad de ppt que aumentara la salinidad) y una asociación negativa cuando se consideró las variantes patogénicas para humanos de *V. parahaemolyticus* que contenía el gen *trh*+ (disminuyendo el riesgo 1,64 veces por cada unidad de ppt que

aumentara la salinidad). Estos datos muestran un patrón diferencial de actuación entre las cepas de *V. parahaemolyticus*, implicando a la salinidad como un factor ambiental condicionante que podría influir en la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* (*trh+*), que podría tener una mayor susceptibilidad a valores altos de salinidad. Esta hipótesis ha sido contrastada en otro estudio reciente llevado a cabo en Galicia (Rodríguez-Castro *et al.*, 2010).

Así mismo, las diferencias significativas encontradas en relación a la especie de molusco revelan que las almejas del género *Ruditapes* presentan mayor riesgo de estar contaminadas por *V. parahaemolyticus* que el resto de las especies de bivalvos cultivados en estas bahías. Sin embargo, llegados a este punto no se puede asegurar con certeza si las almejas del género *Ruditapes* presentan mayor riesgo por ser más receptivas y existir por lo tanto un posible efecto hospedador, o por el sistema de cultivo que se lleva a cabo en las bahías del delta del Ebro (enterradas en la arena). Por este motivo, sería conveniente realizar estudios de campo donde todas las especies de moluscos bivalvos fueran cultivadas en las mismas condiciones para descartar el sistema de cultivo como una variable a tener en cuenta. En cualquier caso, si en las condiciones actuales hubiera que llevar a cabo una vigilancia epidemiológica en estas bahías, y teniendo en cuenta el sistema de cultivo: ostión y mejillón (en cuerdas) y almejas (enterradas en la arena), preliminarmente se recomendaría la selección de muestras de almejas del género *Ruditapes*, siempre y cuando los resultados se apliquen a estas bahías o a estas condiciones de cultivo.

Para finalizar, es necesario indicar que la ausencia de un programa de vigilancia activo sobre estos patógenos, y concretamente sobre las variantes patogénicas de *V. parahaemolyticus* debería ser un motivo de preocupación en el ámbito de la Salud Pública. Además, no hay que olvidar que los factores de riesgo asociados a la presencia de *V. parahaemolyticus* y caracterizados en relación a su perfil de resistencia a antibióticos son importantes teniendo en cuenta que el delta de Ebro es un área densamente poblada en verano, época en la cual podría generarse una cantidad importante de residuos de antibióticos desde la zona urbana exponiendo potencialmente a las bacterias de los bivalvos a sus residuos todavía activos, y causando una presión de selección hacia bacterias resistentes (Smith *et al.*, 2000). La descripción del perfil de resistencia a determinados antibióticos (Roque *et al.*, 2009) en el período de muestreo de 2006 al 2008 para esta área, ha abierto una nueva ventana al conocimiento de este campo en particular.

## **8.2. Caracterización experimental de la dinámica de infección de *V. parahaemolyticus* en almejas**

---

Para complementar y cumplimentar la información obtenida en los estudios de campo fue necesario plantear algunos trabajos experimentales bajo condiciones

controladas. Para ello, se diseñó un modelo experimental que permitiera la obtención de información precisa sobre las cinéticas de dos variantes de *V. parahaemolyticus* (una variante patogénica y una variante no patogénica) en *Ruditapes* spp, tanto en el medio acuático por contaminación *in vivo* en *R. decussatus* y *R. philippinarum* por baño, como durante la fase de post-cosecha (previa contaminación por baño) a diferentes temperaturas del aire.

La necesidad de conocer estos datos sobre la cinética de estas bacterias se encontraba entre los puntos que fueron discutidos en la reunión de expertos que convocó el Comité Conjunto de Expertos de FAO/OMS sobre Evaluación de Riesgos Microbiológicos (FAO/WHO Joint Expert Committee on Microbiological Risk Assessment-JEMRA), previa petición del Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos, en septiembre del 2010.

En primer lugar, con el fin de realizar la incorporación bacteriana bajo condiciones ambientales controladas y con dosis inoculadas conocidas, fue necesario disponer de bivalvos libres de vibrios no fermentadores de sacarosa (entre los que se encuentra *V. parahaemolyticus*) para poder asegurar que las cinéticas estudiadas se debían a la variante inoculada en el baño y no a las poblaciones naturales que contenían previamente los bivalvos en estudio.

Para ello, se abordó con éxito la evaluación de la eficacia de un protocolo experimental de depuración para almejas del género *Ruditapes*, ya que *a priori* eran las especies que habían presentado de forma general una mayor prevalencia y concentración de *V. parahaemolyticus* en los estudios observacionales previos. Sin embargo, el hecho de eliminar las poblaciones tanto de vibrios no fermentadores de sacarosa (SNFV) (entre los que se incluye *V. parahaemolyticus*), como de vibrios fermentadores de sacarosa (SFV) de manera diferente plantea diversos interrogantes que afectan al comportamiento de estas especies de vibrios agrupadas por su capacidad de fermentar o no la sacarosa. En cualquier caso, la mayor tasa de eliminación de la carga natural de SNFV con respecto a SFV de los tejidos de *R. philippinarum*, e independientemente de la temperatura del agua, podría ser debida a una menor capacidad de colonización de estas especies de vibrios (Colwell y Liston, 1960; Vasconcelos y Lee, 1972; Baffone *et al.*, 2001; Akeda *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005) lo que a nivel de Salud Pública favorece la disminución del riesgo de enfermedades gastrointestinales por parte de SNFV involucrados en enfermedades gastrointestinales como son *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae*, *V. mimicus* y *V. vulnificus*, siempre y cuando las especies hospedadoras, en este caso moluscos bivalvos, estén convenientemente depuradas.

Además este estudio puso de manifiesto que a medida que aumentaba la temperatura del medio, las almejas tardaban más tiempo en depurarse (tanto de SNFV, como de SFV) (Lopez-Joven *et al.*, 2011a). Esto podría deberse a que la



temperatura del agua afecta a la tasa de filtración de las almejas en estudio y/o que la multiplicación de estos vibrios en los tejidos es mayor, y por lo tanto se necesitará más tiempo de depuración para eliminarlos.

También es importante destacar que nuestros resultados mostraron que el tiempo de depuración requerido para eliminar ambos grupos de vibrios era muy superior al necesario para eliminar las bacterias atribuibles a la contaminación de origen fecal, como *E. coli* y patógenos como *Salmonella* spp. Y como se viene observando desde hace unos años, el proceso de depuración es efectivo para la eliminación de las bacterias fecales como *E. coli* (Ekanem y Adegoke, 1995), y *Salmonella* spp. (de Abreu Corrêa et al., 2007), que están incluidos como indicadores de la contaminación fecal en el reglamento Europeo (Comisión Europea, 2004a, 2004b, 2006), sin embargo es menos efectiva para los virus entéricos y las poblaciones naturales de *Vibrio* spp (Martínez et al., 2009) y prácticamente ineficaz para algunas toxinas, metales pesados o sustancias químicas orgánicas (FAO, 2010b), que precisarían periodos de depuración más amplios. Estos resultados (Lopez-Joven et al., 2011a) están en concordancia con otros estudios realizados hasta el momento (Eyles y Davey, 1984; Richards, 1988; Franco et al., 1990; Croci et al., 2002; Cozzi et al., 2009) y se vuelve a poner en evidencia que la legislación actual en materia de seguridad alimentaria y en relación al consumo de moluscos podría resultar insuficiente, ya que tan sólo considera las bacterias de origen fecal como indicadores microbiológicos. Debemos tener en cuenta el hecho de que los vibrios patógenos pueden estar en aguas clasificadas como no contaminadas, y que no hay indicadores específicos que determinen su presencia y/o concentración (aunque existen factores asociados como la temperatura y salinidad). Además, los límites que tiene el proceso de depuración podrían deberse a que originalmente se diseñó para eliminar *Salmonella typhi* en los moluscos, lo que implica que los indicadores bacterianos de origen fecal (como *E. coli*) y patógenos (como *Salmonella* spp.) se eliminen con bastante facilidad en sistemas de depuración con el funcionamiento y diseño apropiados (Rippey, 1994).

Una vez evaluada la eficacia de un sistema de depuración que permitía disponer de almejas libres de *V. parahaemolyticus*, se planteó el estudio de la incorporación y la evolución de las concentraciones de esta bacteria en moluscos bivalvos vivos.

La incorporación de *V. parahaemolyticus* no patógeno fue más precoz, alcanzando concentraciones más altas y con una eliminación más reducida, que la variante patogénica. Ésta ha sido la primera vez que se ha observado este resultado, y determinó que se pudiera utilizar la variante no patogénica en los estudios posteriores de modelización en condiciones de cultivo debido a su mayor persistencia en ambas especies de almejas, y a las ventajas que presentaba su utilización en el ámbito de la bioseguridad, evitando los riesgos para los investigadores y el medio ambiente.

Sin embargo, la temperatura del agua, como se ha citado anteriormente, en este caso vuelve a ser un factor fundamental teniendo en cuenta que las diferencias entre los niveles de *V. parahaemolyticus* en bivalvos podrían ser debidas a que cada especie de molusco tiene una temperatura óptima de filtración determinada. Por tanto, se pone de manifiesto que la temperatura del agua juega un papel decisivo en el caso de la exposición de las almejas a un determinado inóculo bacteriano en el agua y, no tanto, la susceptibilidad que pueda llegar a tener una especie de bivalvo con respecto a otra.

A falta de estudios adicionales se recomendaría que cuando en el medio natural se lleven a cabo campañas de vigilancia se debería poner especial atención en los bivalvos que tengan una temperatura óptima de filtración más próxima a la temperatura del agua en el momento del muestreo, ya que filtrarían un mayor volumen de agua por unidad de tiempo y, por lo tanto, podrían incorporar y mantener una mayor concentración bacteriana (Lopez-Joven *et al.*, enviado a Aquaculture Research).

Es importante destacar que los resultados obtenidos con estos estudios han permitido estandarizar un modelo *in vivo* para futuros experimentos, con la utilización de la variante no patogénica de *V. parahaemolyticus*.

Una aplicación de este modelo consistió en el estudio de la cinética bacteriana en almejas cosechadas en diferentes condiciones de almacenamiento para su comercialización y consumo. Se plantearon tres posibles escenarios: la refrigeración a 4°C inmediatamente después de la cosecha y a temperatura ambiente en dos estaciones diferentes del año (invierno: 15°C y verano: 28°C). El periodo estudiado fue de 96 h que es el que correspondería a los primeros días de comercialización en fresco de moluscos bivalvos. Además de la temperatura se incluyó como variable de estudio la variante de *V. parahaemolyticus*.

Se encontraron resultados dispares durante el periodo post-cosecha de almejas (*R. philippinarum*) inoculadas experimentalmente con una u otra variante de *V. parahaemolyticus* (Lopez-Joven *et al.*, enviado a Journal of Food Protection), que estuvieron fundamentalmente determinados por la temperatura de almacenamiento. A 28°C las concentraciones de ambas variantes bacterianas se incrementaron de forma paulatina lo que coincide con lo descrito por diversos autores (Johnson *et al.*, 1973; Cook and Ruple, 1989; Gooch *et al.*, 2002).

Sin embargo, a temperaturas inferiores (4 y 15°C) las concentraciones de *V. parahaemolyticus* patógeno se mantuvieron estables durante los 4 días de almacenamiento, mientras que disminuyeron en el caso de *V. parahaemolyticus* no patógeno. Estos resultados podrían sugerir que la variante patogénica de *V. parahaemolyticus* podría ser más tolerante al frío, ayudando a explicar los resultados obtenidos en otros estudios, que indican una mayor prevalencia de cepas

patogénicas de *V. parahaemolyticus* en invierno (DePaola *et al.*, 2003). A su vez, estos resultados indicarían que, a pesar de que a estas temperaturas no se produjese un incremento de la concentración bacteriana, las densidades pueden mantenerse estables y suficientemente elevadas, lo que podría suponer un serio problema de Salud Pública si los tratamientos previos dirigidos a la eliminación de *V. parahaemolyticus* no han sido suficientes (Cook y Ruple, 1989; Gooch *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2009; DePaola *et al.*, 2010).

En conclusión, estos resultados obtenidos en *Ruditapes* spp., tanto en condiciones de cultivo (ambiente acuático), como en la fase de post-cosecha, permiten ampliar los conocimientos que se tenían hasta la fecha sobre la incorporación y la supervivencia de *V. parahaemolyticus* y proporcionan datos que podrían ayudar a la elaboración de un nuevo marco normativo que regule las amenazas emergentes contra la seguridad alimentaria.

### **8.1. Detection and identification of *V. parahaemolyticus* in the Ebro delta and its intraspecific relationship with other European isolates**

---

The contribution with new data on *V. parahaemolyticus* in the Ebro delta offers current and important European information specifically in relation to the Mediterranean coast. The detection and identification of *V. parahaemolyticus*, and the study of its prevalence and its spatial and temporal distribution in bivalve molluscs grown in each bay, and the association with two parameters (temperature and salinity), provide new knowledge for future risk analysis to be carried out in Europe. This information may be used if it is necessary to amend existing legislation on food safety, and more, considering that so far due to its low impact on Europe it has not been included in European epidemiological surveillance (European Network for Epidemiological Surveillance and Control of Communicable Diseases) (SANCO/4198/2001, revision 21, Draft of Commission Regulation on Microbial Criteria for Foodstuffs, European Community), and it is not incorporated in the European Directive 91/492/EEC applicable to the conditions of production and trade of bivalve molluscs alive.

In the past 60 years there have been numerous studies on pathogenic *V. parahaemolyticus* and its wide geographic distribution (Amirmozafari *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 2010, Julie *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2010), with variable impact, with the U.S., Chile and Japan among the countries hit the hardest. However more research is needed on the European continent to assess the risk of this pathogen which is becoming an emerging health issue (Hervio-Heath *et al.*, 2002, Bauer *et al.*, 2006). Therefore, the information presented in this thesis, together with the data published in recent years and related to both the detection and the prevalence and distribution of *V. parahaemolyticus* in various environmental and/or clinical samples in Europe (Macián *et al.*, 2000; Croci *et al.*, 2001, Lozano-Leon *et al.*, 2003, Robert-Pillot *et al.*, 2004, Martinez-Urtaza *et al.*, 2008, Julie *et al.*, 2010, Baker-Austin *et al.*, 2010), will assist in the event it becomes necessary establish appropriate regulations for aquaculture products to be properly inspected and avoid triggering a public health problem by underestimating the risk of this disease.

In this context, and given the information which was available about the presence of vibrios, specifically *V. parahaemolyticus* potentially pathogenic for humans associated with bivalves in the Ebro delta was virtually nil (Montilla *et al.*, 1994), the discovery of potentially pathogenic variants of *V. parahaemolyticus* (variants *tdh+* and/or *trh+*) in shellfish cultivated in the bays of the Ebro delta, in the studies that

are part of this thesis, it is extremely important, as they confirm the presence of bacterial strains located in the environment and the seafood, and therefore represent a risk to human health. Therefore, these data provide more information to perform a risk analysis in terms of public health, given that these bays are covered by a region with significant aquaculture activity, considered the second most important producing area nationwide after Galicia, and also considering that Spain is not only a leading producer of bivalve molluscs worldwide, but is also a major consumer. The spread of the new strain of serotype O3:K6 (Arakawa *et al.*, 1999) and other ribogroups associated with the pandemic clone in four continents: Asia (Okuda *et al.*, 1997b, Matsumoto *et al.*, 2000; Vuddhakul *et al.*, 2000), America (Cordova *et al.*, 2002, Gonzalez-Escalona *et al.*, 2005, McLaughlin *et al.*, 2005), Africa (Ansaruzzaman *et al.*, 2005) and Europe (Martinez-Urtaza *et al.*, 2005; Quilici *et al.*, 2005; Caburlotto *et al.*, 2008, Ottaviani *et al.*, 2008), has been studied and shown that we are facing a pandemic caused by *V. parahaemolyticus*, which may have been spread by ballast water of ships. It should be noted that in the bay of Ebro delta so far the pandemic serotype O3:K6 has not been detected, but as in other studies, strains of *V. parahaemolyticus* had high serological variability and some of them could not be typed in whole or in part (Lleo *et al.*, 2010). However, it was detected the presence of a serovar related with the pandemic strain serotype (O3:K6) (O1:KUT), included in the pandemic group, expands the existing information at European level, and offers new arguments for changing the current European legislation and to include the species of the genus *Vibrio* which are pathogenic to humans, such as *V. parahaemolyticus*, within surveillance programs, considering they are potential carriers of virulence genes, and could become an emerging problem of Public Health (Chowdhury *et al.*, 2000, Nair *et al.*, 2007, Ottaviani *et al.*, 2010). In addition, the serovars, O4:KUT, and O5:KUT were found, which according to a recent study by Meador *et al.* (2007) could expand the pandemic group.

Another aspect that in recent years has become extremely important from the epidemiological point of view are the taxonomic relationships by studying markers of pathogenicity of *V. parahaemolyticus* (*tdh* genes and/or *trh*) and genetic profiles in strains isolated from different origins, as they can provide key data for understanding the origin, spread and evolution of this pathogen in different territories and/or species (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004). Comparison of strains isolated in the bays of the Ebro delta, with others from various European countries and with different backgrounds (water, fish, shellfish, sick people) by characterizing the PFGE profiles revealed the great genetic diversity and the wide geographical distribution, with strains from different geographical origins, of various sources and with different genotypes falling within the same cluster (Tanil *et al.*, 2005, Ellingsen *et al.*, 2008).

In the study carried out within this PhD thesis (Suffredini *et al.*, 2011) a high genetic heterogeneity was shown, since strains of *V. parahaemolyticus* isolated in the Ebro

delta were located in ten of the eleven clusters or groups identified, and also the persistence of these strains over time (as they were isolated at various summer campaigns). This could be explained by horizontal transfer of genetic material, as noted by other authors (Dryselius *et al.*, 2007).

Consistent with other studies, it was found that *V. parahaemolyticus* was not evenly distributed within the two bays of the Ebro delta, which could be conditioned by various factors (Hsieh *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2010, Julie *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2010). There is widespread agreement that the temperature is the factor that most influences the prevalence and levels of vibrios in the environment (DePaola *et al.*, 2000, Cook *et al.*, 2002). However, it should be noted that at high temperatures, and based on data obtained from the four campaigns undertaken to study the spatial distribution of *V. parahaemolyticus* in the Ebro delta (Lopez-Joven *et al.*, sent to ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology), salinity may also play a role in the probability of detecting both non-pathogenic strains of *V. parahaemolyticus*, as well as the pathogenic strains, and specifically those which carry the *trh* gene. Specifically, a positive association of salinity with the prevalence of total *V. parahaemolyticus* (*tlh*+) (1.27 times increase the risk for each unit to increase ppt salinity) and a negative association when considering human-pathogenic variants of *V. parahaemolyticus* containing the gene *trh*+ (decreasing the risk 1.64 times for each unit to increase the ppt salinity) was observed. These data show a differential pattern of activity among strains of *V. parahaemolyticus*, involving salinity as an environmental condition that could influence the pathogenic variant *V. parahaemolyticus* (*trh* +), which may have increased susceptibility to high levels of salinity. This hypothesis has been proven in another recent study conducted in Galicia (Rodriguez-Castro *et al.*, 2010).

Also, the significant differences found in relation to the species of molluscs reveal that the *Ruditapes* clams genus at greater risk of being contaminated with *V. parahaemolyticus* than other bivalve species grown in these bays. However, at this point it is not whether the *Ruditapes* clams are at greater risk for being more responsive and thus a possible host effect, or whether the farming system that takes place in the bays Ebro delta (buried in the sand) explains this fact. For this reason, it is desirable to conduct studies on all species of bivalve molluscs grown under the same conditions to exclude the culture system as a variable to consider. In any case, surveillance was to be carried out in these bays, and taking into account the culture system: oysters and mussels (on suspended ropes) and clams (buried in the sand), preliminarily the selection of samples of clams *Ruditapes* would be recommended, provided that the results apply to these bays or these culture conditions.

Finally, the fact remains that the absence of an active surveillance program on these pathogens, and specifically on the pathogenic variants of *V. parahaemolyticus* should be a cause for concern in the field of Public Health. Also, the risk factors

associated with the presence of *V. parahaemolyticus* which were characterized in relation to their antibiotic resistance profile are important given that the Ebro delta is a densely populated area in the summer time which could generate a significant amount of antibiotic residues from the urban area potentially exposing bacteria of bivalves to their waste still active and causing selection pressure toward resistant bacteria (Smith *et al.*, 2000). The description of the profile of resistance to certain antibiotic (Roque *et al.*, 2009) in the sampling period 2006 to 2008 for this area has opened a new window to the knowledge of this particular field.

## **8.2. Experimental characterization of the dynamics of infection of *V. parahaemolyticus* in clams**

---

To complement and complete the information obtained in field studies it was necessary to design some experimental work under controlled conditions. To do this, we designed an experimental model that allows to obtain accurate information on the kinetics of two variants of *V. parahaemolyticus* (a pathogenic variant and nonpathogenic variant) in *Ruditapes* spp., both in a bath challenge in *R. decussatus* and *R. philippinarum* and during the post-harvest (after a bath challenge) at different air temperatures. The need to know this information on the kinetics of these bacteria was among the points that were discussed at the meeting of experts convened by the Joint Expert Committee of FAO/WHO Microbiological Risk Assessment (FAO/WHO Joint Expert Committee on Microbiological Risk Assessment-JEMRA) upon request of the Codex Committee on Food Hygiene in September 2010.

First, in order to perform the bacterial incorporation under controlled environmental conditions and with a known inoculum it was necessary to have bivalves free of sucrose nonfermenting vibrios (such as *V. parahaemolyticus*) to ensure that the kinetics studied were due to the variant inoculated into the bath and not to the natural populations already in the studied bivalves.

For that, the evaluation of the efficacy of an experimental protocol for purification *Ruditapes* clams was successfully addressed since clams generally had a higher prevalence and concentration of *V. parahaemolyticus* in previous observational studies. However, the fact that the system eliminated at different rates fermenting vibrios (SNFV) (as *V. parahaemolyticus*) and sucrose fermenting vibrios (SFV) raises several questions that affect the behaviour of these species of vibrio when grouped by their ability to ferment or not sucrose. In any case, the increased rate of removal of the natural load SNFV regarding SFV from the tissues of *R. philippinarum*, regardless of water temperature could be due to reduced capacity for colonization of these species of vibrios (Colwell and Liston, 1960, Vasconcelos and Lee, 1972; Baffone *et al.*, 2001; Akeda *et al.*, 2002 ; Pruzzo *et al.*, 2005) which at Public Health

level favours the decreased risk of gastrointestinal diseases by SNFV involved in gastrointestinal diseases such as *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae*, *V. mimicus* and *V. vulnificus*, provided that the host species, in this case bivalve molluscs are adequately purified.

Also, this study showed that with increasing temperature the clams took longer to depurate (both SNFV and SFV) (Lopez-Joven *et al.*, 2011a). This could be because water temperature affects the filtration rate of the clams and/or multiplication of vibrios in the tissues is greater, and therefore will take longer to depurate.

It is also important to note that present results showed that depuration time required to remove both groups of vibrios was higher than necessary to kill bacteria attributable to faecal contamination, as *E. coli* and pathogens like *Salmonella* spp. And as it has been observed in recent years, the depuration process is effective in removing faecal bacteria such as *E. coli* (Ekanem and Adegoke, 1995), and *Salmonella* spp. (De Abreu Correa *et al.*, 2007), which are included as indicators of fecal contamination in the European regulations (European Commission, 2004a, 2004b, 2006), but it is less effective for enteric viruses and natural populations of *Vibrio* spp. (Martinez *et al.*, 2009) and practically ineffective for some toxins, heavy metals or organic chemicals (FAO, 2010b), which would require more extensive purification periods. These results (Lopez-Joven *et al.*, 2011a) are in agreement with other studies conducted so far (Eyles and Davey, 1984; Richards, 1988, Franco *et al.*, 1990; Croci *et al.*, 2002, Cozzi *et al.*, 2009) and re-highlight that the current legislation on food safety in relation to consumption of shellfish could be insufficient, as it only considers faecal bacteria as microbiological indicators. It must be taken into account that pathogenic vibrios can be present in waters classified as unpolluted waters, and there are no specific indicators to determine its presence and/or concentration (although there are associated factors such as temperature and salinity). In addition, the limitations on the treatment process could be due to that originally it was designed to eliminate *Salmonella typhi* from molluscs, which means that the indicator bacteria of faecal origin (e.g. *E. coli*) and pathogens (e.g. *Salmonella* spp.) are easily removed in the purification systems which have and appropriate design and operation (Rippey, 1994).

Having assessed the efficacy of a treatment system that allowed clams to be free of *V. parahaemolyticus*, the study of incorporation and evolution of the concentrations of these bacteria in bivalve molluscs was designed.

The incorporation of nonpathogenic *V. parahaemolyticus* was more precocious, reaching highest concentrations and slower disappearance than the pathogenic variant. This was the first time this result was observed, and this determined that the non-pathogenic variant could be used in subsequent modeling studies in culture conditions because of its greater persistence in both species of clams, and the



advantages its use presents in the field of biosecurity, avoiding risks to the researchers and the environment.

However, the water temperature, as mentioned above, in this case is again a critical factor considering that the differences between the levels of *V. parahaemolyticus* in shellfish could be due to each species of mollusc has an optimum filtering temperature. Therefore, it becomes clear that the water temperature plays a decisive role in the case of exposure of clams to a particular bacterial inoculum into the water and not so much, susceptibility a species of bivalve can have over another.

In the absence of additional studies it is recommend that when monitoring campaigns are carried out in the natural environment should pay special attention to bivalves with an optimum filtering temperature closest to the water temperature at the time of sampling, as these would filter a larger volume of water per unit time and, therefore, may incorporate and keep a higher bacterial concentration (Lopez-Joven *et al.*, sent to Aquaculture Research).

Importantly, the results obtained from these studies have lead to the standarisation of an *in vivo* model for future experiments, using non-pathogenic *V. parahaemolyticus* variant.

An application of this model was to study the bacterial kinetics in clams harvested nad kept at different storage conditions for the sale and consumption. For this three possible scenarios were investigated: cooling at 4°C immediately after harvest and at room temperature in two different seasons (winter: 15°C and summer: 28°C). The study period was 96 h which is corresponding to the initial days of marketing fresh bivalve molluscs. In addition to temperature, variant of *V. parahaemolyticus* was included as a variable in this study.

Different results were found during post-harvest of clams (*R. philippinarum*) experimentally inoculated with one or the other variant of *V. parahaemolyticus* (Lopez-Joven *et al.*, submitted to Journal of Food Protection), which were mainly determined by the storage temperature. At 28°C the concentrations of both variants increased gradually which coincides with results described by several authors (Johnson *et al.*, 1973, Cook and Ruple, 1989, Gooch *et al.*, 2002).

However, at lower temperatures (4 and 15°C) concentrations of pathogenic *V. parahaemolyticus* remained stable during the 4 days storage, but decreased in the case of nonpathogenic *V. parahaemolyticus*. These results might suggest that the pathogenic variant of *V. parahaemolyticus* could be more tolerant to cold, contributing to explain the results obtained in other studies, which show a higher prevalence of pathogenic *V. parahaemolyticus* strains in winter (DePaola *et al.*, 2003). In turn, these results indicate that, despite the fact that at these temperatures there was no increase in bacterial concentration, the densities can be maintained stable and sufficiently high, which could pose a serious public health

problem if the previous treatments directed at the elimination of *V. parahaemolyticus* have not been sufficient (Cook and Ruple, 1989, Gooch *et al.*, 2002, Shen *et al.*, 2009, DePaola *et al.*, 2010).

In conclusion, these results obtained in *Ruditapes* spp., both in culture conditions (ambient water) and in the post-harvest phase, broaden the existing knowledge on the incorporation and survival of *V. parahaemolyticus* and provide information that could help developing a new regulatory framework regulating emerging threats to food safety.



# 9

## Conclusiones / Conclusions

### Conclusiones

En base a las condiciones del presente estudio y a los resultados obtenidos, se han obtenido las siguientes conclusiones:

PRIMERA: Existe un riesgo potencial de intoxicación alimentaria por una gran variedad de serotipos de *Vibrio parahaemolyticus* patógenos asociada al consumo de moluscos bivalvos, procedentes de las bahías del delta del Ebro, que debería ser evaluado por las autoridades sanitarias.

SEGUNDA: Es posible lograr la depuración de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos, pero el tiempo de depuración necesario es muy superior al establecido por la legislación para el caso de *Salmonella* spp. y/o coliformes fecales.

TERCERA: Se puede emplear la variante no patogénica de *Vibrio parahaemolyticus* para estudios de modelización ya que evitaría los riesgos para los investigadores y el medio ambiente.

CUARTA: La acumulación de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos depende del rango óptimo de temperatura de filtración de cada especie, y debería ser tomada en cuenta como criterio objetivo en el esquema de selección de muestras en un programa de vigilancia epidemiológica.

QUINTA: El control de la carga inicial de *Vibrio parahaemolyticus* patógeno, y el tiempo y la temperatura de almacenamiento son factores clave para minimizar los riesgos de Salud Pública asociados al consumo de moluscos bivalvos.

## Conclusions

Based on the results and the conditions of the present study the following conclusions are drawn:

FIRST: There is a potential risk of food poisoning from a variety of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* serotypes associated with consumption of bivalve molluscs from the Ebro Delta bays, which should be evaluated by the Public Health authorities.

SECOND: It is possible to achieve the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscs, but length of time needed is much longer than that provided by law for the case of *Salmonella* spp. and/or faecal coliforms.

THIRD: The non-pathogenic variant of *Vibrio parahaemolyticus* can be used in modeling studies which would avoid risks to researchers and the environment.

FOURTH: The accumulation of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalve molluscs depends on the optimum temperature range of filtration for each species, and should be considered as an objective criterion in the selection of samples in a surveillance program.

FIFTH: The control of the initial load of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and the time and temperature of storage are key factors to minimise the risks of Public Health associated with consumption of bivalve molluscs.

## 10 Bibliografía

Cada artículo de la tesis incluye sus propias referencias. Esta bibliografía proporciona la información citada en los otros apartados/secciones que componen esta Tesis Doctoral.

- Abbott SL, Powers C, Kaysner CA, Takeda Y, Ishibashi M, Joseph SW, Janda JM. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of Vibrio-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989;27(12):2891-2893.
- Aiso K, Fujiwara K. Feeding tests of the pathogenic halophilic bacteria. *Annals of the Research Institute for Food Microbiology of Chiba University*. 1963;15:34-38.
- Akeda Y, Kodama T, Kashimoto T, Cantarelli V, Horiguchi Y, Nagayama K, Iida T, Honda T. Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of *Vibrio parahaemolyticus* into Caco-2 cells. *Infection and Immunity*. 2002;70(2):970-973.
- Akeda Y, Kodama T, Saito K, Iida T, Oishi K, Honda T. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2-associated chaperone VocC for the T3SS2-specific effector VopC. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;324(2):156-164.
- Alam M, Chowdhury WB, Bhuiyan NA, Islam A, Hasan NA, Nair GB, Watanabe H, Siddique AK, Huq A, Sack RB, Akhter MZ, Grim CJ, Kam KM, Luey CK, Endtz HP, Cravioto A, Colwell RR. Serogroup, virulence, and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75:6268-6274.
- Alday-Sanz V, Roque A, Turnbull JF. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms*. 2002;48(2):91-99.
- Alsina M, Blanch AR. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 1994;76:79-85.
- Amaro C, Esteve C, Biosca EG, Fouz B, Toranzo AE. Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1992;13:29-35.
- Amaro C, Biosca EG. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:1454-1457.
- Amirmozafari N, Forohesh H, Halakoo A. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of Golestan province in Iran. *Archives of Razi Institute*. 2005;60:33-44.
- Andersen PH. Infections with seawater bacteria. *Epidemiology in the News*. 2006;1:26-32.

- Andrews LS, Park DL, Chen YP. Low-temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters. *Food Additives & Contaminants*. 2000;17(9):787-791.
- Andrews L, Jahncke M, Mallikarjunan K. Low-dose gamma irradiation to reduce pathogenic *Vibrios* in live oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2003a;12:71-82.
- Andrews LS, DeBlanc S, Veal CC, Park DL. Response of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to a hot water/cold shock pasteurization process. *Food Additives & Contaminants*. 2003b;20:331-334.
- Andrews LS. Strategies to control *Vibrios* in molluscan shellfish. *Food Protection Trends*. 2004;24:70-76.
- Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen JL, Bhuiyan NA, Wang XY, Safa A, Sultana M, Chowdhury A, Nair GB, Sack DA, von Seidlein L, Puri MK, Ali M, Chaignat CL, Clemens JD, Barreto A. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhoea in Mozambique: Spread of the pandemic into the African continent. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(6):2559-2562.
- Ansaruzzaman M, Chowdhury A, Bhuiyan NA, Sultana M, Safa A, Lucas M, von Seidlein L, Barreto A, Chaignat CL, Sack DA, Clemens JD, Nair GB, Choi SY, Jeon YS, Lee JH, Lee HR, Chun J, Kim DW. Characteristics of a pandemic clone of O3:K6 and O4:K68 *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Beira, Mozambique. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57:1502-1507.
- APROMAR. *La acuicultura marina de peces en España*. Edición especial 25 aniversario. Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. Cádiz, España. 2011;77 pp.
- Arakawa E, Murase T, Shimada T, Okitsu T, Yamai S, Watanabe H. Emergence and prevalence of a novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 1999;52(6):246-247.
- Atlas RM. Chapter 17. *Bacterial diversity*. En: Fishback JE (ed). *Principles of microbiology* (2nd ed). Wm. C. Brown Publishers, Boston, MA. 1997;980 pp.
- Austin B, Austin DA. *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish* (4th ed). Springer. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. 2007;552 pp.
- Austin B. *Vibrios as causal agents of zoonoses*. *Veterinary Microbiology*. 2010;140(3-4):310-317.
- Ayres PA, Barrow GI. The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in British coastal waters: report of a collaborative study 1975-6. *The Journal of Hygiene*. 1978;80(2):281-294.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Pianetti A, Campana R, Bruscolini F. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*. 2001;18:479-488.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L, Donelli G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;89(1):31-39.
- Baker-Austin C, Stockey L, Rangdale R, Martinez-Urtaza, J. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports*. 2010;2:7-18.

- Baker-Austin C, Stockley L, Rangdale R, Martinez-Urtaza J. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports*. 2010;2(1):7-18.
- Barer MR, Harwood CR. Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology*. 1999;41:93-137.
- Barker WH. *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *Lancet*. 1974;1:551-554.
- Baross J, Liston J. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature* 1968;217:1263-1264.
- Barrow GI. Microbiological and other hazards from seafoods with special reference to *Vibrio parahaemolyticus*. *Postgraduate Medical Journal*. 1974;50(588):612-619.
- Bauer A, Ostensvik O, Florvag M, Ormen O, Rorvik LM. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(4):3058-3061.
- Baumann P, Baumann L. Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401<sup>AL</sup>. En: Krieg NR, Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co, Baltimore. 1984;539-545.
- Baumann P, Schubert RHW. Family II. *Vibrionaceae* Vernon 1965, 5245<sup>AL</sup>. En: Krieg NR, Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co, Baltimore. 1984;516-550.
- Baumann P, Furniss AL, Lee JV. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411<sup>AL</sup>. En: Krieg NR, Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co, Baltimore. 1984;518-538.
- Beaz Hidalgo R, Cleenwerck I, Balboa S, Prado S, De Vos P, Romalde JL. *Vibrio breoganii* sp. nov., a non-motile, alginate-producing, marine bacterium within the *Vibrio halioticoli* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(7):1589-1594.
- Beaz-Hidalgo R, Dieguez AL, Cleenwerck I, Balboa S, Doce A, de Vos P, Romalde JL. *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams. *Systematic and Applied Microbiology*. 2010;33(6):311-315.
- Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*. 1999;36(3):215-225.
- Belas R, Colwell RR. Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 1982;150:956-959.
- Belas R, Simon M, Silverman M. Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 1986;167:210-218.
- Beuchat LR. Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*. 1973;25(5):844-846.
- Biosca EG, Amaro C, Esteve C, Alcaide E, Garay E. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eels (*Anguilla anguilla*). *Journal of Fish Disease*. 1991;14:103-109.
- Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MC, Bowen MD, Meyer RF, DePaola A. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;53(2):149-155.



- Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein PC. Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *The New England Journal of Medicine*. 1979; 300(1):1-5.
- Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annual Review of Microbiology*. 1980;34:341-367.
- Blanco-Abad V, Ansedo-Bermejo J, Rodriguez-Castro A, Martinez-Urtaza J. Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129(3):229-236.
- Bogosian G, Morris PJ, O'Neil JP. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(5):1736-1742.
- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 1999;37(1):77-86.
- Bryan FL. Seafood-transmitted infections and intoxications in recent years. En: Kramer DE, Liston J (eds). *Seafood Quality Determinations*. Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska November 10-14. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, The Netherlands. 1986; 319-337.
- Buchanan RE, Gibbons NE (eds). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (8th ed). The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1974; 340-345.
- Cabanillas-Beltran H, Llausás-Magaña E, Romero R, Espinoza A, Garcia-Gasca A, Nishibuchi M, Ishibashi M, Gomez-Gil B. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;265(1):76-80.
- Caburlotto G, Ghidini V, Gennari M, Tafi MC, Lleo MM. Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. *Eurosurveillance* 2008;13(11):pii=8068.
- Cai J, Li J, Thompson KD, Li C, Han H. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology*. 2007;47(1):84-86.
- Calik H, Morrissey MT, Reno P, An H. Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters. *Journal of Food Science*. 2002;67:1506-1510.
- Camp J. *Aproximaciones a la dinámica ecológica de una bahía estuárica mediterránea*. PhD thesis, Univ. Barcelona. 1994.
- Camp J, Delgado M. Hidrografía de las bahías del delta del Ebro. *Investigación Pesquera*. 1987;51:351-369.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters--Pacific Northwest, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 1998;47(22):457-462.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound--Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 1999;48(3):48-51.

- Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration (CFSAN-FDA). *Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in raw oysters*. 2005. Disponible en URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vpra-toc.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Estimates of foodborne illness in the United States*. 2011. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/foodborneburden>.
- Cervino JM, Thompson FL, Gomez-Gil B, Lorence EA, Goreau TJ, Hayes RL, Winiarski-Cervino KB, Smith GW, Hughen K, Bartels E. The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;105(5):1658-1671.
- Chen FR, Liu PC, Lee KK. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C*. 2000;55(1-2):94-99.
- Chen CY, Wu KM, Chang YC, Chang CH, Tsai HC, Liao TL, Liu YM, Chen HJ, Shen AB, Li JC, Su TL, Shao CP, Lee CT, Hor LI, Tsai SF. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Research*. 2003;13:2577-2587.
- Chen HQ, Guan DS, Hoover DG. Sensitivities of foodborne pathogens to pressure changes. *Journal of Food Protection*. 2006;69:130-136.
- Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI, Wang TK., Chao CS. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(12):4621-4625.
- Chowdhury NR, Chakraborty S, Rammamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerging Infectious Diseases*. 2000;6(6):631-636.
- Claver A, Ormad P, Rodriguez L, Ovelleiro JL. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 2006;64:1437-1443.
- Code of Federal Regulations, 21 CFR 113. U.S. Food and Drug Administration. *Thermally Processed Low-Acid Foods Packaged in Hermetically Sealed Containers*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Code of Federal Regulations, 21 CFR 114. U.S. Food and Drug Administration. *Acidified Foods*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC
- Code of Federal Regulations, 21 CFR 179.26. U.S. Food and Drug Administration. *Ionizing radiation for the treatment of food*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Colwell RR, Liston J. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology*. 1960;8:104-109.
- Colwell RR, Huq A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;740:44-54.
- Colwell RR, Huq A, Islam MS, Aziz KM, Yunus M, Khan NH, Mahmud A, Sack RB, Nair GB, Chakraborty J, Sack DA, Russek-Cohen E. Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:1051-1055.
- Comisión Europea. Directiva 79/409/CEE del Consejo, de 2 de abril de 1979, relativa a la conservación de las aves silvestres. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 1979;L 103:1-18.

- Comisión Europea. Directiva 91/492/EEC de 15 de julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 1991;34:15-34 y L 268:1-14.
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 850/98 del Consejo de 30 de marzo de 1998 para la conservación de los recursos pesqueros a través de medidas técnicas de protección de los juveniles de organismos marinos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 1998;L 125.
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2004a;L 139/55.
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2004b;L 139/206.
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2006;L 364/5.
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2007;L 322/12.
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 40/2008 del Consejo de 16 de enero de 2008, por el que se establecen, para 2008, las posibilidades de pesca y las condiciones correspondientes para determinadas poblaciones y grupos de poblaciones de peces, aplicables en aguas comunitarias y, en el caso de los buques comunitarios, en las demás aguas donde sea necesario establecer limitaciones de capturas. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2008;L 19/1
- Comisión Europea. Reglamento (CE) N° 43/2009 del Consejo de 16 de enero de 2009 por el que se establecen, para 2009, las posibilidades de pesca y las condiciones correspondientes para determinadas poblaciones y grupos de poblaciones de peces, aplicables en aguas comunitarias y, en el caso de los buques comunitarios, en las demás aguas donde sea necesario establecer limitaciones de capturas. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2009;L 22/1.
- Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RD. High-pressure processing-effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;281,1-9.
- Cook D, Ruple A. Indicator bacteria and *Vibrionaceae* multiplication in post-harvest shellstock oysters. *Journal of Food Protection*. 1989;52:343-349.
- Cook DW, Ruple AD. Cold storage and mild heat treatment as processing aids to reduce the numbers of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. *Journal of Food Protection*. 1992;55:985-989.
- Cook DW, Bowers JC, DePaola A. Density of total and pathogenic (*tdh+*) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. *Journal of Food Protection*. 2002;65(12):1873-1880.
- Cook DW. Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate-buffered saline and in oysters to high-pressure processing. *Journal of Food Protection*. 2003;66:2276-2282.

- Corbo MR, Bevilacqua A, Campaniello D, D'Amato D, Speranza B, Sinigaglia M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches-a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009;44:223-241.
- Cordova JL, Astorga J, Silva W, Riquelme C. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biological Research*. 2002;35:433-440.
- Cozzi L, Suffredini E, Gianni C, Croci L. Depuration treatment of mussels experimentally contaminated with *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. ICMSS09. En: *Proceedings of the Seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, Nantes, France. 2009;116-120. Disponible en URL: <http://www.symposcience.org>.
- Croci L, Serratore P, Cozzi L, Stacchini A, Milandri S, Suffredini E, Toti L. Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Letters in Applied Microbiology*. 2001 ;32:57-61.
- Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92:460-465.
- Daniels NA, Shafaie A. A review of pathogenic of *Vibrio* infections for clinicians. *Infections in Medicine*. 2000;17:665-685.
- Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruise S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM, Slutsker L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(5):1661-1666.
- Das B, Manna S, Sarkar P, Batabyal K. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in different finfish and shellfish species. *Journal of Food Safety*. 2009;29(1):118-125.
- Davis BR, Fanning GR, Madden JM, Steigerwalt AG, Bradford HB Jr, Smith HL Jr, Brenner DJ. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1981;14:631-639.
- Day AP, Oliver JD. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *The Journal of Microbiology*. 2004;42(2):69-73.
- de Abreu Correa A, Albarnaz JD, Moresco V, Poli CR, Teixeira AL, Oliveira Simoes CM, Monte Barardi CR. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research*. 2007;63(5):479-489.
- de Castillo MC, de Allori CG, de Gutierrez RC, de Saab OA, de Fernandez NP, de Ruiz CS, Holgado AP, de Nader OM. Bactericidal activity of lemon juice and lemon derivatives against *Vibrio cholerae*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2000;23(10):1235-1238.
- Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(7):3575-3580.
- DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(8):2299-2302.
- DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, Cook DW. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(11):4649-4654.

- DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(3):1521-1526.
- DePaola A, Jones JL, Noe KE, Byars RH, Bowers JC. Survey of postharvest-processed oysters in the United States for levels of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 2009;72:2110-2113.
- DePaola A, Jones JL, Woods J, Burkhardt W 3rd, Calci KR, Krantz JA, Bowers JC, Kasturi K, Byars RH, Jacobs E, Williams-Hill D, Nabe K. Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(9):2754-2768.
- Desenclos JC, Klontz KC, Wolfe LE, Hoecherl S. The risk of *Vibrio* illness in the Florida raw oyster eating population, 1981-1988. *American Journal of Epidemiology*. 1991;134(3):290-297.
- Dryselius R, Kurokawa K, Iida T. *Vibrionaceae*, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Research in Microbiology*. 2007;158(6):479-486.
- Drummond LC, Balboa S, Beaz R, Mulcahy MF, Barja JL, Culloty SC, Romalde JL. The susceptibility of Irish-grown and Galician-grown Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, to *Vibrio tapetis* and Brown Ring Disease. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007;95(1):1-8.
- Dufour P, Colon M. The tetrazolium resuscitation method for assessing the viability of individual bacterial cells in aquatic environments: improvements, performance and applications. *Hydrobiologia*. 1992;232(3):211-218.
- Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, Romestand B, Caro A, Got P, Givaudan A, Mazel D, Bachere E, Destoumieux-Garzon D. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology*. 2010;12(4):951-963.
- Dziejman M, Serruto D, Tam VC, Sturtevant D, Diraphat P, Faruque SM, Rahman MH, Heidelberg JF, Decker J, Li L, Montgomery KT, Grills G, Kucherlapati R, Mekalanos JJ. 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*. 2005;102:3465-3470.
- Egidius E, Wiik R, Andersen K, Hoff A, Hjeltnes B. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986;36(4):518-520.
- Ekanem EO, Adegoke GO. Bacteriological study of West African clam (*Egeria radiata* Lamarch) and their overlying waters. *Food Microbiology*. 1995;12:381-385.
- Ellingsen AB, Jorgensen H, Wagley S, Monshaugen M, Rorvik LM. Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;105:2195-2202.
- Elston RA, Hasegawa H, Humphrey KL, Polyak IK, Hase CC. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2008;82:119-134.
- Eurostat. The Statistical Office of the European Communities. Total production of fish, crustaceans, molluscs and other aquatic organisms from aquaculture ("fish-farming"). Última actualización 21.02.2012. Disponible en URL: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=0&language=en&nocode=tag00075>

- Euzéby, JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1997;47:590-592.
- Eyles MJ, Davey GR. Microbiology of commercial depuration of the Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. *Journal of Food Protection*. 1984;47(9):703-706.
- FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)*. Departamento de pesca, Roma, Italia. 2010a;219 pp.
- FAO. *Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos*. Documento Técnico de Pesca 511. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. 2010b;174 pp.
- FAO. *Risk assessment of Vibrio parahaemolyticus in seafood*. Interpretative Summary and Technical Report. Microbiological Risk Assessment Series. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2011;16:6.
- FAO/OMS. Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp. en mariscos. *FAO Food and Nutrition Papers*. 2003;67 pp.
- Farmer JJ3rd, Janda JM, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM. *Vibrio*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR (eds). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, New York. 2005:494-546.
- Farmer JJ3rd, Hickman-Brenner FW. Chapter 3.3.18. *The genera Vibrio and Photobacterium*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, vol. 6 (3rd ed). Springer, New York. 2006;508–563.
- Farmer JJ3rd. Chapter 3.3.17. *The family Vibrionaceae*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, vol. 6 (3rd ed). Springer, New York. 2006; 495-507
- Farto R, Armada SP, Montes M, Guisande JA, Pérez MJ, Nieto TP. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2003; 83(2):149-156.
- Faury N, Saulnier D, Thompson FL, Gay M, Swings J, Le Roux F. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54:2137-2140.
- FDA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services. Chapter 4. *Pathogens From The Harvest Area (A Biological Hazard)*. Fish and Fishery Product Hazards and Controls Guidance (3rd ed). 2001. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/ucm091606.htm>
- FDA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services. *National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish (NSSP) 2005*. Department of Health and Human Services, Washington, D.C. 2006. Disponible en URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/nss3-toc.html>
- FDA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services. *National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish (NSSP)*. Department of Health and Human Services, Washington, D.C. 2009. Disponible en URL: <http://issc.org/NSSP/Default.aspx>

- FDA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services. Fish and Fishery Product Hazards and Controls Guidance (4th ed). 2011. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/default.htm>
- FishStat. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Departamento de Pesca y Acuicultura. *Base de datos de producciones de acuicultura y pesca*. 2009.
- Fouz B, Llorens A, Valiente E, Amaro C. A comparative epizootiologic study of the two fish-pathogenic serovars of *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Journal of Fish Diseases*. 2010;33:383-390.
- Franco E, Toti L, Gabrieli R, Croci L, De Medici D, Panà A. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* contaminated with hepatitis A virus. *International Journal of Food Microbiology*. 1990;11:321-328.
- Fujino T, Okuno Y, Nakada D, Aoyoma A, Fukai K, Mukai T, Ueho T. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*. 1953;4(2-3):299-304.
- Fujino T, Sakaguchi G, Sakazaki R, Takeda Y (ed). International symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Company, Ltd. Tokyo. 1974.
- Fuqua W C, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 1994;176(2):269-275.
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*. 2007;53(2):187-196.
- Gauthier MJ. Chapter 6. En: Colwell RR, Grimes DJ (eds). *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM Press, Washington, D.C. 2000;87 pp.
- Gillman BI, Skonberg DI. Effects of additives on quality of mechanically extracted Jonah crab (*Cancer Borealis*) mince during refrigerated storage. *Journal of Food Quality*. 2002;25(4):265-275.
- Goarant C, Herlin J, Brizard R, Marteau AL, Martin C, Martin B. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2000;40(2):101-107.
- Goarant C, Ansquer D, Herlin J, Domalain D, Imbert F, de Decker S. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture*. 2006a;253(1-4):105-113.
- Goarant C, Reynaud Y, Ansquer D, de Decker S, Saulnier D, le Roux F. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology*. 2006b;29(7):570-580.
- Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Swings J. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 2003;53(1):239-243.
- Gómez-Gutiérrez AI, Jover E, Bodineau L, Albaiges J, Bayona JM. Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: estimate of Ebro River inputs. *Chemosphere*. 2006;65:224-236.

- Gómez-León J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B, Figueras A. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(1):98-104.
- Gonzalez-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F, Romero J, Espejo RT. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11: 129-31.
- Gooch JA, DePaola A, Bowers J, Marshall DL. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*. 2002;65(6):970-974.
- Grove SF, Lee A, Lewis T, Stewart CM, Chen HQ, Hoover DG. Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. *Journal of Food Protection*. 2006;69:957-968.
- Hackney CR, Kleeman EG, Ray B, Speck ML. Adherence as a method of differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1980;40:652-658.
- Hada HS, West PA, Lee JV, Stemmler J, Colwell RR. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984;34(1):1-4.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95-98.
- Hansen W, Freney J, Benyagoub H, Letouzey MN, Gigi J, Wauters G. Severe human infections caused by *Vibrio metschnikovii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(9):2529-2530.
- Hara-Kudo Y, Nishina T, Nakagawa H, Konuma H, Hasegawa J, Kumagai S. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(12):5819-5823.
- Harwood CS. *Beneckeia gazogenes* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium. *Current Microbiology*. 1978;1(4):233-238.
- Hasegawa J, Hara-Kudo Y, Nishina T, Konuma H, Kumagai S. [Survival of *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 strains under acidic conditions]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2002;43:90-94.
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000;406:477-483.
- Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR. Bacteria of the  $\gamma$ -subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68:5498-5507.
- Henke JM, Bassler BL. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 2004;186: 3794-3805.
- Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, Pommepuy M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92:1123-1135.



- Hervio-Heath D, Zidane M, Le Saux J-C, Lozach S, Vaillant V, Le Guyader S, Pommepeuy M. Toxi-infections alimentaires collectives liées à la consommation de moules contaminées par *Vibrio parahaemolyticus*: enquête environnementale. *Bulletin épidémiologique de l'AFSSA*. 2005;17:1-2
- Hesselman DM, Motes ML, Lewis JP. Effects of commercial heat-shock process on *Vibrio vulnificus* in the American oyster, *Crassostrea virginica*, harvested from the Gulf coast. *Journal of Food Protection*. 1999;62:1266-1269.
- Hickman-Brenner FW, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Schreiber M, Holmberg SD, Baldy LM, Lewis CS, Pickens NM, Farmer JJ3rd. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984;20(1):125-127.
- Hite BH. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bulletin West Virginia University Agricultural Experiment Station Morgantown*. 1899;58:15-35.
- Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*. 2010;78:1772-1780.
- Hlady WG, Klontz KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *The Journal of Infectious Diseases*. 1996;173(5):1176-1183.
- Ho SC, Chau PH, Fung PK, Sham A, Nelson EA, Sung J. Acute gastroenteritis in Hong Kong: a population-based telephone survey. *Epidemiology and Infection*. 2010;138(7):982-991.
- Holmes B, Farmer JJ3rd. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* and related organisms. Minutes of the Meetings, 25 July 2005, San Francisco, CA, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59:2633-2637.
- Honda S, Goto I, Minematsu I, Ikeda N, Asano N, Ishibashi M, Kinoshita Y, Nishibuchi N, Honda T, Miwatani T. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet*. 1987;329(8528):331-332.
- Honda T, Arita M, Ayala E, Miwatani T. Production of pili on *Vibrio parahaemolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1988;34(11):1279-1281.
- Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*. 1993;4:106-113
- Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*. 1989;43(3):99-107.
- Howard RJ, Bennett NT. Infections caused by halophilic marine *Vibrio* bacteria. *Annals of Surgery*. 1993;217(5):525-530.
- Hsieh JL, Fries JS, Noble RT. Dynamics and predictive modelling of *Vibrio* spp. in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Environmental Microbiology*. 2008;10:57-64.
- Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 1991;5(4):825-834.
- Huq MI, Alam AK, Brenner DJ, Morris GK. Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 1980;11:621-624.

- Iida T, Suthienkul O, Park KS, Tang GQ, Yamamoto RK, Ishibashi M, Yamamoto K, Honda T. Evidence for genetic linkage between the ure and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Medical Microbiology*. 1997;46(8):639-645.
- Iida T, Hattori A, Tagomori K, Nasu H, Naim R, Honda T. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7:477-478.
- International Committee on Systematics of Prokaryote (ICSP). *Taxonomic subcommittee for Aeromonadaceae, Vibrionaceae and related organisms*. 2010. Disponible en URL: <http://www.the-icsp.org/taxa/vibrio>
- Jackson KL, Ogburn DM. Review of depuration and its role in shellfish quality assurance. *NSW Fisheries Final Report Series No. 13*. FRDC Project No. 96/355. 1999;77 pp
- Jakabi M, Gelli DS, Torre JC, Rodas MA, Franco BD, Destro MT, Landgrafi M. Inactivation by ionizing radiation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis*, and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea brasiliana*). *Journal of Food Protection*. 2003;66(6):1025-1029.
- Jiang X, Chai TJ. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:1300-1305.
- Johnson FH, Shunk IV. An Interesting New Species of Luminous Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1936;31(6):585-593.
- Johnson WG Jr, Salinger AC, King WC. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. *Applied Microbiology*. 1973;26:122-123.
- Johnson CN, Flowers AR, Noriega NF3rd, Zimmerman AM, Bowers JC, DePaola A, Grimes DJ. Relationships between environmental factors and pathogenic Vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(21):7076-7084.
- Johnston MD, Brown MH. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92:1066-1077.
- Jones SH, Howell TL, O'Neill KR. 1991. Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio* sp. from eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) in a commercial controlled purification facility in Maine. *Journal of Shellfish Research*. 1991;10(1):105-111.
- Jones JL, Noe KE, Byars R, Depaola A. Evaluation of DNA colony hybridization and real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in postharvest-processed oysters. *Journal of Food Protection*. 2009;72(10):2106-2109.
- Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2009;77:1723-1733.
- Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Critical Reviews of Microbiology*. 1982;10(1):77-124.
- Joux F, Lebaron P. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997 ;63(9):3643-3647.
- Julie D, Solen L, Antoine V, Jaufrey C, Annick D, Dominique HH. Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. *Environmental Microbiology*. 2010;12(4):929-937.

- Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). *Datos de producción*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Actualización 2011. Disponible en URL: [http://www.magrama.es/app/jacumar/datos\\_produccion/lista\\_datos\\_produccion2.aspx?ld=es](http://www.magrama.es/app/jacumar/datos_produccion/lista_datos_produccion2.aspx?ld=es)
- Kam KM, Luey CK, Parsons MB, Cooper KL, Nair GB, Alam M, Islam MA, Cheung DT, Chu YW, Ramamurthy T, Pazhani GP, Bhattacharya SK, Watanabe H, Terajima J, Arakawa E, Ratchtrachenchai OA, Huttayananont S, Ribot EM, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(8):2766-2773.
- Kaneko T, Colwell RR. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*. 1973;113:24-32.
- Kaneko T, Colwell RR. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Applied Microbiology*. 1975a;29(2):269-274.
- Kaneko T, Colwell RR. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Applied Microbiology*. 1975b;30(2):251-257.
- Kaneko T, Colwell RR. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbial Ecology*. 1978;4:135-155.
- Kaper JB, Remmers EF, Lockman H, Colwell RR. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay during the summer season. *Estuaries*. 1981;4(4):321-327.
- Karunasagar I, Karunasagar I, Venugopal MN, Nagesha CN. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Systematic Applied Microbiology*. 1987;9:316-319.
- Katoh H. Studies on the Growth Rate of Various Food Bacteria. 1. The Generation Time of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nihon Saikingaku Zasshi*. 1965;20:94-99.
- Kaufman GE, Bej AK, Bowers J, DePaola A. Oyster-to-oyster variability in levels of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 2003;66(1):125-129.
- Kaysner CA, Abeyta CJr, Stott RF, Lilja JL, Wekell MM. Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56:904-907.
- Kaysner CA, DePaola A Jr. Chapter 9. *Vibrio*, En: *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC. 2004. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>
- Kelly MT, Stroh EMD. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;26(9):1754-1756.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(4):1173-1177.
- Kishishita M, Matsuoka N, Kumagai K, Yamasaki S, Takeda Y, Nishibuchi M. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(8):2449-2457.
- Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanba K, Simidu U. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993;43(1):8-19.

- Kobayashi T, Enomoto S, Sakazaki R, Kuwahara S. [A new selective isolation medium for the *Vibrio* Group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS Agar Medium)]. *Nihon Saikingaku Zasshi*. 1963;18:387-392.
- Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1979;25(3):415-420.
- Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 1956;178:703.
- Le Roux F, Goubet A, Thompson FL, Faury N, Gay M, Swings J, Saulnier D. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55(6):2251-2255.
- Lee JV, Donovan TJ, Furniss AL. Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschnikovii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1978;28:99-111.
- Lee, R, Lovatelli, A, Ababouch, L. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 511. Roma, FAO. 2010. 153pp.
- Lemoine T, Germanetto P, Giraud P. Toxi-infection alimentaire collective à *Vibrio parahaemolyticus*. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 1999;10:37-38
- Leung K, Lui K. Sand elimination by the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* (L): influences of temperature, salinity and season. *The Journal of Shellfish Research*. 2004;23:443-447.
- Linder K, Oliver JD. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989;55:2837-2842.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). 2011-2012. Disponible en URL: <http://www.bacterio.cict.fr/uw/vibrio.html>
- Lleo MM, Leoni F, Masini L, Canonico C, Potenziani S, DiCesare A, Caburlotto G, Ghidini V, Gennari M, Tafi MC, Mioni R, Costa A, Virgilio S, Serracca L, Bove D, Rubini S, Gasperetti L, Ottaviani D. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* in Italy: molecular and serological characterization of toxigenic strains isolated from marine samples and seafood. Abstract International Conference Vibrios in the Environment 2010, Biloxi, Mississippi. 7-12 November 2010.
- Lopez-Joven C, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Furones MD, Roque A. Persistence of sucrose fermenting and nonfermenting vibrios in tissues of Manila clam species, *Ruditapes philippinarum*, depurated in seawater at two different temperaturas. *Food Microbiology*. 2011a;28(5):951-956.
- Lopez-Joven C, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Furones MD, Roque A. Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2011b;111(1):197-208.
- Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE, Farmer JJ3rd, Hickman FW, Fanning GR. *Vibrio damsela*, a Marine Bacterium, Causes Skin Ulcers on the Damsel Fish *Chromis punctipinnis*. *Science*. 1981;214:1139-1140.
- Lozano-León A, Torres J, Osorio CR, Martínez-Urtaza J. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;226:281-284.

- Ma L, Su YC. Validation of high pressure processing for inactivating *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Food Microbiology*. 2011;144:469-474.
- Macián MC, Arias CR, Aznar R, Garay E, Pujalte MJ. Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *International Microbiology*. 2000;3(1):51-53.
- Mahmoud BS, Burrage DD. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in pure culture, whole live and half shell oysters (*Crassostrea virginica*) by X-ray. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;48:572-578.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:3140-3145.
- 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. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*. 2003;361:743-749.
- Mallett JC, Beghian LE, Metcalf TG, Kaylor JD. Potential of irradiation technology for improved shellfish sanitation. *Journal of Food Safety*. 1991;11(4):231-245.
- Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiology Reviews*. 1991;55(3):335-348.
- Mañas P, Pagán R. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(6):1387-1399.
- Marco-Noales E, Milán M, Fouz B, Sanjuán E, Amaro C. Transmission to eels, portals of entry, and putative reservoirs of *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2). *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67(10):4717-4725.
- Marden P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg K, Odham G, Kjelleberg S. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Archives of Microbiology*. 1985;142:326-332.
- Martin GG, Rubin N, Swanson E. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2004;60(1):21-29.
- Martínez O, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-López ML. Foodborne and indicator bacteria in farmed molluscan shellfish before and after depuration. *Journal of Food Protection*. 2009;72:1443-1449.
- Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M, Liebana E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(10):4672-4678.
- Martinez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, DePaola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Carrera-Flores D, Rey-Alvarez C, Pousa A. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(8):1319-1320.

- Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Varela-Pet J, Trinanes J, Pazos Y, Garcia-Martin O. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(1):265-274.
- Martinez-Urtaza J, Bowers JC, Trinanes J, DePaola A. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*. 2010;43:1780-1790.
- Mata L, Vives M, Vicente G. Extinction of *Vibrio cholerae* in acidic substrata: contaminated fish marinated with lime juice (ceviche). *Revista de biología Tropical*. 1994;42(3):479-485.
- Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Ramamurthy T, Wong HC, Depaola A, Kim YB, Albert MJ, Nishibuchi M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(2):578-785.
- McCarthy SA, DePaola A, Cook DW, Kaysner CA, Hill WE. Evaluation of alkaline phosphatase- and digoxigenin-labelled probes for detection of the thermolabile hemolysin (*tlh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*. 1999;28:66-70.
- McCarthy SA, DePaola A, Kaysner CA, Hill WE, Cook DW. Evaluation of non-isotopic DNA hybridization methods for detection of the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 2000;63:1660-1664.
- McCormack WM, DeWitt WE, Bailey PE, Morris GK, Soeharjono P, Gangarosa EJ. Evaluation of thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, a selective medium for the isolation of *Vibrio cholerae* and other pathogenic vibrios. *The Journal of Infectious Diseases*. 1974;129(5):497-500.
- McLaughlin JC. Chapter 35. *Vibrio*. En: JoBaron E, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Murray PR (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, D.C, 1995:465-476.
- McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, Martinek KA, Napolilli NP, Allison CG, Murray SL, Thompson EC, Bird MM, Middaugh JP. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(14):1463-1470.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 1999;5:607-625.
- Meador CE, Parsons MM, Bopp CA, Gerner-Smidt P, Painter JA, Vora GJ. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical microbiology*. 2007;45:1133-1139.
- Mellado E, Moore ERB, Nieto JJ, Ventosa A. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: Description of *Salinivibrio costicola* gen nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1996;46:817-821.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). *Libro Blanco de la Acuicultura en España. Tomo II*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General de Pesca Marítima. 2001;236 pp.

- Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K, Yamai S. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology*. 1969;100:1147-1149.
- Molero X, Bartolome RM, Vinuesa T, Guarner L, Accarino A, Casellas F, Garcia R. [Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases]. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 1989;92(1):1-4.
- Morris JG Jr, Black RE. Cholera and other vibrioses in the United States. *New England Journal of Medicine*. 1985;312(6):343-350.
- Morris JG Jr. Cholera and other types of Vibriosis: A story of human pandemics and oysters on the half shelf. *Clinical Infectious Disease*. 2003;37:272-280.
- Motilla R, Palomar J, Santmarti M, Fuste C, Viñas M. Isolation and characterization of halophilic *Vibrio* from bivalves bred in nurseries at the Ebre Delta. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1994;63(2):178-181.
- Montilla R, Palomar J, Fusté MC, Viñas M. Taxonomy and protein fingerprinting of halophilic *Vibrio* isolates from bivalves of the Ebre delta. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995;41(1):64-69.
- Murchie LW, Cruz-Romero M, Kerry JP, Linton M, Patterson MF, Smiddy M, Kelly AL. High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2005;6:257-270.
- Murphree RL, Tamplin ML. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:3656-3660.
- Myers ML, Panicker G, Bej AK. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(4):2194-2200.
- Nagayama K, Oguchi T, Arita M, Honda T. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 1995;63:1987-1992.
- Nair GB, Hormazábal JC. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. *Revista Chilena de Infectología*. 2005;22(2):125-130.
- Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;20(1):39-48.
- Nakasone N, Iwanaga M. Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor. *Infection and Immunity*. 1990;58(1):61-69.
- Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park K-S, Yokoyama K, Makino K, Shinagawa H, Honda T. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38:2156-2161.
- Nealson, KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*. 1970;104(1):313-322.
- Nicholls KM, Lee JV, Donovan TJ. An evaluation of commercial thiosulphate citrate bile salt sucrose agar (TCBS). *Journal of Applied Microbiology*. 1976;41(2):265-269.
- Nilsson L, Oliver JD, Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Journal of Bacteriology*. 1991;173:5054-5059.

- Nishibuchi M, Ishibashi M, Takeda Y, Kaper JB. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infection and Immunity*. 1985;49(3):481-486.
- Nishibuchi M, Kaper JB. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*. 1990;4:87-99.
- Nishibuchi M, Fasano A, Russell RG, Kaper JB. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*. 1992;60(9):3539-3545.
- Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*. 1995;63:2093-2099.
- Nordstrom JL, DePaola A. Improved recovery of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from oysters using colony hybridization following enrichment. *Journal of Microbiology Methods*. 2003;52:273-277.
- Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL, DePaola A. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(18):5840-5847.
- Nwoguh CE, Harwood CR, Barer MR. Detection of induced beta-galactosidase activity in individual non-culturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. *Molecular Microbiology*. 1995;17:545-554.
- Nyholm SV, McFall-Ngai MJ. The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2:632-642.
- Nyström T, Kjelleberg S. Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marine *Vibrio* during the initial phases of starvation. *Journal of General Microbiology*. 1989;135(6):1599-1606.
- Okuda J, Ishibashi M, Abbott SL, Janda JM, Nishibuchi M. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997a;35(8):1965-1971.
- Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya SK, Nair GB, Nishibuchi M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997b;35(12):3150-3155.
- Okura M, Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41:4676-4682.
- Olafsen JA, Mikkelsen HV, Giaever HM, Hovik Hansen G. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59:1848-1854.
- Oliver JD. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;133:203-208.



- Oliver JD, Bockian R. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:2620-2623.
- Oliver JD, Hite F, McDougald D, Andon NL, Simpson LM. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:2624-2630.
- Oliver JD, Kaper JB. *Vibrio* species. En: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC. 1997; 228-264.
- Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*. 2005;43(Spec No):93-100.
- Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010;34(4):415-425.
- Osawa R, Okitsu T, Morozumi H, Yamai S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(2):725-727.
- O'Shea YA, Finnan S, Reen FJ, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology*. 2004;150:4053-4063.
- Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Santarelli S, Canonico C, Masini L, Ditrani V, Carraturo A. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(6):2144-2145.
- Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Canonico C, Potenziani S, Santarelli S, Masini L, Scuota S, Carraturo A. *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;66(4):452-455.
- Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2004;59:249-262.
- Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, Horng CB. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35:1260-1262.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Iida T, Honda T. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*. 2004a;48:313-318.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 2004b. 72(11):6659-6665.
- Parveen S, Hettiarachchi KA, Bowers JC, Jones JL, Tamplin ML, McKay R, Beatty W, Brohawn K, Dasilva LV, Depaola A. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;128:354-361.

- Pedersen K, Verdonck L, Austin B, Austin DA, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Tiainen T, Vigneulle M, Swings J. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1998; 48:749-758.
- Penland RL, Boniuk M, Wilhelmus KR. *Vibrio* ocular infections on the U.S. Gulf Coast. *Cornea*. 2000;19(1):26-29.
- Pérez Camacho A, Delgado M, Albentosa M. Influencia del tamaño y la concentración de alimento sobre las tasas de aclaramiento e ingestión de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Boletín-Instituto Español de Oceanografía*. 2002;18:315-320.
- Pollitzer R, Swaroop S, Burrows W. Cholera. *Monographs Series World Health Organization*. 1959;58:1001-1019.
- Potasman I, Paz A, Odeh M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;35:921-928.
- Prado S, Romalde JL, Montes J, Barja JL. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Disease of Aquatic Organisms*. 2005;67(3):209-215.
- Prat N, Ibáñez C. Effects of water transfers projected in the Spanish National Hydrological Plan on the ecology of the lower river Ebro (N.E.Spain) and its Delta. *Water Science and Technology*. 1995;31:79-86.
- Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*. 2005;7(6):761-772.
- Pujalte MJ, Ortigosa M, Urdaci MC, Garay E, Grimont PAD. *Vibrio mytili* sp. nov., from mussels. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993;43(2):358-362.
- Quilici M-L, Robert-Pillot A, Picart J, Fournier J-M. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(7):1148-1149
- Raghunath P, Acharya S, Bhanumathi A, Karunasagar I. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. *Food Microbiology*. 2008;25:824-830.
- Ramsar. Manual de la Convención de Ramsar: Guía a la Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971) (4a. ed). Gland (Suiza): Secretaría de la Convención de Ramsar. 2006;121 pp. Disponible en URL: [http://www.ramsar.org/cda/es/ramsar-documents-ramsram43/main/ramsar/1-31-112%5E15988\\_4000\\_2\\_\\_](http://www.ramsar.org/cda/es/ramsar-documents-ramsram43/main/ramsar/1-31-112%5E15988_4000_2__)
- Ravel J, Knight IT, Monahan CE, Hill RT, Colwell RR. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiology*. 1995;141(2):377-383.
- Reilly GD, Reilly CA, Smith EG, Baker-Austin C. *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Euro Surveillance*. 2011;16(42):pii=19994.
- Richards GP. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *Journal of Food Protection*. 1988;51:218-251.
- Rippey SR. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994;7:419-425.

- Riquelme C, Toranzo AE, Barja JL, Vergara N, Araya R. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with Larval Mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 1996;67(3):213-218.
- Robert-Pillot A, Guenole A, Lesne J, Delesmont R, Fournier JM, Quilici ML. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;91:319-325.
- Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, Malle P, Quilici ML. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;143:190-197.
- Roche Applied Science. *DIG application manual for filter hybridization*. Roche Applied Science, Indianapolis, IN. 25 November 2009, posting date. Disponible en URL: [http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/DIG\\_MAN/dig\\_toc.htm](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/DIG_MAN/dig_toc.htm).
- Rodrigues A, Sandstrom A, Ca T, Steinsland H, Jensen H, Aaby P. Protection from cholera by adding lime juice to food - results from community and laboratory studies in Guinea-Bissau, West Africa. *Tropical Medicine and International Health*. 2000;5(6):418-422.
- Rodriguez-Castro A, Ansedo-Bermejo J, Blanco-Abad V, Varela-Pet J, Garcia-Martin O, Martinez-Urtaza J. Prevalence and genetic diversity of pathogenic populations of *Vibrio parahaemolyticus* in coastal waters of Galicia, Spain. *Environmental Microbiology Reports*. 2010;2(1):58-66.
- Roig FJ, Sanjuan E, Llorens A, Amaro C. *pilF* Polymorphism-based PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains potentially dangerous to public health. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(5):1328-1333.
- Roque A, Lopez-Joven C, Lacuesta B, Elandaloussi L, Wagley S, Furones MD, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Rangdale R, Gomez-Gil B. Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean Coast. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(23):7574-7577.
- Rosec JP, Simon M, Causse V, Boudjemaa M. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using *pR72H* or *toxR* targets with a culture method. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129:136-145.
- Rowse AJ, Fleet GH. Effects of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella charity* and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*). *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;48:1061-1063.
- Ruby EG, Urbanowski M, Campbell J, Dunn A, Faini M, Gunsalus R, Lostroh P, Lupp C, McCann J, Millikan D, Schaefer A, Stabb E, Stevens A, Visick K, Whistler C, Greenberg EP. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(8):3004-3009.
- Ruple AD, Cook DW. *Vibrio vulnificus* and indicator bacteria in shellstock and commercially processed oysters from the Gulf coast. *Journal of Food Protection*. 1992;55:667-671.
- Sakar BL, Nair GB, Sircar BK, Pal SC. Incidence and level of *Vibrio parahaemolyticus* associated with freshwater plankton. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983; 46:288-290.

- Sakazaki R, Iwanami S, Fukumi H. Studies on the Enteropathogenic, Facultatively Halophilic Bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, Cultural and Biochemical Properties and Its Taxonomical Position. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 1963;16:161-188.
- Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y, Yamai S. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 1968;21(5):325-331.
- Sanyal SC, Sen PC. Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. En: Fujino T, Sakaguchi G, Sakazaki R, Takeda Y (eds). *International Symposium on Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Company, Tokyo. 1974;227-230.
- Sawabe T, Hayashi K, Moriwaki J, Thompson FL, Swings J, Potin P, Christen R, Ezura Y. *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 2004;54(3):843-846.
- Sawabe T, Fujimura Y, Niwa K, Aono H. *Vibrio comitans* sp. nov., *Vibrio rarus* sp. nov. and *Vibrio inusitatus* sp. nov., from the gut of the abalones *Haliotis discus discus*, *H. gigantean*, *H. madaka* and *H. rufescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(5):916-922.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 2011a;17(1):7-15.
- Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*. 2011b;17(1):16-22.
- Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 1984;37:67-75.
- Schwarz JR. Rapid chilling of oyster shellstock: a post harvest process to reduce *Vibrio*. En: *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Seafood Science & Technology Society of the Americas*, Longboat, Fla, 9-11 Octubre 2000.
- Shen X, Cai Y, Liu C, Liu W, Hui Y, Su YC. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). *International Journal of Food Microbiology*. 2009;136:129-132.
- Shieh WY, Chen AL, Chiu HH. *Vibrio aerogenes* sp. nov., a facultatively anaerobic marine bacterium that ferments glucose with gas production. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000;50(1):321-329.
- Shimohata T, Takahashi A. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Medical Investigation*. 2010;57(3-4):179-182.
- Shinoda S, Okamoto K. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *Journal of Bacteriology*. 1977;129:1266-1271.
- Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections. *Biocontrol Science*. 2011;16(4):129-137.
- Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y, Nishibuchi M. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*. 1990;58(11):3568-3573.

- Sizemore RK, Davis JW. Source of *Vibrio* spp. found in the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1985;46(1):109-110.
- Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays*. 2000;22:1115-1122.
- Sobrinho Pde S, Destro MT, Franco BD, Landgraf M. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of Sao Paulo State, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76:1290-1293.
- Son NT, Fleet GH. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying, and storage. *Applied and Environmental Microbiology*. 1980;40:994-1002.
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano R, Rio-Rodriguez RD, Dieguez AL, Romalde JL. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.006>.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:1043-1047.
- Staley C, Harwood VJ. The use of genetic typing methods to discriminate among strains of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*. *Journal of AOAC International*. 2010;93(5):1553-1569.
- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*. 1984;37(3):1015-1026.
- Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*. 2000;2:177-188.
- Styles MF, Hoover DG, Farkas DF. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*. 1991;56, 1404-1407.
- Su HP, Chiu SI, Tsai JL, Lee CL, Pan TM. Bacterial food-borne illness outbreaks in northern Taiwan, 1995-2001. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2005a;11(1):146-151.
- Su YC, Duan J, Wu WH. Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 2005b;68:1454-1456.
- Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*. 2007;24:549-558.
- Suffredini E, Lopez-Joven C, Maddalena L, Croci L, Roque A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(17):6301-6304.
- Sun Y, Oliver JD. Antimicrobial action of some GRAS compounds against *Vibrio vulnificus*. *Food Additives and Contaminants*. 1994;11(5):549-558.
- Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T, Nettip N, Supavej S, Eampokalap B, Makino M, Honda T. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(5):1405-1408.

- Tada J, Ohashi T, Nishimura N, Shirasaki Y, Ozaki H, Fukushima S, Takano J, Nishibuchi M, Takeda Y. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. 1992;6(6):477-487.
- Takahashi H, Iwade Y, Konuma H, Hara-Kudo Y. Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and seawater. *Journal of Food Protection*. 2005;68:1083-1088.
- Takeda Y. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacology and Therapeutics*. 1982;19(1):123-146.
- Takikawa I. Studies on pathogenic halophilic bacteria. *Yokohama Medical Bulletin*. 1958;9:313-322.
- Tamplin M, Rodrick GE, Blake NJ, Cuba T. Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982;44:1466-1470.
- Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M, Mizuguchi Y. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *Journal of Bacteriology*. 1985;162:510-515.
- Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, Higashi K, Mizuguchi Y. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*. 1986;1:425-432.
- Tanil GB, Radu S, Nishibuchi M, Rahim RA, Napis S, Maurice L, Gunsalam JW. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2005;36(4):940-945.
- Tantillo GM, Fontanarosa M, Di Pinto A, Musti M. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology*. 2004;39:117-126.
- Tauxe RV. 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 2002;78(1-2):31-41.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(9):2233-2239.
- Thompson CA Jr, Vanderzant C. Relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters, water and sediment, and bacteriological and environmental indices. *Journal of Food Science*. 1976a;41:118-122.
- Thompson CA Jr, Vanderzant C. Effect of processing, distribution and storage on *Vibrio parahaemolyticus* and bacterial counts of oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science*. 1976b;41:123-127.
- Thompson CA Jr, Vanderzant C. Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. *Journal of Food Protection*. 1976c;41(1):204-205.
- Thompson FL, Hoste B, Thompson CC, Goris J, Gomez-Gil B, Huys L, De Vos P, Swings J. *Enterovibrio norvegicus* gen. nov., sp nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae: A new member of the family *Vibrionaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:2015-2022.

- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53:1615-1617.
- Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR)*. 2004;68(3):403-431.
- Thompson JR, Polz MF. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*. ASM Press, Washington DC. 2006;13:190-203.
- Tomotake H, Koga T, Yamato M, Kassa A, Ota F. Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. 2006;52:157-160.
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. *Aquaculture*. 2005;246:37-61.
- Torres JA, Velazquez G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*. 2005;67:95-112.
- Turino-Luque JD, Garrido Rasco R, Gonzalez Galan V, de Alarcon A. [Sepsis and cellulitis by *Vibrio vulnificus* in cirrhotic patient]. *Anales de la Medicina Interna*. 2007;24:456-457.
- Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35(2):339-346.
- Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV. Reclassification of *Vibrio fisheri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fisheri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov., and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57:2823-2829.
- Vasconcelos GJ, Lee JS. Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied Microbiology*. 1972;23:11-16.
- Vattakaven T, Bond P, Bradley G, Munn CB. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(10):6508-6513.
- Velazquez G, Vázquez P, Vázquez M, Torres JA. Avances en el procesado de alimentos por alta presión. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2005;4(5):353-367.
- Véron M. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *Comptes Rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*. 1965;261(23):5243-5246.
- Vidal-Dupiol J, Ladrière O, Destoumieux-Garzon D, Sautière PE, Meistertzheim AL, Tambutte E, Tambutte S, Duval D, Foure L, Adjeroud M, Mitta G. Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(25):22688-22698.
- Vuddhakul V, Chowdhury A, Laohaprertthisan V, Pungrasamee P, Patararungrong N, Thianmontri P, Ishibashi M, Matsumoto C, Nishibuchi M. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(6):2685-2689.

- Wagley S, Koofhethile K, Wing JB, Rangdale R. Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK. *International Journal of Environmental Health Research*. 2008;18(4):283-293.
- Wagley S, Koofhethile K, Rangdale R. Prevalence and potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) harvested from the River Thames estuary, England. *Journal of Food Protection*. 2009;72(1):60-66
- Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996;272:1910-1914.
- Wang YW, Chern LL, Cam PD, Chiou CS. Evaluation of restriction enzymes for standardizing pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008;61:251-255.
- Watkins WD, Cabelli VJ. Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985;49(5):1307-1313.
- Wells CL, Wilkins TD. Botulism and *Clostridium botulinum*. En: Baron S et al. (eds.). *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. 1996.
- West PA. The human pathogenic vibrios--a public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection*. 1989;103(1):1-34.
- Whitesides MD, Oliver JD. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63:1002-1005.
- Wilkins S, Millar M, Hemsworth S, Johnson G, Warwick S, Pizer B. *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. *Pediatric Blood & Cancer*. 2008;50(4):891-892.
- Wolf P, Oliver JD. Temperature effects on the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992;101(1):33-39.
- Wong HC, Liu SH, Ku LW, Lee IY, Wang TK, Lee YS, Lee CL, Kuo LP, Shih DY. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection*. 2000;63:900-906.
- Wong HC, Lin CH. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39:4233-4240.
- Wong HC, Wang P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96:359-366.
- Wong HC, Liu SH, Chiou CS, Nishibuchi M, Lee BK, Suthienkul O, Nair GB, Kaysner CA, Taniguchi H. A pulsed-field gel electrophoresis typing scheme for *Vibrio parahaemolyticus* isolates from fifteen countries. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;114:280-287.
- World Health Organization. Cholera vaccines. *WHO Weekly Epidemiological Record*. 2001;76:117-124.
- Xu H-S, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*. 1982;8:313-323.
- Yeung PS, Hayes MC, DePaola A, Kaysner CA, Kornstein L, Boor KJ. Comparative phenotypic, molecular, and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68:2901-2909.



- Yoh M, Honda T, Miwatani T, Nishibuchi M. Characterization of thermostable direct hemolysins encoded by four representative *tdh* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*. 1991;10(2):165-172.
- Yokomaku D, Yamaguchi N, Nasu M. Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(12):5544-5548.
- Yoshizawa S, Wada M, Kita-Tsukamoto K, Ikemoto E, Yokota A, Kogure K. *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(7):1645-1649.
- Yoshizawa S, Wada M, Yokota A, Kogure K. *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2010;56:499-507.
- Yu PA, Puhr ND, Bopp CA, Gerner-Smidt P, Painter JA. *Vibrio parahaemolyticus* hemolysins associated with decreased hospitalization from shellfish-borne illness. Abstract Fifth International Conference Emerging Infectious Diseases. Abstract 475, p. 189, Atlanta, GA, 19 to 22 March 2006.
- Zimmerman AM, DePaola A, Bowers JC, Krantz JA, Nordstrom JL, Johnson CN, Grimes DJ. Variability of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in northern Gulf of Mexico water and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(23):7589-7596.
- Zimmermann R, Iturriaga R, Becker-Birck J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978;36(6):926-935.

# 11 Apéndices

## 11.1. Características de las revistas

---

En el presente apéndice se indican el factor de impacto (JIF) y las áreas temáticas correspondientes a las revistas donde se han publicado los trabajos incluidos en la presente Tesis Doctoral.

Todos los valores se han obtenido del Journal Citation Reports® disponible en ISI Web of Knowledge.

En cada una de las áreas temáticas señaladas se indica entre paréntesis la posición de la revista indicada sobre el total de revistas incluidas en el área de estudio.

<b>Revista</b>	Applied and Environmental Microbiology	
<b>JIF</b>	3.686	<b>Año</b> 2009
<b>Áreas temáticas</b>	Biotechnology & Applied Microbiology (29/152 - Q1) Microbiology (25/95 - Q2)	
<b>Revista</b>	ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology	
<b>JIF</b>	6.153	<b>Año</b> 2010*
<b>Áreas temáticas</b>	Ecology (7/129 - Q1)	
<b>Revista</b>	Applied and Environmental Microbiology	
<b>JIF</b>	3.778	<b>Año</b> 2010*
<b>Áreas temáticas</b>	Biotechnology & Applied Microbiology (32/160 - Q1) Microbiology (24/107 - Q1)	
<b>Revista</b>	Food Microbiology	
<b>JIF</b>	3.320	<b>Año</b> 2010*
<b>Áreas temáticas</b>	Biotechnology & Applied Microbiology (40/160 - Q2) Food Science & Technology (6/128 - Q1) Microbiology (30/107 - Q2)	

**Revista** Journal of Applied Microbiology

---

**JIF** 2.365

**Año** 2010\*

**Áreas temáticas** Biotechnology & Applied Microbiology (64/160 - Q2)  
Microbiology (55/107 - Q3)

---

**Revista** Aquaculture Research

---

**JIF** 1.186

**Año** 2010\*

**Áreas temáticas** Fisheries (21/46 - Q2)

---

**Revista** Journal of Food Protection

---

**JIF** 1.720

**Año** 2010\*

**Áreas temáticas** Food Science & Technology (37/128 - Q2)  
Biotechnology & Applied Microbiology (89/160 - Q3)

---

## **11.2. Contribución de la doctoranda y renuncia de coautores no Doctores**

La doctoranda es la primera o segunda autora de todos los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral, lo que justifica plenamente su contribución.

Además, debemos indicar que todos los coautores que no son doctores han renunciado expresamente a presentar el trabajo del que son coautores como parte de otra Tesis Doctoral, tal y como consta en los documentos que se incluyen a continuación.

A quién corresponda,

Todos los autores del trabajo titulado "**Detection and Identification of *tdh* and *trh*-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Four Species of Cultured Bivalve Molluscs on the Spanish Mediterranean Coast**" y que forma parte de esta tesis doctoral son doctores, con la excepción de Carmen Lopez-Joven, la cuál es la propietaria de esta tesis y Beatriz Lacuesta, con D.N.I. 47623723 S que renuncia expresamente a presentar el artículo citado, del que es coautora, como parte de otra tesis doctoral, si se diera el caso, para lo que firma el presente documento.

Sant Carles de la Ràpita, 16 Febrero 2011



Beatriz Lacuesta

To whom it may Concern,

All co-authors of work entitled "**PGFE AND PCR CHARACTERISATION OF ENVIRONMENTAL VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS STRAINS OF DIFFERENT ORIGINS**" and which is part of this thesis have a PhD, with the exception of Carmen Lopez-Joven, who is the owner of this Thesis, and Liliana Maddalena, who expressly renounces to present this article of which she is co-author as part of another doctoral thesis, in case Liliana Maddalena ever does one.

For this reason, she signs this letter.

Roma, June 2011

Liliana Maddalena

A quién corresponda,

Todos los autores del trabajo titulado "*Evolution of nonpathogenic Vibrio parahaemolyticus in a cohabitating population of Ruditapes decussatus and Ruditapes philippinarum under experimental conditions*", que forma parte de esta Tesis Doctoral, son doctores, con la excepción de Carmen Lopez-Joven (propietaria de esta Tesis) y Josu Pérez-Larruscain, quién renuncia expresamente a presentar el artículo citado del que es coautor, como parte de otra Tesis Doctoral, en el caso de que se diera el caso. Por este motivo firma el presente documento.

San Carles de la Ràpita, 20 Febrero 2012



Fdo: Josu Pérez-Larruscain

### **11.3. Trabajos actualmente en elaboración dentro del marco de la presente Tesis Doctoral**

---

#### **11.3.1. Recovery and Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in experimental inoculated samples and environmental samples, Using Tangential Flow Filtration Procedure (TFF) following with MPN and Real-Time PCR methods**

Lopez-Joven C. worked and studied at the U.S. Food and Drug Administration, Gulf Coast Seafood Laboratory in Dauphin Island, Alabama. She worked with Dr. Roberto Marrero-Ortiz, Dr. Jessica L. Jones and Dr. Angelo DePaola on a feasibility study for direct quantification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater using tangential flow filtration (TFF) and real-time PCR. The methods currently used for quantification of vibrios from seawater are more laborious and less precise than the TFF-real time PCR approach.

Main objectives were (i) evaluate the effectiveness of TFF in recovering *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* from seawater disinfected by UV-light then spiked with laboratory strains, (ii) evaluate the effectiveness of TFF in recovering *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* from natural seawater samples collected near Dauphin Island, AL, (iii) comparative analyses between the most probable number (MPN)-real-time PCR, TFF-MPN-real-time PCR and between TFF-direct real-time PCR enumeration methods.

#### **Recuperación y detección de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en muestras inoculadas experimentalmente y muestras ambientales, utilizando el procedimiento de filtración de flujo tangencial (TFF) y recuento según el número más probable (MPN) y la PCR a tiempo real**

Los objetivos de este estudio fueron evaluar (i) la eficacia de la TFF para la recuperación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* inoculados experimentalmente en agua de mar previamente desinfectada con luz UV, (ii) la eficacia de la técnica de TFF en la recuperación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* directamente en agua de mar (área de Dauphin Island, Alabama), (iii) comparar la eficacia de diferentes técnicas de detección: TFF-MPN-real-time PCR y entre TFF-real-time PCR directamente.

Mejorar la capacidad de concentración patógenos a partir de muestras de gran volumen de agua de mar utilizando la técnica de TFF ofrecerá sensibilidad, reproducibilidad y rentabilidad, lo que hará que esta técnica se pueda utilizar para mejorar la seguridad alimentaria.



**11.3.2. Comparación de la eficacia de diferentes protocolos de depuración con agua de mar para eliminar la población natural de vibrios fermentativos y no fermentativos de sacarosa en tejidos de dos especies de almejas: *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus***

En el presente estudio se analizó la eficacia de tres tratamientos diferentes, y se comparó el tiempo requerido por ambas especies de almejas para eliminar la población natural de vibrios fermentativos y no fermentativos de sacarosa en sus tejidos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar el ritmo endógeno en el proceso de filtración de cada una de estas especies de almejas cuándo fueron expuestas a los diferentes tratamientos. Esta información no sólo contribuye a aumentar el conocimiento de la fisiología de estas especies de almejas, sino también es importante a nivel de la seguridad alimentaria.